

---

**Studien zur pflanzenspezifischen  
WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie**  
**Vergleichende Analyse zwischen dem Moos, *Physcomitrella patens*, und  
höheren Pflanzen sowie eine gesamtgenomischen Betrachtung von  
WRKY-DNA-Bindungsstellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Dierk Wanke**

aus München

**Köln 2003**

---

---

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Hahlbrock  
Prof. Dr. Klaus Harter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2003

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>- 4 -</b>
Ziele dieser Arbeit .....	- 13 -
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2.1. Chemikalien und Lösungsmittel.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2.2. Arbeiten mit Radioisotopen .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2.3. Antibiotika.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2.4. Allgemeine Medien, Lösungen und Puffer.....</b>	<b>- 15 -</b>
2.4.1. Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit Bakterien und Hefen.....	- 16 -
2.4.2. Medien und Lösungen zur Anzucht von Pflanzen.....	- 18 -
2.4.2.1. Medien und Lösungen zur Anzucht höherer Pflanzen.....	- 18 -
2.4.2.2. Medien zur Anzucht von <i>P. patens</i> .....	- 19 -
2.4.2.3. Medien zur Protoplasten-Gewinnung und Transformation von <i>P. patens</i> .....	- 20 -
2.4.3 Puffer zur Gelelektrophorese.....	- 21 -
2.4.3.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA .....	- 21 -
2.4.3.2. Formaldehyd-Agarosegele zur Auftrennung von RNA.....	- 22 -
2.4.4. Puffer zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	- 22 -
2.4.5. Puffer der Southern-Hybridisierung .....	- 23 -
2.4.6. Puffer zur Koloniehybridisierung .....	- 24 -
2.4.7. Puffer des alkalischen Minilysat.....	- 25 -
2.4.8. Puffer zur DNA-Präparation.....	- 25 -
<b>2.5. Enzyme .....</b>	<b>- 26 -</b>
2.5.1. Restriktionsendonucleasen .....	- 26 -

---

2.5.2. DNA-Polymerasen.....	- 26 -
2.5.2.1. Klenow-Fragment aus <i>E. coli</i> .....	- 26 -
2.5.2.2. Hitzestabile DNA-Polymerasen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	- 26 -
2.5.2.3. RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptase) .....	- 27 -
2.5.2.4. Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase.....	- 27 -
2.5.3. T4-DNA-Ligase.....	- 27 -
2.5.4. Alkalische Phosphatase .....	- 28 -
2.5.5. Clonasen <sup>®</sup> für die GATEWAY <sup>®</sup> -Technologie .....	- 28 -
<b>2.6. Biologisches Material .....</b>	<b>- 28 -</b>
2.6.1. Bakterienstämme .....	- 28 -
2.6.2 Hefestamm.....	- 30 -
2.6.3 Pflanzenmaterial .....	- 30 -
<b>2.7. Oligonucleotide (Primer) für die PCR.....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>2.8. Vektoren .....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>2.9. Gen-Bibliotheken .....</b>	<b>- 34 -</b>
2.9.1. Lambda-Bibliothek mit genomischer DNA aus <i>P. patens</i> .....	- 34 -
2.9.2. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus <i>P. patens</i> .....	- 34 -
2.9.2.1. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus <i>P. patens</i> (unbehandelt).....	- 34 -
2.9.2.2. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus Auxin behandelten <i>P. patens</i> .....	- 35 -
2.9.3. Cosmid-Bibliothek mit genomischer DNA aus <i>P. patens</i> .....	- 35 -
<b>2.10. Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....</b>	<b>- 36 -</b>
2.10.1. Anzucht von Bakterien .....	- 36 -
2.10.2. Lagerung von Bakterien .....	- 36 -
2.10.3. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mittels RbCl <sub>2</sub> -Methode.....	- 36 -
2.10.4. Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	- 37 -
2.10.5. Präparation von Plasmid-DNA .....	- 38 -
2.10.5.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	- 38 -
2.10.5.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab .....	- 38 -
2.10.6. 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	- 38 -
2.10.7. Klonieren mit der GATEWAY <sup>®</sup> -Technologie .....	- 38 -
2.10.8. Koloniehybridisierung .....	- 39 -
2.10.9. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> und Proteinextraktion.....	- 39 -
2.10.10. Nachweis von rekombinantem Protein im Protein-Blot-Experiment (Western-Analyse) .....	- 39 -

---



2.10.11. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) mit rekombinantem Protein.....	- 39 -
<b>2.11. Arbeiten mit Hefe.....</b>	<b>- 40 -</b>
2.11.1. Anzucht von Hefe.....	- 40 -
2.11.2. Lagerung von Hefe.....	- 40 -
2.11.3. Transformation chemisch kompetenter Hefe mit Plasmid-DNA.....	- 40 -
2.11.4. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe.....	- 41 -
<b>2.12. Arbeiten mit Nucleinsäuren.....</b>	<b>- 41 -</b>
2.12.1. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	- 41 -
2.12.2. Nucleinsäure-Präzipitation mit Ethanol.....	- 42 -
2.12.3. Nucleinsäure-Präzipitation mit Isopropanol.....	- 42 -
2.12.4. Extraktion von Nucleinsäurelösungen mit PCI oder CI.....	- 42 -
2.12.5. Restriktionsspaltung von DNA.....	- 42 -
2.12.6. Präparation genomischer, pflanzlicher DNA.....	- 43 -
2.12.6.1. Präparation genomischer, pflanzlicher DNA für PCR.....	- 43 -
2.12.6.2. Präparation genomischer DNA aus <i>P. patens</i> .....	- 43 -
2.12.6.3. Präparation genomischer pflanzlicher DNA zur schnellen Genotypisierung.....	- 43 -
2.12.7. Agarose-Gelelektrophorese.....	- 44 -
2.12.8. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	- 44 -
2.12.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	- 44 -
2.12.10. Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 45 -
2.12.10.1. Thermocyclerprogramme.....	- 45 -
2.12.10.2. Amplifikation von DNA mittels Temperaturgradienten-PCR.....	- 45 -
2.12.10.3. RAGE (Rapid-Amplification of Genomic Ends).....	- 46 -
2.12.10.4. inverse Polymerase-Kettenreaktion (iPCR).....	- 46 -
2.12.10.5. Reaktionsansätze.....	- 47 -
2.12.10.6. FailSafe-PCR.....	- 47 -
2.12.11. DNA-Sequenzierung.....	- 47 -
2.12.12. Präparation von RNA aus pflanzlichen Geweben.....	- 47 -
2.12.13. cDNA-Synthese und RT-PCR.....	- 48 -
2.12.13.1. cDNA-Synthese.....	- 48 -
2.12.13.2. Qualitative Analyse von Transkripten mittels saturierter RT-PCR.....	- 48 -
2.12.13.3. Quantitative RT-PCR zur Abschätzung von Transkriptmengen.....	- 49 -
2.12.14. Southern-Analyse.....	- 49 -
2.12.14.1. Alkalischer Desoxyribonucleinsäure-Transfer (Southern-Blot).....	- 49 -

2.12.14.2. Präparation von genspezifischen Sonden .....	50 -
2.12.14.3. Radioaktive Markierung von DNA-Molekülen.....	50 -
2.12.14.4. Hybridisierung von Membran-gebundener DNA .....	50 -
2.12.14.5. Waschbedingungen.....	50 -
2.12.14.6. Exposition.....	51 -
2.12.14.7. Mehrfache Hybridisierung einer Southern-Membran.....	51 -
2.13. Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek aus <i>P. patens</i> .....	51 -
<b>2.14. Arbeiten mit Lambda-1-Phagen.....</b>	<b>52 -</b>
2.14.1. Anzucht der Wirts-Bakterienstämme.....	52 -
2.14.2. Infektion der Wirts-Bakterienstämme mit Lambda-λ-Phagen .....	52 -
2.14.3. Ernten der Lambda-λ-Phagen.....	52 -
2.14.4. Durchmustern der Lambda-λ-Phagen-Bibliotheken.....	53 -
2.14.5. Präparation von Lambda-λ-Phagen-DNA im präparativen Maßstab .....	53 -
2.14.6. Subklonieren von Lambda-λ-Phagen .....	54 -
2.14.7. Direktes Sequenzieren von Lambda-λ-Phagen-DNA.....	54 -
<b>2.15. Arbeiten mit <i>P. patens</i>.....</b>	<b>54 -</b>
2.15.1. Allgemeine Anzuchtbedingungen von <i>P. patens</i> .....	54 -
2.15.1.1. Anzuchtbedingungen und Vermehrung von Protonema in axenischer Kultur ..-	55 -
2.15.1.2. Anzuchtbedingungen und Vermehrung von Sporophoren in axenischer Kultur .....	56 -
2.15.1.3. Induktion von Sporophyten zur Gewinnung von Sporen .....	56 -
2.15.1.4. Anzucht von <i>P. patens</i> aus Sporen .....	57 -
2.15.2. Lagerung von <i>P. patens</i> .....	57 -
2.15.3. Präparation von Protoplasten aus <i>P. patens</i> .....	57 -
2.15.4. Transformation von <i>P. patens</i> mit Plasmid-DNA .....	58 -
2.15.5. Biolistische Transformation mittels Partikelbeschuss .....	59 -
2.15.6. Untersuchung zur Physiologie von <i>P. patens</i> Protonema.....	59 -
<b>2.16. Arbeiten mit höheren Pflanzen .....</b>	<b>60 -</b>
2.16.1. Allgemeine Anzuchtbedingungen von <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> .....	60 -
2.16.1.1. Anzucht von <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> auf Erde .....	60 -
2.16.2. Allgemeine Anzuchtbedingungen von <i>L. esculentum</i> .....	61 -
2.16.3. Pflanzenschutzmaßnahmen .....	61 -
<b>2.17. Arbeiten in vitro mit höheren Pflanzen.....</b>	<b>61 -</b>
2.17.1. Arbeiten in vitro mit <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> .....	61 -

---

2.17.1.1. Sterilisation der Samen.....	- 61 -
2.17.1.2. Anzucht von <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> auf sterilen Medien.....	- 62 -
2.17.2. Arbeiten <i>in vitro</i> mit <i>L. esculentum</i> .....	- 62 -
2.17.2.1. Sterilisation der Samen.....	- 62 -
2.17.2.2. Anzucht von <i>L. esculentum</i> auf sterilen Medien .....	- 63 -
2.17.3. Untersuchung zur Physiologie höherer Pflanzen.....	- 63 -
<b>2.18. Bildbearbeitung und Sequenzanalyse .....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>3.1. Charakterisierung der <i>P. patens</i> Insertionsmutanten .....</b>	<b>- 66 -</b>
3.1.1. Morphologische Untersuchung der <i>wrky20</i> -ko#2- und <i>Linie#1</i> - Mutanten .....	- 66 -
3.1.2. Physiologische Untersuchung von <i>Linie#1</i> und <i>wrky20</i> -ko#2 .....	- 67 -
3.1.3. Expressionsanalyse von <i>P. patens</i> WRKY-Genen in der Insertionsmutante <i>wrky20</i> -ko#2.....	- 67 -
<b>3.2. Molekularbiologische Untersuchung des <i>PpWRKY20</i>-Gens.....</b>	<b>- 68 -</b>
3.2.1. Die Struktur des <i>PpWRKY20</i> -Gens .....	- 68 -
3.2.2. Die Struktur der HARF-Domäne.....	- 71 -
3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von <i>PpWRKY20</i> .....	- 71 -
3.2.4. Aktivierung der Transkription durch <i>PpWRKY20</i> in Hefe.....	- 72 -
3.2.5. GST- <i>PpWRKY20</i> -6xHis bindet <i>in vitro</i> nicht an W2-Box-Elemente .....	- 75 -
3.2.6. Etablieren des biolistischen Partikelbeschuß für <i>P. patens</i> .....	- 76 -
3.2.7. Gemeinsamer Partikelbeschuss mit Reporter- und Effektor-konstrukten in <i>P. patens</i> Protonema.....	- 77 -
<b>3.3. Andere WRKY-Gene aus <i>P. patens</i> .....</b>	<b>- 79 -</b>
3.3.1. RAGE .....	- 79 -
3.3.2. Durchmustern von Lambda- $\lambda$ -Phagen Bibliotheken .....	- 79 -
3.3.3. Durchmustern der BAC-Bibliothek.....	- 81 -
3.3.4. Datenbankrecherche neuer EST-Sequenzen.....	- 82 -
<b>3.4. Funktionelle Charakterisierung artifiziieller Promotoren in <i>P. patens</i> <i>Protonema</i> .....</b>	<b>- 83 -</b>
3.4.1. Biolistische Transformation von Konstrukten mit artifiziiellen cis-Elementen in <i>P. patens</i> Protonema.....	- 84 -
3.4.2. Untersuchung von Reporter-Genaktivität der artifiziiellen Kontrukte .....	- 84 -
3.4.3. Reporter-Genaktivität des synthetischen p4xW2-Konstruktes unter flg22 .....	- 86 -

---

3.4.4. Die W-Box ist für die Reporterogenaktivität des synthetischen p4xW2-Konstruktes unter flg22 verantwortlich.....	87 -
<b>3.5. Expressions-Analyse von <i>P. patens</i> Genen nach flg22- und UV-Behandlung.....</b>	<b>89 -</b>
3.5.1. Expressions-Analyse von <i>P. patens</i> Genen nach flg22-Behandlung.....	89 -
3.5.2. Expressions-Analyse von <i>P. patens</i> Genen nach Behandlung mit verschiedenen Peptiden.....	91 -
3.5.3. Expressions-Analyse von <i>P. patens</i> Genen nach UV-Behandlung .....	93 -
<b>3.6. Vergleichende Sequenzanalyse der WRKY-Gene.....</b>	<b>95 -</b>
3.6.1. Vergleichende Analyse der WRKY-EST-Sequenzen aus <i>P. patens</i> .....	95 -
3.6.2. Vergleichende Analyse der WRKY-Proteine aus <i>A. thaliana</i> und <i>O. sativa</i> .....	101 -
3.6.3. Vergleich der Gruppenzugehörigkeit der WRKY-Gene aus den pflanzlichen Modellorganismen <i>P. patens</i> , <i>A. thaliana</i> und <i>O. sativa</i> .....	107 -
<b>3.7. Funktionelle Konservierung der WRKY-Proteine.....</b>	<b>108 -</b>
3.7.1. Sind WRKY-Gene schnell evolvierende Gene? .....	108 -
3.7.2. Strukturelle Analyse der orthologen WRKY10- Gene aus <i>A. thaliana</i> , <i>C. rubella</i> und <i>L. esculentum</i> .....	110 -
3.7.3. Vergleich anderer WRKY-Gene aus <i>C. rubella</i> mit ihren orthologen in <i>A. thaliana</i> .....	111 -
3.7.4. Das Expressionsmuster von <i>AtWRKY10</i> , <i>CrWRKY10</i> und <i>LeWRKYY10</i> ist konserviert .....	112 -
3.7.5. Das Expressionsmuster orthologer WRKY-Gene ist zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>C. rubella</i> konserviert.....	115 -
3.7.6. Analyse der Promotorsequenzen von <i>AtWRKY10</i> , <i>CrWRKY10</i> und <i>LeWRKYY10</i> .....	116 -
<b>3.8. Promotor-Analyse anhand des Motif-Mapper-Programms .....</b>	<b>117 -</b>
3.8.1. Das Prinzip des <i>Motif-Mapper</i> -Programms .....	118 -
3.8.2. Hexanucleotid Verteilung in Genomen von fünf Modellorganismen .....	119 -
3.8.4. Die Elementverteilung kann zwischen Organismenreichen konserviert sein.....	122 -
3.8.5. Mit Motif-Mapper können „neue“ Promoter-Elemente gefunden werden .....	123 -
3.8.6. Das (TC/GA) <sub>8</sub> -Element des pflanzlichen GAF ist in Promotoren häufig.....	124 -
3.8.7. Verteilung von <i>cis</i> -Elementen im Genom. ....	125 -
3.8.8. Verteilung von pathogenresponsiven <i>cis</i> -Elementen.....	127 -
3.8.9. Verteilung von pathogenresponsiven <i>cis</i> -Elementen in den Promotoren verschiedener Genfamilien.....	128 -

---

3.8.10. Die Verteilung von Motiven ist abhängig von ihrer Orientierung .....	- 130 -
3.8.11. Übertragbarkeit der <i>in silico</i> Analysen auf ein biologisches System .....	- 132 -
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>- 134 -</b>
<i>4.1. Die WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie in P. patens.....</i>	<i>- 134 -</i>
<i>4.2. Genaktivierung in P. patens .....</i>	<i>- 142 -</i>
<i>4.3. Evolution der WRKY-Gene.....</i>	<i>- 146 -</i>
<i>4.4. Arbeiten mit dem Motif-Mapper-Programm.....</i>	<i>- 150 -</i>
<i>Ausblick.....</i>	<i>- 155 -</i>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>- 157 -</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>- 158 -</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>- 159 -</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>- 177 -</b>
<i>A1. Verwendete Oligonucleotide .....</i>	<i>- 177 -</i>
A1.1. <i>Physcomitrella patens</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 177 -
A1.1.1. <i>PpWRKY20</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 177 -
A1.1.2. <i>PpWRKY1</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 178 -
A1.1.3. <i>PpWRKY2</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 178 -
A1.1.4. <i>PpWRKY3</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 178 -
A1.1.5. <i>PpWRKY4</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 178 -
A1.1.6. <i>PpWRKY5</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 179 -
A1.1.7. <i>PpWRKY6</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 179 -
A1.1.8. <i>PpWRKY7</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 179 -
A1.1.9. <i>PpWRKY16</i> spezifische Oligonucleotide (Giavalisco, 1999).....	- 179 -
A1.1.10. <i>Pp18S rDNA</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 179 -
A1.1.11. <i>PpWRKY-EST1</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -
A1.1.12. <i>PpWRKY-EST2</i> spezifisches Oligonucleotide .....	- 180 -
A1.1.13. <i>PpWRKY-EST3</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -
A1.1.14. <i>PpWRKY-EST4</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -
A1.1.15. <i>PpWRKY-EST5</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -

A1.1.16. <i>PpWRKY-EST6</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -
A1.1.17. <i>PpWRKY-EST7</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 180 -
A1.1.18. <i>PpWRKY-EST281</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 181 -
A1.1.19. <i>PpWRKY-EST503</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 181 -
A1.1.20. <i>PpPPRP1</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 181 -
A1.1.21. <i>PpRAD51-A</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 181 -
A1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 181 -
A1.2.1. <i>Actin3</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 181 -
A1.2.2. <i>AtWRKY10</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 181 -
A1.2.3. <i>AtWRKY11</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 182 -
A1.2.4. <i>AtWRKY22</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 182 -
A1.2.5. <i>AtWRKY26</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 182 -
A1.2.6. <i>AtWRKY33</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 182 -
A1.2.7. Andere <i>Arabidopsis thaliana</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 182 -
A1.3. <i>Capsella rubella</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 183 -
A1.3.1. <i>Actin3</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 183 -
A1.3.2. <i>CrWRKY10</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 183 -
A1.3.3. <i>CrWRKY11</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 183 -
A1.3.4. <i>CrWRKY33</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.4. <i>Lycopersicon esculentum</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.4.1. <i>LeWRKY10</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.4.2. <i>LeActin</i> spezifische Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> spezifische Oligonucleotide.....	- 184 -
A1.6. Andere-Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.6.1. Degenerierte <i>WRKY</i> -Oligonucleotide .....	- 184 -
A1.6.2. Andere Oligonucleotide.....	- 185 -
A1.6.3. Oligonucleotide für EMSA.....	- 185 -
<b>A2: Phylogenetische Untersuchung an <i>WRKY</i>-Genen.....</b>	<b>- 186 -</b>
A2.1: Vergleich der konservierten Umgebung des GHARFRR-Konsensus der Subgruppe IId <i>WRKY</i> -Proteine .....	- 186 -
A2.2: COG - Cluster Orthologer Gruppen aller isolierter <i>PpWRKY</i> -Seuqnzen .....	- 186 -
A2.3: Vergleich aller verwendeter <i>WRKY</i> -Domänen.....	- 189 -
A2.4: Phylogenetischer Baum aus <i>WRKY</i> -Domänen.....	- 197 -
<b>A3. Einträge nach GenBank .....</b>	<b>- 199 -</b>

---

**A4. Vergleiche der orthologen WRKY-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana* ..... - 202 -**

A4.1 Vergleich der orthologen *WRKY11*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana* ..... - 202 -

A4.2 Vergleich der orthologen *WRKY22*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana* ..... - 203 -

A4.3 Vergleich der orthologen *WRKY33*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana* ..... - 204 -

**Vergleich der orthologen 5'Promotor-Bereiche von *WRKY10* aus *Capsella rubella*,  
*Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum*..... - 207 -**

## Abkürzungsverzeichnis

---

Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nucleinsäure-Bausteine, chemische Substanzen und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der IUBC. Ferner wurden Bezeichnungen für diverse Chemikalien und Methoden in Anlehnung an Sambrock et al. (1989) verwendet.

Abb.	Abbildung
ACC	1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan
AS	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. rubella</i>	<i>Capsella rubella</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EST	<i>Expressed-Sequence-Tags</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
flg22	Flagellin22-Elizitor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glukuronidase
h	Stunde
JA	Methylasmonat
kb	kilo-Basenpaare

---



<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
min	Minute
MW	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NLS	Nuclear Localization Signal
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen in der Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -galaktosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -glukoronsäure
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode, Dreibuchstabencode)

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin

---

R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen für Nucleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Tymidin
Y	Cytosin und Tymidin
R	Adenin und Guanin

# 1. Einleitung

---

Modellorganismen repräsentieren eine kleine Auswahl der gesamten Biodiversität. Aus Experimenten mit Modellorganismen werden exemplarisch Erkenntnisse erhalten, die später auf andere Organismengruppen übertragen werden können. Während früher für Modellorganismen die klassischen Auswahlkriterien entscheidend waren, wie etwa eine geringe Größe oder ein schneller Generationszyklus, so ist heute das Vorhandensein der vollständigen Genomsequenz zu einem der wichtigsten Kriterien geworden. Dabei haben alle Bereiche der Biologie und Medizin von der Verfügbarkeit komplett sequenzierter Genome einer Vielzahl von Organismen profitiert.

Die Modellorganismen auf Grund der klassischen Auswahlkriterien sind nun auch die ersten eukaryotischen Organismen mit einem nahezu vollständig sequenzierten Genom. Beispiele hierfür sind *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Arabidopsis thaliana* (Adams *et al.*, 2000; *The C. elegans Sequencing Consortium*, 1998; Goffeau *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2002; *Arabidopsis Genome Initiative*, 2000)

Die Genom-Sequenzierungsprojekte wurden damals auf der Basis der großen Menge vorhandener Informationen hinsichtlich der Physiologie, Morphologie und der klassischen Genetik der Modellorganismen initiiert. Inzwischen sind Sequenzierungsprojekte eher anwendungsorientiert und der Modellcharakter des Organismus ist in den Hintergrund gerückt. An erster Stelle für diese Art von Sequenzierungsprojekten ist sicherlich das humane Genomprojekt zu nennen (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Aber auch das Genom-Sequenzierungsprojekt für *Oryza sativa* ist eher kommerzieller Natur (Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002).

Die Verfügbarkeit von Informationen aus Expressed-Sequence-Tags (ESTs) sowie aus genetischen Genomkarten sind allen diesen Modellorganismen gemeinsam. Vergleichende Analysen der vorhandenen Sequenzinformationen haben ergeben, dass viele Genfamilien in allen Organismenreichen vertreten sind (Woese, 2002). Funktionelle Informationen, die in einem Modellorganismus gewonnen wurden, können deshalb auf andere übertragbar sein. Besonders interessant für zukünftige

---

Untersuchungen sind solche Arten, deren evolutive Vorfahren Brückenarten zwischen zwei sich abspaltenden Linien gewesen sind. Ein Beispiel hierfür sind die vergleichenden Analysen zwischen dem Genom des Kugelfisches *Fugu rubripes*, ein Knochenfisch und somit ein ursprünglicher Vertreter der Fische, und dem menschlichen Genom. Die Kugelfisch-Vorfahren trennten sich von jenen Fischen, welche die Linie zu den Tetrapoden und damit die Linie zu den Menschen begründeten, vor etwa 450 bis 500 Mio. Jahren (Brenner *et al.*, 1993). Das Genom des Kugelfisches ist sehr kompakt, besitzt aber trotzdem annähernd so viele Gene und Genfamilien wie das menschliche Genom (Aparacio *et al.*, 2002; Hedges und Kumar, 2002). Die Gründe sind das nahezu vollständige Fehlen von dispers verteilten repetitiven Sequenzen und die geringe Größe der Introns. Das Genom des Kugelfisches ist deswegen ein Zehntel kleiner als das menschliche Genom (Aparacio *et al.*, 2002; Hedges und Kumar, 2002). Regulatorische Bereiche können dadurch im Kugelfischgenom viel leichter identifiziert werden. Genauso wurden verwandte, kodierende Sequenzen gefunden, die zur Beschreibung neuer, zuvor nicht entdeckter Gene im Menschen führten (Lewis, 2002; Hedges und Kumar, 2002). Diese gewonnenen Erkenntnisse konnten vom Kugelfisch auf den Menschen übertragen werden und waren für die Annotierung des humanen Chromosoms 20 ein essentieller Faktor (Deloukas *et al.*, 2001).

Das kombinierte Wissen über die phylogenetischen Beziehungen zwischen Arten und deren Genomen ermöglicht neue Einblicke in die vergleichende Genomanalyse und verleiht dieser einen mehr angewandten Charakter als bisher. Während früher synthenische Bereiche zwischen Sequenzen hinsichtlich ihrer Organisation untersucht worden sind, ermöglichen moderne Ansätze der vergleichenden Genomanalyse das Auffinden neuer Gene und Regulationselemente (Deloukas *et al.*, 2001).

In tierischen Organismen kann man auf ein erheblich größeres Spektrum an Modellorganismen zurückgreifen, das von den einfach organisierten Nematoden bis zum Menschen reicht, als es zur Zeit für Pflanzen der Fall ist.

Mit den Modellpflanzen *A. thaliana* und *O. sativa* vertreten zwei Angiospermen das gesamte Pflanzenreich. Dabei nehmen die evolutiv „jungen“ Angiospermen weniger als ein zehntel der gesamten pflanzlichen Biomasse ein. Von den verbleibenden Stämmen der Grünpflanzen, den Gymnospermen, Farne, Bärlappe, Moose und Algen, sind keine nennenswerten Sequenzinformationen vorhanden.

Nur das Laubmoos *Physcomitrella patens* ssp. *patens* stellt eine Ausnahme dar. Mit mehr als 67 000 EST-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken und 110 087 weiteren aus einem nicht-öffentlichen Sequenzierungsprojekt sind für *Physcomitrella patens* mehr EST-Sequenzen bekannt als für irgendeine andere Pflanze (Rensing *et al.*, 2002).

Dies war ein Grund, warum *Physcomitrella patens* kürzlich als weiterer pflanzlicher Modellorganismus vorgeschlagen wurde (Pryer *et al.*, 2002; Rensing *et al.*, 2002). Ein

---

zweiter Grund ist die Möglichkeit *P. patens* mittels zielgerichteter, homologer Rekombination zu transformieren (Schaefer und Zryd, 1997). Dabei liegen die Transformationsraten zwischen 10 % und 90 %, je nachdem mit welcher Methode die Transformation durchgeführt wurde (Reski, 1999; Schaefer und Zryd, 2001). Die Effizienz der in höheren Pflanzen erreichten Transformation mittels homologer Rekombination liegt in der Regel zwischen 0,05 % und 0,1 % (Ray und Langer, 2002; Puchta und Hohn, 1996).

Eine vergleichende Analyse der bekannten EST-Sequenzen aus *P. patens* mit *A. thaliana* und *O. sativa* hat ergeben, dass nur für 47 % der Moos-Gene korrespondierende Orthologe in höheren Pflanzen vorhanden sind (Rensing *et al.*, 2002). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass 53 % der Gene aus *P. patens* keine Ähnlichkeit zu bekannten Pflanzengenen haben. Für die meisten dieser Sequenzen fanden sich auch keine Homologe in den Genomen von Bakterien, Pilzen oder Tieren (Rensing *et al.*, 2002).

Aus diesen Analysen konnte abgeleitet werden, dass fünf *A. thaliana*-Gene durchschnittlich zu einem *P. patens*-Gen homolog sind (Rensing *et al.*, 2002). Im umgekehrten Fall werden mit einem *P. patens*-Gen in *A. thaliana* durchschnittlich drei Gene gefunden (Rensing *et al.*, 2002). Das bedeutet, dass die in *A. thaliana* vorhandenen Genfamilien zwischen dreimal und fünfmal umfangreicher sind als in *P. patens*.

Für das molekulare Arbeiten mit *P. patens* stehen verschiedene Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken zur Verfügung, die Insertionen von genomischer DNA und von cDNA enthalten. Inzwischen ist auch eine Bacterial-Artificial-Chromosome (BAC) -Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens* verfügbar, womit der erste Schritt in Richtung eines Genom-Sequenzierungsprojektes gemacht wurde (Andrew Cummings, persl. Mitteilung). Erst in der letzten Zeit finden sich vermehrt genomische DNA-Sequenzeinträge in den öffentlichen Datenbanken zu *P. patens* und es ist zu hoffen, dass neben den reinen Gensequenzen auch bald regulatorische Bereiche und nicht kodierende Bereiche hinzukommen, die das Bild eines Modellorganismus vervollständigen.

Funktionelle Analysen des CaMV 35S-Promotor, der in höheren Pflanzen zu einer ektopischen Überexpression von Genen führt, und des  $\beta$ -Glukuronidase-Reportergen, *GUS*, zeigten, dass diese auch in *P. patens* funktionstüchtig sind und annähernd die gleiche Effizienz wie in höheren Pflanzen zeigen (Schaefer *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1995; Chakhparonian, 2001).

Für entwicklungsbiologische Untersuchungen wurden in *P. patens* Linien mit modifizierten bakteriellen Transposons generiert, die im Vergleich zu ähnlichen Linien in *A. thaliana* eine zehnmal höhere Trefferfrequenz besaßen (Egener *et al.*, 2002).

Die genetischen Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die homologen Proteine aus *P. patens* in der Regel eine sehr ähnliche oder die gleiche Funktion wie die Proteine in höheren Pflanzen besaßen. Besonders gut untersucht sind die lichtphysiologischen Aspekte der Moosentwicklung, die sich neben *P. patens* auch auf *Ceratodon purpureus*, ein weiteres Laubmoos, stützen. Schon früh konnte gezeigt werden, dass die Phytochrome und Cryptochrome der Moose denen aus der höheren Pflanze in Funktion und Struktur sehr ähnlich sind (Kolukisaoglu *et al.*, 1993). Dabei verhalten sich auch die Null-Mutanten dieser Gene in *P. patens* ähnlich wie die bekannten Null-Mutanten aus *A. thaliana* (Imaizumi *et al.*, 2002).

Für Multigenfamilien wird angenommen, dass sie durch Genduplikation mit einer anschließenden Diversifikation entstanden sind und in Veränderungen an der gesamten Pflanze resultierten (Meyerowitz, 1999; Wolfe, 2001). Deswegen ist es äußerst wichtig, Genfamilien in Pflanzenarten zu untersuchen, die nicht zu den Angiospermen gehören, um die molekularen Ergebnisse mit entwicklungs- und evolutionsbiologischen Prozessen korrelieren zu können (Schaefer und Zryd, 2001).

So konnte für eine Unterfamilie der *c-Myc*-Genfamilie gezeigt werden, dass die in *P. patens* gefundenen Gene ähnlicher zu denen aus Tieren waren, als zu *A. thaliana* (Kranz *et al.*, 2000). Deswegen kann angenommen werden, dass diese Gene bereits vor der Abspaltung der Linien, die später zu den Tieren und Pflanzen geführt haben, bestanden haben muss.

Im umgekehrten Fall konnte für *KNOX*-Gene und *MADS-box*-Gene gezeigt werden, dass sie pflanzenspezifische Linien darstellen. Dabei hat sich die Familie der *MADS-box*-Gene nach der Abspaltung der höheren Pflanzen von der Moos-Linie erheblich vergrößert und diversifiziert (Himi *et al.*, 2001).

Ein Vergleich der in *P. patens* gefundenen Gene für Transkriptionsfaktoren hat gezeigt, dass alle aus *A. thaliana* bekannten Klassen auch im Moos vertreten waren (Riechmann *et al.*, 2000; Egner *et al.*, 2002; Tomoaki Nishiiyama, persl. Mitteilung).

Bei der Anpassung der Pflanzen an ihren Lebensraum vermitteln Transkriptionsfaktoren die physiologischen Antworten auf äußere Reize.

Pflanzen als sessile Organismen haben nicht die Möglichkeit in einer ungünstigen Lebensphase abzuwandern, sich bei Gefahr in Gruppen zusammenzuschließen oder Schutz zu suchen, wie es bei Tieren der Fall ist. Dadurch muss jede Pflanze mit dem genetischen und physiologischen Rüstzeug ausgestattet sein, auf die biotischen und abiotischen Veränderung in ihrer Umwelt reagieren zu können. So ist gezeigt worden, dass die heutigen Vorkommen von *Welwitschia mirabilis* in Namibia vor mehr als 4000 Jahren in einem savannenartigen Grasland keimten. Das Klima hat sich seit dieser Zeit verändert und das ehemalige Grasland ist nun eine Wüste ohne regelmäßigen Niederschlag. *Welwitschia mirabilis* war jedoch in der Lage, diese Veränderung zu überstehen. Diese Pflanze konnte den klimatischen Unterschied bisher physiologisch

kompensieren und in einer Umwelt überleben, die für Gräser zu lebensfeindlich geworden ist.

Dies ist nur durch die komplexen Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation, der Signalperzeption und Signalübertragung sowie der transkriptionellen Regulation möglich (Meyerowitz, 1999).

Bei der Wahrnehmung äußerer Reize sowie deren Signalübertragung haben Pflanzen eigene Wege beschritten. So verfügen sie beispielsweise über Rezeptorkinasen aus der Klasse der Serin/Threonin- und der Histidin-Kinasen. Bei Tieren hingegen dominieren Tyrosin-Rezeptor-Kinasen.

Die Signalübertragungswege enden meistens auf der Ebene der transkriptionellen Kontrolle von Genen. Dabei werden die eintreffenden Signale über ein komplexes Netzwerk miteinander wechselwirkender Transkriptionsfaktoren in eine spezifische und genau dosierte Veränderung der Genexpression von Zielgenen umgesetzt. Transkriptionsfaktoren binden mit einer DNA-bindenden Domäne an bestimmte *cis*-Elemente und üben mittels anderer Domänen einen Einfluss auf die Aktivität des RNA-Polymerase II-Komplexes aus (Liu *et al.*, 1999). Die Wichtigkeit der transkriptionellen Regulation wird auch durch die Zahl der bekannten Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Genomen verdeutlicht. So stellen die bekannten Gene, die mutmaßlich für Transkriptionsfaktoren kodieren, in *A. thaliana* und in *O. sativa* die zweitgrößte Gruppe dar (Riechmann *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002).

Die Gegenwart von Kernlokalisierungssignalen (*NLS*) ist für die Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern verantwortlich. Die Proteine der Kernimport-Rezeptor-Familie am Kernporenkomplex erkennen solche Signale und bewirken dann einen aktiven Import aus dem Cytoplasma über den Kernporenkomplex in den Zellkern (Nakielny und Dreyfuss, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Vertreter der Transkriptionsfaktorfamilien sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkung auf die Transkription eines bestimmten Zielgens haben können (Schwechheimer und Bevan, 1998). Dabei kann sogar ein einzelner Transkriptionsfaktor je nach Kontext als Aktivator oder Repressor auf die Expression von unterschiedlichen Zielgenen wirken (McCarty *et al.*, 1991; Hoecker *et al.*, 1995).

In der Regel werden Transkriptionsfaktoren auf Grund ihrer DNA-bindenden Domäne in verschiedene Genfamilien zusammengefasst, die dann wiederum strukturell oder funktionell in Untergruppen unterteilt werden.

Dabei können solche Multigenfamilien im Genom entweder in sogenannten *Clustern* gruppiert vorliegen oder dispers über alle Chromosomen verteilt sein (Takatsuji, 1998). Die häufigsten Vertreter der Transkriptionsfaktorfamilien in Pflanzen stellen die bHLH-, die Homeobox-, die MYB-, die MADS-Box-, die bZIP- und die Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren dar (Riechmann *et al.*, 2000). Aber nicht nur anhand der

---

---

Proteinsequenzen lassen sich Transkriptionsfaktorfamilien unterscheiden, sondern auch anhand ihrer spezifischen DNA-Binde-Motive können die einzelnen Gruppen von einander getrennt werden.

Untersuchungen an artifiziellen Promotorkonstrukten, die jeweils nur ein definiertes *cis*-Element in mehrmaliger Wiederholung vor einem Reporter gen tragen, liefern einen Einblick in die vernetzte Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren und ihren spezifischen Bindungselementen (Rushton *et al.*, 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass einzelne Elemente genügen, um pathogen- oder verwundungsresponsiv das Reporter gen zu aktivieren. Es wurden drei verschiedene Klassen von *cis*-Elementen aus verschiedenen Pflanzenarten in *A. thaliana* getestet. Darunter befanden sich W-Boxen (WRKY-Bindestellen), GCC-ähnliche Boxen (ERF/EREBP-Bindestellen) und D-Boxen, von denen der bindende Transkriptionsfaktor noch nicht bekannt ist (Rushton *et al.*, 2002). Hervorzuheben ist die Möglichkeit selbst verwandte *cis*-Elemente, die mutmaßlich von der selben Klasse Transkriptionsfaktoren gebunden werden, auf Grund ihrer spezifischen Reporter gen-Antwort unterscheiden zu können. So sind die GCC-Box (AGCCGCC) und die S-Box (AGCCACC) bis auf ein Nucleotid identische *cis*-Elemente. Jedoch vermittelt die GCC-Box deutlich stärkere Reporter gen-Aktivität nach Verwundung, wohingegen das S-Box-Element nur wenig verwundungsresponsiv, aber vergleichbar pathogenresponsiv ist (Rushton *et al.*, 2002).

Dabei ist es bemerkenswert, dass verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren gemeinsam unter einem Stimulus aktiviert werden und später über verschiedene *cis*-Elemente die Transkription derselben Zielgene kontrollieren können. So werden die Reaktionen auf biotischen oder abiotischen Stress durch viele unterschiedliche Signalübertragungswege reguliert und trotzdem ist es möglich, dass die erhaltenen Expressionsmuster nach verschiedenen Stimuli sehr ähnlich sein können (Durrant *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2001).

Man hat herausgefunden, dass nach dem Auslösen einer Stressreaktion hauptsächlich drei Klassen von Transkriptionsfaktoren signifikante Unterschiede in den Transkriptmengen zeigen: ERF (*ethylen-responsive-element-binding-factors*)-Proteine, bZIP (*basic-domain leucin-zipper*)-Proteine und WRKY-Proteine.

Obwohl auch in anderen Transkriptionsfaktorfamilien, wie etwa den MYB-Proteinen (Stracke *et al.*, 2001) oder den DOF-Transkriptionsfaktoren (Yanagisawa, 2002), stressresponsive Gene gefunden werden konnten, handelt es sich vor dem Hintergrund der verfügbaren Informationen jedoch nur um einzelne Vertreter (Singh *et al.*, 2002).

Die ERF-Proteine sind eine Subfamilie der pflanzenspezifischen APETALA2 (AP2)/EREBP (*ethylen-responsive-element-binding-protein*) Transkriptionsfaktoren

---



und besitzen in *A. thaliana* etwa 124 Mitglieder (Riechmann *et al.*, 2000). Alle ERF-Proteine besitzen eine charakteristische 58 bis 68 Aminosäuren große ERF-Domäne, welche die spezifische Bindung zu den GCC-box-ähnlichen und DRE (*dehydration-responsive-element*)-box-ähnlichen DNA-Motiven vermittelt. Dabei könnte die ERF-Domäne möglicherweise eine amphiphatische  $\alpha$ -Helix bilden, über die der Kontakt zur DNA hergestellt wird (Liu *et al.*, 1999). Die Anzahl der AP2-DNA-Binde-Domäne dient der Gliederung der ERF/EREBP-Familie. Vertreter mit einer einzelnen AP2-Domäne werden in der ERF/EREBP-Subfamilie zusammengefasst, wohingegen Faktoren mit zwei Domänen zur AP2-Subfamilie gezählt werden. Während die Mitglieder der AP2-Subfamilie eher entwicklungsabhängige Prozesse steuern, scheinen die Faktoren der ERF/EREBP-Subfamilie in vielfältige Reaktionen auf biotische und abiotische Stressfaktoren wie Pathogenbefall, Kälte und Trockenheit eingebunden zu sein (Zhou *et al.*, 1997; Stockinger *et al.*, 1997, Gilmour *et al.*, 1998; Menke *et al.*, 1999).

Die bZIP-Multigenfamilie besitzt etwa 74 Mitglieder in *A. thaliana* (Jacoby *et al.*, 2002). Vertreter dieser Transkriptionsfaktorfamilie binden an *cis*-Elementen mit dem Konsensus ACGT, wie er in A-, C- und G-Boxen gefunden werden kann (Ramachandran *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1992). Einige Gene der bZIP-Transkriptionsfaktoren werden Licht-abhängig reguliert, andere hingegen werden durch Phytohormone wie Abscisinsäure, Auxin oder Salicylsäure beeinflusst. Die von bZIP-Faktoren gebundenen DNA-Motive liegen oft in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen *cis*-Elementen und es wird vermutet, dass die Aktivität der Faktoren erheblich durch kooperative Bindung und Wechselwirkung mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird (Chandrasekharan *et al.*, 2003).

Die pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren repräsentieren eine Multigenfamilie mit 74 Genen in *A. thaliana*.

Alle WRKY-Proteine besitzen die charakteristische, hoch konservierte WRKY-Domäne, bestehend aus 60 bis 80 AS mit dem folgenden Konsensus (Eulgem *et al.*, 2000): D-WRKYGQK-X<sub>7</sub>-PR-YY-C-X<sub>4-7</sub>-C-X<sub>22-23-(26)</sub>-H-(H/C)

Diese Domäne beinhaltet neben dem namensgebenden AS-Motiv WRKY auch konservierte Cysteine und Histidine, die eine putative Zink-Finger-Struktur ausbilden können. Vor dem Hintergrund der bisher beschriebenen C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motive aus Zink-Finger-Proteinen stellt das C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Motiv der WRKY-Proteine eine neuartige Zink-Finger-Struktur dar (Liu *et al.*, 1999; Takatsuji, 1998). Gestützt wird diese Annahme durch die Inhibition der DNA-Bindung mittels chelatierenden Agenzien wie EDTA oder 1,10-o-Phenanthrolin (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 2000).

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die WRKY-Domäne mit hoher Affinität an ein spezifisches DNA-Motiv, das W-Box-Element, bindet (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl das invariante WRKYGQK-Aminosäure-Motiv als auch die putative Zink-Finger-Struktur essentiell für die Bindung sind (de Pater *et al.*, 1996; Maeo *et al.*, 2001).

Die W-Box hat den absolut konservierten Konsensus TTGACY. Obwohl keine Abweichungen von diesem Kernmotiv toleriert werden, zeigten verschiedene Kombinationen aus W-Boxen mit begleitenden W-Box-ähnlichen Motiven in der näheren Umgebung funktionelle Unterschiede. So konnte Eulgem *et al.* (1999) eine schnelle und transiente Genexpression auf eine palindromische Anordnung von W-Boxen zurückführen. Pathogen- und Salicylsäure-abhängige WRKY-Proteinen konnten an ein elizitorresponsives Element, das ein Tandem TGAC-TGAC-Motiv beinhaltet, binden und die Expression eines Chitinase-Gens aus *Nicotiana tabacum* aktivieren (Yang *et al.*, 1999).

Die WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie kann auf Grund der Anzahl an vorhandenen WRKY-Domänen in zwei Gruppen geteilt werden. Vertreter der Gruppe I besitzen zwei WRKY-Domänen, von denen nur die carboxyterminal gelegene an der DNA-Bindung beteiligt zu sein scheint (Eulgem *et al.*, 2000). Die Funktion der aminoterminalen Domäne ist unklar. Allerdings ist es denkbar, dass sie einen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben könnte, oder Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Eulgem *et al.*, 2000). Mitglieder der Gruppe II und Gruppe III besitzen jeweils nur eine WRKY-Domäne. Jedoch unterscheiden sie sich in der putativen Zink-Finger-Struktur: Im Falle der Gruppe II besitzt diese ein C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motiv, wohingegen ein C<sub>2</sub>-HC Motiv für die WRKY-Proteine der Gruppe III charakteristisch ist. Außerdem ist der Abstand innerhalb des Zink-Fingers bei Gruppe III etwas größer als der von Gruppe II (Eulgem *et al.*, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass WRKY-Proteine an vielfältigen stress- und pathogenabhängigen Signalübertragungswegen beteiligt sind (Eulgem *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2003). Auch eine Beteiligung von WRKY-Faktoren an seneszenzgesteuerten Prozessen konnte nachgewiesen werden (Robatzek und Somssich, 2001). Für *AtWRKY44/TTG2* konnte gezeigt werden, dass dieses Protein an der pflanzlichen Entwicklung beteiligt ist. Die Null-Mutante in *A. thaliana* besitzt deformierte Trichome. Außerdem ist die Trichom-Anzahl verringert und die Samenschale transparent (Johnson *et al.*, 2002).

Inzwischen konnte in einem Transfektionsexperiment mit Mesophyll-Protoplasten aus *A. thaliana* ein kompletter Signalübertragungsweg, an dem WRKY-Proteine beteiligt sind, charakterisiert werden. Dabei erfolgt die Erkennung des Peptid-Elizitors flg22 durch *FLAGELLIN SENSITIVE2 (FLS2)*, einer Rezeptor-ähnlichen Proteinkinase (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Über eine MAP-Kinase-Kaskade, wie sie vergleichbar

---

auch aus tierischen Systemen bekannt ist, wird die Expression der *WRKY*-Gene *AtWRKY22* und *AtWRKY29* induziert (Asai *et al.*, 2002). Eines der identifizierten Zielgene ist eine Rezeptor-ähnliche Proteinkinase, welche flg22-abhängig und MAP-Kinase-abhängig durch *AtWRKY22* und *AtWRKY29* kontrolliert wird (Asai *et al.*, 2002). Jedoch wurde die selbe Kinase, *SIRK/FRK1*, auch von Robatzek und Somssich (2002) in einem *AtWRKY6*-abhängigen, alterungsbedingten Signalübertragungsweg gefunden. Somit laufen in *SIRK/FRK1* sowohl pathogen- als auch seneszenzabhängige Prozesse zusammen, die durch verschiedene Transkriptionsfaktoren derselben Multigenfamilie gesteuert werden (Singh *et al.*, 2002).

Außerdem wurden W-Box-Elemente in einer Reihe von Pathogen-, Salicylsäure- und anderen Stress-responsiven Promotoren gefunden (Rushton und Somssich, 1998; Maleck *et al.*, 2000). Vor diesem Hintergrund kann angenommen werden, dass *WRKY*-Proteine essentielle Bestandteile des physiologischen Antwortprogramms auf Pathogene und Stress der Pflanzen sind.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten acht *WRKY*-Genfragmente aus *P. patens* mittels eines PCR-gestützten Ansatzes mit degenerierten Oligonucleotiden gewonnen werden (Giavalisco, 1999). Nach eingehender Untersuchung waren sogar neun verschiedenen *PpWRKY*-Genfragmente von B. Al-Sady isoliert worden. Für zwei Gene, *PpWRKY20* und *PpWRKY16*, konnte gezeigt werden, dass diese Gene im Moos-Protonema exprimiert wurden. Für *PpWRKY20* konnte in einer cDNA-Bibliothek ein Klon gefunden werden, der das gesamte offene Leseraster enthielt (Petra Köchner und Paul J. Rushton, persl. Mitteilung). Ausgehend von der Information für *PpWRKY20* konnte ein Rekombinationsfragment erstellt werden, mit dem eine Null-Mutante in *P. patens* mittels homologer Rekombination generiert werden konnte (Giavalisco, 1999).

## Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine vergleichende Analyse der pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie zwischen niederen und höheren Pflanzen. Als ein Modellorganismus für evolutiv frühe pflanzliche Prozesse hat sich das Laubmoos *Physcomitrella patens* als nützlich erwiesen.

Das Vorhandensein der WRKY-Gene in *P. patens* und der hohe Konservierungsgrad der WRKY-Domäne, die in höheren Pflanzen die Bindung zur DNA-Zielsequenz, der W-Box, vermittelt, legen die Möglichkeit einer konservierten Wechselwirkung zwischen WRKY-Proteinen und W-Box-Elementen in *P. patens* nahe.

Um dies näher zu untersuchen, sollen die *PpWRKY*-Gene mit den WRKY-Genen der höheren Pflanze *A. thaliana* verglichen werden. Eine vergleichende Charakterisierung von *PpWRKY20* mit dem verwandten *AtWRKY11* wird durchgeführt, um einen Eindruck von dem Grad der funktionellen Konservierung zu erhalten.

Desweiteren soll eine physiologische Analyse von *P. patens* darüber Auskunft geben, ob die von höheren Pflanzen bekannten Reaktionen auf stressauslösende Stimuli sowie verschiedene Phytohormone auch schon bei niederen Pflanzen ausgeprägt sind.

Dabei stehen die im Vorfeld dieser Arbeit generierten *P. patens* Insertionsmutanten *Linie#1* und *wrky20-ko#2* im Mittelpunkt des Interesses.

Der Nachweis über die Funktionalität bekannter *cis*-Elemente aus höheren Pflanzen in *P. patens* kann mit Hilfe artifizieller Promotor-Reportergenkonstrukte gezeigt werden.

Zu diesem Zweck soll der biolistische Partikelbeschuss zur Transformation von *P. patens* etabliert werden, um eine funktionelle Charakterisierung von WRKY-Proteinen *in vivo* zu ermöglichen.

Um einen möglichst vollständigen Einblick in die WRKY-Genfamilie zu erhalten, werden die *PpWRKY*-Gene untereinander, aber auch mit den Genen aus *A. thaliana* und *O. sativa* verglichen. Diese Untersuchung führt zur funktionellen und strukturellen Analyse von Orthologen WRKY-Genen. Zur funktionellen Charakterisierung werden Expressionsanalysen von paralogenen Genen in *P. patens* sowie von orthologen Genen in höheren Pflanzen durchgeführt. In diesem Zusammenhang erscheint eine Analyse der W-Box-Elemente sinnvoll. Um einen Eindruck von der gesamtgenomischen Verteilung von *cis*-Elementen zu erhalten, wird ein gesamtgenomischer Ansatz entwickelt.

## 2. Material und Methoden

---

### Material

#### *2.1. Chemikalien und Lösungsmittel*

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien und organischen Lösungsmittel im analytischen Reinheitsgrad von den folgenden Firmen bezogen:

Ambion (Wiesbaden), BioRad (München), Biozym (Hameln), Duchefa (Halem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Pfeiffer & Langen (Dormagen), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haen (Hannover), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma - Aldrich (Deisenhofen)

Wasser wurde in Milli-Q<sup>®</sup>-Qualität verwendet. Für alle Klonierungsarbeiten wurde Aqua bidest (dH<sub>2</sub>O) benutzt.

#### *2.2. Arbeiten mit Radioisotopen*

Es wurde ausschließlich [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (370 kBp/ $\mu$ l entspricht  $\sim$ 300  $\mu$ Ci/mmol) verwendet, das von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen wurde. Das für die Reinigung radioaktivmarkierter Sonden verwendete Säulenmaterial G-50 wurde von Pharmacia bezogen. Die Röntgenfilme lieferte die Firma Kodak (Rochester, USA).

#### *2.3. Antibiotika*

Es wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Ampicillin	100 mg / ml Wasser
Kanamycin	50 mg / ml Wasser
Tetracyclin	10 mg / ml Etanol
Gentamycin	50 mg / ml Wasser
Paromomycin	40 mg / ml Wasser

---

#### ***2.4. Allgemeine Medien, Lösungen und Puffer***

Medien, Lösungen und Puffer, die nur bei einer Methode Verwendung fanden, wurden unter der jeweiligen Methode aufgeführt. Zum Ansetzen von Puffern verwendetes Wasser war deionisiert, zur Verwendung in enzymatischen Reaktionen wurde dieses Wasser zusätzlich autoklaviert. Organische Lösungsmittel, die bei der axenischen Kultur von Pflanzen Verwendung fanden, aber nicht autoklaviert werden konnten, wurden mittels Vakuum Einwegfilter-Apparaturen der Firma Nalgene, Rochester, USA, steril filtriert.

##### Tris/HCl, 1 M

121 g Tris-Base in dH<sub>2</sub>O

##### EDTA-Stammlösung, 0,5 M

186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA in 700 ml dH<sub>2</sub>O gelöst  
pH 8,0 mit NaOH eingestellt

##### TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA (pH 8,0) in dH<sub>2</sub>O

##### 10x STE-Puffer

200 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
100 mM EDTA (pH 8,0) in dH<sub>2</sub>O  
1 M NaCl

##### 20x SSC

3 M NaCl  
0,3 M Natrium-Citrat

die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.

X-Gluc-Stammlösung

für 400 ml:	dH <sub>2</sub> O	360 ml
	1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,6 ml
	1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	24,4 ml
	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	263 mg
	Triton-X 100	0,1 %
	X-Gluc (5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Glucuronid)	200 mg

Die Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Ethidiumbromid-Stammlösung

50 mg EtBr (Ethidiumbromid) in 100 ml dH<sub>2</sub>O

Die Stammlösung findet in Verdünnungen von 1:1000 bis zu 1:20000 Verwendung zum quantitativen Färben von Nucleinsäuren nach der Gelelektrophorese oder von Zellwänden und Zellkernen in der Fluoreszenz-Mikroskopie.

### 2.4.1. Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit Bakterien und Hefen

#### L-Medium

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
2,4 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Gegebenenfalls wurden Antibiotika-Stammlösungen abhängig von der gewählten Selektion 1:1000 verdünnt zugegeben.

Zur Herstellung von L-Platten werden jeweils 15 g Agar/l Medium zugegeben und autoklaviert.

#### LB-Medium

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Gegebenenfalls wurden Antibiotika-Stammlösungen abhängig von der gewählten Selektion 1:1000 verdünnt zugegeben.

Zur Herstellung von LB-Platten werden jeweils 15 g Agar/l Medium zugegeben und autoklaviert.

#### NZYM-Medium

100 g NZYM-Fertigmedium in Trockensubstanz (Fluka)

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

Zur Herstellung von NZYM-Platten werden jeweils 15 g Agar/l Medium zugegeben und autoklaviert. Für NZYM-Topagar werden jeweils 7 g Agar/l Medium zugegeben und autoklaviert.

#### SD-Medium

6,7 g Hefe-Aminosäure-Basis-Gemisch (Sigma-Aldrich)

2 % Glucose

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 5,8 eingestellt, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

Dem Hefe-Aminosäure-Basis-Gemisch fehlen die essentiellen Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Histidin sowie Uracil, welche entsprechend den Selektionsbedingungen nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugefügt werden müssen.

Zur Herstellung von SD-Platten werden jeweils 20 g Agar/l Medium zugegeben und autoklaviert.

#### SM-Medium

5,8 g NaCl

2 g MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O

50 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5

0,01 % Gelatine

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

#### SOC-Medium

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

2,5 mM KCl

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die folgenden Substanzen als steril-filtrierte Lösungen zugesetzt und ad 1 l Volumen aufgefüllt:

10 mM MgCl

2,4 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

20 mM Glucose



#### YPD-Medium

- 10 g Hefeextrakt
- 20 g Pepton
- 20 g Glucose

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,4 eingestellt, das Volumen ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Antibiotika wurden abhängig von der gewählten Selektion 1:1000 verdünnt zugegeben. Zur Herstellung von YPD-Platten wurden zu 1 l des YPD-Flüssigmediums 15 g Agar hinzugegeben und autoklaviert.

#### Lösungen zur Blau-Weiß-Selektion von Bakterien:

##### IPTG-Stammlösung

- 100 mM IPTG in Wasser

Von der IPTG-Stammlösung wurden 40 µl pro 20 ml Agarplatte ausgestrichen. Die Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

##### X-Gal-Stammlösung

- 2 % X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid)  
in DMSO

Von der X-Gal-Stammlösung wurden 20 µl pro 20 ml Agarplatte ausgestrichen. Die Stammlösung wurde bei -20°C in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahrt.

## **2.4.2. Medien und Lösungen zur Anzucht von Pflanzen**

### **2.4.2.1. Medien und Lösungen zur Anzucht höherer Pflanzen**

#### Arabidopsis (AM) -Flüssigmedium

- 4,3 g MS Medium (Salze und Vitamine) (Murashige and Skoog, 1962)
- 10 g Saccharose

auf 1 l dH<sub>2</sub>O; der pH-Wert wurde mit KOH auf 6 eingestellt.

#### AM-Platten zur Anzucht von Pflanzen:

zu 1 l des AM-Flüssigmediums wurden 7 g Agar hinzugegeben und autoklaviert. Phytohormone, Antibiotika, oder andere Chemikalien wurden abhängig von der gewünschten Endkonzentration verdünnt und im Verhältnis 1:1000 in das abgekühlte Medium zugegeben.

Hoagland´s-Medium zur Pflanzen-Düngung

Calciumnitrat	[Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O]	1100 mg / l
Magnesiumsulfat	[MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O]	738 mg / l
Kaliumnitrat	[KNO <sub>3</sub> ]	505 mg / l
Ammoniumnitrat	[NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ]	120 mg / l
Kaliumdihydrogenphosphat	[KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	8 mg / l
Sequestrine (*)	[chelatiertes 138-Fe]	15 mg / l
Borsäure	[H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ]	2,1 mg / l
Manganchlorid	[MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O]	1,4 mg / l
Zinksulfat	[ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O]	165 µg / l
Molybdän	[H <sub>3</sub> MoO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O]	68 µg / l
Kupfersulfat	[CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O]	60 µg / l

(\*) bezogen von Ciba-Geigy Corp.

Für die angeführten Chemikalien wurden Stammlösungen angesetzt, die gemeinsam mit dH<sub>2</sub>O zu einer Lösung mit den angegebenen Endkonzentration gemischt wurden. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Schwefelsäure [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] auf einen Wert zwischen 5,7 und 6,0 eingestellt (Koncz *et al.*, 1998).

**2.4.2.2. Medien zur Anzucht von *P. patens***

PPNO<sub>3</sub>-Medium

Makroelemente

CaNO <sub>3</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,8 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,0125 g/l

Mikroelemente

CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,055 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,055 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,614 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,389 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,055 mg/l
KI	0,028 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l

Vitamine

Thiamin/HCl	0,055 mg/l
Para-Aminobenzoesäure	0,055 mg/l
Nikotinsäure	0,614 mg/l

Makroelemente, Mikroelemente und Vitamine werden als 1000x Stammlösungen angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

PPNH<sub>4</sub>-Medium

Die Zusammensetzung des PPNH<sub>4</sub>-Mediums entspricht jener des PPNO<sub>3</sub>-Mediums, jedoch mit folgenden Zusätzen:

Ammoniumtartrat	0,5 g/l
Glucose	5 g/l

Es wurde auch PPNH<sub>4</sub>-Medium verwendet, dem keine Glucose zugesetzt worden ist, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu reduzieren.

Protoplasten-Medium

Die Zusammensetzung des Protoplasten-Mediums entspricht jener des PPNH<sub>4</sub>-Mediums, jedoch mit folgendem Zusatz:

Mannit	66 g/l
--------	--------

Zur Herstellung von PPNO<sub>3</sub>-, PPNH<sub>4</sub>- und Protoplasten-Platten werden zu 1 l des jeweiligen Flüssigmediums 7 g Agar zugegeben und autoklaviert. Phytohormone, Antibiotika, oder andere Chemikalien wurden abhängig von der gewünschten Endkonzentration verdünnt und in das abgekühlte Medium gegeben.

Kalium-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 g/l
---------------------------------	---------

auf 1 l dH<sub>2</sub>O; der pH-Wert wurde mit 4 M KOH auf 7 eingestellt.

**2.4.2.3. Medien zur Protoplasten-Gewinnung und Transformation von *P. patens***

MMM

Mannit	0,48 M
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
MES	0,1 %

das Medium wurde mit KOH auf pH 5,6 eingestellt.

---

PEG-Lösung

Mannit	0,38 M
CaNO <sub>3</sub>	0,1 M
PEG 4000	33 %

das Medium wurde mit Tris/HCl pH 8 auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Mannit-Lösung

Mannit	0,48 M
--------	--------

Driselase-Lösung

Driselase	2 % (w/v)
-----------	-----------

Entsprechende Mengenverhältnisse Driselase (Fluka 44585) werden in dH<sub>2</sub>O gelöst und für 20 min bei 4000 rpm. in einer Heraeus-Bodenzentrifuge zentrifugiert. Da es sich bei Driselase um eine Mischung verschiedener Enzyme aus einem groben Aufschluß verschiedener Basidiomyceten handelt, werden durch die Zentrifugation unlösliche Bestandteile wie z.B. Zellbruchstücke sedimentiert. Der braune, klare Überstand wird vor der Verwendung steril filtriert.

### 2.4.3 Puffer zur Gelelektrophorese

#### 2.4.3.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA

##### TAE-Gelelektrophorese

Gelpuffer:	1x TAE
Laufpuffer:	1x TAE
50x TAE	

242 g Tris-Base  
57,1 ml Essigsäure, 96%  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

wurden ad 1 l Volumen mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

##### TBE-Gelelektrophorese für die Pulsfeldgelelektrophorese

Gelpuffer:	0,5x TBE
Laufpuffer:	0,5x TBE
10x TBE	

108 g Tris-Base  
55 g Borat  
40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

wurden ad 1 l Volumen mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert.

DNA-Probenpuffer (10x):

0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
 30 % (v/v) Glycerol in dH<sub>2</sub>O  
 10 mM Tris-Base

**2.4.3.2. Formaldehyd-Agarosegele zur Auftrennung von RNA**

Gelpuffer: 1x Mops

Laufpuffer: 1x Mops

10x Mops:

41,86 g Mops  
 6,6 g NaAcetat  
 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

pH 8.0 für Gelpuffer, pH 7.0 für den Laufpuffer  
 (pH mit Natronlauge bzw. Essigsäure einstellen)

2x RNA-Probenpuffer (1ml):

Formamid	660 µl
Formaldehyd	80 µl
Bromphenolblau	Spatelspitze
10xMops	100 µl
EtBr (1mg/ml)	100 µl
dH <sub>2</sub> O	60 µl

**2.4.4. Puffer zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

10x PCR Puffer

200mM Tris/HCl (pH 8,4)  
 500mM KCl  
 25mM MgCl<sub>2</sub>

wurden in Wasser der Milli-Q<sup>®</sup>-Qualität angesetzt.

10x dNTP-Mix:

2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP und 2,5 mM dTTP

Die dNTP's wurden als Lyophilisat bezogen und in dH<sub>2</sub>O gemischt.

10x Stammlösungen des PCR Puffers und des dNTP-Mix wurden bei -20°C gelagert.

---

### 2.4.5. Puffer der Southern-Hybridisierung

Spermidine-Stammlösung zur Restriktionsspaltung von genomischer Pflanzen DNA:

100 mM Spermidine in 10 mM Tris/HCl (pH 8) gelöst.

20x SSPE

175,3 g NaCl

27,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

7,4 g EDTA

wurden in 800ml dH<sub>2</sub>O gelöst, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und auf 1 l Volumen aufgefüllt. Anschließend wurde die Stammlösung autoklaviert.

20% SDS:

200 g Natrium-Dodecyl-sulfat

wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O bei 68°C gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,2 eingestellt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.

Unspezifische DNA zur Prähybridisation

CT-DNA 10 mg / ml Kalbsthymus DNA

Heringssperma-DNA 10 mg / ml Heringssperma-DNA

wurden in dH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gelöst, NaCl bis zu einer Konzentration von 0,1 M hinzugegeben und die Lösung mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde durch Scheren mittels wiederholten Auf- und Absaugen durch einer feine Spritzenkanüle fragmentiert, mit Ethanol gefällt und in dH<sub>2</sub>O gelöst. Vor der Verwendung wurde die DNA für 5 min bei 95°C denaturiert und dann sofort in einem Eisbad abgekühlt. So behandelte DNA wurde anschließend der vorgewärmten Prähybridisierungslösung zugesetzt.

50x Denhardt's Prähybridisierungslösung

10 mg / ml Rinderserum-Albumin

10 mg / ml Ficoll 400 (MG 40000)

10 mg / ml PVP (Polyvinylpyrrolidon)

wurden in dH<sub>2</sub>O angesetzt und durch vorsichtiges erhitzen gelöst.

Dextransulfat Prähybridisierungslösung

10 % Dextransulfat

1 % SDS, pH 7,2

1 M NaCl

wurden in dH<sub>2</sub>O angesetzt und durch vorsichtiges erhitzen gelöst.

---

Phosphatpuffer zur Prähybridisierung

0,5 M NaPO<sub>4</sub>, pH 7,2

7 % SDS, pH 7,2

10 mM EDTA

Diese Lösung wird in der Regel wie folgt angesetzt:

Es werden 134 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, mit 3,5 bis 4 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,2 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt. Diese Lösung entspricht

1 M NaPO<sub>4</sub>, pH 7,2

Waschlösung 1:

2x SSPE

0,1 % SDS (w/v)

in dH<sub>2</sub>O

Waschlösung 2

0,2x SSPE

0,1 % SDS (w/v)

in dH<sub>2</sub>O

Neutralisierungslösung:

1% (v/v) HCl

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

**2.4.6. Puffer zur Koloniehybridisierung**

1. Denaturierungslösung:

1% (w/v) SDS

0,5 M NaOH

2. Neutralisierungslösung:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris/HCl, pH 7,4

3. 2x SSC:

30 mM Na-Citrat  
300 mM NaCl

#### **2.4.7. Puffer des alkalischen Minilysat**

Lösung 1:

TE-Puffer

Lösung 2:

0,2 M NaOH  
1 % SDS

Lösung 3:

3M KAc

(60 ml 5 M KAc + 11,5 ml Eisessig + 28,5 ml dH<sub>2</sub>O)

#### **2.4.8. Puffer zur DNA-Präparation**

2x CTAB

2 % Cetyl-trimethyl-Ammoniumbromid (CTAB)  
1,4 M NaCl  
20 mM EDTA  
100 mM Tris/HCl, pH 8,0

L - Puffer

5 % (w/v) Frosch-Waschmittel in dH<sub>2</sub>O

persönliche Mitteilung A. Eckhoff (verändert nach Bahl und Pfenninger, 1996)

RNase-Stammlösung:

Es wurde eine RNase-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg / ml angesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge RNase eingewogen und in 10 mM Tris (pH 8) aufgenommen. Die Lösung wurde zur Inaktivierung der enthaltenen DNasen für 20 min in einem kochenden Wasserbad, bei 100°C inkubiert, anschließend abgekühlt und bei 4°C gelagert.

TR (Tris / RNase):           10 mM Tris/HCl (pH 8)  
                                      100 µg/ml RNase



---

PCI:	2 % (v/v) Isoamylalkohol
	48 % (v/v) Chloroform
	50 % (v/v) Tris gesättigtes Phenol (pH8)
CI:	4 % (v/v) Isoamylalkohol
	96 % (v/v) Chloroform

## 2.5. Enzyme

### 2.5.1. Restriktionsendonucleasen

Analytische und präparative Spaltungen von DNA wurden mit den Enzymen folgender Hersteller durchgeführt

New England Biolabs (Schwalbach), Boehringer (Erlangen), Gibco BRL (Eggstein).

Für die Reaktionen wurden 1 - 20 U des Enzyms im entsprechenden Puffersystem nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 2.5.2. DNA-Polymerasen

#### 2.5.2.1. Klenow-Fragment aus *E. coli*

Für die Präparation von radioaktiv markierten DNA-Sonden und für die Auffüllreaktion von 5'-überstehenden DNA-Enden wurde das Klenow-Fragment benutzt. Das große Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli*, auch als Klenow Fragment bezeichnet, besitzt keine 5' - 3' Exonucleaseaktivität, jedoch eine 3' - 5' Exonucleaseaktivität (proofreading). Für die Reaktionen wurde das mitgelieferte Puffersystem nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Klenow-Fragment	Gibco BRL (Eggstein)
-----------------	----------------------

#### 2.5.2.2. Hitzestabile DNA-Polymerasen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für alle DNA-Amplifikationsreaktionen im Bereich der Analyse von Matrizen-DNA wurde die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet. Dieser DNA-Polymerase fehlt die 3' - 5' Exonucleaseaktivität; daher ist ihre Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide relativ hoch.

Taq-DNA-Polymerase	Boehringer (Erlangen)
	Invitrogen (Heidelberg)

Für alle DNA-Amplifikationsreaktionen, deren Produkte eine hohe Sequenzidentität verlangten, wurde die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Pyrococcus furiosus* oder eine ihrer Mutanten verwendet, die eine 3' - 5' Exonucleaseaktivität besitzen. Daher ist ihre Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide sehr gering. Diese Enzyme wurden außerdem für die Auffüllreaktion von 5'-überstehenden DNA-Enden verwendet. Pfx-DNA-Polymerase wurde außerdem für die Amplifikation langer DNA-Fragmente (bis 6,5 kb) verwendet.

Pfu - DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
Pfx - DNA-Polymerase	Invitrogen (Heidelberg)

#### **2.5.2.3. RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptase)**

Für die Darstellung von Erststrang-cDNA aus gesamt RNA-Präparationen wurde das Reverse Transkriptase (RT) Enzym Superscript II der Firma Invitrogen, Heidelberg, verwendet, welches eine RNase-H-Mutante der Reversen-Transkriptase des Maloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) ist. Diese Modifizierte Version weist eine Punktmutation in der RNase-H-codierenden Sequenz auf, so dass diese Enzymvariante während der Synthese des ersten DNA-Stranges die RNA nicht abbaut und deshalb insgesamt mehr cDNA-Moleküle, die die vollständige mRNA abdecken, in größeren Mengen synthetisiert.

#### **2.5.2.4. Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase**

Zur Polymerisation von Nucleotiden an ein freies 3'-Ende eines DNA-Stranges wurde die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase der Firma Roche, Mannheim, nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden ausschließlich dATP-Nucleotide verwendet, so dass in nachfolgender PCR eine spezifische Anlagerung eines dT-Oligonucleotid-Primers gewährleistet wird.

#### **2.5.3. T4-DNA-Ligase**

Für die Katalyse der Phosphodiesterbindung von Vektor und DNA Fragmenten (Ligation) wurde dieses Enzym im mitgelieferten Puffersystem nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

T4-DNA Ligase	Gibco BRL (Eggestein)
---------------	-----------------------

#### 2.5.4. Alkalische Phosphatase

Für die Dephosphorylierung von 5′-Phosphatgruppen freier DNA-Enden wurde die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) verwendet.

CIAP    Gibco BRL (Eggestein)

#### 2.5.5. Clonasen® für die GATEWAY®-Technologie

Für die spezifische Rekombination zwischen flankierenden att-Regionen im Rahmen der GATEWAY-Technologie wurden die entsprechenden Clonasen nach Angaben des Herstellers Invitrogen, Heidelberg, verwendet.

BP-Clonase    Invitrogen (Heidelberg)

LR-Clonase    Invitrogen (Heidelberg)

### 2.6. Biologisches Material

#### 2.6.1. Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich Bakterienstämme der Art *Escherichia coli* verwendet.

**DH5 $\alpha$ :**    Dieser Bakterienstamm wurde für die Klonierungen von Plasmiden verwendet. Er besitzt eine "loss of function"-Mutation in der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens. So wird eine  $\alpha$ -Komplementation mit der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens aus entsprechenden Vektoren (pUC-Derivaten) ermöglicht.

Genotyp:      supE44  $\Delta$ lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 F

**DH10B:**    Dieser Bakterienstamm wurde ebenfalls für die Klonierungen von Plasmiden verwendet. Dieser Stamm ist besonders rekombinationsarm. Im Gegensatz zu anderen Stämmen besitzt DH10B kein Antibiotika-Resistenzgen und kann deswegen zur Klonierung sämtlicher Plasmide mit verschiedenen Antibiotikaselektionsmarkern verwendet werden. DH10B ist besonders für die Klonierung großer Vektoren geeignet. Auch dieser Stamm besitzt eine "loss of function"-Mutation in der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens, so dass eine  $\alpha$ -Komplementation durch entsprechende Vektoren (pUC-Derivate) ermöglicht wird.

Dieser Stamm wurde von der Firma Gibco BRL, Eggestein, bezogen.

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

**SURE:** Dieser Bakterienstamm wurde für die Klonierungen von Plasmiden und Cosmiden verwendet. Dieser Stamm ist besonders rekombinationsarm. SURE besitzt ein Tetracyclin- und ein Kanamycin-Antibiotika-Resistenzgen. SURE ist besonders für die Klonierung großer Vektoren und Cosmide geeignet.

Dieser Stamm wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg, bezogen.

Genotyp: e14<sup>-</sup> (mcrA<sup>-</sup>) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96  
relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) [F<sup>-</sup>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10  
(Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>

**DE3 (BL21):** Dieser Bakterienstamm wurde ausschließlich für die heterologe Expression von rekombinanten pflanzlichen Proteinen in *E. coli* verwendet.

Dieser Stamm wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg, bezogen.

Genotyp: F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) galλ(DE3)

**DB3.1:** Dieser Bakterienstamm wurde ausschließlich für die Amplifikation des originären GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatiblen Plasmids pDONR verwendet. Dieser Stamm ist resistent gegenüber dem Genprodukt des CcdB-Gens zur Selektion GATEWAY<sup>®</sup>-rekombinanter Vektoren

Dieser Stamm wurde von der Firma Invitrogen, Heidelberg, bezogen.

Genotyp: F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) supE44 ara14  
galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Sm<sup>r</sup>)xyl5 Δleu mtl1

**TOPO10F':** Dieser Bakterienstamm wurde für die Klonierungen von pTOPO-Vektoren von der Firma Invitrogen, Heidelberg, zur Verfügung gestellt und ist Bestandteil des pTOPO-II-TA-Klonierungs-Kits. TOP10F' besitzt ebenfalls eine "loss of function"-Mutation in der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens. So wird eine α-Komplementation mit der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens aus entsprechenden Vektoren ermöglicht.

Dieser Stamm wurde von der Firma Invitrogen, Heidelberg, zusammen mit pCR2.1TOPO-Vektoren bezogen.

Genotyp: F<sup>-</sup> {lacI<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15  
ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>)  
endA1 nupG

XL1-blue MRF': Dieser Bakterienstamm wurde für das Arbeiten mit Lambda- $\lambda$ -Phagen- und Cosmid-Bibliotheken verwendet. Dieser Stamm ist besonders rekombinationsarm. XL1-blue MRF' besitzt ein Tetracyclin-Antibiotika-Resistenzgen. Dieser Stamm ist besonders für das Arbeiten mit Phagen, sowie zur Klonierung großer Vektoren wie Cosmide oder BACs geeignet.

Dieser Stamm wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg, bezogen.

Genotyp:  $\Delta$ mcrA183  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)173 endA1 supE44 thi-1 recA1  
gyrA96relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

XL1-blue MRA (P2): Dieser Bakterienstamm wurde ausschließlich für das Arbeiten mit Lambda- $\lambda$ -Phagen verwendet. Dieser Stamm ist besonders rekombinationsarm. XL1-blue MRA (P2) besitzt kein Antibiotika-Resistenzgen. Er entspricht weitestgehend dem Bakterienstamm XL1-blue MRF', jedoch enthält dieser Stamm den lysogenen Prophagen P2 (Stratagene, Heidelberg). Dieser Stamm ist besonders für das Arbeiten mit Phagen, sowie zur Klonierung großer Vektoren wie Cosmide oder BACs geeignet.

Dieser Stamm wurde von der Firma Stratagene, Heidelberg, bezogen.

Genotyp: relA1 lac (proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15)  $\Delta$ mcrA183  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)173  
endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96

### 2.6.2 Hefestamm

Y190: Dieser Stamm besitzt Mutationen die Auxotrophie für die essentiellen Aminosäuren Leucin, Lysin, Histidin und Tryptophan vermitteln. Eine  $\alpha$ -Komplementation durch entsprechende Vektoren ermöglicht so die gezielte Selektion. Dieser Stamm wurde freundlicher Weise von Csaba Koncz, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt.

Genotyp: MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4 $\Delta$   
met<sup>-</sup> gal80 $\Delta$  cyh<sup>r</sup>2 LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3:: GAL1<sub>UAS</sub>-  
GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ

### 2.6.3 Pflanzenmaterial

Protonema und Sporen in axenischer Suspension des „Gransden“ Wildtyp-Stammes von *P. patens* ssp. *patens* (Hedw.) Bruch, Schimp & Gümbel, kürzlich in die Gattung *Aphanoregma* als Taxon *Aphanoregma patens* (Hedw.) Lindb. überführt, wurden freundlicher Weise von Didier Schaefer und Jean-Pierre Zrýd, Universität Lausanne, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Protonema und Sporophore der Art auf sterilen Medien wurden freundlicher Weise von Ulrich Markmann-Mulisch und Bernd Reis, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt.

Die *P. patens* - Mutanten *Linie#1* und *wrky20-ko#2* wurden freundlicher Weise von Patrik Giavalisco und Imre E. Somssich für diese Arbeit überlassen. Beide Mutanten enthalten eine Insertion des PpWRKY20-Rekombinationsfragments (Giavalisco, 1999). Dabei führte die Insertion in der Mutante *wrky20-ko#2* zur Deletion der *PpWKKY20*-Gensequenz. Dahingegen enthält die *Linie#1* das inserierte Konstrukt in *trans* und nicht in diesem Gen-Locus.

Samen von *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia (Col-0) wurden aus dem Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) bezogen (Inventarnummer: CS 3180). Samen von *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Wassilewskija (Ws-2) wurden ebenfalls aus dem ABRC bezogen (Inventarnummer: CS 2360).

Samen von *C. rubella* wurden freundlicher Weise von Renate Schmidt, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Golm, zur Verfügung gestellt (Acerkan *et al.*, 2000). Außerdem wurde Pflanzengewebe sowie genomische DNA dieser Art von Marcel Lafos, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt.

Samen und Pflanzengewebe von *L. esculentum* der Sorte 'MoneyMaker' wurden freundlicher Weise von Klaus Theres und Gregor Schmitz, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt (Schumacher *et al.*, 1999).

### **2.7. Oligonucleotide (Primer) für die PCR**

Die Primer wurden von folgenden Firmen bezogen:

MWG Biotech (Ebersberg)

Operon/Qiagen (Köln/Hilden)

Gibco BRL/Invitrogen (Eggestein/Heidelberg)

Alle verwendeten Primer wurden als Lyophilisat bezogen: entsprechend der Quantifizierung des Herstellers in Wasser der Milli-Q<sup>®</sup>-Qualität gelöst und als 100 pM Stammlösung bei -20°C gelagert. Als Arbeitsverdünnung wurden die Stammlösungen im Verhältnis 1:8 verdünnt. Von der erhaltenen 12,5 pM Lösung wurden in der Regel 1 bis 2 µl in eine PCR von 50 µl Volumen eingesetzt.

GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatible Extensionen werden (GWF) und (GWR) abgekürzt. Dabei steht (GWF) für eine "Sinn"-orientierte attB<sub>1</sub>- und (GWR) für eine

"Gegensinn"-orientierte attB<sub>2</sub>-Extension. Diese Oligonucleotide wurden ausschließlich von der Firma Invitrogen, Heidelberg, bezogen.

Von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, wurden oligo-dT<sub>12-18</sub> - Oligonucleotide bezogen, die in der Reversen-Transkriptase Reaktion und für RAGE verwendet wurden. Die Sequenzen der Oligonucleotide sind im Anhang (A1.) aufgeführt.

## 2.8. Vektoren

pCR2.1TOPO	Invitrogen, Heidelberg
pDONR 201	Invitrogen, Heidelberg
pDEST 32 (BD)	Invitrogen, Heidelberg
pBluescript (S/K)+	Stratagene, Heidelberg
pCLD04541	Bancroft <i>et al.</i> , 1997
pSIRKp	Robatzek und Somssich, 2002

p35S-intron-WRKY29 (GW)  
p35S-intron-WRKY6 (GW)  
p35S-intron-GFP-GUS (GW)  
p35S-WRKY6-GFP (GW)

Diese Vektoren wurden freundlicher Weise von Aifen Zhou zur Verfügung gestellt. Die Vektoren basieren auf einem modifizierten pAM-PAT-Vektor von Thomas Rademacher (GenBank accession AY027531). Bei diesen Vektoren handelt es sich um mit der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatible Vektoren unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promoters zur ektopischen Expression von Proteinen in Pflanzen mit translationalem HA-Epitop am Carboxyterminus und einem nicht translatierten Intron aus AtWRKY33 im 5'-UTR (Franziska Turck und Bekir Ülker, persönliche Mitteilung).

pGEX2Tm-GW

Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Ingo Ciolkowski und Bekir Ülker zur Verfügung gestellt. Der Vektor basiert auf dem pGEX2T-Vektor, Pharmacia. Bei pGEX2Tm-GW handelt es sich um einen mit der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatiblen Vektor zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen mit aminoterminaler GST-Extension und carboxyterminalen 6xHis-Epitop in *E. coli*.

p35S-GW-GFP(Kan)

Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Franziska Turck und Bekir Ülker zur Verfügung gestellt. Der Vektor basiert auf dem pAM-PAT von Thomas Rademacher

(GenBank accession AY027531). Bei 35S-GW-GFP(Kan) handelt es sich um einen mit der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatiblen binären Pflanzen-Vektor unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promoters zur ektopischen Expression von Proteinen mit translationaler GFP-Fusion am Carboxyterminus in Pflanzen.

#### pPTV35S-GUS

Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Bekir Ülker zur Verfügung gestellt. Der Vektor basiert auf dem pGPTV (Koncz *et al.*, 1989). Dieses Konstrukt enthält das GUS-Reporter gen unter der Kontrolle eines einzelnen CaMV 35S-Promotor.

#### pAM-PAT-GW

Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Bekir Ülker und Thomas Rademacher (GenBank accession AY027531). Bei pAM-PAT handelt es sich um einen mit der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie kompatiblen binären Pflanzen-Vektor unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promoters zur ektopischen Expression von Proteinen in Pflanzen.

Vektoren mit synthetischen *cis*-regulierenden Promoter-Elementen wurden freundlicher Weise von Paul J. Rushton, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt und sind Derivate des pBT10- $\beta$ -glucuronidase (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000). Die Promoterkonstrukte wurden durch das Hybridisieren phosphorylierter Oligonucleotide und das anschließende, gerichtete Klonieren in die *Xba*I- und *Spe*I-Restriktionsspaltstellen des pBT10- $\beta$ -glucuronidase erzeugt:

#### p4xW1-GUS

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

CACTTAATTTGACCGAGTAACATTCGCC

#### p4xW2-GUS

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

TTATTCAGCCATCAAAGTTGACCAATAAT

#### p4xD-GUS

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

TACAATTCAAACATTGTTCAAACAATTAACC

#### p4xS-GUS

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

CAGCCACCAAAGAGGACCCAGAAT

#### p4xGCC-GUS

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

CAGCCGCCAAAGAGGACCCAGAAT

#### p4xW2MW-GUS

Paul Rushton, persönliche Mitteilung

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz



---

TTATTCAGCCATCAAAGTTGTCCAATAAT

p4xW2MS-GUS

Paul Rushton, persönliche Mitteilung

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

TTATTCAGCCACCAAAGTTGACCAATAAT

p4xGST1

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

TTCTAGCCACCAGATTTGACCAAAC

p4xJERE

Rushton *et al.*, 2002

Dieser Vektor enthält die viermalige Wiederholung der Nukleotidsequenz

AGACCGCCAAAGAGGACCCAGAAT

Die bekannten, funktionalen *cis*-regulierenden Promoter-Elemente wurden unterstrichen.

## 2.9. Gen-Bibliotheken

### 2.9.1. Lambda-Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens*

Eine DNA-Bibliothek, die genomische DNA aus *P. patens* enthält, wurde in einem modifizierten Lambda- $\lambda$ -Phagen-Vektor erstellt. Hierzu wurde ein Lambda- $\lambda$ -Phagen-Vektor der Firma Stratagene, Heidelberg, verwendet (Frishauf *et al.*, 1983).

Diese Lambda-Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens* wurde freundlicher Weise von Andrew Cumings und Celia Knight, University of Leeds, Leeds, England, zur Verfügung gestellt.

### 2.9.2. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus *P. patens*

#### 2.9.2.1. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus *P. patens* (unbehandelt)

Eine DNA-Bibliothek, die cDNA aus *P. patens* enthält, wurde in einem modifizierten Lambda- $\lambda$ -Phagen-Vektor erstellt. Die cDNA basiert auf revers-transkribierter RNA, welche aus 7 Tage altem Protonema, das in Flüssigmedium kultiviert wurde, gewonnen worden ist. Hierzu wurden modifizierte Lambda- $\lambda$ -ZapII-Phagen-Vektoren der Firma Stratagene, Heidelberg, verwendet (Frishauf *et al.*, 1983).

Diese Lambda-Bibliothek mit cDNA aus *P. patens* wurde von William Martin, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, erstellt (Martin *et al.*, 1993) und Üner Kolukisaoglu, Universität zu Köln (jetzt: Universität Rostock) zur Nutzung überlassen. Freundlicher Weise wurde diese Lambda-Bibliothek mit cDNA aus *P. patens* für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### **2.9.2.2. Lambda-Bibliothek mit cDNA aus Auxin behandelten *P. patens***

Eine DNA-Bibliothek, die cDNA aus *P. patens* enthält, wurde in einem modifizierten Lambda- $\lambda$ -Phagen-Vektor erstellt. Die cDNA basiert auf revers-transkribierter RNA, welche aus 7 Tage altem Protonema, das auf Platten kultiviert und mit 1  $\mu$ M NAA - Auxin für 1 h, 6 h und 24 h behandelt wurde, gewonnen worden ist. Hierzu wurden modifizierte Lambda- $\lambda$ -ZapII-Phagen-Vektoren der Firma Stratagene, Heidelberg, verwendet (Frishauf *et al.*, 1983).

Von den erhaltenen cDNAs wurden ausschließlich Fragmente mit einer Größe von mindestens 600 bp für die gerichtete Ligation in die  $\lambda$ -ZapII-Phagen-Vektoren verwendet. Diese Lambda-Bibliothek mit cDNA aus *P. patens* wurde von Pamela Taylor, PEP - *Physcomitrella EST Programme*, University of Leeds, Leeds, England, zur Verfügung gestellt.

### **2.9.3. Cosmid-Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens***

Eine DNA-Bibliothek, die genomische DNA aus *P. patens* enthält, wurde an der Southern Illinois University von Khalid Meksem für das Leeds University/Washington University *Physcomitrella EST Programme* (PEP) in dem pCLD04541-Cosmid-Vektor (Bancroft *et al.*, 1997) erstellt.

Die Cosmid-Bibliothek wurde auf positiv geladene Nylonmembrane in Feldern von 5 x 5 "Spots" aufgestempelt. Jeder Cosmid-Klon ist als Duplikat in jedem Feld als interne Kontrolle vorhanden, um so der Selektion eines falschen "Spots" vorzubeugen. Die Bibliothek umfaßt 16 896 Cosmid-Clone (44 x 384 - Microtiterplatten) mit einer Größe für die *Inserts* von überwiegend 75 bis 120 kb. Der pCLD04541-Cosmid-Vektor ist ein "BiBAC" - Vektor, der die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation höherer Pflanzen erlaubt. Die Fragmente wurde in die *HindIII*-Restriktionsspaltstelle kloniert. Der pCLD04541-Cosmid-Vektor wurde freundlicher Weise von Caroline Dean, University of Norwich, England, für diese Cosmid-Bibliothek zur Verfügung gestellt. Diese Cosmid-Filter-Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens* wurde freundlicher Weise von Andrew Cumings, PEP - *Physcomitrella EST Programme*, University of Leeds, Leeds, England, zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurde der pCLD04541-Cosmid-Vektor freundlicher Weise von Renate Schmidt zur Verfügung gestellt.

## **Methoden**

### ***2.10. Arbeiten mit E. coli***

#### **2.10.1. Anzucht von Bakterien**

Zellen der unter 2.6.1. beschriebenen Stämme von *E. coli* wurden aus Glycerin-Stammkulturen in einer angemessenen Verdünnung auf LB-Agarplatten (die das entsprechende Antibiotikum enthielten) ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert. Die Platten konnten anschließend zwei bis drei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Für ü.N.-Kulturen transformierter Bakterien wurden 5 ml LB-Flüssigmedium einschließlich Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C ü.N. geschüttelt. Zur Anzucht von größeren Kulturen transformierter Bakterien wurden 250 ml mit einer ü.N.-Kultur angeimpft und eine weitere Nacht bei 37°C geschüttelt.

#### **2.10.2. Lagerung von Bakterien**

Um Bakterienstämme oder transformierte Bakterien langfristig lagern zu können, wurden Glycerin-Langzeitkulturen angelegt. Dazu wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl Glycerin versetzt und gut gemischt. Danach wurden die Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.10.3. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mittels RbCl<sub>2</sub>-Methode**

Während der Arbeiten ist es essentiell die Zellen, Geräte und Lösungen auf 4 °C oder auf Eis vorzukühlen. Am Besten ist es, die Arbeiten in einem Kühlraum zu verrichten.

Übernachtskultur zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien:

100 ml L - Medium in einem Erlenmeyerkolben wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Diese wird stehend bei 37°C ü.N. auf einem exzenter-horizontal Schüttler bei etwa 225 rpm geschüttelt.

Präparation der Bakterienzellen:

100 ml L - Medium werden mit 1 ml der Übernachtskultur inokuliert und für ca. 2 h bei 37 °C geschüttelt (225 rpm).

Dannach sollte alle 30 min die optische Dichte OD<sub>550</sub> bestimmt werden. Sobald diese eine Extinktion von 0,3 bis 0,5 erreicht hat, wird die Kultur in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 5000 rpm sedimentiert. Der Überstand wird verworfen.

Anschließend wird das Sediment in 0,4 Volumen TFB1 (20 ml bei 50 ml Ausgangskultur) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert.

Durch eine erneute Zentrifugation bei 4 °C für 15 min und 5000 rpm werden die Zellen abermals sedimentiert und der Überstand wird verworfen.

Jetzt wird das Bakteriensediment in 0,04 Volumen TFB2 (2 ml bei 50 ml Ausgangskultur) aufgenommen.

Sofort sollten 50 – 100 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigen N<sub>2</sub> tiefgefroren werden.

Die Bateriazellen werden bei -80°C gelagert.

Mit diesem Protokoll konnten chemokompetente *E. coli*-Zellen mit einer Transformations-Effizienz von 1 bis 5 x 10<sup>9</sup> cfu hergestellt werden. Die Transformations-Effizienz wurde durch eine Test-Transformation mit 50 pg Plasmid-DNA, pUC19, ermittelt.

#### TFB I

	für 150 ml	für 300 ml
30 mM KaC	0,44 g	0,883 g
50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,48 g	2,969 g
100 mM RbCl <sub>2</sub>	1,81 g	3,627 g
10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,22 g	0,441 g
15 % Glycerin	22,5 ml	45 ml

der pH wird mit HCl auf 5,8 eingestellt.

#### TFB II

	für 50 ml	für 150 ml
10 mM Mops	0,105 g	0,45 g
75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,551 g	1,65 g
10 mM RbCl <sub>2</sub>	0,061g	0,18 g
15 % Glycerin	7,5 ml	22,5 ml

der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

#### 2.10.4. Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Gefrorene chemisch kompetente Bateriazellen (2.10.3.) wurden auf Eis aufgetaut und mit bis zu 10 µl eines Ligationsansatzes oder 2 bis 5 µl einer DNA-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 1 min bei 42°C

wurden 0,8 ml LB-Flüssigmedium zugesetzt und die Zellsuspension bei 37°C im Wärmeschrank für 30 – 60 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer LB-Platte mit den entsprechenden selektionierenden Antibiotika ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### **2.10.5. Präparation von Plasmid-DNA**

#### **2.10.5.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Überprüfung der Plasmide von *E. coli* Kulturen wurde die alkalische Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

#### **2.10.5.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab**

Diese Arbeiten wurden mit dem Nucleospin Plasmid - Kit der Firma Macherey & Nagel, Düren, durchgeführt. Es handelt sich dabei ebenfalls um eine alkalische Lyse der Zellen mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine hydrophil beschichtete Silikamembran unter hohen Salzbedingungen und der Elution unter niedrigen Salzbedingungen. Nach der jeweiligen Präparation erfolgte eine relative Quantifizierung auf einem Agarosegel.

#### **2.10.6. 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Bei der Ligation von Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, bestand die Gefahr einer Rezirkularisierung der Vektormoleküle. Zur Ligation benötigt die Ligase eine Phosphatgruppe an dem 5'-Ende der zu ligierenden DNA. Durch eine Dephosphorylierung dieser DNA, bei der die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) abgespalten wird, kann eine Rezirkularisierung verhindert werden. Die Dephosphorylierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde anschließend mit dem Nucleospin Extract - Kit der Firma Macherey & Nagel, Düren, gereinigt.

#### **2.10.7. Klonieren mit der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie**

Das Verwenden der GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie, das mittels Clonasen<sup>®</sup> die spezifische Rekombination zwischen att-Regionen katalysiert, sowie das Erstellen von GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie-kompatiblen Oligonucleotiden oder Vektoren erfolgte nach Angaben des Herstellers Invitrogen, Heidelberg.

### **2.10.8. Koloniehybridisierung**

Für die Identifikation positiver Bakterienkolonien wurde eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Dazu wurden Kolonien von einer Agarplatte auf eine Nylon N<sup>+</sup>-Membran übertragen und wie in einem herkömmlichen Southern-Experiment (2.12.14.) mit einer spezifischen Probe hybridisiert.

### **2.10.9. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* und Proteinextraktion**

Zur bakteriellen Expression von rekombinantem Protein aus *P. patens* wurden DE3-Bakterienzellen mit dem Expressionsvektor pET32b-GW transformiert, der zuvor mit der entsprechenden cDNA-Kassette des zu exprimierenden Proteins mittels GATEWAY<sup>®</sup>-Technologie rekombiniert wurde. Die Proteinexpression wurde induziert durch die Zugabe von 1 mM IPTG zu 500 ml LB-Medium bei einer Bakterienkonzentration von der optischen Dichte OD<sub>600</sub> = 0,6 – 0,8. Die Zellen wurden nach 4 h Inkubation durch Zentrifugation geerntet. Ein Gesamtextrakt von Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen erhalten (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoffpuffer, pH 8,0). Anschließend wurde der Extrakt für 8 h bei 4°C gegen Puffer (25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 40 mM KCl, 10 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 100 mM PMSF, 1 mM DTT) dialysiert.

### **2.10.10. Nachweis von rekombinantem Protein im Protein-Blot-Experiment (Western-Analyse)**

Rekombinantes Protein wurde im halbtrockenen Proteintransfer auf PVDF-Membranen übertragen. Der WB-Transferpuffer wurde nach Anleitung des Herstellers der *Blotting-Apparatur* TRANS-BLOT SD *Semi-Dry Transfer Cell*, BioRad, München, jedoch ohne Methanol angesetzt. Der Transfer wurde bei 20 V für 30 min durchgeführt.

Der Nachweis des rekombinanten Proteins auf der Membran wurde mit einem primären Anti-6xHis-Antikörper und einem sekundären Anti-Maus-Antikörper (beide Sigma-Aldrich) nach Sambrook *et al.* (1999) durchgeführt. Der Anti-Maus-Antikörper ist ein Peroxidase-Konjugat. Die Detektion erfolgte durch Lumineszenz mit dem Substrat ECL-*western-blotting-detection-reagents* des Herstellers Pharmacia, Freiburg, und Belichtung eines Röntgenfilms.

### **2.10.11. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) mit rekombinantem Protein**

Synthetische Oligonucleotide wurden miteinander hybridisiert, um doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten. Diese wurden mittels Terminaler Desoxynucleotidyl-Transferase unter Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP terminal radioaktiv markiert. Die

Protein-DNA-Bindung wurde in Binde-Puffer (25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 40 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 µg poly-(dIdC), 10 mM PMSF, 1 mM DTT) mit 10000 cpm radioaktiv markierter Oligonucleotide und 25 µg Proteinextrakt durchgeführt. Dazu wurde der Bindungsansatz für 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf einem 6 % Polyacrylamid-Gel in 0,5 x TBE-Puffer bei 4°C für 2 - 3 h bei 230 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf 3MM (Whatman) getrocknet. Zur Belichtung wurde ein Röntgenfilm ü.N. dem Gel in einer Kassette bei -70°C exponiert und anschließend entwickelt.

## ***2.11. Arbeiten mit Hefe***

### **2.11.1. Anzucht von Hefe**

Die Anzucht des Y190 Hefestammes wurde auf YPD-Vollmedium oder SD-Selektionsmedium durchgeführt. Den Medien wurden bisweilen Ampicillin zugesetzt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Dabei wurden die Hefen auf Agar-Platten oder unter ständigem Schütteln in Flüssigmedium für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert.

### **2.11.2. Lagerung von Hefe**

Der Y190-Wildtyp-Hefestamm wurde auf YPD-Platten bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Zeit wurde eine Kolonie auf einer frischen YPD-Platte ausgestrichen.

Entsprechend wurde mit transgenen Hefestämmen verfahren, jedoch wurden diese auf SD-Selektionsmedium kultiviert. Für die durchgeführten Experimente waren Langzeitkulturen der Hefen nicht erforderlich, da entsprechende Plasmid-DNA zur Retransformation gelagert wurde.

### **2.11.3. Transformation chemisch kompetenter Hefe mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation von Hefe wurden 240 µl einer 50 %igen PEG 4000-Lösung (steril filtriert) 36 µl 10x LiAcetat, 20 µl dH<sub>2</sub>O, 50 µl unspezifische DNA sowie 100 ng Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Von einer frischen YPD-Platte aus zweitägiger Kultur wurde eine Hefe-Kolonie entnommen und zum oben beschriebenen Ansatz gegeben. Der Transformationsansatz wurde gut gemischt (Vortex) und für 1 h bei 30°C inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 20 min bis 60 min bei 42°C in einem Wasserbad. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis gegeben und anschließend in einer Tischzentrifuge für wenige Sekunden zentrifugiert, um die Zellen

zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 1 ml YPD-Medium vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation für 1 h bei 30°C unter Schütteln wurde der Transformationsansatz auf entsprechende SD-Platten ausgestrichen.

10x LiAcetat

1 M LiAcetat, pH 7,5 (steril filtriert)

#### **2.11.4. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe**

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe wurde ein modifiziertes Protokoll von Andreas Eckhoff, Forschungszentrum Jülich, verwendet. Dieses basiert auf einem mechanisch-enzymatischen Aufschluss der Hefezellen und Lösungen des Nucleospin Plasmid - Kit der Firma Macherey & Nagel, Düren.

Es wurden 4 ml YPD- oder SD-Medium mit einer Hefekolonie angeimpft und ü.N. bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 300 µl L-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurden ca. 0,3 g Glaskugeln zugegeben und für 1 min bei RT gut geschüttelt (Vortex). Nach Zugabe von 10 µl TR-Puffer wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 4 min in einer Tischzentrifuge bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl A3-Puffer und 200 µl Ethanol vermischt (mehrmaliges Invertieren). Der Ansatz wurde auf eine Säule des Nucleospin Plasmid - Kit gegeben und in einer Tischzentrifuge (8000 rpm für 30 s.) zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit jeweils 400 µl CW-Puffer und A4-Puffer gewaschen und einmal ohne Puffer trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Hefe-DNA wurde zweimal mit 25 µl Elutions-Puffer (Tris/HCl) eluiert.

### **2.12. Arbeiten mit Nucleinsäuren**

#### **2.12.1. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Durch photometrische Bestimmung der Lichtabsorbtion einer wäßrigen DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde deren Konzentration bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1,0 einer Konzentration von etwa 50 µg / ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Bei der photometrischen Bestimmung der Lichtabsorbtion einer wäßrigen RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine optische Dichte von 1,0 einer Konzentration von etwa 40 µg / ml RNA oder einzelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).



### **2.12.2. Nucleinsäure-Präzipitation mit Ethanol**

Zur Fällung von DNA wurde die wäßrige DNA-Lösung mit zwei Volumina 100 %igen Ethanols und einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetats (pH 5) vermischt und für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde das Sediment mit 0,8 ml 80 %igen Ethanols gewaschen, im Vakuumtrockner getrocknet und in einem angemessenen Volumen TE oder destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. Entsprechend kann auch mit RNA verfahren werden.

### **2.12.3. Nucleinsäure-Präzipitation mit Isopropanol**

Zur Fällung von DNA wurde die wäßrige DNA-Lösung mit einem Volumen kalten Isopropanol und einem zehntel Volumen 3 M Natriumacetats (pH 5) vermischt und für 30 min bei -20°C gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde das Sediment mit 0,8 ml 80 %igen Ethanols gewaschen, im Vakuumtrockner getrocknet und in einem angemessenen Volumen TE oder destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. Entsprechend kann auch mit RNA verfahren werden.

### **2.12.4. Extraktion von Nucleinsäurelösungen mit PCI oder CI**

Auf Grund ihrer guten Löslichkeit in wässrigen Lösungen können Nucleinsäuren von anderen Bestandteilen, wie z.B. Proteinen, mittels PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 2.4.8.) oder CI (Chloroform/Isoamylalkohol; 2.4.8.) getrennt werden. Dabei ist es wichtig, dass der Salzgehalt der Nucleinsäure-Lösung während der Extraktion nicht zu hoch eingestellt ist, da die Nucleinsäuren als Nucleinsäure-Salze in der organische Phase gelöst werden können und zu einem Verlust der Nucleinsäure führen kann. Die Extraktion wurde entsprechend den Angaben in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### **2.12.5. Restriktionsspaltung von DNA**

1 - 2 µg DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl behandelt. Als Puffer dienten die von den Herstellern gelieferten Lösungen für optimale Enzymaktivität. Die Ansätze wurden mit ein- bis zweifachem Enzymüberschuß in Bezug auf die Enzymaktivität bei entsprechenden Temperaturoptima für mindestens 1 h inkubiert.

## **2.12.6. Präparation genomischer, pflanzlicher DNA**

### **2.12.6.1. Präparation genomischer, pflanzlicher DNA für PCR**

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Präparation dienten pflanzliche Gewebe, die nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren worden waren. Deutlich bessere Präparations-Ergebnisse wurden mit lyophilisiertem Material erzielt. Dazu wurde das geerntete Material in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach für zwei Tage gefriergetrocknet. Dieses lyophilisierte Material konnte, ohne sichtbare Degradation der DNA, bei Raumtemperatur weiter gelagert werden.

Das homogenisierte Material wurde mit einer auf CTAB-Extraktion basierenden Methode aufgearbeitet (Kilby und Furner, 1990). Bei dieser Präparationsmethode wird ein CTAB (Cetyl-trimethyl-Ammoniumbromid)-haltiger Puffer verwendet.

### **2.12.6.2. Präparation genomischer DNA aus *P. patens***

Der hohe Wassergehalt der axenischen *P. patens* Kulturen machte den Aufschluß des Gewebes zur Extraktion von DNA besonders schwierig. Das schnelle Einfrieren in flüssigem Stickstoff führte bei dem filamentösen Protonema während des Aufschlusses zu einem Zusammenklumpen des Gewebes, so dass die rasche Suspension in den entsprechenden Puffern nicht gewährleistet werden konnte und zur Degradation der Nucleinsäuren führte.

Aus diesem Grund wurde das gefrorene Gewebe in einem Verhältnis von 1 : 1 (w/w) mit Trockeneis in einer handelsüblichen Kaffeemühle für ca. 30 s zerkleinert. Das erhaltene Homogenat aus Trockeneis und Moosgewebe wurde ü.N. in einem Gefrierschrank bei -20 °C gelagert, damit das Trockeneis sublimieren kann. So wird ein feines, gefrorenes Gewebepulver erhalten, das sich auch für die Präparation genomischer DNA nach der unter 2.12.6.1. beschriebenen Methode eignet.

Giavalisco (1999) sowie Schaefer und Zryd (2001) empfehlen eine modifizierte Methode der DNA-Präzipitation durch "aussalzen" mittels CTAB nach Rogers und Bendich (1988).

### **2.12.6.3. Präparation genomischer pflanzlicher DNA zur schnellen Genotypisierung**

Zur schnellen Präparation genomischer pflanzlicher DNA wurde 10 - 100 mg Pflanzengewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 50 - 500 µl Extraktions-Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 M NaCl) versetzt und mit einem kleinen Pistil, oder Spatel zerquetscht. Die unlöslichen Pflanzenteile wurden durch Zentrifugation in einer

Tischzentrifuge (10 min bei 13000 rpm.) sedimentiert. der Überstand konnte sofort für die PCR verwendet werden (modifiziert nach persönlicher Mitteilung, Kenneth Berendzen).

### **2.12.7. Agarose-Gelelektrophorese**

Horizontale Gele wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht von 320 nm Wellenlänge, das das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, sichtbar gemacht. Die Gele wurden fotografisch dokumentiert.

### **2.12.8. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Horizontale Pulsfeldgele wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Dabei wurde 0,5 % bis 1,5 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Lösung durch Erhitzen gelöst. Die handwarme Agarose-Lösung wurde in eine entsprechende Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Das erstarrte Gel wurde in die Pulsfeldgelelektrophorese-Kammer gesetzt und der Probenkamm wurde entfernt. Die Elektrophoresekammer sowie das angeschlossene Kühlaggregat und die Versorgungspumpe wurden mit 0,5x TBE-Lösung gefüllt, so dass das Gel vollständig von Puffer bedeckt wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt. Durch das gleichzeitige Auftragen von selbstangefertigten Größenstandards aus gespaltener, ungespaltener und mit sich selbstligierender Lambda- $\lambda$ -Phagen-DNA wurde die Abschätzung der aufgetragenen DNA-Menge für Fragmentgrößen von 5 kb bis 200 kb möglich. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele in eine Wanne, gefüllt mit Ethidiumbromidlösung der Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , überführt. Die DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht von 320 nm Wellenlänge, das das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, sichtbar gemacht. Die Gele wurden fotografisch dokumentiert.

Um eine Auftrennung zwischen 5 kb und 1000 kb zu erreichen, wurde die PFGE (Apparatur von Pharmacia, Freiburg) bei einer konstanten Laufpuffertemperatur von 14 °C, einem Winkel von 120° und bei einer Spannung von 150 V für 12 bis 17 h durchgeführt. Dabei betrug die Pulsfrequenz konstant 15 s.

### **2.12.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die Extraktion von im Agarose-Gel aufgetrennten DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Nucleospin Extract - Kit der Firma Macherey & Nagel, Düren, nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.12.10. Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht das spezifische Kopieren von DNA-Fragmenten *in vitro*. In einer PCR werden mit Hilfe von flankierenden Oligonucleotiden (Primer), einer hitzestabilen DNA-Polymerase und eines speziellen, programmierbaren Heizblocks (Thermocycler) DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert. Dabei werden die DNA-Stränge durch Erhitzung auf 95 °C voneinander getrennt (Denaturierung). Bei einer speziellen Temperatur, die von der Sequenz-Zusammensetzung der Primer abhängig ist, können diese Oligonucleotide an komplementären Strängen der Matrizen-DNA hybridisieren (Annealing) und bilden so die essentielle Doppelsträngige DNA, welche von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen erkannt werden kann. Abschließend erfolgt die Synthese der Zielsequenzen durch Verlängerung dieser Doppelstrang-DNA (Elongation), mit Hilfe der hitzestabilen Polymerase bei deren Teperaturoptima (72°C für Taq- bzw. 68°C für Pfu-Polymerasen). Dieser Vorgang wird 25-40 fach wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenzen kommt.

#### 2.12.10.1. Thermocyclerprogramme

Es wurden verschiedene Thermocyclerprogramme verwendet, die im Prinzip nur leichte Modifikationen des folgenden Standard-PCR-Programm entsprachen. Je nach Anwendung wurde die Annealing und die Elongationszeit variiert werden.

Denaturierung	94°C	0'45 min	
Denatierung	94°C	0'45 min	} 25-40x
Annealing	58°C	0'45 min	
Elongation	72°C	0'45 min bis 2,5 min	
Endelongation	72°C	4 min	

Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes gewählt. Dabei geht man davon aus, das die Polymerase ca. 1 kb bis 1,5 kb pro min synthetisiert. Als Annealing-Temperatur wurde standardmäßig 58 °C gewählt, da meistens Primer mit einem GC-Gehalt von 50 % eingesetzt wurden.

#### 2.12.10.2. Amplifikation von DNA mittels Temperaturgradienten-PCR

Bei der Verwendung von Primern, welche eine erheblich abweichende Länge oder einen unterschiedlichen G/C-Gehalt besitzen, ist es sinnvoll eine gemeinsame Temperatur für ein gutes Annealing zu finden, so dass eine optimale Amplifikation

hinsichtlich der Spezifität und Quantität der PCR-Produkte erreicht werden kann. Für eine solche PCR wurde eine Gradientenfunktion für die Annealingtemperatur von 53°C bis 63°C verwendet.

Für die Verwendung degenerierter oder spezifischer Primer auf heterologe Matrizen-DNA, z.B. spezifische Primer aus *Arabidopsis thaliana* auf Matrizen-DNA aus *C. rubella*, wurde eine Gradientenfunktion für die Annealingtemperatur von 45°C bis 64°C verwendet.

Für die Amplifikation auf Matrizen-DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine Gradientenfunktion für die Annealingtemperatur von 42 °C bis 70 °C verwendet.

Da die Ezymaktivität der DNA-Polymerasen bei höheren Temperaturen rascher abnimmt, kann es sinnvoll sein, die Inkubationszeit zyklweise zu verlängern. So wurden bei einigen Temperaturgradienten-PCRs mit degenerierten Primern auf heterologer Matrizen-DNA das Annealing und die Elongation ab der 15. Wiederholung der Schleife um je 5 s verlängert.

Wenn mit einer Temperatur des Gradienten optimale Ergebnisse erzielt wurden, wurde die Reaktion ohne Gradient mit dieser festen Temperatur wiederholt.

#### **2.12.10.3. RAGE (Rapid-Amplification of Genomic Ends)**

Bei der RAGE handelt es sich um eine Methode basierend auf der PCR zur Amplifikation unbekannter 5'-genomischer Sequenz (Cormack und Somssich, 1997). Es wurden jeweils 1 µg genomische DNA in verschiedenen Reaktionsansätzen mit diversen Restriktionsendonucleasen gespalten. Die Endonucleasen wurden so gewählt, dass die zu erwartenden Fragmente eine statistische Durchschnittlänge von 1 kb bis 3 kb aufweisen. Für die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase Reaktion wurde ausschließlich dATP-Nucleotide verwendet, so dass in der nachfolgenden PCR der oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primer verwendet werden konnte.

#### **2.12.10.4. inverse Polymerase-Kettenreaktion (iPCR)**

Bei der iPCR handelt es sich um eine PCR-Methode zur Amplifikation flankierender, unbekannter DNA ausgehend von bekannter Sequenzinformation (Triglia *et al.*, 1988 ). Die Methode basiert auf der spezifischen Restriktionsspaltung und Religation der linearen Spaltungsprodukte einschließlich der bekannten Sequenz zu einer ringförmigen DNA. Diese dient in einer nachfolgen PCR als Matrizen-DNA.

#### **2.12.10.5. Reaktionsansätze**

Die Reaktionsgemische der PCR waren wie folgt zusammengesetzt:  
(50 µl Reaktionsvolumen)

5 µl	10x Puffer
5 µl	dNTP Mix (je 2,5 mM dCTP, dATP, dTTP und dGTP)
2 µl	Sinn Primer
2 µl	Gegensinn Primer
1 µl	Matrizen-DNA
0,2 µl	DNA-Polymerase
35 µl	dH <sub>2</sub> O

Die Matrizen-DNA wurde stets so verdünnt, das 1 µl DNA-Lösung pro PCR (50µl) eingesetzt werden konnte. Für mehrere PCR-Ansätze wurde stets ein Mastermix angesetzt, so dass Fehler durch ungenaues Pipettieren minimiert werden konnten.

#### **2.12.10.6. FailSafe-PCR**

Die FailSafe-PCR wurde mit dem FailSafe-PCR *PreMix Selektion* Kit nach Angaben des Herstellers EPICENTRE TECHNOLOGIES, Madison, USA, durchgeführt.

#### **2.12.11. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten erfolgte durch die im MPIZ-Köln ansässige Arbeitsgruppe für Automatische DNA-Isolierung und Sequenzierung (ADIS-Unit) in ABI-Sequencing Automaten. Es wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Anstelle radioaktiv markierter ddNTPs finden Fluoreszenzmarkierte ddNTPs Verwendung.

#### **2.12.12. Präparation von RNA aus pflanzlichen Geweben**

Die Präparation von RNA aus pflanzlichen Geweben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant-Extraction - Kit der Firma Qiagen, Hilden, sowie mit dem Nucleospin RNA-Extract Plant - Kit der Firma Macherey & Nagel, Düren.

Für die Präparation von Gesamt-RNA für die Reverse-Transkriptase-Reaktion (2.12.13.1.) wurde die Extraktionslösung RNAwizz der Firma Ambion, Wiesbaden, entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der Trennung von Nucleinsäuren und Proteinen auf Grund ihrer physikalisch-chemischen

Eigenschaften, die eine Kontamination der einzelnen Extrakte nahezu ausschließt. RNAwizz enthält eine phenolische Hochsalzlösung auf MOPS-Basis. Für die Extraktion von RNA aus *P. patens* wurde pro Gewebeprobe die doppelte Menge RNAwizz verwendet.

### **2.12.13. cDNA-Synthese und RT-PCR**

Es wurde ausschließlich die "Zwei Schritt"-reverse-Transkriptase-PCR durchgeführt. Der erste Schritt besteht aus der reversen Transcription der RNA zu einem Strang cDNA, welche in einem zweiten Schritt, in einer PCR als Matrize verwendet wird. Dieses Vorgehen hat sich besonders in quantitativen Analysen der Transkriptmengen als reproduzierbarer herausgestellt, als die "Ein Schritt"-RT-PCR.

#### **2.12.13.1. cDNA-Synthese**

Zur cDNA-Synthese wurde mit Hilfe eines oligo-dT-Primers und dem Enzym Reverse-Transkriptase (Superscript II; Invitrogen, Heidelberg) eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Dabei wurde Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt. Aufgrund der Spezifität des oligo-dT-Primers wurden nur die polyadenylierten mRNAs als Matrize für die cDNA-Synthese verwendet.

Die 2 µg bis 5 µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit der entsprechenden Menge an oligo-dT-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 65°C denaturiert, für weitere 10 min bei RT abkühlen gelassen und anschließend auf Eis gelagert. Dann wurden die übrigen Puffer, Nucleotide und die Reverse Transkriptase entsprechend den Anweisungen des Herstellers zugegeben und auf einen Reaktionsansatz von 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird zur reversen Transkription für 1,5 h bis 2 h bei 42°C inkubiert. Danach wird das Volumen auf 100 µl bis 200 µl aufgefüllt. Die cDNA-Konzentration wurde so eingestellt, dass für die nachfolgende PCR 1 µl DNA-Lösung ausreichte. Diese cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **2.12.13.2. Qualitative Analyse von Transkripten mittels saturierter RT-PCR**

Für die RT-PCR wurde 1 µl der cDNA in eine PCR mit zwei genspezifischen Primern eingesetzt.

Zur qualitativen Analyse von Transkripten mit sequenzspezifischen Primern sowie zum Auffinden noch unbekannter Transkripte durch die Verwendung degenerierter Primerpaare, wurden saturierte RT-PCR-Ansätze mit 35 bis 40 Zyklen durchgeführt.

### **2.12.13.3. Quantitative RT-PCR zur Abschätzung von Transkriptmengen**

Zur Quantitativen Analyse zur Abschätzung von Transkriptmengen wurden RT-PCR-Ansätze mit 25 bis 32 Zyklen durchgeführt. Dazu wurden für die genspezifischen Transkripte Zyklenanzahlen von 22 bis 32 für die RT-PCR getestet, um den Bereich der exponentiellen Produktakkumulation zu bestimmen. Für die genspezifischen Produkte *PpWRKY20*, *PpWRKY16*, *Pp18S* rDNA sowie für *AtActin3* wurden Southern Analysen (2.12.14.) durchgeführt und die Membrane mit radioaktiv-markierten spezifischen Gensonden hybridisiert. Eine Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte durch "Belichten" und Auslesen eines Phospho-Imager „screens“ and der anschließenden Analyse anhand des Phospho-Imager Programms ImageQuant. Das einfach-logarithmische Auftragen der Werte führte zu einem linearen Verlauf der Produktamplifikation für alle vier getesteten Transkripte in einem Bereich zwischen 22 und 30 Zyklen.

Aus diesem Grund wurden alle quantitativen RT-PCR-Experimente zunächst mit 28 Zyklen in der PCR durchgeführt. Für schwach exprimierte WRKY-Gene wurden im Einzelfall Zyklenanzahlen bis zu 32 Wiederholungen angewendet.

In der Regel wurde jede RT-PCR zur quantitative Analyse zeitgleich zweimal durchgeführt, wobei identische Reaktionsansätze mit verschiedenen Mengen an eingesetzter Matrizen-cDNA Verwendung fanden. Desweiteren stammen die Proben zur quantitative Analyse aus mindestens zwei unabhängigen Parallelexperimenten.

### **2.12.14. Southern-Analyse**

#### **2.12.14.1. Alkalischer Desoxyribonucleinsäure-Transfer (Southern-Blot)**

Immobilisierte, einzelsträngige Desoxyribonucleinsäuren können für verschiedene Hybridisierungstechniken verwendet werden. In allen Hybridisierungsexperimenten dienten Nylonmembranen als Matrix für den Transfer und die Immobilisierung.

Die Plasmid-, BAC-Cosmid- sowie Lambda- $\lambda$ -Phagen-DNA wurde wie beschrieben präpariert und mit Restriktionsenzymen gespalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA in einem 0,8 %igem Agarosegel wurde dieses zunächst mit Ethidiumbromid für wenige Minuten nachgefärbt und anschließend fotografiert.

Die Durchführung des Southern-Blot erfolgt gemäß Sambrook *et al.* (1989).



#### **2.12.14.2. Präparation von genspezifischen Sonden**

Zur Herstellung von genspezifischen Sonden wurde die PCR-Technologie (2.12.10.) verwendet. Als Matrize wurden Plasmide, die die entsprechende cDNA enthalten, oder genomische Pflanzen-DNA verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kit's von Oligonukleotiden, Nukleotiden und Salzen des PCR-Ansatzes getrennt. Diese gereinigten PCR-Produkte konnten direkt radioaktiv markiert und in eine Southern-Hybridisierung eingesetzt werden. Für Southern Experimente mit Plasmid-DNA sind solche Sonden in der Regel spezifisch genug. Für genomische Southernexperimente sind klonierte Proben besser geeignet.

#### **2.12.14.3. Radioaktive Markierung von DNA-Molekülen**

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden, zu denen sowohl Restriktionsspaltprodukte aus unterschiedlichen Klonen als auch PCR-Fragmente genutzt wurden, erfolgte unter Verwendung des Ready-To-Go-Kits der Firma Pharmacia. Als Radioisotop wurde ausschließlich [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP benutzt. Die Reinigung von DNA-Sonden fand über einen Gelfiltrationsschritt mit Sephadex G50 statt.

Alternativ wurden radioaktiv markierten Sonden nach einem Protokoll von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) unter Verwendung des Klenow-Fragmentes (2.5.2.1.) hergestellt.

Der Einbau radioaktiv markierten dCTP in die DNA-Sonde Radioaktivität wurde anhand eines Aliquots des Eluats in einem Szintillationszähler bestimmt.

#### **2.12.14.4. Hybridisierung von Membran-gebundener DNA**

Die Membran wurde zuvor mit 10 ml bis 15 ml des Hybridisierungspuffers zusammen mit unspezifischer DNA (2.4.5.) vorhybridisiert. Diese Prähybridisierung wurde für ca. 4 h bei 65°C durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte in der Prähybridisierungslösung nach Zugabe der radioaktiv markierten und denaturierten Sonde für 12 h - 16 h bei der selben Temperatur.

#### **2.12.14.5. Waschbedingungen**

Nach der Hybridisierung wurde die Sonde abgossen und für eine spätere Wiederverwendung in einem 50 ml Reaktionsröhrchen bei -20°C gelagert. Alle Membranen wurden zweimal mit der vorgewärmten Waschlösungen 1 und einmal mit der Waschlösung 2 bei 60 bis 65°C für jeweils 20-30min gewaschen. Danach wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingewickelt.

#### **2.12.14.6. Exposition**

Abhängig von der Signalstärke, die mit einem Berthold-Zählrohr abgeschätzt wurde, sind die Membranen 30 min bis 7 Tage bei -80°C in Autoradiographiekassetten mit Verstärkerschirmen exponiert worden. Für sämtliche Experimente wurden Kodak Bio-Max Filme verwendet. Nach der Exposition mit den Röntgenfilmen wurden die Membranen bei -20°C weiter gelagert.

Für die Quantitative Analyse von RT-PCR-Fragmenten nach einer Southern Analyse (2.12.13.3.) sowie für die Auswertung der Hybridisierung der Cosmid-Bibliothek-Membranen mit genomischer DNA aus *P. patens* (2.9.3) wurden Phospho-Imager "screens" belichtet, auf einem STORM860-Scanner, Molecular Dynamics, Sunnyval, USA, ausgelesen und der anschließenden Analyse anhand des Phospho-Imager Programms ImageQuant unterzogen.

#### **2.12.14.7. Mehrfache Hybridisierung einer Southern-Membran**

Bevor eine Southern-Membran, z.B. eine der Membranen der genomischen Cosmid-Bibliothek von *P. patens* (2.9.3.), mit einer weiteren Sonde hybridisiert wurde, wurde sie zweimal für 10 min bei RT in einer Lösung aus 0,1 M NaOH, 10 mM EDTA und 0,1 % SDS unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran einmal mit Wasser der Milli-Q®-Qualität gespült und dann zweimal für 10 min in 5x SSPE unter kontinuierlichem Schütteln gewaschen.

Die Membran wurde dann mit einem Berthold-Zählrohr überprüft.

Die Membran kann jetzt getrocknet werden und entweder in einer Plastiktüte verpackt bei 4°C gelagert oder erneut hybridisiert werden.

#### **2.13. Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek aus *P. patens***

Die Membranen der genomischen Cosmid-Bibliothek von *P. patens* (2.9.3.) werden wie normale Southern-Membrane prähybridisiert und hybridisiert. Die Membranen werden anschließend zweimal stringent gewaschen. Für die Auswertung der Hybridisierung der Cosmid-Bibliothek-Membranen mit genomischer DNA aus *P. patens* wurden Phospho-Imager "screens" belichtet, auf einem STORM860-Scanner, Molecular Dynamics, Sunnyval, USA, ausgelesen und der anschließenden Analyse anhand des Phospho-Imager Programms ImageQuant unterzogen. Putativ positive Klone wurden über Andrew Cumings, PEP - Physcomitrella EST Programme, University of Leeds, Leeds, England, bezogen.

## **2.14. Arbeiten mit Lambda-l-Phagen**

Die Anzucht der Lambda- $\lambda$ -Phagen der Lambda-Bibliothek mit genomischer DNA aus *P. patens* (2.9.1.) erfolgte ausschließlich im Bakterienstamm XL1-blue MRA (P2), wohingegen beide Lambda-Bibliotheken mit cDNA aus *P. patens* nur im Bakterienstamm XL1-blue MRF' vermehrt wurden. Beide Stämme sind modifiziert, um die Stabilität gegenüber methylierter DNA zu gewährleisten.

### **2.14.1. Anzucht der Wirts-Bakterienstämme**

Die Anzucht der Wirtsbakterien erfolgte nach den Angaben des Vertreibers Stratagene, Heidelberg.

### **2.14.2. Infektion der Wirts-Bakterienstämme mit Lambda-l-Phagen**

Die angegebenen Mengenverhältnisse beziehen sich auf je eine Platte NZYM-Medium (in Petrischalen von  $\varnothing$  9 cm).

- Pro Platte werden 3 ml flüssigen NZYM-Topagar in einem Wasserbad auf 48°C vorgewärmt.
- Jeweils 250  $\mu$ l Suspension an Wirts-Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> werden mit 1  $\mu$ l Phagen-Suspension vermischt und für 15 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.
- Jeweils 3 ml Topagar werden zu der Bakterien-Phagen-Suspension gegeben und sofort gleichmäßig auf einer Platte NZYM-Medium verteilt.
- Die Platten wurden nicht länger als 8 h bei 37°C inkubiert, so dass die erhaltenen Plaques nicht größer als 1 - 2 mm waren.

### **2.14.3. Ernten der Lambda-l-Phagen**

Über Nacht inkubierte Platten mit Plaques entsprechender Größe und Häufigkeit werden mit 2 bis 4 ml SM-Medium überschichtet und für mehrere Stunden bei 4°C leicht geschüttelt. Nach mindestens 4 h werden 10  $\mu$ l bis 20  $\mu$ l Chloroform zugegeben, um eine vollständige Lyse der Bakterien zu gewährleisten. Die Suspension wird bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert, um Zellbruchstücke und Topagar zu sedimentieren. Der Überstand wird abgenommen, mit 5 % Chloroform versetzt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **2.14.4. Durchmustern der Lambda-l -Phagen-Bibliotheken**

Das Durchmustern der Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken erfolgte nach den Angaben des Vertreibers der Wirtsbakterien Stratagene, Heidelberg, oder nach Sambrook *et al.* (1989).

Die Durchmusterung wurde über drei Runden durchgeführt, um sicher identifizierte Einzel-Phagen-Klone zu erhalten.

#### **2.14.5. Präparation von Lambda-l -Phagen-DNA im präparativen Maßstab**

- Ein Infektionsansatz bestehend aus 15  $\mu$ l Phageneluat wird mit 100  $\mu$ l Wirtsbakterien in 500  $\mu$ l SM-Puffer für 20 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.
- Der Infektionsansatz wird in 25 ml L-Medium gegeben und ü.N. bei 37°C geschüttelt.
- Die Bakterien sollten nahezu vollständig lysiert worden sein und am Boden des Gefäßes als klumpiges Sediment zu sehen sein.
- Dieses Anzuchtmedium wird bei 4000 rpm in einer Bodenzentrifuge für 15 min zentrifugiert.
- Das Sediment wird verworfen, der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 10  $\mu$ l RNase (10 mg/ml) sowie 50  $\mu$ l DNase (2 mg/ml) versetzt. Dieses Gemisch wird bei 37°C für 1,5 h inkubiert.
- Der erhaltenen Phagensuspension wurde 25 ml einer Lösung aus 20 % PEG 6000 und 2 M NaCl in SM-Medium zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert, um die Phagen zu präzipitieren.
- Der Präzipitationsansatz wird für 20 min bei 4°C und 4000 rpm in einer Bodenzentrifuge zentrifugiert.
- Das Phagensediment wird gut getrocknet (mit Kleenex auswischen) und anschließend in 2,5 ml SM-Puffer resuspendiert (Vortex)
- Anschließend werden 25  $\mu$ l 10 % SDS und 50  $\mu$ l 250 mM EDTA zugegeben und bei 65°C für 15 min inkubiert.
- Die so erhaltenen Phagensuspension wurde je einmal mit PCI und CI (2.12.4.) extrahiert und die Lambda- $\lambda$ -Phagen-DNA mit Isopropanol (2.12.3.) gefällt.
- Die erhaltene Lambda- $\lambda$ -Phagen-DNA wurde anschließend zweimal mit kaltem Ethanol gewaschen (2.12.2.) und in 150  $\mu$ l Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

#### **2.14.6. Subklonieren von Lambda-l -Phagen**

Jeweils 1 µg der Lambda-λ-Phagen DNA der genomischen Bibliothek aus *P. patens* wird mit *SacI* und *XbaI* in 50 µl Volumen gespalten. Die Restriktionsspaltprodukte werden in einer Southern-Analyse (2.12.14.) mit einer spezifischen Probe hybridisiert, so dass das Spaltprodukt mit entsprechender Größe identifiziert und aus dem Agarosegel eluiert werden kann. Die isolierten Fragmente wurden in den zuvor mit kompatiblen Restriktionsenzymen gespaltenen pBluescript ligiert und in *E. coli* transformiert.

#### **2.14.7. Direktes Sequenzieren von Lambda-l -Phagen-DNA**

Die direkte Sequenzierung von Lambda-λ-Phagen-DNA erfolgte durch die im MPIZ-Köln ansässige Arbeitsgruppe für Automatische DNA-Isolierung und Sequenzierung (ADIS-Unit) in ABI-Sequencing Automaten. Dabei wurden 20 µg Lambda-λ-Phagen-DNA als Matrize für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Ausserdem wurde die Sequenzierung unter Verwendung eines speziellen Programms durchgeführt (ADIS, persönliche Mitteilung)

#### **2.15. Arbeiten mit *P. patens***

Da Moose aus einzelnen Zellen vollständig regenerieren können und um die Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen zu minimieren, wurden alle Geräte nach ihrer Verwendung ü.N. in 1x SDS gelegt, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschliessend autoklaviert. Zu entsorgendes Moosgewebe auf Platten oder in Suspensionen wurde zuvor immer Autoklaviert.

##### **2.15.1. Allgemeine Anzuchtbedingungen von *P. patens***

Protonema und beblätterte Sporophore von *P. patens* wurden ausschließlich in axenischer Kultur auf Festmedium kultiviert. Dazu wurden Gewebestücke der entsprechenden Lebensphase in der Regel auf PPNH<sub>4</sub>-Medium verteilt, die in wenigen Wochen wieder zu vollständigen Sporophoren regenerierten.

Überwiegend wurde die homogene, filamentöse Lebensphase des Moooses, das Protonema, in axenischer Gewebekultur propagiert.

---

Kulturbedingungen in der Phytokammer:

Photoperiode 16 h, Photonenflußdichte  $350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

Temperatur 24°C Tag, 18°C Nacht

Pflanzenschutzmaßnahmen entfallen.

#### **2.15.1.1. Anzuchtbedingungen und Vermehrung von Protonema in axenischer Kultur**

Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit des Protonemas bildet das Moos nach einer Zeit von 6 bis 10 Tagen Knospen der beblätterten Sporophore aus. Dies ist abhängig von der Art des verwendeten Mediums. Zu diesem Zeitpunkt muss das Protonema mit einem sterilen Spatel geerntet werden, um eine homogene Gewebekultur zu behalten. In einer Suspension aus 10 ml dH<sub>2</sub>O wird das Protonema aus 1 bis 4 Gewebekultur-Platten mit einem Polytron PT3100 (Kinematica-Brinkmann/Eppendorf, Luzern-Littau, Schweiz) in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 1 min homogenisiert. Längeres homogenisieren reduziert die Regeneration des Protonemas, wahrscheinlich auf Grund der hohen Temperaturen, die während der Fragmentation im Dispergier-Aggregat des Polytron auftreten.

Um Kontaminationen zu vermeiden sollte das fragmentierte Protonema zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen werden, um durch den groben Zellaufschluß freigesetzte Nährstoffe zu entfernen. Dazu wird das Protonema für 5 min im Reaktionsgefäß absinken gelassen, der flüssige Überstand wird abgenommen und durch das gleiche Volumen dH<sub>2</sub>O ersetzt.

Zur Anzucht des Protonema werden Zellophanscheiben auf die Oberfläche der Festmedien-Platten gelegt, die das Festwachsen des Gewebes verhindern. Die Zellophanscheiben wurden zuvor in dH<sub>2</sub>O getränkt, mehrmals mit frischem dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschliessend autoklaviert. Kurz bevor das Protonema auf die Platten ausgebracht wird, wird die Oberfläche des Mediums mit einer Zellophanscheibe bedeckt. Etwa 2 ml Suspension aus fragmentiertem Protonema werden pro Platte gleichmäßig auf den Zellophanscheiben erteilt und möglichst ohne weitere Aggitation in die Phytokammer überführt.

Den Medien wurde bisweilen Ampicillin zugesetzt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden in der Regel Medien verwendet, denen keine Glucose oder Saccharose zugesetzt worden war. Paralell wurde immer eine Platte mit Glucose angereichertem Medium verwendet, um Kontaminationen frühzeitig erkennen zu können.

Um die Gefahr von Kontaminationen zu reduzieren, wurde außerdem das Dispergier-Aggregat nach Gebrauch zur Reinigung in 1x SDS für mehrere Stunden gewaschen und anschliessend in dH<sub>2</sub>O ü.N. inkubiert. Anschliessend wird das gesamte Aggregat mit 70 % Ethanol gewaschen und der Fragmentier-Kopf ü.N. in 70 % Ethanol inkubiert. Abschliessend wird er in Flaschen feucht autoklaviert und so nicht länger als zwei Wochen gelagert.

#### **2.15.1.2. Anzuchtbedingungen und Vermehrung von Sporophoren in axenischer Kultur**

Die Sporophore des Mooses stellen die beblätterte Lebensphase des Gametophyten dar. Auf Grund der hohen Regenerationsfähigkeit der Moose können Sporophore durch „Kopfstecklinge“ oder aus einzelnen Moosblättchen bereits gewachsener Sporophore auf Medium angezogen werden, indem die Gewebeteile leicht in das Medium der Platte gedrückt wird. Ebenfalls können aus Protonema nach der Knospung Sporophore erhalten werden. Dazu werden entweder bereits gewachsene Sporophore von alten Protonema-Kulturen entnommen und auf frisches Medium umgesetzt oder kleine Büschel aus Protonema 5 Tage alter Protonema-Kulturen werden tief in frisches Medium gedrückt, so dass sofort Sporophore an der Oberfläche des Kulturmediums gebildet werden.

In der Regel wurden die verwendeten Mutanten *Linie#1* und *wrky20-ko#2* (Giavalisco, 1999) durch Auslegen und Regeneration aus „Kopfstecklingen“ oder aus einzelnen Moosblättchen propagiert.

Zur Anzucht mehrerer Hundert Wildtyp-Sporophore zur physiologischen Untersuchung auf biotische oder abiotische Veränderungen wurden überwiegend kleine Büschel aus Protonema zu Induktion von kleinen Gruppen an Sporophoren verwendet.

#### **2.15.1.3. Induktion von Sporophyten zur Gewinnung von Sporen**

Sporophore können durch Kultur unter kühleren Bedingungen zur Bildung von Archegonien und Antheridien angeregt werden. Dazu werden 2 Wochen alte Sporophore auf NO<sub>3</sub>-Medium bei 15°C inkubiert. Nach etwa drei Wochen haben sich in den Achseln der Moosblättchen Gametangien gebildet, so dass die Pflänzchen bis auf die Spitzen mit sterilem dH<sub>2</sub>O bedeckt werden können, um den Austausch der beweglichen Antherozoiden und eine Befruchtung der Eizelle zu ermöglichen. Die Kultur wird weitere 2 bis 3 Wochen bei 15°C inkubiert. Danach wird das Wasser abgossen und wieder in die Phytokammer zurückgestellt. Nach weiteren 2 bis 3 Wochen haben sich in den Blattachsen Sporophyten ausgebildet, die nach zwei

weiteren Wochen, aber noch vor dem Aufplatzen der Sporenkapsel mit einer Pinzette vorsichtig entfernt werden können.

Solche Sporophyten können in wässriger Lösung oder getrocknet bei 4°C gelagert werden.

#### **2.15.1.4. Anzucht von *P. patens* aus Sporen**

Um axenische Kulturen von *P. patens* aus Sporen zu gewinnen können diese entweder sofort (falls sie bereits unter sterilen Bedingungen geerntet wurden) auf Platten ausgebracht werden, oder zunächst Oberflächensterilisiert werden. Dazu können die Sporen – nicht der Sporophyt oder die Sporenkapsel – wie folgt behandelt werden:

Man entnimmt der Sporenkapsel die Sporen, indem die Kapsel mit einer sterilen Pipettenspitze geöffnet und die Sporen herausgedrückt werden. Die Sporen werden für 30 sek. in einem Gemisch aus 9 % Natriumhypochlorid-Lösung und 0,1 % Triton X-100 und anschließend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift werden die Sporen durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert. Schließlich werden die Sporen zweimal mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen und in einem größeren Volumen Wasser auf das mit einer Zellophanscheibe abgedeckten Medium übertragen.

#### **2.15.2. Lagerung von *P. patens***

Beblätterte Gametophyten können auf Platten, die mit Parafilm dicht abgeschlossen wurden für mehrere Monate in der Phytokammer aufbewahrt werden.

Fragmentiertes Protonema kann als wässrige Suspension für etwa ein Jahr im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Dabei ist es wichtig nur wenig und gut gewaschenes Gewebe zu verwenden.

Sporen und Sporophyten in wässriger Lösung eignen sich zur Lagerung von *P. patens* bis zu 2 Jahren bei 4°C.

Getrocknete Sporen und Sporophyten können in Reaktionsgefäßen mit Gummidichtung bis zu mehreren Jahren bei 4°C gelagert werden.

#### **2.15.3. Präparation von Protoplasten aus *P. patens***

Die Arbeiten zur Präparation von Protoplasten aus *P. patens* wurden an einer Steril-Arbeitsbank ohne Licht durchgeführt.

- 10 ml Mannit-Lösung wurden in eine Petrischale gefüllt und Protonema von etwa 5 Platten wird hinzugegeben.
- Anschließend wurden 10 ml 2 % Driselase zugegeben, die Petrischale wurde verschossen und so 30 min inkubiert.



- 
- Diese Suspension wurde durch ein Plastik- oder Metallsieb mit der Maschenweite 100  $\mu\text{m}$  gefiltert und mit 5 ml Mannit-Lösung gewaschen.
  - Nach weiteren 15 min Inkubation wurde die Suspension durch ein Plastik- oder Metallsieb mit der Maschenweite 50  $\mu\text{m}$  gefiltert.
  - Die erhaltene Protoplastensuspension wurde für 5 min bei 600 rpm in einer Bodenzentrifuge zentrifugiert, um die enthaltenen Protoplasten zu sedimentieren.
  - Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Protoplastensediment wurde in 10 ml Mannit-Lösung resuspendiert nochmals mittels Zentrifugation sedimentiert und erneut in Mannit-Lösung aufgenommen.

Diese Protoplastenlösung konnte im Dunkeln bei 4°C für etwa eine Woche gelagert werden.

#### **2.15.4. Transformation von *P. patens* mit Plasmid-DNA**

- Die vorbereitete Protoplastensuspension wurde auf eine Konzentration von etwa  $2 \times 10^6$  Protoplasten pro ml eingestellt (unter dem Mikroskop in Zählkammern auszählen).
- Die Protoplastensuspension wurde für 5 min bei 600 rpm in einer Bodenzentrifuge zentrifugiert, um die Protoplasten zu sedimentieren.
- Jeweils 15  $\mu\text{g}$  (Volumen 30  $\mu\text{l}$ ) der zu transformierenden DNA werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt.
- Das Protoplastensediment wird in 1 ml MMM-Lösung resuspendiert und jeweils 300  $\mu\text{l}$  werden zu der vorgelegten DNA gegeben.
- Sofort wurden 300  $\mu\text{l}$  PEG-Lösung zugesetzt und durch invertieren gemischt.
- Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 45°C für 5 min durchgeführt.
- Danach wurde die Protoplastenlösung für 10 min bei RT abkühlen gelassen.
- Nach und nach Protoplastenmedium zugegeben: etwa 5x 300  $\mu\text{l}$ , dann 5x 1 ml werden im Abstand von ca. 1 min zugefügt und dabei vorsichtig invertiert (ergibt etwa 8 ml Suspension).
- Das Reaktionsgefäß mit der Protoplastensuspension mit Aluminiumfolie lichtdicht verpacken und für 48 h bei RT im Dunkeln stehen lassen.
- Die Protoplasten durch zentrifugieren (5 min, 600 rpm in einer Bodenzentrifuge) sedimentieren, bis auf ca. 3 ml wird der Überstand entnommen und verworfen.
- Das selbe Volumen (ca. 3 ml) Protoplasten-Topagar zugeben und auf drei, Zellophan-bedeckten  $\text{PPNH}_4$  + Mannit-Platten ausplattieren.
- Nach etwa einer Woche werden die Protoplasten auf  $\text{PPNH}_4$ -Selektionsplatten mit der Zellophanscheibe übertragen.

#### **2.15.5. Biolistische Transformation mittels Partikelbeschuss**

Es wurde das *Particle Delivery System* Biolistic-PDS-1000/He nach Angaben des Herstellers BioRad, München, verwendet. Zubehör wurde ausschließlich beim Hersteller des Geräts bezogen. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Bombardierungen wurden *rupture-disks* von 900 psi, Goldpartikel der Größe 1 µm und Wolframpartikel von 0,7 µm verwendet. Das Überdrucksystem wird mit Helium betrieben. Das Bombardieren von Zwiebel- oder Lauch-Epidermiszellen wurde wie das Bombardieren von *P. patens* Protonema nach Cho *et al.*, (1999) durchgeführt. In der Regel wurden insgesamt 6 µg DNA auf den Partikeln präzipitiert.

#### **2.15.6. Untersuchung zur Physiologie von *P. patens* Protonema**

Zur Behandlung von *P. patens* Protonema mit exogenen Gaben an Phytohormonen wurden das Protonema-Gewebe 4 Tage nach der Fragmentation mit der Zellophanscheibe auf PPNH<sub>4</sub>-Platten übertragen, die mit den jeweiligen Hormonen angereichert waren. Das Protonema-Wachstum und die Genexpression wurde nach Inkubation auf PPNH<sub>4</sub>-Platten angereichert mit 50 µM bzw. 100 µM Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>), 100 µM bzw. 200 µM Abscissinsäure (ABA) und 50 µM bzw. 100 µM Salicylsäure (SA) untersucht. Dabei wurden die Zeitpunkte 1 h, 3 h, 6 h sowie 24 h betrachtet.

Das Protonema-Wachstum und die Genexpression unter Hitze- oder Trockenstress wurde untersucht, indem 4 Tage altes Protonema-Gewebe im Licht bei 37°C (Hitzestress) oder im Kulturschrank bei geöffnetem Deckel (Trockenstress) für 0 min, 30 min, 1 h, 3 h sowie 6 h inkubiert wurde.

Exogene Gaben von 10 µM bzw. 25 µM 1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan (ACC), 10 µM bzw. 25 µM Salicylsäure (SA), 10 µM bzw. 25 µM Methyljasmonat (JA) wurden als steril filtrierte Lösungen als feiner Nebel aus einem Zerstäuber direkt auf das Protonema gesprüht. Ebenso wurden Gaben an Flagellin22-Elizitor (flg22) in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM sowie 100 µM appliziert. Behandlungen mit 10 µM nicht funktionellem Flagellin-analogen Peptids sowie 1x Rinderserum-Albumin wurden ebenfalls durch Sprühen von feinem Nebel aus einem Zerstäuber durchgeführt. In der Regel wurden die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h sowie 24 h betrachtet.

Das Protonema-Wachstum und die Genexpression unter UV-Stress wurde untersucht, indem 4 Tage altes Protonema-Gewebe in einem UV-Crosslinker mit UV-Strahlen mit der Energie 10 mJ, 50 mJ, 100 mJ oder ohne UV bestrahlt wurde. Es wurden die Zeitpunkte 3 h, 6 h sowie 24 h betrachtet. zur Kontrolle wurden Gewebepplatten in der Apparatur gestellt, nachdem diese für 20 s in betrieb war. Da unter UV-Licht größere

Mengen an Ozon gebildet werden können, sollten so mögliche Überschneidungen zwischen dem UV- und Ozon-Signalübertragungsweg verringert werden.

Das spezifische Protonema-Wachstum wurde eine Woche nach der jeweiligen Behandlung durch die Gewichtszunahme im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen ermittelt [jeweils 20 Platten von Protonema oder 5 Platten mit je 100 Sporophoren].

Außerdem konnte das relative Wachstum der Sporophore über digitale, chronologische Bilder des Mooses ermittelt werden, indem diese als TIF-Datei in das Bildverarbeitungsprogramm ImageQuant importiert und dort die relativen Flächen der Kolonien über mehrere Wochen hinweg bestimmt wurden.

## **2.16. Arbeiten mit höheren Pflanzen**

### **2.16.1. Allgemeine Anzuchtbedingungen von *A. thaliana* und *C. rubella***

*A. thaliana* und *C. rubella* sind nahe miteinander Verwand und können unter den selben Bedingungen angezogen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Art *C. rubella* etwa 10x so groß werden kann wie *A. thaliana* und deswegen von Anfang an mehr Raum zum Wachsen benötigt.

#### **2.16.1.1. Anzucht von *A. thaliana* und *C. rubella* auf Erde**

Für die Aussaat von *A. thaliana* und *C. rubella* wurde ein Gemisch aus VM-Erde:Agriperl im Verhältnis 4:1 in Plastiktöpfen komprimiert und mit Wasser angestaut. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von etwa 5 (*A. thaliana*) oder 1 (*C. rubella*) Samen pro cm<sup>2</sup> direkt auf die Erde. Zur Stratifikation wurde die Saat für zwei Tage bei 4°C inkubiert. Nach ca. einer Woche nach der Keimung wurden die Pflanzen pikiert. Die Bewässerung erfolgte nach dem Bedarf der Pflanzen und wurde überwiegend durch die Gärtner sichergestellt.

Experimente zur Physiologie und Morphologie der Pflanzenentwicklung wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Kulturbedingungen in der Phytokammer:

Photoperiode	16 h, Photonенflußdichte 450 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperatur	18°C Tag, 18°C Nacht
relative Luftfeuchte	68 %

Kulturbedingungen im Gewächshaus:

Photoperiode	16 h, Photonenflußdichte $450 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperatur	20-24°C Tag, 18-20°C Nacht
relative Luftfeuchte	60 - 70 %

### **2.16.2. Allgemeine Anzuchtbedingungen von *L. esculentum***

Für die Aussaat von *L. esculentum* wurde ein Gemisch aus VM-Erde : Agriperl im Verhältnis 4:1 in Plastiktöpfen komprimiert und mit Wasser angestaut. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von etwa 1 Samen pro  $\text{cm}^2$  direkt auf die Erde. Zur Stratifikation wurden die Samen für 10 min bei 65°C einem Hitzeschock ausgesetzt, dann langsam bei RT abkühlen gelassen und für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach ca. einer Woche nach der Keimung wurden die Pflanzen pikiert. Die Bewässerung erfolgte nach dem Bedarf der Pflanzen und wurde überwiegend durch die Gärtner sichergestellt.

Experimente zur Physiologie und Morphologie der Pflanzenentwicklung wurden unter den selben Kulturbedingungen durchgeführt, wie sie für die Anzucht von *A. thaliana* und *C. rubella* beschrieben wurden.

### **2.16.3. Pflanzenschutzmaßnahmen**

Schädlingpopulationen wurden durch den Einsatz von Nützlingen, Gelb und Blautafeln kontrolliert. Die Nützlingspopulationen wurden nach Angaben des Herstellers (Neudorff) verwendet.

Schädling:

Trauermücken

Blattläuse

Pflanzenschutzmaßnahme:

entomopathogene Nematoden

*Steinernema bibionis*

entomopathogene Schlupfwespen

*Aphidius matricariae*

## **2.17. Arbeiten in vitro mit höheren Pflanzen**

### **2.17.1. Arbeiten in vitro mit *A. thaliana* und *C. rubella***

#### **2.17.1.1. Sterilisation der Samen**

Samen von *A. thaliana* und *C. rubella* wurden kurz in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für 1 min in einem Gemisch aus 9 % Natriumhypochlorid-Lösung und

---

0,1 % Triton X-100 inkubiert. Während dessen wurde das Gefäß mehrfach invertiert. Zusammengeklumpte Samen wurden vorsichtig mit einem Zahnstocher an der Wand des Gefäßes gerieben, so daß die gesamte Oberfläche aller Samen von der Lösung benetzt werden konnte. Die sich am Gefäßboden abgesetzten Samen wurden in ein neues Gefäß überführt, einmal mit autoklavierten Leitungswasser und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. So behandelt wurden die Samen in einem größeren Volumen 70 % Ethanol aufgenommen und auf Filterpapier unter der Sterilbank getrocknet.

#### **2.17.1.2. Anzucht von *A. thaliana* und *C. rubella* auf sterilen Medien**

Oberflächensterilisierte Samen von *A. thaliana* und *C. rubella* wurden auf AM-Platten angezogen. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von etwa 5 (*A. thaliana*) oder 1 (*C. rubella*) Samen pro  $\text{cm}^2$  im oberen Drittel der Platte. Zur Stratifikation wurde die Saat für zwei Tage bei 4°C inkubiert. Nach ca. einer Woche nach der Keimung wurden die Pflanzen pikiert und gegebenenfalls auf neue Platten oder andere Gefäße zur axenischen Kultur überführt.

Experimente zur Physiologie und Morphologie der Pflanzenentwicklung wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Kulturbedingungen in der Phytokammer:

Photoperiode 16 h, Photonendichte  $350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

Temperatur 20°C Tag, 18°C Nacht

Pflanzenschutzmaßnahmen entfallen.

#### **2.17.2. Arbeiten *in vitro* mit *L. esculentum***

##### **2.17.2.1. Sterilisation der Samen**

Samen von *L. esculentum* wurden kurz in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min in einem Gemisch aus 9 % Natriumhypochlorid-Lösung und 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Während dessen wurde das Gefäß mehrfach invertiert. Zusammengeklumpte Samen wurden vorsichtig mit einem Zahnstocher an der Wand des Gefäßes gerieben, so daß die gesamte Oberfläche aller Samen von der Lösung benetzt werden konnte. Die Samen wurden in ein neues Gefäß überführt, einmal kurz mit autoklavierten Leitungswasser und zweimal mit 70 % Ethanol für je 2 min gewaschen. So behandelt wurden die Samen entweder in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit autoklaviertem Leitungswasser überschichtet und bis zu eine Woche bei

4°C gelagert, oder in einem größeren Volumen 70 % Ethanol aufgenommen und auf Filterpapier unter der Sterilbank getrocknet.

#### **2.17.2.2. Anzucht von *L. esculentum* auf sterilen Medien**

Zur Stratifikation wurden oberflächensterilisierte Samen von *L. esculentum* in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit autoklaviertem Leitungswasser überschichtet und für 10 min bei 65°C einem Hitzeschock ausgesetzt, dann langsam bei RT abkühlen gelassen und für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Ein bis zwei Tage vor der Aussaat wurden die Samen bei RT gehalten. So behandelte Samen wurden einzeln mit einer Pinzette auf AM-Platten ausgebracht. Nach ca. zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen pikiert und gegebenenfalls auf neue Platten oder andere, größere Gefäße zur axenischen Kultur überführt.

Experimente zur Physiologie und Morphologie der Pflanzenentwicklung wurden unter den selben Kulturbedingungen durchgeführt, wie sie für die Anzucht von *A. thaliana* und *C. rubella* beschrieben wurden.

#### **2.17.3. Untersuchung zur Physiologie höherer Pflanzen**

Zur Behandlung von *L. esculentum*, *A. thaliana* und *C. rubella* mit exogenen Gaben an Flagellin22-Elizitor in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM sowie 100 µM wurden steril filtrierte Lösungen als feiner Nebel aus einem Zerstäuber direkt auf die Pflanzen gesprüht. In der Regel wurden die Zeitpunkte 3 h, 6 h sowie 24 h gewählt, um Gewebeproben zur Analyse der Genexpression zu entnehmen.

Zur Untersuchung von *L. esculentum*, *A. thaliana* und *C. rubella* unter UV-Stress wurde zwei Wochen alte Pflanzen in einem UV-Crosslinker mit UV-Strahlen mit der Energie 10 mJ, 50 mJ, 100 mJ oder ohne UV bestrahlt. Es wurden an den Zeitpunkten 3 h, 6 h sowie 24 h Gewebeproben zur Analyse der Genexpression genommen.

Das spezifische Wachstum unter den jeweiligen Bedingungen wurde zwei Wochen nach der jeweiligen Behandlung durch die Gewichtszunahme im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen ermittelt.

#### **2.18. Bildbearbeitung und Sequenzanalyse**

Autoradiogramme der Southernblotanalyse und Photos der Agarosegele wurden mit dem SNAPSCAN 1236S mit Durchlichteinheit (Agfa), Dias mit dem Slidescan (Nikon) eingelezen. Dabei wurde als Scan-Software das Programm FotoLook (SA 2.09.6) von Agfa bzw. die Photoshop-Implementierung von Nikon, NikonScan (Version 5.1 G), verwendet. Die weitere Bearbeitung der Abbildungen erfolgte dann mit dem Programm

Adobe Photoshop (Version 6.0). Die Bildbearbeitung bestand in erster Linie in der Wahl des relevanten Bildausschnittes und abgesehen von Kontrast und Helligkeit wurden die Bilder in anderen Parametern nicht mehr als 25 % farblich verändert. Bilddateien wurden in der Regel mit einer Auflösung von 600 dpi für einfache Abbildungen und 1200 dpi für Farbbilder verarbeitet und mit einer mittleren JPEG-oder GIF-Kompression gespeichert.

Zur Sequenzanalyse wurde das GCG-Programmpaket (Version 10.0) der Genetics-Computer-Gruppe der Universität Madison (Wisconsin), auf Unix basierenden Rechnern verwendet. Für einfache Sequenzbearbeitungen wurde das Programm DNA Strider 1.2 auf Apple Macintosh Computern benutzt.

Phylogenetische Analysen wurden mit dem Distanz-Matrix-Algorithmus des Programmes ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) und mit dem PHYLIP-*phylogeny inference program* Packet (von Joe Felsenstein: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) (Felsenstein, 1997) durchgeführt.

Für die weitere Bearbeitung und Analyse wurden folgende, im Internet verfügbare Programme benutzt:

ClustalW	( <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a> )
GenBank NCBI	( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
NCBI Blast	( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a> )
NCBI Genome Blast	( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/PlantBlast.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/PlantBlast.html</a> )
Physcomitrella EST Program PEP	( <a href="http://www.moss.leeds.ac.uk/startpage.html">http://www.moss.leeds.ac.uk/startpage.html</a> )
TAIR	( <a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a> )
Flybase	( <a href="http://www.flybase.org/">http://www.flybase.org/</a> )
RIKEN	( <a href="http://pfgweb.gsc.riken.go.jp/index.html">http://pfgweb.gsc.riken.go.jp/index.html</a> )
ChlamydomonasDB	( <a href="http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/libraries.html">http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/libraries.html</a> )
Oryzabase	( <a href="http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/">http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/</a> )
Rice Genome Program	( <a href="http://rgp.dna.affrc.go.jp/">http://rgp.dna.affrc.go.jp/</a> )
Expasy Proteomics tools	( <a href="http://us.expasy.org/tools/">http://us.expasy.org/tools/</a> )
MIPS	( <a href="http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html">http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html</a> )
Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements Database	( <a href="http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/">http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/</a> )
CyanoBase	( <a href="http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html">http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html</a> )
PantCare	( <a href="http://oberon.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.html">http://oberon.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.html</a> )
<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA Sequences at Sanger center	( <a href="http://afgc.stanford.edu/afgc_html/QueryEST.html">http://afgc.stanford.edu/afgc_html/QueryEST.html</a> )

Prosite ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-in/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-in/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html))

EMBL European Bioinformatics Institute EBI

(<http://www.ebi.ac.uk/>)

Regulatory Sequence Analysis Tools RSA

(<http://embnet.cifn.unam.mx/rsa-tools/>)

TIGR (<http://www.tigr.org>)

TIGR\_Brassica\_Base (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/bog1/>)

GlimmerM (<http://www.tigr.org/software/glimmerm>)

Pfam-Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/>)



## 3. Ergebnisse

---

### 3.1. Charakterisierung der *P. patens* Insertionsmutanten

#### 3.1.1. Morphologische Untersuchung der *wrky20-ko#2*- und *Linie#1*- Mutanten

Die im Vorfeld dieser Arbeit generierten *P. patens* Insertionsmutanten *Linie#1* und *wrky20-ko#2* wurden im Vergleich mit Wildtyp-Moos auf morphologische Unterschiede untersucht (Giavalisco, 1999). Falls das Fehlen des *PpWRKY20*-Transkriptionsfaktors zur Deregulation primärer oder sekundärer Zielgene führt, könnte die phänotypische Analyse der Null-Mutanten *wrky20-ko#2* wesentlich zur funktionellen Charakterisierung des Proteins beitragen.

Der Wildtyp und die *Linie#1*-Insertionslinie, die das *PpWRKY20*-Rekombinationsfragment nicht im *PpWRKY20*-Gen, sondern anderswo im Genom inseriert trägt und somit in bezug auf *PpWRKY20* Wildtyp ist, wurden zeitgleich mit *wrky20-ko#2* kultiviert. Da *PpWRKY20* sowohl im Protonema als auch im Sporophor exprimiert wurde (Giavalisco, 1999), war davon auszugehen, dass ein morphologischer Phänotyp während dieser Lebensphasen zu detektieren sein könnte.

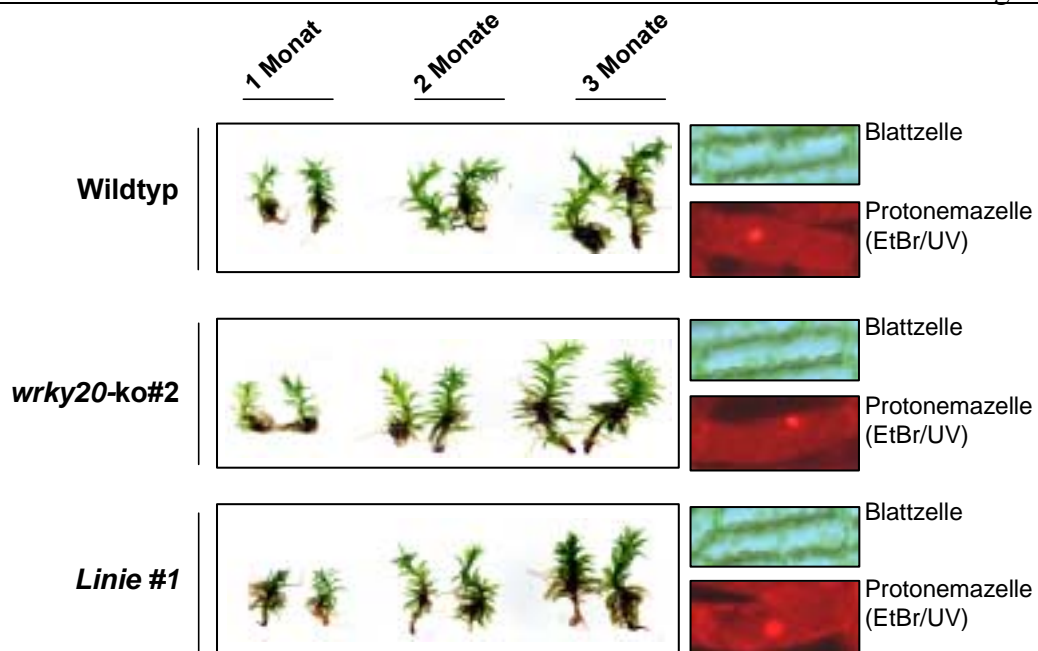
Deswegen wurden Untersuchungen hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit des Protonemas und des Sporophors durchgeführt. Außerdem wurden die Frisch- und Trockenmassen als weitere wachstumsbezogenen Parameter bestimmt. Jedoch konnte bei keiner der beiden Insertionsmutanten eine Veränderung gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.1).

Die Anzahl von Zellen pro Blättchen oder Rhizoid des Sporophors sowie deren Form und Größe sind mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3.1).

Das Längenwachstum des Sporophors und des Protonemas ist ebenfalls unverändert.

Ebenso wurden unter induzierenden Bedingungen zur selben Zeit Sporophyten gebildet, so dass eine Beteiligung von *PpWRKY20* an grundlegenden Entwicklungsprozessen des Mooses, wie etwa dem Generationswechsel, unwahrscheinlich ist.

---



**Abb. 3.1: Phänotyp einer *Physcomitrella patens* Wildtyp-Pflanze, der *wrky20-ko#2*-Null-Mutante und der transgenen Linie *Linie#1*.** Die Bilder zeigen den Habitus des Sporophors (lebensgroß) an drei Zeitpunkten nach der Regeneration aus einem einzelnen Blättchen (links) sowie Detailaufnahmen einer Blattzelle des Sporophor und einer Protonema-Zelle (rechts). Die Protonema-Zellen wurden mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt und die Fluoreszenz unter UV-Licht betrachtet (800 x Vergrößerung).

### 3.1.2. Physiologische Untersuchung von *Linie#1* und *wrky20-ko#2*

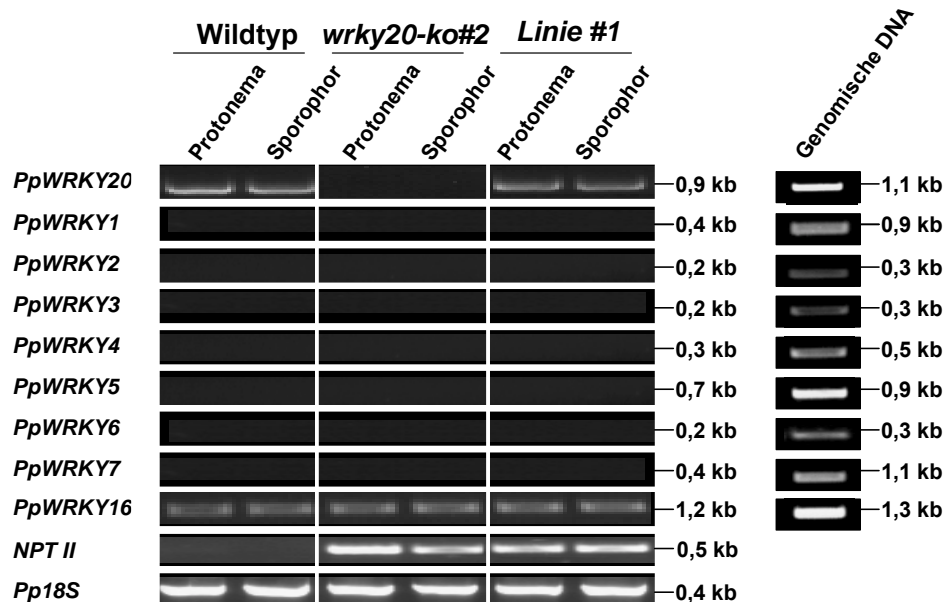
Vor dem Hintergrund einer Beteiligung von WRKY-Proteinen an der Übertragung von biotischen oder abiotischen Stress-Signalen in höheren Pflanzen, wurden Protonema und Sporophore von *Linie#1* und *wrky20-ko#2* sowie von Wildtyp-Moos unterschiedlich lange verschiedenen Konzentrationen von Gibberellinsäure ( $GA_3$ ), Abscissinsäure (ABA), Salicylsäure (SA), 1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan (ACC), Methyljasmonat (JA) und Flg22-Elizitor (flg22) ausgesetzt (2.15.5.). Außerdem wurden die Moos-Linien mit Hitze- oder Trockenstress behandelt.

Nach 7 oder nach 14 Tagen wurden die Moospflänzchen wie zuvor untersucht (3.1.1.). Auch jetzt konnten keine morphologischen Veränderungen gefunden werden, die auf die Deletion des *PpWRKY20*-Gens zurückgeführt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3. Expressionsanalyse von *P. patens* WRKY-Genen in der Insertionsmutante *wrky20-ko#2*

Die Untersuchung der WRKY-Transkriptionsfaktor-Familie in *A. thaliana* hat gezeigt, dass eine teilweise Überlappung der Proteinfunktion zwischen Mitgliedern der WRKY-Proteine vorkommen kann (Aifen Zhou und Bekir Ülker, persl. Mitteilung). Um festzustellen, ob eines der übrigen sieben *P. patens* WRKY-Gene ein verändertes

Expressionsmuster in der *wrky20-ko#2*-Null-Mutante aufweist, wurde eine quantitative RT-PCR-Analyse auf der Basis der bekannten Sequenzinformation durchgeführt. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, konnten keine Veränderung der mRNA-Transkriptmenge der bekannten *P. patens* WRKY-Gene in der *wrky20-ko#2*-Null-Mutanten gegenüber der *Linie#1* und dem Wildtyp gefunden werden.



**Abb. 3.2:** Expression von *PpWRKY*-Genen in verschiedenen Geweben der Mutanten-Linien und des Wildtyps. Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit der verwendeten Primerpaare diente die Kontrollamplifikation mit genomischer DNA aus *P. patens* Wildtyp-Moos als Matrize. Die Identität der Insertionsmutanten wurde durch das Vorhandensein des NPTII-Transkriptes bestätigt. Weiterhin diente die Transkriptmenge der 18S rRNA als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge.

Das Expressionsmuster der *PpWRKY*-Gene wurde ebenfalls nach verschiedenen Behandlungen (3.1.2.) für das Protonema ermittelt. Auch hier konnten keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

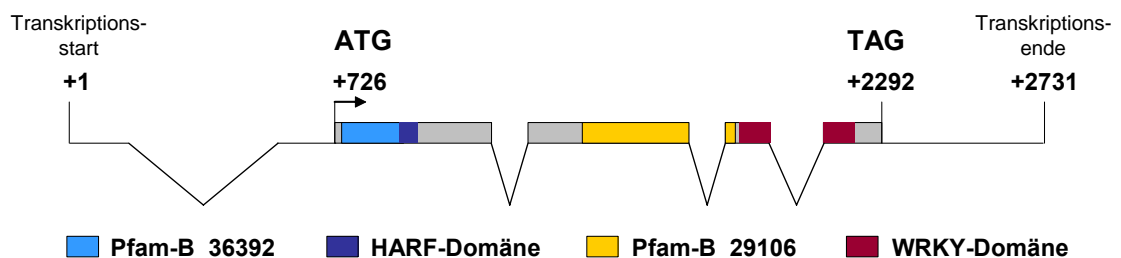
### 3.2. Molekularbiologische Untersuchung des *PpWRKY20*-Gens

#### 3.2.1. Die Struktur des *PpWRKY20*-Gens

Zu Beginn der Arbeit lag ein *PpWRKY20*-cDNA-Klon vor, der ein offenes Leseraster (ORF) von 1972 bp umfasst und damit den gesamten codierenden Bereich für das

*PpWRKY20*-Protein enthält. Der errechnete Wert für das Molekulargewicht beträgt 43,1 kDa und für den pI 9,71. Damit ist *PpWRKY20* recht basisch.

Um die Struktur des *PpWRKY20*-Gens näher untersuchen zu können, wurde die genomische Sequenz des Gens ausgehend von der cDNA-Sequenzinformation mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Anhang A.3). Das *PpWRKY20*-Gen besteht aus fünf Exons und vier Introns wobei eines der Introns im nicht-translatierten 5'UTR liegt (Abb. 3.3). Auf Grund der abgeleiteten Proteinsequenz kann *PpWRKY20* der Gruppe II-WRKY-Transkriptionsfaktoren als Vertreter der Subgruppe IId zugeordnet werden. Charakteristisch für diese Subgruppe ist das Vorhandensein einer weiteren hoch konservierten Domäne, die ausschließlich bei WRKY-Proteinen auftritt und den nahezu invarianten Aminosäurekonsensus GHARFRR besitzt (Eulgem *et al.*, 2000). Vergleichende Analysen der abgeleiteten Proteinsequenz mittels Datenbankrecherche (Pfam-Sanger; Prosite; 2.13.) ergaben zwei weitere Domänen mit hoher Ähnlichkeit zu *PpWRKY20*, die ausschließlich in WRKY-Proteinen zu finden sind und denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (Abb. 3.3). Die erste Domäne hat die Akzession Pfam-B\_36392 (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/>), beginnt kurz hinter dem Translationsstart an Position 15 und endet mit der bereits erwähnten HARF-Domäne an Position 78 der Proteinsequenz. Die zweite Domäne, Akzession Pfam-B\_29106 (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/>), ist weniger konserviert, beginnt an Position 242 und endet an Position 322 aminoterminal vor der WRKY-Domäne.



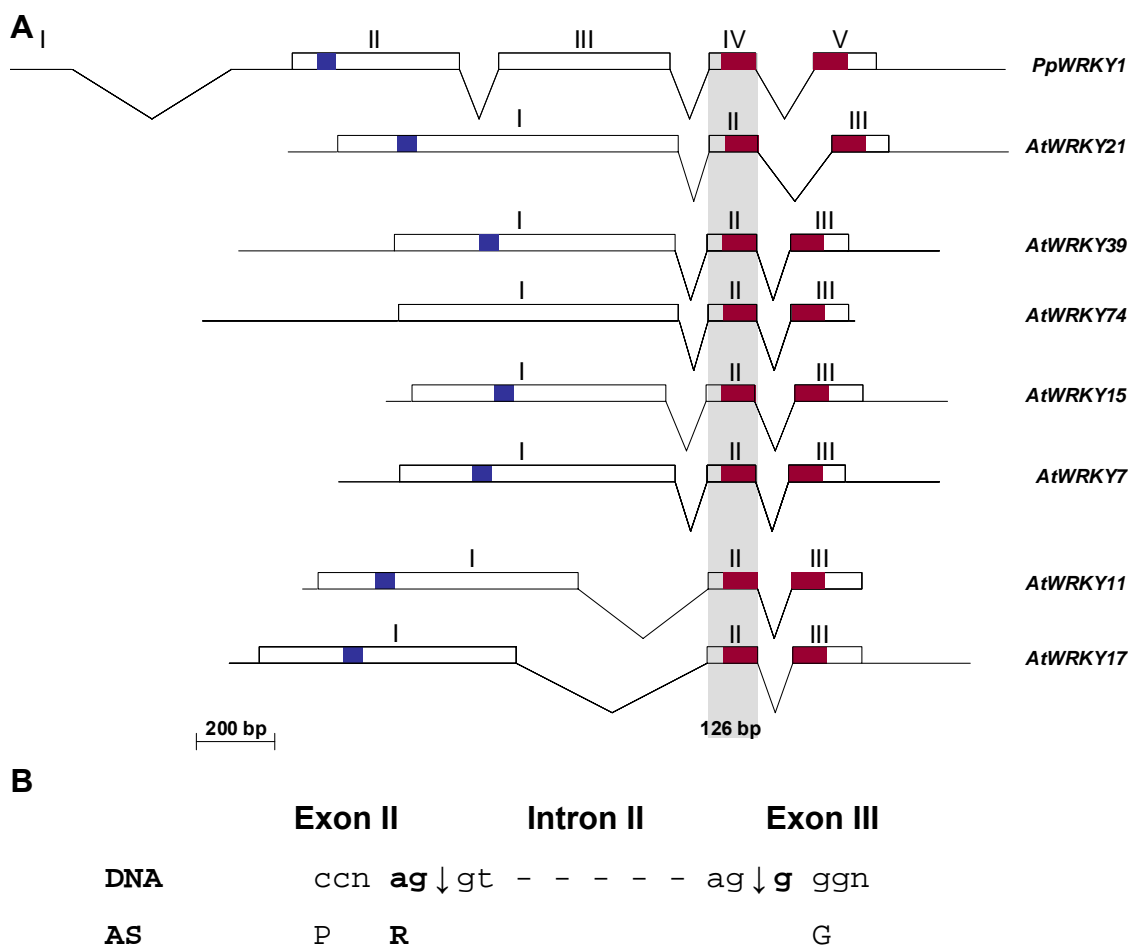
**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur des *PpWRKY20*-Gens.** Die vier konservierten Domänen, die für die WRKY-Transkriptionsfaktoren der Subgruppe IId charakteristisch sind, wurden maßstabsgerecht in verschiedenen Farben dargestellt.

Soweit die Informationen von EST-Projekten aus Pflanzen, vor allem die der Voll-Längen-EST-Sammlung des RIKEN-Instituts aus *A. thaliana* (<http://pfgweb.gsc.riken.go.jp/index.html>), es zulassen, besitzt kein weiteres WRKY-Gen der Subgruppe IId ein Intron im 5'UTR.

Es ist bemerkenswert, dass die Anzahl und die Positionen der Introns sowie die Intron/Exon-Übergänge zwischen den sieben Genen aus *A. thaliana* sowie zwischen diesen und *PpWRKY20* hoch konserviert sind. Wie in Abbildung 3.4A zu sehen, ist das

zweite Intron des *PpWRKY20*-Gens in keinem anderen Gen der höheren Pflanze enthalten. Die sieben Gene besitzen nur zwei Introns in der kodierenden Sequenz und drei Exons, wobei das erste Exon in allen Fällen das jeweils längste ist.

Das Exon IV von *PpWRKY20* ist dem Exon II der *A. thaliana* Subgruppe IId ortholog. Überraschend ist, dass dessen Länge von 126 bp im Laufe der Evolution konserviert geblieben ist. Ein Teil dieses Exons kodiert für den aminoterminalen Bereich der WRKY-Domäne. Das sich 3' anschließende Intron ist ein Phase-2-Intron - der Exon/Intron-Übergang liegt zwischen der zweiten und dritten Base eines Codons (Kolukisaoglu *et al.*, 2002). Das Donor- und Akzeptor- Motiv ist ebenfalls in allen *WRKY*-Genen der Subgruppe IId konserviert, wobei das betroffene Basentriplet immer für ein Arginin (R) kodiert (Abb. 3.4B).



**Abb. 3.4: Maßstabgerechte Darstellung der Intron/Exon-Strukturen der WRKY-Gene der Subgruppe IId.** (A) Intron/Exon-Strukturen der sieben Vertreter der *A. thaliana* WRKY-Gene der Subgruppe IId im Vergleich zum *PpWRKY20*-Gen. Die Sequenzbereiche, welche für die konservierten Domänen kodieren, sind farblich dargestellt: WRKY-Domäne (rot), HARE-Domäne (blau). Das konservierte Exon ist grau hinterlegt. (B) Invarianter Phase-2-Intron-Übergang der *WRKY*-Gene der Subgruppe IId.

### 3.2.2. Die Struktur der HARF-Domäne

Ein Vergleich der vorhandenen Sequenzinformation von *Pp*WRKY20 mit den sieben Vertretern der Subgruppe IId aus *A. thaliana* ergab, dass alle Proteinsequenzen eine Ähnlichkeit zur aminoterminalen Pfam-B\_36392-Domäne zeigten. Überraschend war, dass auch die ersten 15 AS von *Pp*WRKY20 mit denen von *At*WRKY7, *At*WRKY11, *At*WRKY15 und *At*WRKY17 ähnlich waren.

Bei *At*WRKY39 und *At*WRKY74 fehlte der GHARFRR-Konsensus. Bei diesen und auch bei *At*WRKY21 war die Ähnlichkeit der HARF-Domäne zu *Pp*WRKY20 geringer. Ausgehend von der verfügbaren Datenbankinformation wurden 18 HARF-Domänen von WRKY-Proteinen der Subgruppe IId aus 8 verschiedenen Pflanzenarten zur phylogenetischen Analyse herangezogen (siehe Anhang A2.1). Dabei wäre es möglich, die Vertreter dieser Subgruppe in weitere Untergruppen zu teilen. Jedoch können keine sogenannten „informativen Aminosäurepositionen“ zugeordnet werden, die charakteristisch für die eine, aber nicht für die andere Untergruppe sind.

Die HARF-Domäne ist etwa 40 AS lang und ist mit einem errechneten pI um 10 von basischer Natur. Ein aus der phylogenetischen Analyse abgeleiteter Aminosäure-Konsensus lautet wie folgt:

EIT...T...VSKFKRVASLL.RTGHARFRR(G/R)PV

Auffallend ist, dass es nur vier absolut konservierte AS-Positionen gibt (hervorgehoben und unterstrichen). Aminoterminal der HARF-Domäne ist die Sequenz in der Regel reich an Glutamin- und Serinresten, wohingegen sich carboxyterminal ein Bereich mit häufigen Glutamin- und Serin-, aber vor allem Prolinresten anschließt. Auf der Basis dieser Untersuchung muss die Proteinfamilien-Domäne Pfam-B\_36392 (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/>) weiter gefasst werden und schließt nun den N-Terminus der Subgruppe IId-WRKY-Proteine beginnend mit dem Translationsstart bis einschließlich ca. 20 bis 30 AS hinter dem HARF-Konsensus ein. Bisher konnte weder dem GHARFRR-Konsensus noch der Domäne Pfam-B\_36392 eine Funktion zugeordnet werden.

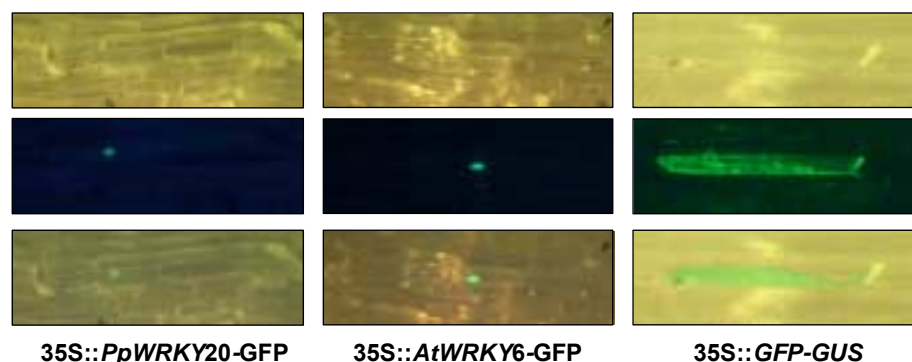
### 3.2.3. Subzelluläre Lokalisation von *Pp*WRKY20

Vor dem Hintergrund der durchgeführten Datenbankrecherche hinsichtlich vorhandener Proteindomänen, wurde gleichzeitig nach vorhandenen Kernlokalisationssequenzen gesucht. Die Domäne Pfam-B\_29106 enthält zwei putative Kernlokalisierungssignale in kurzem Abstand (<sup>269</sup>PTPKKC\_X<sub>21</sub> KRRK<sup>299</sup>). Außerdem könnte der konservierte Aminoterminus der Subgruppe IId auf ein konserviertes Signalpeptid hindeuten. Obwohl für viele *A. thaliana* WRKY-Proteine inzwischen gezeigt werden konnte, dass

sie im Zellkern lokalisiert sind (Bekir Ülker, persl. Mitteilung), muss dies für *PpWRKY20* erst noch gezeigt werden.

Dazu wurde die cDNA-Sequenz von *PpWRKY20* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors am Carboxyterminus translational mit GFP fusioniert. Die Transformation mit dem erstellten Konstrukt *p35S::PpWRKY20-GFP* erfolgte mittels biolistischem Partikelbeschuss mit Gold- oder Wolframpartikel, an deren Oberflächen die Vektor-DNA präzipitiert wurde. Als Kontrollen diente der Vektor *p35S-intron-GFP-GUS*, dessen Genprodukt als Marker für die cytosolische Lokalisation verwendet wurde, sowie ein entsprechendes Konstrukt bei dem *AtWRKY6* aus *A. thaliana* mit GFP fusioniert wurde, von dem bereits bekannt ist, dass es im Kern lokalisiert ist.

Als Testsystem hat sich die heterologe Expression in Epidermiszellen von Zwiebeln oder Lauch bewährt. Nach 8 h und nach 24 h wurde die beschossene Epidermis im UV-Licht betrachtet. In den Geweben beider Pflanzenarten konnte für *PpWRKY20-GFP* die Lokalisation im Zellkern gezeigt werden. Die Expression in Zwiebelzellen war an beiden Zeitpunkten jedoch deutlich schwächer, als die in Lauchepidermiszellen (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Subzelluläre Lokalisation von *PpWRKY20-GFP*.** Heterologe Expression von *PpWRKY20-GFP* in Lauchzellen 24 h nach Partikelbeschuss. Als Kontrolle für die Kernlokalisierung diente *AtWRKY6-GFP*. GFP-GUS wurde als Kontrolle für die cytosolische Expression herangezogen. Die Abbildungen zeigen einen entsprechenden Ausschnitt von Epidermiszellen in lichtmikroskopischer Betrachtung (obere Reihe), unter UV-Licht durch eine GFP-Fluoreszenz Filtereinheit (mittlere Reihe) sowie die Überlagerung beider Bilder (untere Reihe).

#### 3.2.4. Aktivierung der Transkription durch *PpWRKY20* in Hefe

Bei den bisher näher charakterisierten WRKY-Proteinen aus höheren Pflanzen handelt es sich in der Regel um Regulatoren der Transkription, welche sowohl einen stimulierenden als auch reprimierenden Einfluss auf die Expression haben können. Für Proteinregionen, die reich an Glutamin und Serin sind, ist bekannt dass diese putativ aktivierend auf die Expression wirken können. Auf Grund des Vorhandenseins solcher

---

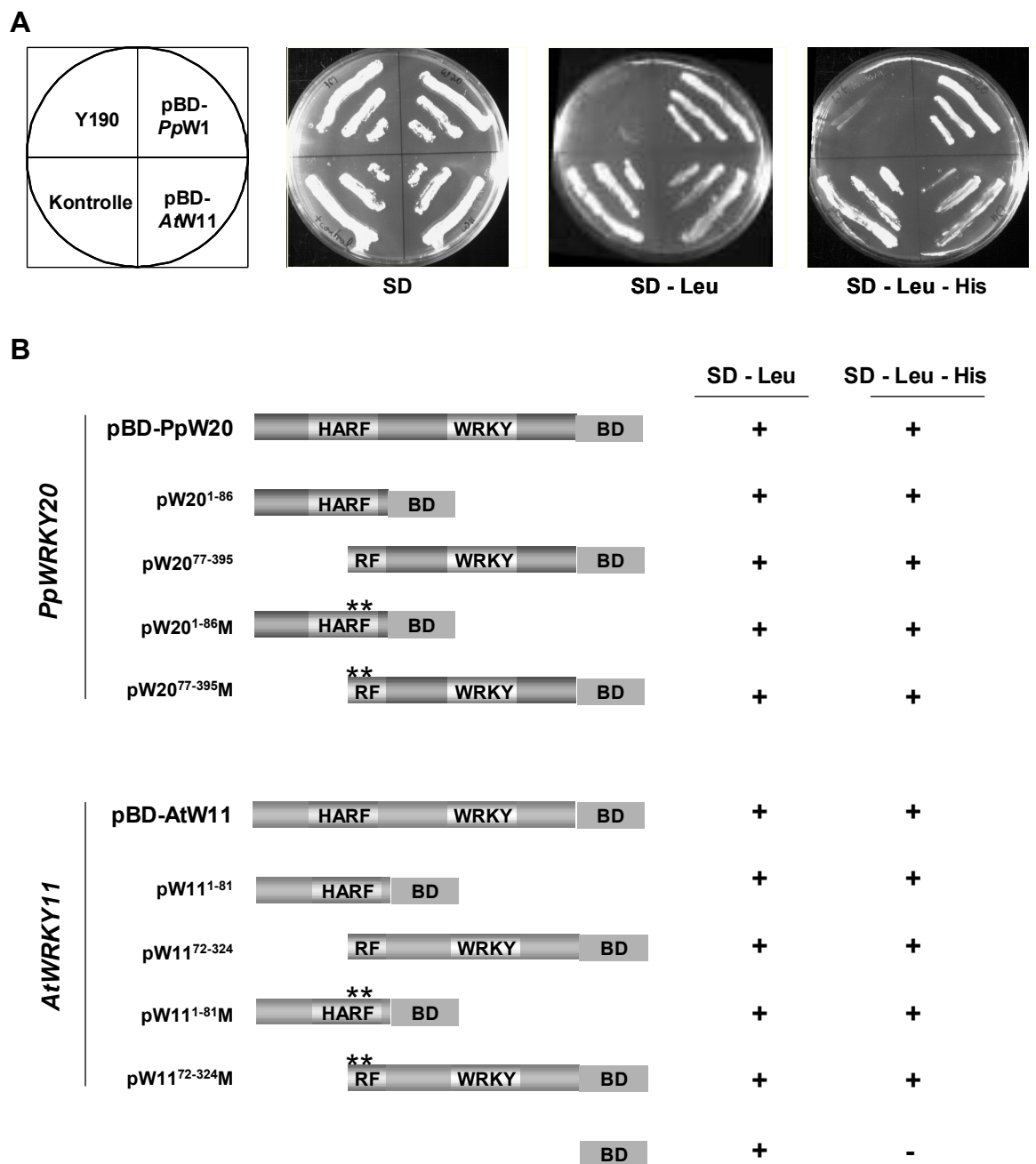
Bereiche in *PpWRKY20* nahe der HARF-Domäne, wurde untersucht, ob es sich dabei um potenzielle Aktivatoren der Transkription handeln könnte. Da das spezifische DNA-Bindungsmotiv für *PpWRKY20* nicht bekannt ist, können die Untersuchungen zur Transaktivierung *in planta* nicht erfolgreich durchgeführt werden. Bereits in früheren Arbeiten zum Studium der Transaktivierungs-Eigenschaften von WRKY-Proteinen wurde deswegen die Reporter-gen-Aktivierung in Hefe (*S. cerevisiae*) im Hefe-2-Hybrid-System untersucht (Eulgem, 1999).

Dazu wurde die cDNA von *PpWRKY20* aminoterminal der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert und in dem Hefestamm Y190 exprimiert (Abb. 3.6). Dieser Hefestamm ist auxotroph für Uracil, Tryptophan, Leucin und Histidin. Die Expression des BD-*PpWRKY20*-Fusionsproteins führte zum Wachstum der Hefekolonien sowohl auf Leucinmangelmedium als auch auf Medium, dem Histidin fehlte. Eine Komplementation des Histidinmangels ist in der Regel nur dann möglich, wenn die GAL4-Aktivierungsdomäne zusammen mit der GAL4-Bindungsdomäne coexprimiert wird und der GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert werden kann oder wenn das DB-Fusionsprotein alleine schon Transaktivierungseigenschaften besitzt (Bhalerao *et al.*, 1999). Parallel wurde dieses Experiment mit der cDNA von *AtWRKY11* durchgeführt, welches ebenfalls ein WRKY der Subgruppe IId ist. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die Transaktivierung durch *PpWRKY20* eine *P. patens* spezifische WRKY-Funktion ist oder ob die Erkenntnisse auch auf WRKY-Proteine höherer Pflanzen übertragbar sind. In der Tat konnte auch für das BD-*AtWRKY11*-Fusionsprotein Transaktivierung gezeigt werden (Abb. 3.6).

Da in beiden Proteinen die Pfam-B\_36392-Domäne mit dem GHARFRR-Konsensus vorhanden ist, wurden zwei unterschiedlich lange Fragmente für beide Proteine ebenfalls mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert, um zu untersuchen, ob die HARF-Domäne für die Transaktivierung verantwortlich ist. Die Aminosäuren 1 bis 86 (W20<sup>1-86</sup>) und 77 bis 395 (W20<sup>77-395</sup>) umfassen die gewählten Bereiche von *PpWRKY20*. Für *AtWRKY11* wurden die Aminosäuren 1 bis 81 (W11<sup>1-81</sup>) und 72 bis 324 (W11<sup>71-324</sup>) für die Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne gewählt.

Da sich die beiden Fragmente der jeweiligen Proteine innerhalb des sieben AS langen GHARFRR-Konsensus überlappen, wurden auch veränderte Fusionsproteine durch Aminosäure-Substitutionen erzeugt. Bei diesen wurde das Phenylalanin an Position 5 des Konsensus durch ein Serin und das darauf folgende Arginin durch ein Lysin ersetzt. Diese Veränderungen betreffen somit die Aminosäurepositionen 78 bzw. 79 von *PpWRKY20* (W20<sup>1-86</sup>M und W20<sup>77-395</sup>M) und 73 bzw. 74 von *AtWRKY11* (W11<sup>1-81</sup>M und W11<sup>71-324</sup>M). Wie in der Abbildung 3.6 zu sehen ist, konnte für alle erzeugten Fusionsproteine, sowohl für die veränderten als auch für die unveränderten Fragmente, Transaktivierung gezeigt werden.



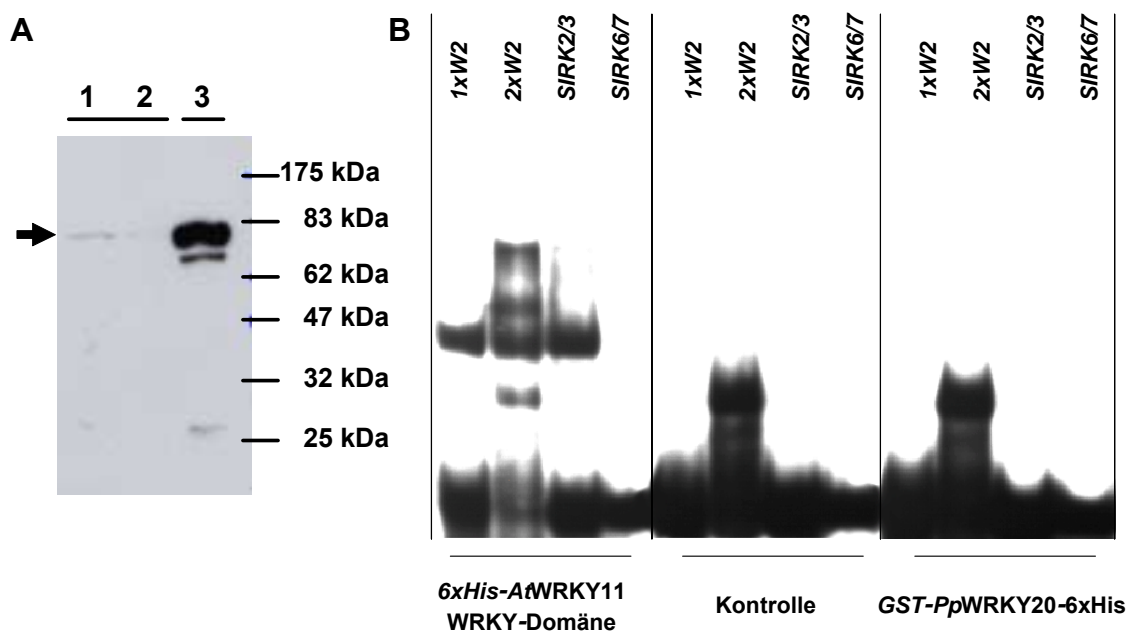


**Abb. 3.6: Transaktivierung durch *PpWRKY20* und *AtWRKY11* in Hefe.** (A) Heterologe Expression von BD-*PpWRKY20* und BD-*AtWRKY11* im Hefestamm Y190. Die Anzucht erfolgte für 2 Tage bei 30°C auf Vollmedium (SD) sowie Vollmedium zur Selektion, dem die essentiellen Aminosäuren Leucin (-Leu) oder Leucin und Histidin (-Leu -His) fehlten. Als Kontrolle für die Aktivierung des Reportergens wurden die beiden Fusionsproteine GBD-AKIN10 und GAD-SFN4 von Z. Koncz zur Verfügung gestellt und in die Hefe co-transformiert (Bhalerao *et al.*, 1999). Als Kontrolle für das Vorhandensein des Transformationskonstruktes diente der Wildtypstamm Y190. (B) Schematische Übersicht der verwendeten Fragment-BD-Fusionen und eine Abschätzung über die Fähigkeit der Hefe nach der Transformation auf entsprechenden Selektionsmedien zu wachsen. Zusätzlich zu den unter (A) erwähnten Kontrollen wurde auch die GAL4-Bindungsdomäne alleine getestet. Wachstum (+), kein Wachstum (-)

Die Beobachtung, dass zwei verschiedene Proteinfragmente unabhängig voneinander Reporterexpression aktivieren können, legt die Existenz von wenigstens zwei Transaktivierungsdomänen nahe. Diese könnten sogar zwischen *PpWRKY20* und *AtWRKY11* konserviert sein. Wie die durch Aminosäure-Substitution erhaltenen Proteinfragmente der HARF-Domäne zeigen, kann der konservierte GHARFRR-Konsensus nicht für die in diesem Experiment festgestellte Transaktivierung verantwortlich gemacht werden.

### 3.2.5. GST-*PpWRKY20*-6xHis bindet *in vitro* nicht an W2-Box-Elemente

Für WRKY-Proteine aus verschiedenen höheren Pflanzenarten konnte eine Bindung *in vitro* an DNA-Motive mit dem Konsensus TTGACY, die sogenannte W-Box, gezeigt werden. Auch für die WRKY-Domäne des *AtWRKY11* konnte Bindung an das W2-Box-Element des PR1-Promotor aus Petersilie gezeigt werden (Ingo Ciolkowski, persl. Mitteilung; Abb. 3.7B). Vor diesem Hintergrund sollte getestet werden, ob auch *PpWRKY20* an das W2-Box-Element binden kann.



**Abb. 3.7: Protein-Blot Experiment und W-Box-Bindung in einem EMSA mit rekombinantem *PpWRKY20*.** (A) Nachweis von rekombinantem 6xHis-*PpWRKY20*-GST-Fusionsprotein (Pfeil) in einem groben Zellaufschluss mittels Protein-Blot-Experiment mit primärem Anti-6xHis-Antikörper und sekundärem Peroxydase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper. Spur 1 und 2 enthalten nativ aufgeschlossenen, Spur 3 denaturiert aufgeschlossenen Proteinextrakt. (B) EMSA mit rekombinantem GST-*PpWRKY20*-6xHis und verschiedenen synthetischen Oligonucleotiden, die funktionelle W-Box-Elemente enthielten. Als Kontrolle für eine positive Bindung wurde die rekombinante WRKY-Domäne von 6xHis-*AtWRKY11*-WRKY-Domäne verwendet, die von Ingo Ciolkowski für diesen Versuch zur Verfügung gestellt wurde. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung diente ein grober Aufschluss von Zellen, die zuvor mit dem Vektor ohne cDNA-Insertion transformiert worden waren.

Aus diesem Grund wurde die cDNA von *PpWRKY20* in den pGEX2Tm-GW-Expressionsvektor kloniert und in *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen exprimiert. Bei der Expression des Proteins wird GST aminoterminal und ein 6xHis-Epitop carboxyterminal an *PpWRKY20* fusioniert.

Das Vorhandensein des GST-*PpWRKY20*-6xHis im groben Zellaufschluss konnte mittels Protein-Blot-Experiment mit einem spezifischen Anti-His-Antikörper gegen das 6xHis-Epitop gezeigt werden (Abb.3.7A). Das erhaltene Signal entspricht in etwa der errechneten Größe für ein Fusionsprotein aus *PpWRKY20* und GST.

In einer elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) wurde die Bindung von 6xHis-*AtWRKY11*-WRKY-Domäne und GST-*PpWRKY20*-6xHis an [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP markierte, synthetische, doppelsträngige Oligonucleotide getestet. Jedoch konnte eine Bindung von GST-*PpWRKY20*-6xHis an die verwendeten Elemente nicht detektiert werden (Abb.3.7B), was auf Grund der gezeigten funktionellen Ähnlichkeit in Hefe und der strukturellen Verwandtschaft zwischen *AtWRKY11* und *PpWRKY20* nicht erwartet wurde. Da die Bindungsstudien für *AtWRKY11* nur mit der WRKY-Domäne und nicht mit dem gesamten Protein durchgeführt wurden, kann es sein, dass die WRKY-Domäne von *PpWRKY20* alleine auch an W2-Box-Elemente gebunden hätte.

### 3.2.6. Etablieren des biolistischen Partikelbeschuss für *P. patens*

Die Methode der Transformation von Pflanzengewebe mittels biolistischem Partikelbeschuss mit Gold- oder Wolframpartikel, an deren Oberflächen DNA präzipitiert wurde, ist für viele Anwendungen etabliert (siehe 3.2.3). So ist es möglich eine große Zahl von Transformationen für transiente Expressionsexperimente schnell und reproduzierbar durchzuführen. Deswegen sollte geprüft werden, ob diese Methode auch für *P. patens* Protonema genutzt werden kann.

**Tabelle 3.1: Anzahl durch Partikelbeschuss transformierter Protonema-Zellen.** Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von Protonema-Zellen mit detektierbarer GUS-Aktivität an drei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Beschuss. Es wurden zwei Vektoren von unterschiedlicher Größe getestet (p35S-GFP-GUS: 8203 bp; pPTV35S-GUS: 13364 bp). Jedes Experiment wurde dreimal parallel sowohl mit linearisierten (lin.) als auch mit zirkulären (circ.) Vektoren durchgeführt. <sup>a</sup>Anzahl transformierter Protonema-Zellen in einem vergleichbaren experimentellen Ansatz. Entnommen aus Cho *et al.*, (1999).

	1 Tag	2 Tage	3 Tage
<b>p35S-GFP-GUS<sub>lin.</sub></b>	<b>204 ± 46</b>	<b>243 ± 56</b>	<b>289 ± 32</b>
<b>p35S-GFP-GUS<sub>circ.</sub></b>	<b>226 ± 35</b>	<b>198 ± 61</b>	<b>350 ± 35</b>
<b>pPTV35S-GUS<sub>lin.</sub></b>	<b>32 ± 15</b>	13 ± 2	0
<b>pPTV35S-GUS<sub>circ.</sub></b>	0	0	0
<b>pCambia<sup>a</sup></b>	195 <sup>a</sup>	245 <sup>a</sup>	-

---

Auf der Basis einer einzigen Publikation (Cho *et al.*, 1999), welche die Transformationseffizienz von *P. patens* durch biolistischen Partikelbeschuss beschreibt, wurde zunächst versucht, die dort beschriebenen Ergebnisse zu reproduzieren.

Wie aus Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, besteht für den kleineren Vektor p35S-GFP-GUS eine direkte Korrelation zwischen der Gesamtzahl GUS-Aktivität zeigender Protonemazellen und der Zeit, die nach dem Partikelbeschuss verstrichen ist. Dabei war es unerheblich, ob der Vektor als ringförmiges Plasmid oder linearisiert verwendet wurde. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den publizierten Daten (Cho *et al.*, 1999), bei denen Reportergenaktivität an zwei Zweitpunkten nach dem Beschuss untersucht worden ist. Außerdem wurde gezeigt, dass die Zahl transformierter und GUS-Aktivität zeigender Protonema-Zellen über die beschriebenen Zeitpunkte hinaus noch weiter ansteigen kann (Tabelle 3.1).

Unter Verwendung des größeren Vektors pPTV-35S-GUS war die Korrelation zwischen der Gesamtzahl GUS-Aktivität zeigender Protonema-Zellen und den Tagen nach dem Partikelbeschuss negativ. Außerdem ging die Transformations-Effizienz von Zellen mit detektierbarer GUS-Aktivität einen Tag nach dem Partikelbeschuss um 70 % gegenüber dem kleineren Vektor zurück. In keinem der Experimente mit dem ringförmigen pPTV-GUS wurden Zellen mit Reportergen-Aktivität gefunden.

Da der Vektor p35S-GFP-GUS für ein Fusionsprotein aus GFP und GUS codiert und bereits im Experiment 3.2.3. als Kontrolle Verwendung fand, wurde überprüft, ob neben dem nachgewiesenen Vorhandensein der GUS-Aktivität auch GFP-Fluoreszenz in den Protonema-Zellen zu erkennen war. Aus diesem Grund wurden zwei Ansätze am zweiten Tag nach dem Partikelbeschuss und noch vor der Bestimmung der GUS-Aktivität unter UV-Licht betrachtet. Jedoch konnte in dem Protonema keinerlei GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, obwohl nachfolgend für mehrere hundert Zellen GUS-Aktivität detektiert werden konnte.

### **3.2.7. Gemeinsamer Partikelbeschuss mit Reportergen- und Effektorstrukturen in *P. patens* Protonema**

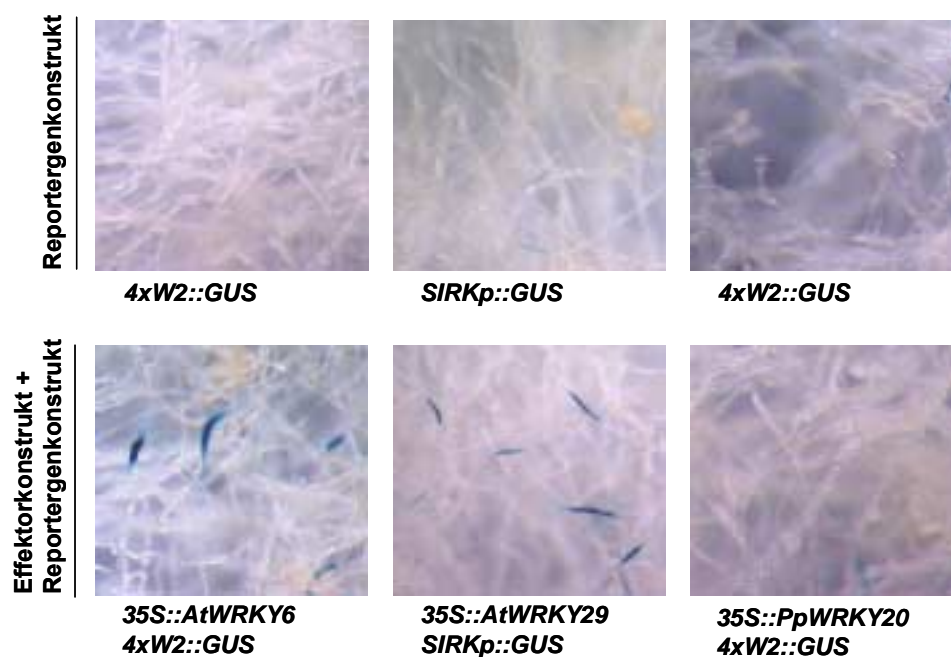
Durch den gemeinsamen Partikelbeschuss von einem Effektorstruktur, welches zur ektoptischen Expression eines *WRKY*-Gens führt, und einem Reportergenstruktur, welches das *cis*-aktive W-Box Motiv enthält, soll sowohl die spezifische *in planta* Bindung von *PpWRKY20*-Proteinen, als auch die Aktivierung des Reportergens in Protonema untersucht werden.

Vor dem Hintergrund, dass GST-*PpWRKY20*-6xHis *in vitro* nicht an das W2-Box-Element oder ähnliche W-Box-Elemente gebunden hat, stellt sich die Frage, ob *PpWRKY20* *in vivo* an das W2-Box-Element binden und das Reportergen aktivieren kann. Zunächst wurden Effektor- und Reporterstrukturen gewählt, die sich bereits in

*A. thaliana* als funktionell erwiesen haben. So konnte gezeigt werden, dass *AtWRKY29* für die Aktivierung der Expression von *SIRK/FRK1* (Asai *et al.*, 2002; Aifen Zhou, persl. Mitteilung) verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde das Effektor-konstrukt *35S::AtWRKY29* zusammen mit dem Reporter-genkonstrukt *SIRKp::GUS* in *P. patens* Protonema geschossen. Am zweiten Tag nach dem Beschuss wurde die Reporter-gen-Aktivität bestimmt. Im Vergleich zu Protonema, das nur mit dem Reporter-genkonstrukt transformiert worden war, zeigten mehr Zellen eine insgesamt stärkere GUS-Aktivität nach gemeinsamem Partikelbeschuss mit dem *35S::AtWRKY29*-Effektor-konstrukt (Abb. 3.8).

Unter Verwendung der Kombination von *4xW2::GUS* und *35S::AtWRKY6* konnten in transienten Transfektionsexperimenten in *A. thaliana*-Protoplasten aus Zellkultur keine Reporter-gen-Aktivität gefunden werden (Silke Robatzek, persl. Mitteilung). Im Gegensatz dazu konnte im gemeinsamen Partikelbeschuss in *P. patens* Protonema Reporter-gen-Aktivierung gefunden werden.

Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist, lag für die Kombination *4xW2::GUS* und *35S::PpWRKY20* die Reporter-gen-Aktivität nicht über der für das Reporter-genkonstrukt gefundenen Hintergrund-Aktivität. Dieses Ergebnis deckt sich mit den zuvor gezeigten *in vitro* Daten zu *PpWRKY20*.



**Abb. 3.8: Partikelbeschuss von *P. patens* Protonema mit Reporter-gen- und Effektor-konstrukten.** GUS-Aktivität in 7 Tage altem Protonema, am zweiten Tag nach dem Partikelbeschuss. Gezeigt wird die Reporter-gen-Aktivität des Reporter-genkonstruktes ohne Effektor-konstrukt (obere Reihe) und mit Effektor-konstrukt (untere Reihe). Die Kombination aus *SIRKp::GUS* und *35S::AtWRKY29* diente als Kontrolle für eine positive Interaktion zwischen Effektor und dem Promotor des Reportergens. Pro Schuss wurden 6 µg gesamt DNA verwendet.

### 3.3. Andere WRKY-Gene aus *P. patens*

In Datenbanken verfügbare DNA-Sequenzinformation über *P. patens* war zu Beginn der Arbeit auf ca. 12 000 EST Sequenzen beschränkt. Insgesamt waren nur 14 Einträge genomischer DNA außerhalb codierender Sequenz aus *P. patens* in den Online-Ressourcen verfügbar.

Erst im Januar, April und Oktober 2002 wurden große Mengen von EST-Sequenzen in den Gen-Datenbanken veröffentlicht, so dass zur Zeit (März 2003) auf mehr als 70 000 Sequenzen zugegriffen werden kann.

Aus diesem Grund wurde von Anfang an versucht, möglichst viele Sequenzen putativer *PpWRKY*-Gene zu erlangen.

#### 3.3.1. RAGE

Mittels RAGE (Cormack und Somssich, 1997) konnten für alle der bekannten *PpWRKY*-Gen-Sequenzen PCR-Fragmente erhalten werden. Diese wurden in pCR2.1TOPO kloniert und sequenziert. Jedoch konnte nur ein 320 bp langes Amplifikat dem 3' Bereich der bekannten *PpWRKY5*-Sequenz zugehörig identifiziert werden (Abb.3.9). Alle anderen Sequenzen enthielten keine Ähnlichkeit zu den bekannten *PpWRKY*-Genen.

#### 3.3.2. Durchmustern von Lambda- $\lambda$ -Phagen Bibliotheken

Da mittels RAGE keine zufriedenstellende Sequenzinformation erhalten werden konnte, wurden drei verfügbare Lambda- $\lambda$ -Phagen Bibliotheken mit genomischen Fragmenten aller bis dahin bekannten *PpWRKY*-Gene, als auch mit Proben der cDNA von *PpWRKY20* und *PpWRKY16* durchmustert.

Um den Arbeitsaufwand für die neun genomischen Fragmente zu minimieren, wurden bis zu drei *WRKY*-Gen-Fragmente gemischt und radioaktiv markiert, so dass die primäre und sekundäre Durchmusterung parallel mit vier Ansätzen durchgeführt wurde. Die vier Ansätze bestanden aus [*PpWRKY3*, *PpWRKY5* und *PpWRKY20*], [*PpWRKY1* und *PpWRKY7*], [*PpWRKY2* und *PpWRKY4*] sowie [*PpWRKY6* und *PpWRKY16*].

Das Durchmustern der beiden cDNA-Bibliotheken blieb erfolglos. Es konnten bereits in der primären Durchmusterung keine putativ positiven Phagen-Plaques gefunden werden.

Im Gegensatz zu der Durchmusterung der cDNA-Bibliotheken, wurden in der Lambda- $\lambda$ -Phagen Bibliothek mit genomischer DNA nach drei Durchmusterungsrunden 18

putativ positive Einzel-Plaques isoliert. Dabei wurden zwei unabhängige Phageneluate mit den in Ansatz 4 verwendeten *PpWRKY6* und *PpWRKY16* erhalten. Alle 16 verbliebenen Phageneluate wurden mit den in Ansatz 1 gemischten *PpWRKY3*, *PpWRKY5* und *PpWRKY20* gefunden.

**Tabelle 3.2: Übersicht über die erhaltenen putativ positiven Phagen-Plaques pro Durchmusterung der genomischen *P. patens* Bibliothek.** Dargestellt ist die Zahl erhaltener Plaques, die für die in den jeweiligen Ansätzen enthaltenen *PpWRKY*-Gen-Fragmente putativ positive Signale bei den Durchmusterungen ergeben haben.

Ansatz	<i>PpWRKY</i> Proben	Anzahl putativ positiver Lambda- $\lambda$ -Phagen-Plaques			
		1. Durchmusterung	2. Durchmusterung	3. Durchmusterung	Einzel- Phagen
1	3, 5, 20	6	18	16	16
2	1, 7	5	11	0	-
3	2, 4	6	12	0	-
4	6, 16	3	7	5	2

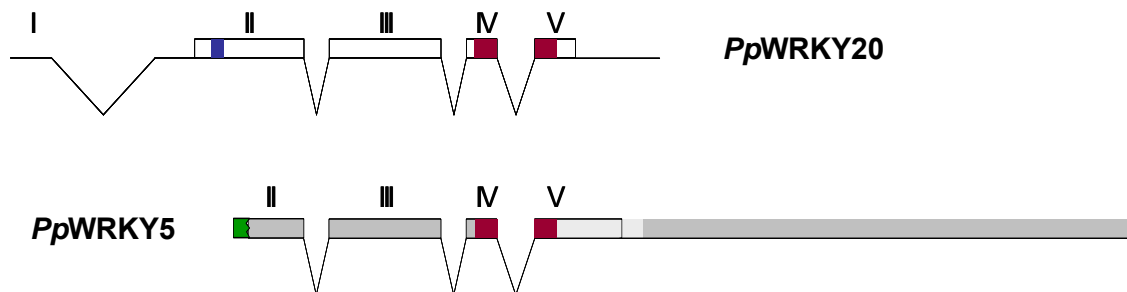
Nach einer Southern-Analyse konnte gezeigt werden, dass die beiden mit dem Ansatz 4 erhaltenen Einzel-Phagen keine *PpWRKY6* - und *PpWRKY16* - Sequenz enthielten. Ein Vergleich des Bandenmusters nach einer *HindIII* - Restriktionsspaltung erbrachte, dass beide Klone Wildtyp-Lambda- $\lambda$ -Phagen waren und keine Insertion anderer, fremder DNA enthielten.

Nach einer Southern-Analyse der 16 Phageneluate des Ansatzes 1 wurde in allen Fällen ein für *PpWRKY5* positives Signal erhalten. Außerdem war ersichtlich, dass alle 16 isolierten Einzel-Phagen identische Bandenmuster sowohl nach der Restriktionsspaltung im Agarosegel, als auch nach der Hybridisierung mit einer spezifischen *PpWRKY5*-Probe zeigten.

Die durch Restriktionsspaltung gewonnenen Lambda- $\lambda$ -Phagen Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung und Elution aus dem Agarosegel in den zuvor kompatibel gespaltenen pBluescript (S/K)+ kloniert und sequenziert. Auf diese Weise konnten 8 überlappende Fragmente identifiziert werden, die eine durchgehende *PpWRKY5*-DNA-Sequenz enthielten.

Jedoch war die Sequenz des *PpWRKY*-Gens in der klonierten genomischen DNA des Lambda- $\lambda$ -Phagen nicht vollständig enthalten. Im 5'-Bereich der Gensequenz geht die genomische *P. patens* DNA in die flankierenden Bereiche des Lambda- $\lambda$ -Phagen über (Abb.3.9). Es konnten 3284 bp genomische DNA-Sequenz erhalten werden, welche den 3' Bereich des *PpWRKY5*-Gens umfasst sowie weitere 2009 bp genomische Sequenz hinter dem putativen Stop-Codon.

Die Durchmusterung der Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken wurde mit anderen Proben der *WRKY*-Gen-Fragmente wiederholt. So wurde insgesamt 29 mal der identische *PpWRKY5*-Phagen-Klon isoliert. Andere *PpWRKY*-Gene scheinen in den Bibliotheken nicht enthalten zu sein.



**Abb. 3.9:** Schematische Übersicht der mittels RAGE und der Durchmusterung der genomischen Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliothek gewonnenen Sequenz des *PpWRKY5*-Gens im Vergleich mit dem *PpWRKY20*-Gen. Maßstabgerecht dargestellt ist die, aus Vergleichen mit dem *PpWRKY20*-Gen und den *WRKY*-Genen der Subgruppe IId aus *A. thaliana*, abgeleitete Intron/Exon-Struktur des *PpWRKY5*-Gens. Hervorgehoben sind die mittels RAGE (hell grau) und Durchmusterung der Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliothek (dunkel grau) erhaltenen Sequenzen für das *PpWRKY5*-Gen. Farblich dargestellt sind die für die *WRKY*-Domäne (rot) und die HRF-Domäne (blau) codierende Sequenz, und der Übergang in flankierende Lambda- $\lambda$ -Phagen-DNA (grün).

### 3.3.3. Durchmustern der BAC-Bibliothek

Da das Durchmustern der Lambda- $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken nur für *PpWRKY5* erfolgreich verlief, wurde die im Oktober 2002 zur Verfügung gestellte BAC-Bibliothek, die genomische DNA aus *P. patens* enthält, mit Proben für *PpWRKY20* und *PpWRKY16* durchmustert.

Für *PpWRKY20* konnten drei putativ positive Klone (103K15, 103J15, 103K14) identifiziert werden. Bei 103K15 und 103K14 konnte das Vorhandensein von *PpWRKY20* durch PCR belegt werden. Mittels Southern-Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich um identische Klone handelt. Mit verschiedenen Primerkombinationen aus degenerierten Primern sowie mit spezifischen Primern für *PpWRKY5* und *PpWRKY3* wurde getestet, ob das Signal für *PpWRKY20* im Klon 103K15 möglicher Weise durch Kreuzhybridisierung mit anderen *WRKY*-Genen entstanden sein könnte. Ebenso wurde geprüft, ob sich weitere bekannte *WRKY*-Gene in den positiv identifizierten Klonen befinden. Es konnten jedoch keine anderen *WRKY*-Gene mit diesem Ansatz bestätigt werden. So ist davon auszugehen, dass keine der schon bekannten *WRKY*-Gene der Subgruppe IId in der nahen Umgebung zu *PpWRKY20* vorliegen, und Tandemduplikationen von *WRKY*-Genen in der Nachbarschaft ausgeschlossen werden können.

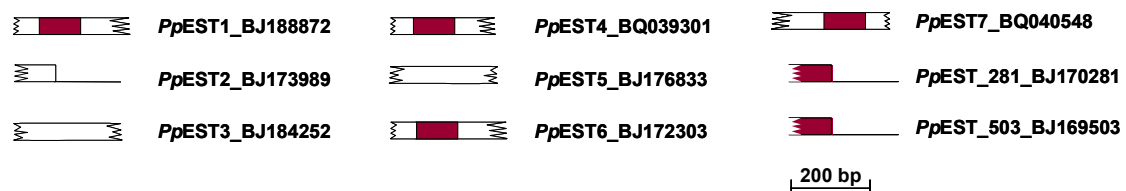


Für *PpWRKY16* wurden 128 putativ positive Klone identifiziert. Von diesen wurden jene 13 ausgewählt, die die besten Hybridisierungs-Signale zeigten (102E05, 103L11, 106F03, 100E04, 105K17, 105N19, 105J07, 108M14, 105N17, 105O18, 102D03, 016J12, 108H05). Auch hier wurde zuerst versucht mittels PCR das Vorhandensein der Probe zu belegen. Jedoch konnte für keinen der Klone gezeigt werden, dass die *PpWRKY16*-Gensequenz enthalten ist. Mit verschiedenen Primerkombinationen für *PpWRKY16*, aber auch mit dem oben beschriebenen Ansatz für die Untersuchung der *PpWRKY20*-Klone konnten keine *WRKY*-Gen-ähnliche Sequenzen gefunden werden.

### 3.3.4. Datenbankrecherche neuer EST-Sequenzen

Im Januar, April und Oktober 2002 wurden große Mengen von EST-Sequenzen von *P. patens* in den öffentlichen Gen-Datenbanken zugänglich gemacht. Diese wurden sowohl mit allen bisher bekannten *PpWRKY*-Gen-Sequenzen als auch mit einzelnen Vertretern der Subgruppen aus *A.thaliana* mittels tBLASTn oder tBLASTx (Altschul *et al.*, 1997) durchsucht.

Als mögliche neue *PpWRKY*-Gene wurden solche Sequenzen angesehen, die eine Trefferwahrscheinlichkeit von  $p = 1 \text{ e}^{-24}$  oder weniger besaßen. Dies traf auf nur 11 von ca. 70000 EST-Sequenzen zu. Die EST-Sequenzen enthielten qualitativ verwendbare Sequenzinformation von nur 260 bp bis 320 bp.



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der putativen *PpWRKY*-Gene, die aus den EST-Sequenzen neu hinzugewonnen wurden.** Maßstabgerecht dargestellt sind die Bereiche der EST-Sequenzen, die qualitativ verwendbare Information möglicher *PpWRKY*-Gene enthielten. Für die *WRKY*-Domäne (rot) kodierende Sequenzbereiche sind farbig hervorgehoben.

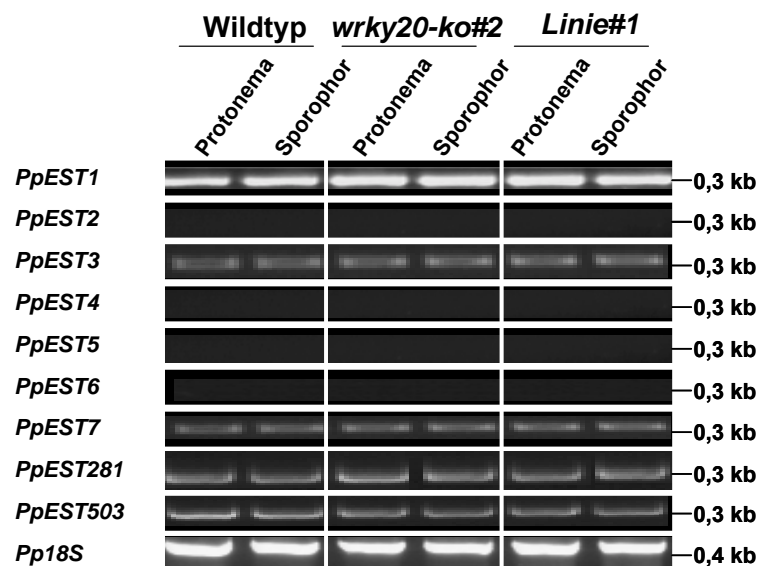
Zwei EST-Sequenzen entsprachen zu 100 % der bekannten Sequenz zu *PpWRKY20*. Von den übrigen neun enthielten bereits sechs für die *WRKY*-Domäne kodierende Sequenzen.

Die drei verbliebenen EST-Sequenzen konnten nicht eindeutig als *PpWRKY*-Gen-Sequenzen identifiziert werden. Eine eingehende Analyse aller Sequenzen erfolgt unter 3.6.1.

Um festzustellen, ob eines der putativen *WRKY*-Gene, die aus den neun *P. patens* EST-Sequenzen abgeleitet wurden, ein verändertes Expressionsmuster in der *wrky20-ko#2*-

Null-Mutante aufweist, wurde die quantitative RT-PCR-Analyse unter den selben Bedingungen wiederholt, wie sie für die zuvor bekannten *PpWRKY*-Gene durchgeführt worden war (3.1.3.).

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, konnten keine Veränderung der mRNA-Transkriptmenge in *wrky20-ko#2* gegenüber *Linie#1* und dem Wildtyp gefunden werden.



**Abb. 3.11: *PpEST*-Transkripte in verschiedenen Geweben der Mutanten-Linien und des Wildtyps.** Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge der 18S rRNA.

### 3.4. Funktionelle Charakterisierung artifiziieller Promotoren in *P. patens* Protonema

Eine Möglichkeit, Einblicke in die transkriptionelle Regulation eines Gens zu erhalten, ist die Fusion des *cis*-regulatorischen Bereiches und des Promotors mit einem Reportergen und die Transformation von Pflanzen mit solchen Konstrukten. So können mittelbar wichtige Informationen über das zu untersuchende Gen gewonnen werden, ohne dessen Funktion zu stören.

Die Verwendung artifiziieller Promotoren zeigte, dass bereits einzelne *cis*-Elemente in der Lage waren, die Expression eines Reportergens (GUS) spezifisch und lokal begrenzt zu kontrollieren (Rushton, *et al.*, 2002). Die verwendeten Pathogen-induzierbaren *cis*-Elemente wurden in *A. thaliana* getestet, jedoch wurden sie ursprünglich in verschiedenen Pflanzenarten charakterisiert. Unter den getesteten Bedingungen blieben

---

die bekannten Expressionsmuster auch in *A. thaliana* weitgehend erhalten, obwohl es sich um ein heterologes pflanzliches System handelte (Rushton, *et al.*, 2002).

Vor dem Hintergrund einer möglichen konservierten Funktion der *cis*-Elemente in verschiedenen Pflanzenfamilien sollte geklärt werden, ob diese Funktion bereits in den niederen Pflanzen bestanden haben könnte.

#### **3.4.1. Biolistische Transformation von Konstrukten mit artifiziellen *cis*-Elementen in *P. patens* Protonema**

Da im Rahmen dieser Arbeit der biolistische Partikelbeschuss für die Transformation von Protonema etabliert wurde (3.2.6.), konnte *P. patens* sofort mittels dieser Methode mit den von Paul J. Rushton zur Verfügung gestellten artifiziellen Promotor-Reportergenkonstrukten transformiert werden.

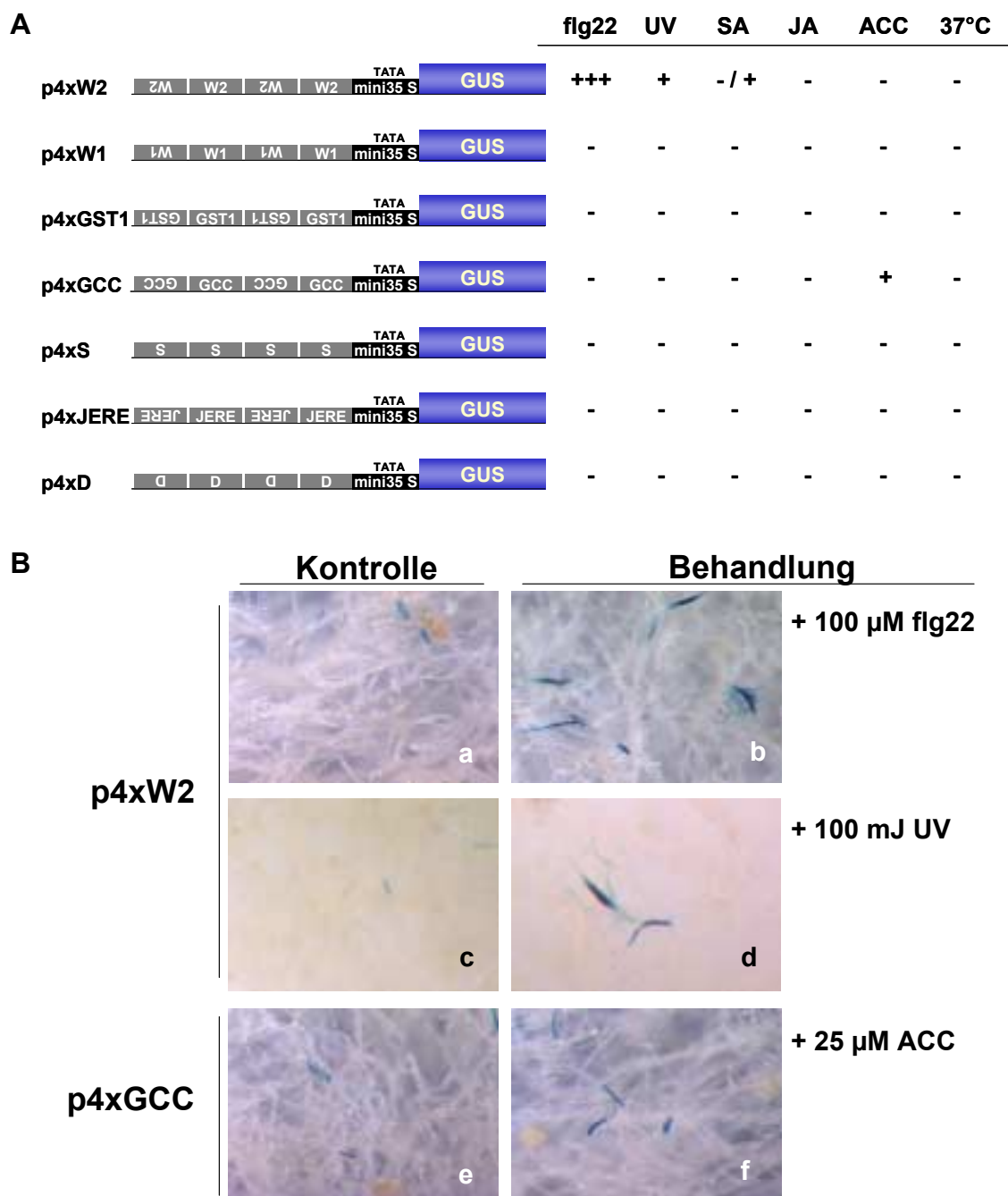
Vorteilhaft erwies sich, dass die Vektoren als Derivate des pBT10- $\beta$ -glucuronidase relativ klein waren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Transformationseffizienz für ringförmige oder linearisierte Vektoren von ca. 8 kb Größe gleich war (Tabelle 3.1). Aus diesem Grund wurden die Konstrukte p4xD, p4xS, p4xGCC, p4xJERE, p4xW2, p4xW1 und p4xGST1 (2.8.) als ringförmige Plasmide auf den Gold- oder Wolframpartikeln präzipitiert.

Nach der Transformation von 7 Tage altem Protonema wurden die Kultur-Platten zur Regeneration für zwei Tage in der Phytokammer kultiviert, bevor weitergehende Untersuchungen durchgeführt wurden.

#### **3.4.2. Untersuchung von Reportergenaktivität der artifiziellen Konstrukte**

Nach einer Regenerationszeit wurde das transformierte Protonema mit flg22, UV, SA, JA, ACC sowie 37°C behandelt (2.15.5.). Einen Tag später wurde das Gewebe mit x-Gluc-Stammlösung überschichtet, vakuumfiltriert, für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl durch Berliner Blau schwach und stark blau gefärbter Zellen pro Platte und pro Behandlung wurde unter der Stereolupe bestimmt. Bis auf das Konstrukt p4xW1 konnte bei allen übrigen die Transformationseffizienz anhand einer basalen Hintergrundexpression bestimmt werden. Die Reportergenaktivität wurde über den Quotienten der schwach blau gefärbten gegenüber den stark blau gefärbten Zellen abgeschätzt.

Waren unter einem bestimmten Stimulus nur noch wenige schwach blaue Zellen vorhanden und fast nur noch stark gefärbte zu finden, so wurde von einer starken Aktivierung des Reportergens ausgegangen.



**Abb. 3.12: Partikelbeschuss mit artifiziellen Promotor-Reportergenkonstrukten in *P. patens* Protonema.** GUS-Aktivität in Protonema einen Tag nach der Behandlung und drei Tage nach dem Partikelbeschuss. **(A)** Schematische Übersicht der verwendeten artifiziellen Promotor-Reportergenkonstrukte (Rushton *et al.*, 2002). Abschätzung der GUS-Reportergen-Aktivierung unter den angegebenen Stimuli: keine Änderung (-), Änderung der GUS-Aktivität im nicht signifikanten Rahmen (-/+), eine schwache, aber signifikante Veränderung (+) oder eine starke signifikante Änderung (+++) gegenüber der Hintergrundaktivität. **(B)** Aktivierung des Reportergens mittels artifiziellen Promotor-Reportergenkonstrukten im Protonema unter den in (A) herausgefundenen signifikant aktivierenden Bedingungen. Explarisch dargestellt sind Beispiele der Hintergrundaktivität (a, c, e) und der Aktivität nach einem Tag Behandlung (b, d, f).

---

Wie in Abbildung 3.12 gezeigt ist, konnte für die Konstrukte p4xW1, p4xGST1, p4xS, p4xJERE und p4xD unter keinem der hier betrachteten Stimuli eine signifikante Reporter-gen-Aktivierung oberhalb der Hintergrundaktivität der jeweiligen Konstrukte festgestellt werden.

Eine starke und signifikante Veränderung der GUS-Aktivität wurde unter Zugabe des flg22-Elizitors (flg22) mit dem Konstrukt p4xW2 gefunden. Dieses Ergebnis beweist einerseits die Funktionalität der synthetischen Promotor-Reporter-genkonstrukte auch in niedern Pflanzen. Andererseits bedeutet dies, dass *P. patens* in der Lage sein muss, den flg22-Elizitor zu perzipieren.

Außerdem war ein Anstieg der Reporter-genaktivität mit p4xW2 nach UV-Bestrahlung zu verzeichnen. In höheren Pflanzen konnte gezeigt werden, dass flg22- und UV-Signalübertragung auch W-Box und WRKY-Protein vermittelte Vorgänge sind (Singh et al., 2002).

Da für *PpWRKY20* demonstriert wurde, dass das rekombinante Protein *in vitro* nicht an das W2-Box-Element bindet und auch keine Reporter-genaktivierung *in vivo* vermitteln konnte, müssen entweder andere *PpWRKY*-Proteine für die Aktivierung in diesem Experiment verantwortlich sein, oder die WRKY-Proteine aus *P. patens* besitzen andere Bindungspräferenzen. In dem Fall müssen andere Faktoren die Reporter-genaktivität vermitteln.

Für das Konstrukt p4xGCC konnte eine signifikante Aktivierung des GUS-Reporter-gens nach der Behandlung mit ACC, einer physiologischen Ethylen-Vorstufe, erhalten werden.

In höheren Pflanzen wurde von Ohme-Takagi und Shinshi (1995) gezeigt, dass GCC-Box-ähnliche Elemente unmittelbar an der Ethylen-vermittelten Aktivierung von Genen des Ethylen-Signalübertragungsweges beteiligt sind.

### **3.4.3. Reporter-genaktivität des artifiziellen p4xW2-Konstruktes unter flg22**

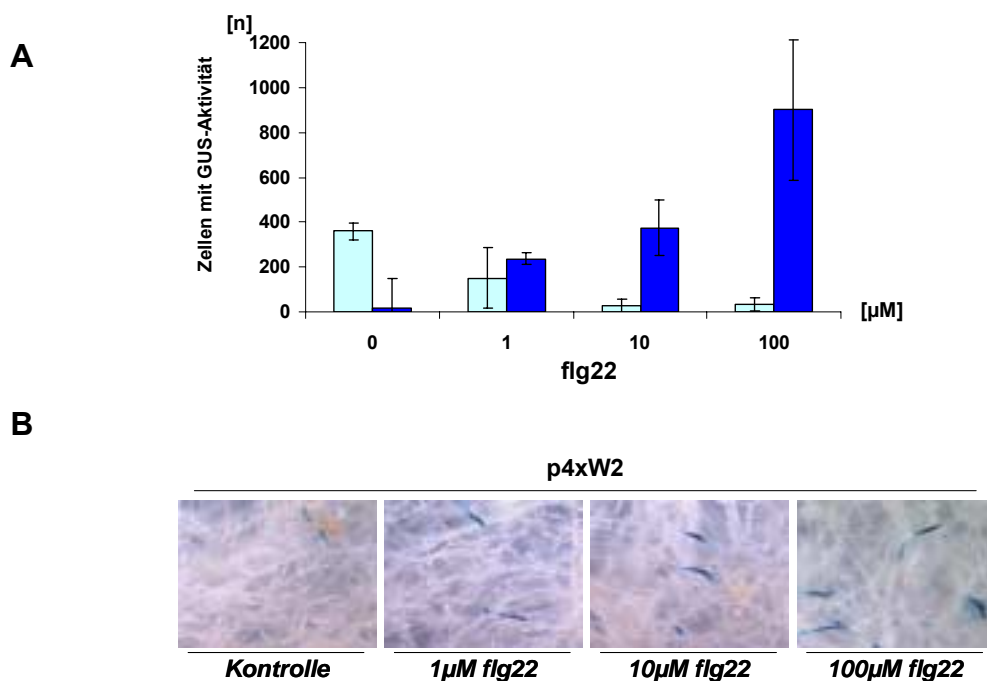
Eine Aktivierung des GUS-Reporter-gens nach der Behandlung mit flg22-Elizitor ist von ganz besonderem Interesse, da bisher weder für *P. patens* noch für ein anderes Moos ein Pathogen charakterisiert worden ist. Bei flg22 handelt es sich um einen Peptid-Elizitor, der sich vom Flagellin Gram-negativer Bakterien ableitet (Gomez-Gomez und Boller, 2000). Eine spezifische Reaktion auf flg22 könnte die Basis zur Untersuchung bakterieller Pathogene in *P. patens* darstellen.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es sich bei der Aktivierung des GUS-Reporter-gens um eine dosisabhängige Antwort gegenüber dem flg22-Elizitor handelt.

In vier unabhängigen Transformationsansätzen wurden jeweils 16 Protonema-Platten mit dem p4xW2-Konstrukt transformiert und nach zwei Tagen Regeneration mit 1 µM, 10 µM, 100 µM flg22-Elizitor oder Triton mit Wasser (Kontrolle) behandelt.

In allen Versuchsansätzen wurde eine Korrelation zwischen Elizitor-Konzentration und GUS-Aktivität gefunden (Abb. 3.13).

Die Anzahl blau gefärbter Zellen, die bereits unter den Kontrollbedingungen [0  $\mu\text{M}$  flg22] zusehen waren, stellt die zu Grunde gelegte Hintergrundaktivität des p4xW2-Konstruktes dar (Abb. 3.13). Wie zu sehen ist, nimmt mit steigender flg22-Konzentration die Zahl schwach blau gefärbter Zellen ab. Im Gegensatz dazu nimmt nicht nur der Anteil stark gefärbter Zellen zu, sondern die Gesamtzahl gefärbter Zellen steigt an (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Reporterogenaktivität des artifiziellen p4xW2-Konstruktes unter flg22 in *P. patens* Protonema.** Das flg22 wurde in Wasser mit 0,1 % Triton X 100 gelöst. Als Kontrolle diente Wasser mit 0,1 % Triton X 100. **(A)** Anzahl von Zellen mit GUS-Aktivität einen Tag nach flg22-Behandlung und drei Tage nach dem Partikelbeschuss mit p4xW2. Dargestellt ist die Zahl schwach blau gefärbter gegenüber stark blau gefärbter Zellen eines Transformationsansatzes in Abhängigkeit von drei Konzentrationen des flg22-Elizitors. **(B)** Aktivierung des synthetischen p4xW2-Promoter-Reportergenkonstruktes durch flg22 im Protonema.

#### 3.4.4. Die W-Box ist für die Reporterogenaktivität des artifiziellen p4xW2-Konstruktes unter flg22 verantwortlich

Wie in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, aktiviert flg22 spezifisch und konzentrationsabhängig das GUS-Reportergen im synthetischen p4xW2-Promoter-Reportergenkonstrukt. Um ausschließen zu können, dass die GUS-Aktivität durch andere, nicht bekannte *cis*-Elemente hervorgerufen wurde, ist ein Teil der Experimente mit Promoter-Reportergenkonstrukten wiederholt worden, die veränderte *cis*-Elemente enthielten.

Zunächst wurde in dem Promotor-Reportergenkonstrukt p4xW2MW der in der W2-Box enthaltene W-Box-Konsensus TTGACC durch den nicht funktionellen W-Box-Konsensus TTGTCC (Rushton *et al.*, 1996) ersetzt (Abb. 3.14). Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, konnte mit diesem Konstrukt keine Reportergenaktivität mehr gefunden werden, was die Beteiligung des W-Box-Elementes an der flg22-abhängigen Aktivierung des Reportergens beweist.

A	Nucleotidsequenz	Gen	Spezies	Motiv
	TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATAAT	<i>PR1-1</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	W
	TTATTCAGCCATCAAAAAGTTG <u>T</u> CCAATAAT	-	-	-
	TTATTCAGCC <u>A</u> CAAAAAGTTGACCAATAAT	-	-	W und S
	TT••CTAGCCACC•AGATTGACCAAAC	<i>Gst1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	W und S

B	p4xW2	p4xW2MW	p4xW2MS	p4xGST1	SA	JA	ACC	flg22
					-	-	-	+++
					-	-	-	+++
					-	-	-	-
					-	-	-	+
					-	-	-	-

**Abb. 3.14: Reportergenaktivität des artifiziiellen p4xW2-Konstruktes und deren Derivate in *P. patens* Protonema.** (A) Nucleotidsequenz der verwendeten Elemente sowie deren bekannten funktionellen Motive. Für das W2- und das GST1-Box-Element wurde außerdem deren Herkunft angegeben. Bei W2MS und W2MW handelt es sich um artifiziielle W2-Box-Derivate mit veränderter Nucleotid-Zusammensetzung. (B) Schematische Übersicht der verwendeten synthetischen Promotor-Reportergenkonstrukte. Abschätzung der GUS-Reportergen-Aktivierung unter den angegebenen Stimuli (25  $\mu$ M SA, 25  $\mu$ M JA, 25  $\mu$ M ACC, 10  $\mu$ M flg22): keine Änderung (-), eine schwache, aber signifikante Veränderung (+) oder eine starke signifikante Änderung (+++) gegenüber der Hintergrundaktivität.

Bei einem Vergleich der cis-Elemente in den Promotor-Reportergenkonstrukten p4xGST1 und p4xW2 fällt auf, dass die enthaltene funktionelle W-Box sowie deren Umgebung in beiden Konstrukten sehr ähnlich ist. Im Konstrukt p4xGST1 ist noch ein weiteres bekanntes cis-Element, die S-Box, vorhanden. Interessanter Weise befindet sich im Konstrukt p4xW2 ein ähnliches Motiv an derselben Stelle (Abb. 3.14). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass trotz der W2-ähnlichen Sequenz bei dem p4xGST1 Promotor-Reportergenkonstrukt keine flg22-Responsivität festgestellt werden konnte.

---

Aus diesem Grund wurde auch das p4xW2MS Promotor-Reportergenkonstrukt getestet, welches einen Nucleotidaustausch in der Sequenz der W2-Box enthält, der zur Konstitution einer putativ funktionelle S-Box führt (Abb. 3.14). In diesem Fall liegen ähnlich der GST1-Box sowohl S- als auch W-Box-Elemente gemeinsam in diesem Konstrukt vor. Obwohl nur die Umgebung des TTGACC-Konsensus im p4xW2MS-Konstrukt verändert wurde, nahm die Reporterogenaktivität im Vergleich zu p4xW2 deutlich ab. Trotzdem lag die GUS-Aktivität für p4xW2MS nach flg22-Behandlung über der des p4xGST-Konstruktes (Abb. 3.14).

Unter den Behandlungen mit SA, JA und ACC blieb die detektierbare GUS-Aktivität gleich der Hintergrundaktivität.

### **3.5. Expressions-Analyse von *P. patens* Genen nach flg22- und UV-Behandlung**

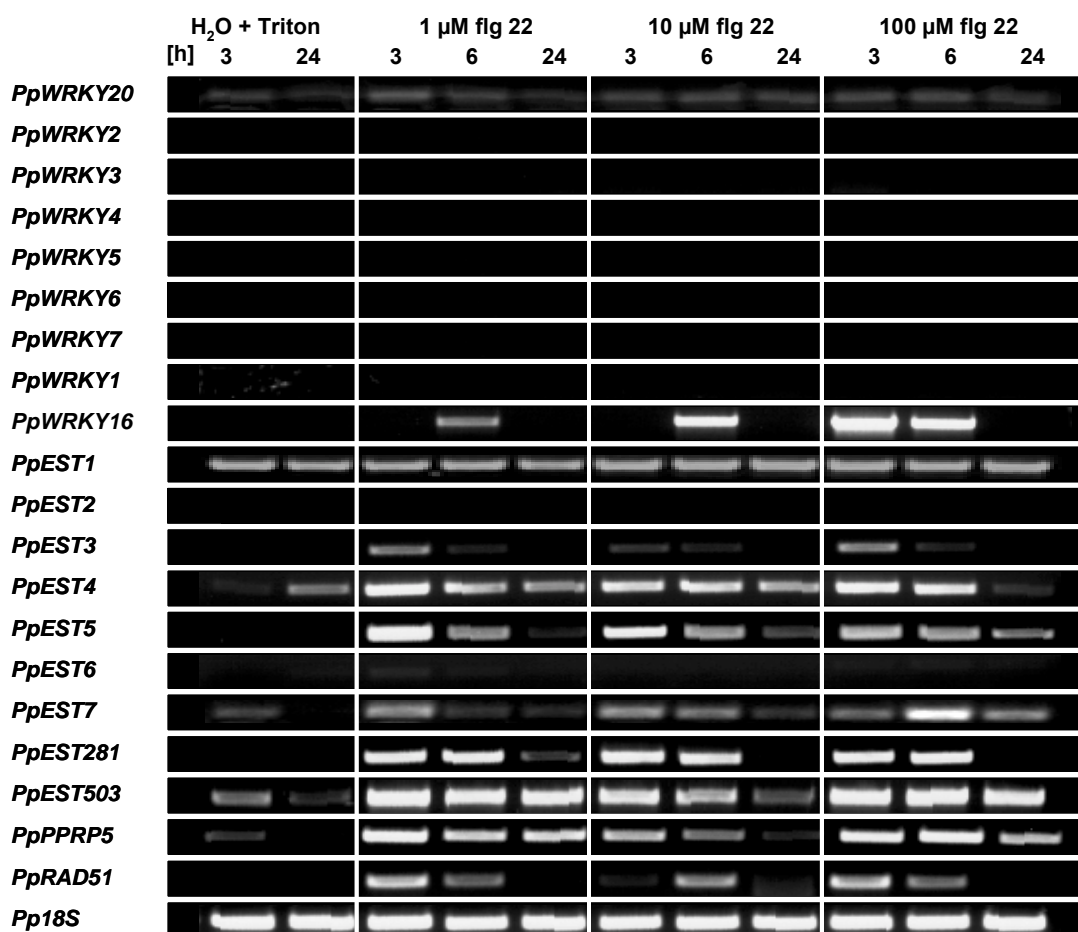
Wie die Untersuchungen mit den artifiziellen Promotor-Reportergenkonstrukten gezeigt haben, kann für flg22 eine spezifische und W-Box-abhängige Aktivierung der Reporterogenaktivität nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass es WRKY-Proteine in *P. patens* geben könnte, welche unter diesen Bedingungen an den W-Box-Konsensus binden und wie in höheren Pflanzen eine transkriptionelle Kontrolle der 3'-gelegenen Gene ausüben. Vor diesem Hintergrund wurden Expressions-Analysen von den vorhandenen *P. patens* Genen nach der Behandlung mit flg22-Elizitor durchgeführt.

Da für das W2-Box-Element auch unter UV-Behandlung eine Aktivierung des GUS-Reportergens gefunden werden konnte, wurde zusätzlich unter diesem Stimulus der Einfluss auf die Expression untersucht.

#### **3.5.1. Expressions-Analyse von *P. patens* Genen nach flg22-Behandlung**

Wie in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, aktiviert flg22 spezifisch und konzentrationsabhängig das GUS-Reportergen im synthetischen p4xW2-Promotor-Reportergenkonstrukt. Um herauszufinden, ob eines der charakterisierten *P. patens* Gene eine veränderte Expression nach dieser Behandlung zeigt, wurden quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden zwei unabhängige Experimente mit verschiedenen Konzentrationen flg22-Elizitor durchgeführt. Gewebeproben wurden nach 3 h, 6 h und 24 h entnommen.





**Abb. 3.15:** *P. patens*-Transkripte nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des flg22-Elizitors. Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge der *Pp18S* rRNA. Die Transkriptmenge des stress-responsiven Gens *PpRAD51* aus *P. patens* diente als Kontrolle für eine Stress-auslösende Behandlung des Protonemas (Ulrich Markmann-Mulisch und Bernd Reis, persl. Mitteilung).

In Abbildung 3.15 ist zu sehen, dass die Gene *PpWRKY20*, *PpEST1*, *PpEST3* und *PpEST6* nur wenig, aber dafür konstitutiv exprimiert waren. Ein weiteres Gen, *PpPPRP5* (*Putive Pathogenesis Related Protein5*), das von einem EST mit Ähnlichkeiten zu Resistenzgenen höherer Pflanzen abgeleitet wurde, zeigte ebenfalls eine gleichförmige Transkriptmenge unter allen Bedingungen.

Die *PpWRKY*-Gene *PpWRKY1*, *PpWRKY2*, *PpWRKY3*, *PpWRKY4*, *PpWRKY5*, *PpWRKY6* und *PpWRKY7* zeigten gar keine detektierbaren Transkripte. Ebenso sind für *PpEST2* keine Transkripte nachweisbar (Abb. 3.15).

Für einige der Gene konnte jedoch eine Erhöhung der Transkriptmenge nach im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. So zeigten die auf der Basis der EST-

---

Sequenzen neu hinzugewonnenen Gene *PpEST4*, *PpEST5* sowie *PpEST281* und *PpEST503* eine deutlich höhere Transkriptakkumulation im behandelten als im unbehandelten Protonema (Abb. 3.15).

Auch nach mehrmaliger Wiederholung der PCR konnten in beiden unabhängigen Experimenten für die Gene *PpWRKY16* und *PpEST7* keine zufriedenstellend übereinstimmenden Transkriptakkumulationen erzielt werden. Dabei handelt es sich um zum Teil erhebliche Abweichungen in den nachzuweisenden Transkriptmengen zwischen Kontrolle und dem behandelten Protonema.

### **3.5.2. Expressions-Analyse von *P. patens* Genen nach Behandlung mit verschiedenen Peptiden**

Nachdem im vorangegangenen Experiment tatsächlich einige der *P. patens* Gene eine veränderte Transkriptmenge nach Behandlung mit dem flg22-Elizitor zeigten, muss die Frage gestellt werden, in wie weit dies tatsächlich diesem Peptid zugeordnet werden kann. Aus diesem Grund wurde das *P. patens* Protonema mit 10 µM flg22-Elizitor und als Kontrolle mit 10 µM flg15Δ5, einem nicht funktionellen Flagellin-Peptid, besprüht. Um auszuschließen, dass *P. patens* unspezifisch auf Peptide reagiert, wurde das Protonema simultan mit 100 µM BSA behandelt. Auch dieser experimentelle Ansatz wurde zweimal unabhängig wiederholt.

Da die zuvor getestete *P. patens* Zell-Linie wegen starker bakterieller Kontamination leider nicht mehr verwendet werden konnte, wurde das Experiment mit frischen, sauberen Kulturen wiederholt, die von Ulrich Markmann-Mulisch freundlicher Weise zur Verfügung gestellt wurden.

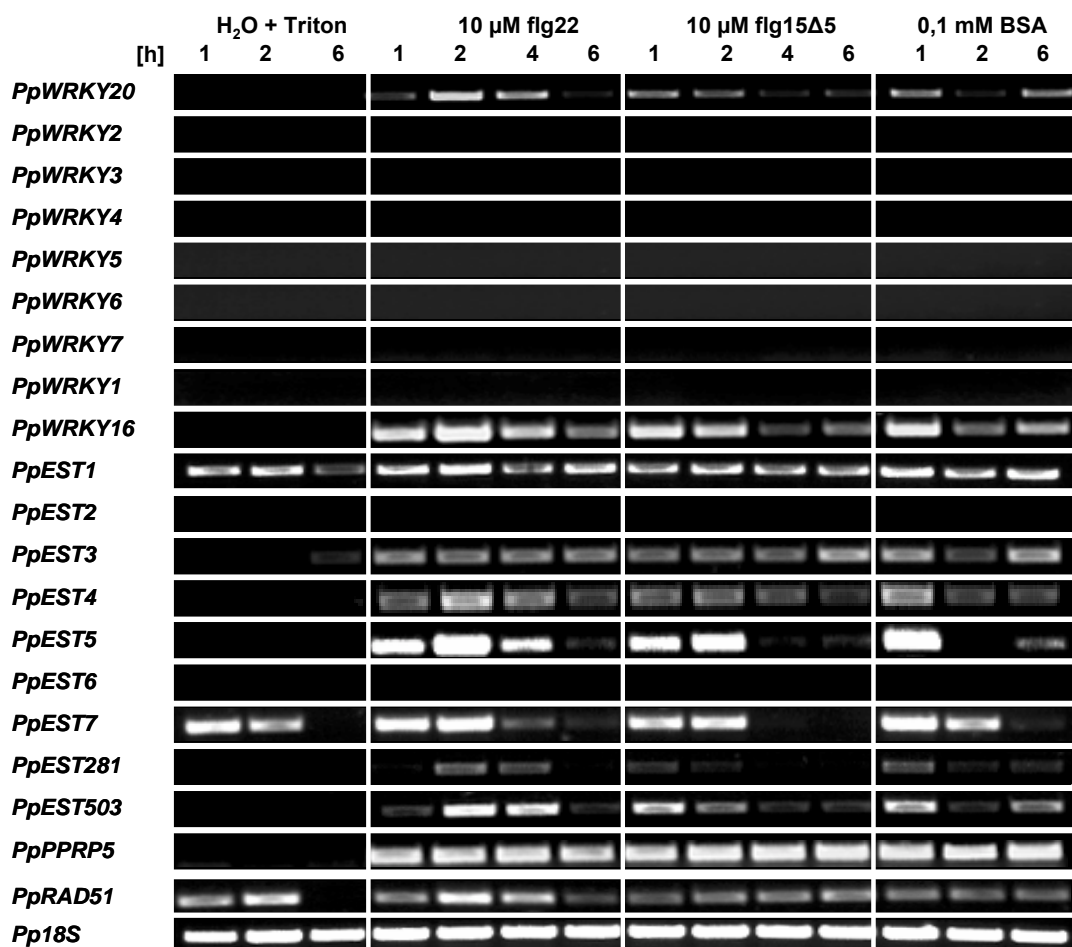
Wie der Abbildung 3.16 zu entnehmen ist, konnten die Expressionsmuster mittels RT-PCR für 10 µM flg22 mit dieser Zell-Linie reproduziert werden. Die Expression des *PpEST7* verlief jetzt sehr ähnlich dem Stress-induzierten *PpRAD51*. Bereits die Applikation der Lösungen durch Sprühen auf das Gewebe führte in der Kontrolle zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von *PpEST7* und *PpRAD51*.

Leider konnte gezeigt werden, dass die Änderungen der Transkriptmengen nicht flg22-spezifisch sind (Abb.3.16). Vielmehr handelt es sich um eine völlig unspezifische Reaktion auf Peptide und Proteine, da die Veränderungen im Expressionsmuster gegenüber der Kontrolle auch nach der Behandlung mit 100 µM BSA und 10 µM flg15Δ5 detektiert werden konnte (Abb.3.16). Aus beiden durchgeführten RT-PCR-Experimenten kann für *PpEST285* und *PpEST503* zusammengefasst werden, dass eine transiente Expressionsänderung im Zeitraum von 2 h bis 4 h nach der Behandlung zu verzeichnen ist. Die Expression von *PpEST5* ist ein bis zwei Stunden nach der Behandlung am höchsten und fällt nach drei Stunden ab, so dass nach 6 h nur noch

wenig Transkript detektiert werden kann. Für *PpEST4* konnte in beiden Experimenten eine lang anhaltende, aber nur leichte Änderung der Transkriptmenge im Vergleich zu Kontrolle gefunden werden.

Die Transkriptmengen von *PpWRKY20* und *PpEST1* sind sehr gering, konstitutiv aber unabhängig von den getesteten Behandlungen.

In Ergänzung zum vorangegangenen Experiment zeigte sich jedoch, dass die Expression des *PpEST7* und *PpRAD51* sehr sensitiv und schnell bereits durch die Applikation der Lösungen durch Sprühen auf das Protonema zu einer Erhöhung der Transkriptmenge führte. Die Transkriptmengen, die im vorangegangenen Experiment detektiert wurden, repräsentierten bereits den Rückgang der Expression bei 3 h nach der Behandlung.



**Abb. 3.16: *P. patens*-Transkripte nach der Behandlung mit verschiedenen Peptiden.** Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge der 18S rRNA. Die Transkriptmenge des stress-responsiven Gens *PpRAD51* aus *P. patens* diente als Kontrolle für eine Stress-auslösende Behandlung des Protonemas.

Für die *P. patens* Gene *PpWRKY1*, *PpWRKY2*, *PpWRKY3*, *PpWRKY4*, *PpWRKY5*, *PpWRKY6* und *PpWRKY7* sowie für *PpEST2* konnten gar keine Transkripte nachgewiesen werden.

Eine zufriedenstellend reproduzierbare Transkriptmenge in beiden unabhängigen experimentellen Ansätzen konnte für *PpWRKY16* wieder nicht erhalten werden. Jedoch waren die Transkriptmengen für die Kontrolle und unter den getesteten Bedingungen reproduzierbar unterschiedlich.

Trotz der unspezifischen Reaktion auf Peptide bleibt bemerkenswert, wie rasch die Akkumulation einiger Transkripte innerhalb eines Zeitraumes von nur einer Stunde nach der Behandlung zunimmt.

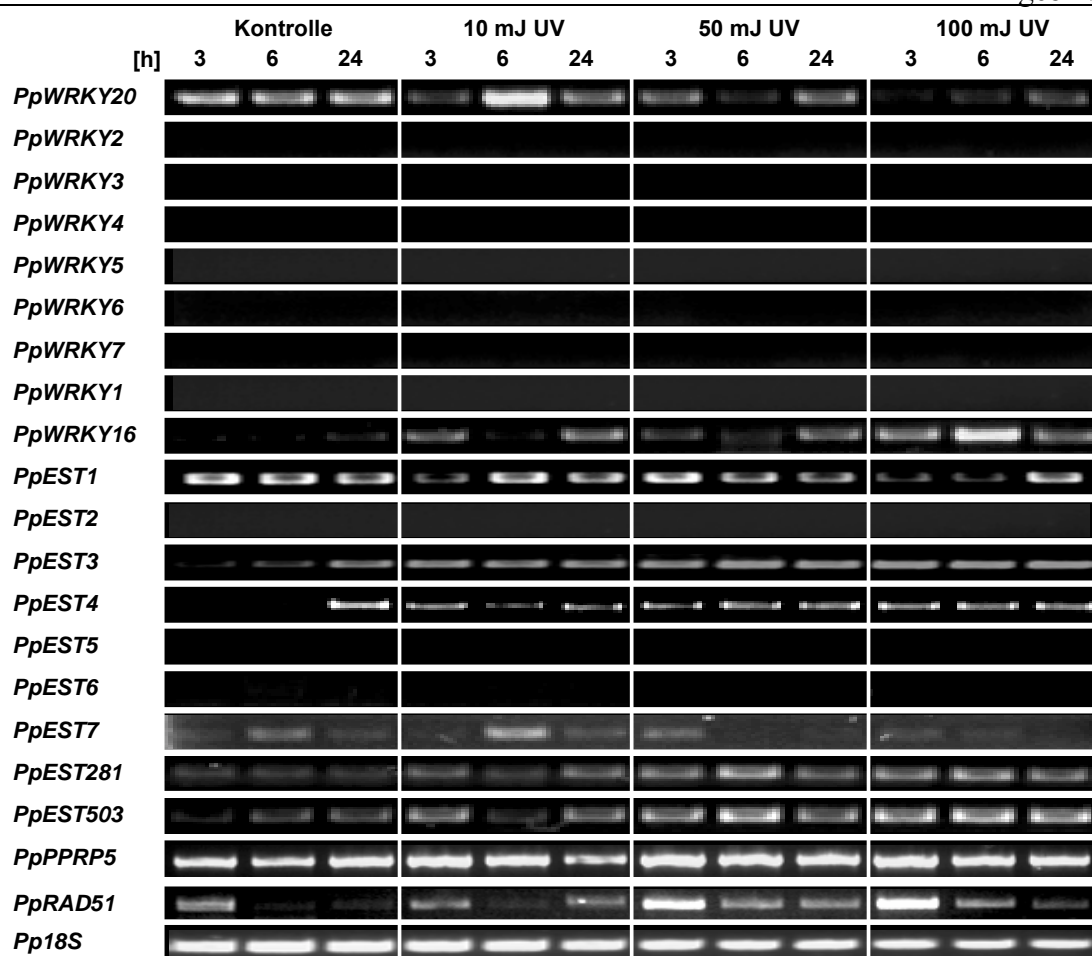
### **3.5.3. Expressions-Analyse von *P. patens*-Genen nach UV-Behandlung**

Die vorangegangenen Experimente wurden mit einem aus Bakterien abgeleiteten Elizitor durchgeführt, von dem in höheren Pflanzen ein biotisches Stress-Signal ausgeht. Im weitesten Sinne ist dies auch in dem hier durchgeführten Versuchsansatz geschehen, da eine Expressionsänderung von *P. patens* Genen auf unspezifische Peptide stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu soll nun untersucht werden, ob sich die Transkriptmengen nach UV-Behandlung verändern.

Die Bestrahlung des Protonemas mit definierten UV-Mengen wurde in einem UV-Crosslinker der Firma Stratagene durchgeführt. Dazu wurde die Strahlendosis mit der Energie von je 10 mJ, 50 mJ, 100 mJ verwendet. Die Bestrahlung dauerte zwischen 15 s und 30 s, um die eingestellten UV-Dosen zu erreichen.

Wie in der Abbildung 3.17 zu sehen ist, erhöht sich die Transkriptmenge von *PpRAD51* in Abhängigkeit von der UV-Strahlendosis. Für *PpRAD51* ist bekannt, dass es ein gutes Markergen für UV-Behandlungen ist (Ulrich Markmann-Mulisch und Bernd Reis, persl. Mitteilung).

Bei allen anderen Genen fehlen deutliche Unterschiede in der Transkriptmenge zwischen der Kontrolle und dem behandelten Protonema.



**Abb. 3.17: *P. patens*-Transkripte nach UV-Behandlung.** Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge der 18S rRNA. Die Transkriptmenge des UV-responsiven Gens *PpRAD51* aus *P. patens* diente als Kontrolle für eine Stress-auslösende Behandlung des Protonemas.

Die Gene *PpWRKY20*, *PpEST1*, *PpEST3*, *PpEST4*, *PpEST5*, *PpEST6*, *PpEST7*, *PpEST281*, *PpEST503* und *PpPPRP5* sind konstitutiv aber unterschiedlich stark exprimiert. Während sich dieser Trend für *PpWRKY20*, *PpEST1* und *PpEST6* fortsetzt, ist für die anderen Gene eine zum Teil erhebliche Veränderung ihres Expressionsmusters gegenüber den vorangegangenen Experimenten zu sehen. So ist das Transkript von *PpEST5* in diesem Versuch nach 28 Zyklen PCR nicht im Gel zu erkennen (Abb. 3.17).

Ebenso verhält es sich mit den Transkripten von *PpEST7*, *PpEST281* und *PpEST503*, die in diesem Experiment nur schwer nachzuweisen waren, wohingegen nach Behandlung mit Peptiden deutlich sichtbare Transkriptakkumulation zeigten (Abb. 3.16).

Für die *P. patens* Gene *PpWRKY1*, *PpWRKY2*, *PpWRKY3*, *PpWRKY4*, *PpWRKY5*, *PpWRKY6* und *PpWRKY7* sowie für *PpEST2* konnten abermals keine Transkripte gefunden werden.

Die Transkriptmenge von *PpWRKY16* war auch in diesem Experiment sehr unterschiedlich und in den unabhängigen Versuchsansätzen inkonsistent. Deshalb wurde mittels FailSafe-PCR versucht die Identität der von Patrick Giavalisco isolierten genomischen und cDNA-Sequenzen zu verifizieren (Giavalisco, 1999). Dies war jedoch nur für den die WRKY-Domäne kodierenden Bereich möglich. Auch von Patrick Giavalisco durchgeführte 5'RACE-Experimente auf *PpWRKY16* ließen an der Richtigkeit der verfügbaren DNA-Sequenzen Zweifel aufkommen (Giavalisco, 1999). Es muss davon ausgegangen werden, dass die für *PpWRKY16* bekannte Sequenz - ausgenommen der für die WRKY-Domäne kodierenden Bereich - fehlerhaft ist. Dies erklärt auch die widersprüchlichen Ergebnisse aus der Durchmusterung der Lambda- $\lambda$ -Phagen- und BAC-Bibliothek.

### **3.6. Vergleichende Sequenzanalyse der WRKY-Gene**

Wegen des recht hohen Grades an funktioneller und struktureller Konservierung der WRKY-Gene der Subgruppe IId aus *P. patens* und *A. thaliana* (Kapitel 3.2.), stellt sich die Frage, ob dies ein Sonderfall der WRKY-Gene der Subgruppe IId ist, oder ob diese Ergebnisse auf andere Gruppen übertragbar sind. Um diese Frage eingehend beantworten zu können, wurden alle *P. patens* WRKY-Gene untereinander und mit den öffentlich zugänglichen Sequenzinformationen der Datenbanken verglichen.

Die Verfügbarkeit von Sequenzinformation aus zwei nahezu vollständig bekannten Pflanzengenomen, *A. thaliana* und *O. sativa*, ermöglicht in einem zweiten Schritt die WRKY-Gene höherer Pflanzen verwandtschaftlich zu ordnen.

#### **3.6.1. Vergleichende Analyse der WRKY-EST-Sequenzen aus *P. patens***

Ein direkter Vergleich zwischen den *PpWRKY*-Genen ist nur dann mit einfachen Mitteln möglich, wenn homologe Sequenzbereiche für die Analyse zur Verfügung stehen.

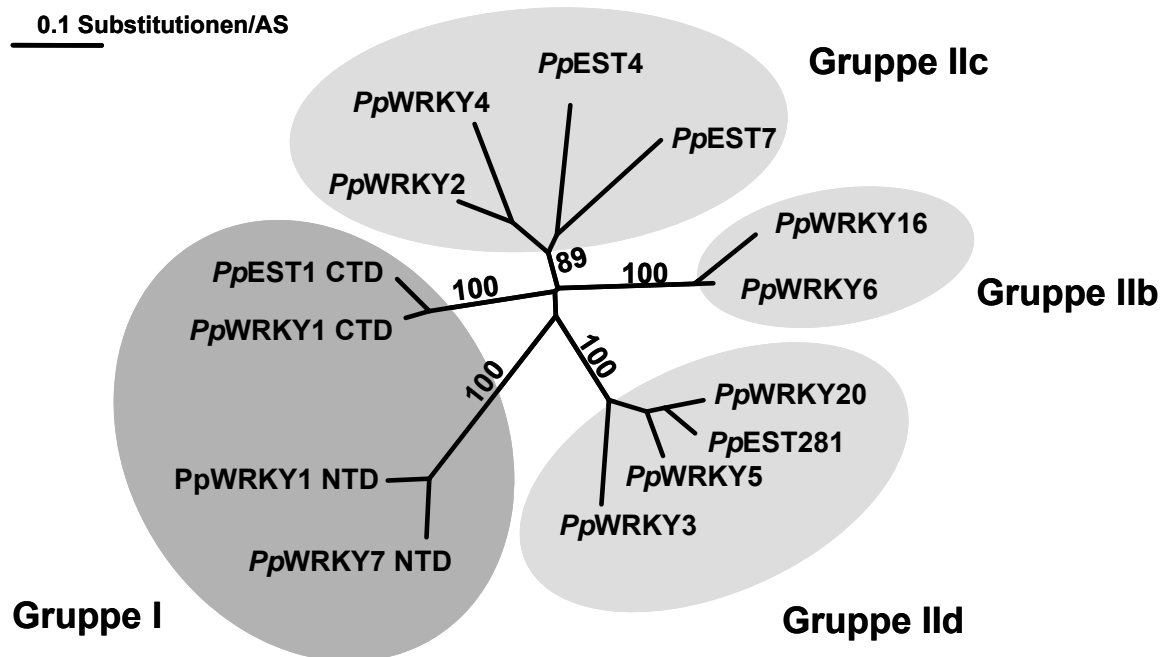
Die abgeleitete Aminosäuresequenz für die 67 AS-lange WRKY-Domäne der *PpWRKY*-Gene zeigt für 13 exemplarisch untersuchten Gene eine Identität zwischen 41 % und 91 % (Tabelle 3.3). Die höchste Ähnlichkeit wurde zwischen den Vertretern der Subgruppe IId sowie zwischen den aminoterminalen und carboxyterminalen Domänen der Gruppe I gefunden.

**Tabelle 3.3: Identität der Aminosäuren der für die WRKY-Domäne kodierenden Sequenz zwischen den *PpWRKY*-Genen.** Dargestellt ist die Anzahl konservierter Aminosäuren in der WRKY-Domäne in Prozent. Hervorgehoben sind die Werte für putativ paraloge WRKY-Gene.

	<i>PpWRKY20</i>	<i>PpWRKY1</i>	<i>PpWRKY16</i>	<i>PpWRKY2</i>	<i>PpWRKY3</i>	<i>PpWRKY4</i>	<i>PpWRKY5</i>	<i>PpWRKY6</i>	<i>PpWRKY7 NTD</i>	<i>PpWRKY1 NTD</i>	<i>PpEST281</i>	<i>PpEST1</i>	<i>PpEST4</i>	<i>PpEST7</i>
<i>PpWRKY20</i>		58	50	52	<b>77</b>	52	<b>86</b>	60	50	58	<b>91</b>	59	54	48
<i>PpWRKY1_CTD</i>			56	70	58	60	63	67	47	47	60	<b>92</b>	63	60
<i>PpWRKY16</i>				63	51	52	46	<b>92</b>	44	45	47	57	57	56
<i>PpWRKY2</i>					58	<b>81</b>	56	67	52	43	54	61	69	<b>78</b>
<i>PpWRKY3</i>						66	<b>79</b>	64	45	47	<b>75</b>	48	46	41
<i>PpWRKY4</i>							58	66	49	45	53	55	63	63
<i>PpWRKY5</i>								62	47	52	<b>89</b>	59	54	48
<i>PpWRKY6</i>									47	45	58	64	58	60
<i>PpWRKY7_NTD</i>										<b>88</b>	47	52	50	47
<i>PpWRKY1_NTD</i>											54	56	56	50
<i>PpEST281_BJ170281</i>												59	53	50
<i>PpEST1_BJ188872</i>													60	62
<i>PpEST4_BQ039301</i>														69

Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den *PpWRKY*-Genen konnten durch einen phylogenetischen Baum (Abb. 3.18) gestützt werden. Die Verzweigung der erhaltenen *Cluster* spiegelt die Einteilung in Gruppen und Subgruppen wieder. Die Verzweigungen des Baumes in einzelne Gruppen sind sehr basal und es kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten WRKY-Domänen keiner frühen phylogenetischen Linie im Pflanzenreich angehören. Das heißt, man kann annehmen, dass sich bei den WRKY-Proteinen eine ancestrale Homologie durch die Klasse der grünen Pflanzen zieht und die Entstehung der WRKY-Domäne monophyletischen Ursprungs ist.

Um auch solche Sequenzen vergleichen zu können, von denen keine homologen Bereiche bekannt sind, kann in der Regel nur ein strikt sequenzorientierter Ansatz verwendet werden. Eine Methode ist in diesem Fall besonders hilfreich und bezieht die verfügbare Sequenzinformation anderer Genome mit ein, um auf diese Weise *Cluster* von orthologen Gruppen (COG) zu bilden (Tatusov *et al.*, 1997).



**Abb. 3.18: Phylogenetischer Baum auf der Basis der für die *PpWRKY*-Domäne kodierenden Sequenzen zur Verdeutlichung der evolutionären Beziehungen.** Die Analyse erfolgte mit dem Programm ClustalW mit 67 AS der abgeleiteten WRKY-Domänen aus 13 verschiedenen *PpWRKY*-Gen-Sequenzen. Der Phylogenetische Baum wurde auf der Basis eines Distanz-Matrix-Algorithmus erstellt und ist nicht gewurzelt. Die Zahlen an den wichtigsten Zweigen sind Bootstrap-Wahrscheinlichkeiten [%] für 100 Datensätze (erstellt mit SEQBOOT, PHYLIP; Felsenstein, 1997). Die zu einer Gruppe gehörenden Unterverzweigungen sind für Gruppe I - *WRKY*-Gene dunkel-grau und für Gruppe II - *WRKY*-Gene hell-grau hinterlegt.

Dabei wird für jedes Gen eines Genoms in anderen Genomen jenes Gen mit der höchsten Sequenzähnlichkeit bestimmt. Es ist in diesem Fall nicht wichtig, dass das Ausgangsgenom vollständig bekannt ist. Um eine möglichst eindeutige Zuordnung der Sequenzen zu erhalten, wird jedoch mindestens ein komplett sequenziertes Genom für diese Art von Vergleich benötigt. Diese Vorgehensweise ist bei größeren phylogenetischen Abständen schwierig, da Genduplikationen und nur geringe Sequenzähnlichkeiten einen direkten Vergleich von Gen zu Gen nicht erlauben. Die *WRKY*-Gene sind jedoch so hoch konserviert und waren bereits vor der evolutiven Abspaltung der Moose von der Linie der höheren Pflanzen vorhanden, so dass ein Sequenzvergleich mit höheren Pflanzengenomen durchgeführt werden kann.

Die Verfügbarkeit der beiden sequenzierten Pflanzengenome von *A. thaliana* und *O. sativa* bildet ein konsistentes und komplettes Klassifizierungssystem für Gengruppen mittels COG-Analyse: Für alle *P. patens* Gene wurde mittels tBLASTx (Altschul *et al.*, 1997) der *best-hit*, BeT (Tatusov *et al.*, 1997), bestimmt, indem die Sequenzen mit der



---

kleinsten Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  für *A. thaliana* und *O. sativa* ermittelt wurde. Entsprechend wurde auch mit Treffern von *WRKY*-Genen anderer Pflanzenarten verfahren. Auch diese wurden in die *Cluster*-Analyse mit einbezogen.

Das sich aus dem paarweisen Vergleich der einzelnen Gene oder Gengruppen ergebende Muster der Beziehungen wurde analysiert. Symmetrische Beziehungen sind solche, bei denen wechselseitige Paarungen zwischen zwei Genen bestehen, die für einander BeTs darstellen. In asymmetrische Beziehungen findet nur eines der Gene das andere als „Partner“, aber nicht umgekehrt (Rauhut, 2001). Um die zu analysierenden Muster möglichst einfach zu halten, wurden die Beziehungen nur für die untersuchten *PpWRKY*-Gene in die Kreisdiagramme eingetragen. Die als signifikant zu Grunde gelegte Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  wurde auf  $< 1e-24$  gesetzt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden an dieser Stelle nur die COGs für die Gene *PpWRKY20* und *PpWRKY5* exemplarisch dargestellt. Für die übrigen *P. patens* Gene befinden sich die Diagramme im Anhang (A2.2).

Wie in der Abbildung 3.19 zu sehen ist, können selbst nahe verwandte *P. patens* Gene mittels der COG-Analyse eindeutig voneinander unterschieden werden. Das sich ergebende Muster für die beiden *PpWRKY*-Gene der Subgruppe IId ist verschieden. Man kann sehen, dass es sich bei *PpWRKY20* um das orthologe Gen zu *AtWRKY15* und bei *PpWRKY5* um das orthologe Gen zu *AtWRKY17* aus *A. thaliana* handelt. Da das Genom von *A. thaliana* bis auf einen kleinen Teil nahezu vollständig sequenziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser beiden *P. patens* Gene zu ihren orthologen Partnern wahrscheinlich nicht mehr ändern werden. Aus einem direkten Sequenzvergleich, wie er z.B. in Tabelle 3.3 zusammengefasst dargestellt ist, wäre eine solche Information nicht zu gewinnen.

Nach der Durchführung der *Cluster*-Analyse können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Die Sequenzen von *PpEST2* und *PpEST3* sind keine *WRKY*-Gene. Obwohl einige *WRKY*-Gene hohe Ähnlichkeiten zu *PpEST3* zeigen, wurden in der *Cluster*-Analyse nur BeTs mit Glutamin-Synthetase-ähnlichen Proteinen gefunden. Gleiches gilt für *PpEST2*, der jedoch keine signifikante Ähnlichkeit ( $p < 1e-24$ ) zu Genen aus höheren Pflanzen zeigt. Statt dessen werden BeTs mit weitaus niedriger Trefferwahrscheinlichkeit in prokaryotischen Organismen gefunden.

Da sich die Muster der COGs für *PpEST7* und *PpEST6* entsprechen, muss es sich hierbei um identische Gene handeln. Das orthologe Gen zu diesen beiden EST-Sequenzen aus *A. thaliana* ist *AtWRKY57*. Die Expressionsmuster für *PpEST7* und *PpEST6* wichen jedoch von einander ab (z.B. Abb. 3.16). Die zu Grunde liegenden EST-Sequenzen enthalten oft Sequenzinformationen von schlechter Qualität. Wie jetzt durch die durchgeführte COG-Analyse und mittels direkten Sequenzvergleiches mit *PpEST7* im Nachhinein für *PpEST6* gezeigt werden konnte, liegt einer der ausgewählten Primer für

---

die RT-PCR ungünstig in einem Bereich mit geringer Sequenzqualität. Dies hat wahrscheinlich dazu geführt, dass nicht die *PpEST7*-identische Matrize, sondern eine andere Sequenz in der RT-PCR amplifiziert wurde.

*PpEST281* und *PpEST503* müssen ebenfalls identisch sein und das orthologe Gen aus *A. thaliana* ist *AtWRKY74*. Hier waren die Transkriptmengen für *PpEST281* und *PpEST503* unter den getesteten Bedingungen immer sehr ähnlich, was als eine sehr gute, interne Kontrolle für die durchgeführten RT-PCR-Experimente gewertet werden kann.

*PpWRKY1* und *PpWRKY7* sind paraloge Gene im Moos und ihre WRKY-Domäne ist zu 88 % identisch (Tabelle 3.3). Mittels Cluster-Analyse konnte für *PpWRKY7* gezeigt werden, dass *AtWRKY20* das entsprechend orthologe Gen ist. Dahingegen ist *AtWRKY33* das orthologe Gen zu *PpWRKY1*.

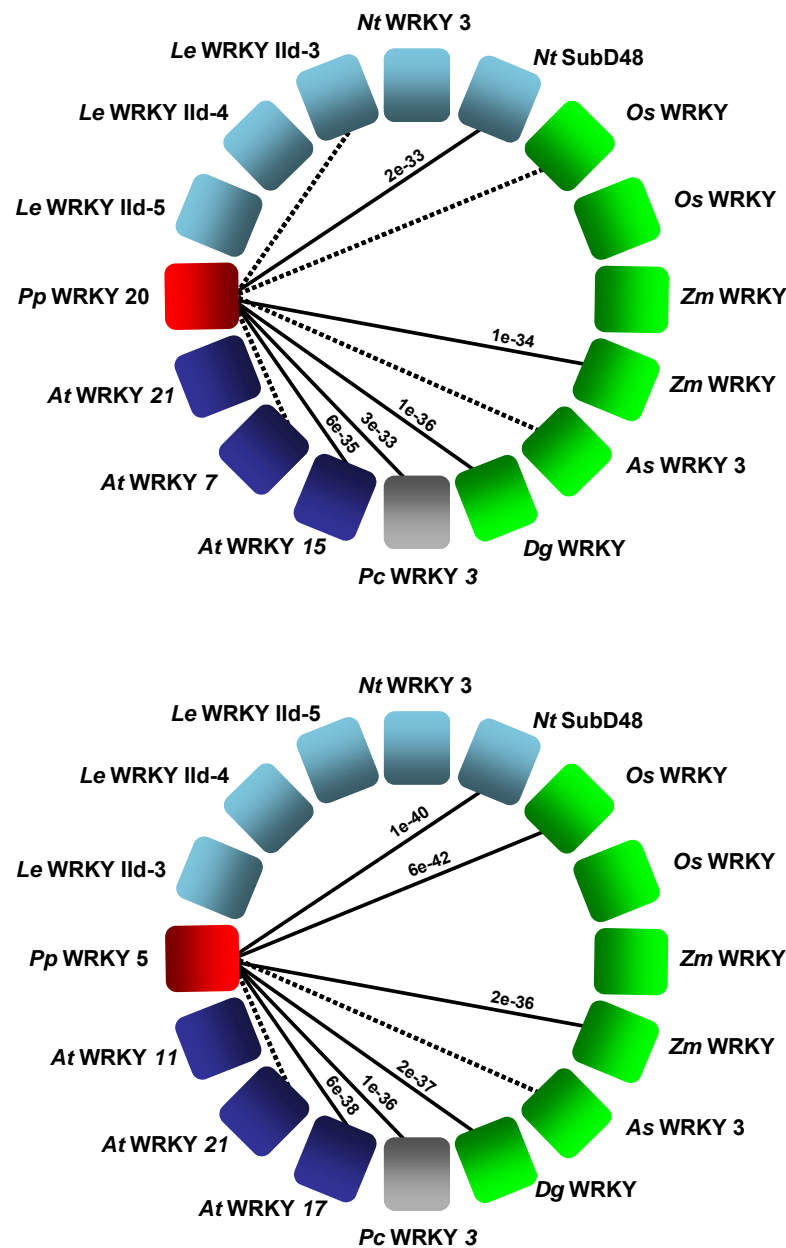
Für *PpEST1* konnte gezeigt werden, dass das *A. thaliana* *AtWRKY2*-Gen ortholog ist, und für *PpWRKY3* ist *AtWRKY15* das orthologe *A. thaliana* Gen.

Bei den Sequenzen *PpWRKY2* und *PpWRKY4* handelt es sich auch um paraloge Gene in *P. patens*. Jedoch konnte für beide keine signifikante Ähnlichkeit zu Genen aus höheren Pflanzen gezeigt werden. Die BeTs mit der geringsten Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  wurden allerdings mit Gruppe II -WRKY-Genen gefunden.

Für *PpEST5* konnte ebenfalls keine signifikante Ähnlichkeit zu WRKY-Genen höherer Pflanzen gefunden werden. Jedoch konnte *PpEST5* der Subgruppe IId zugeordnet werden. Entsprechend verhält es sich für *PpEST4*.

Auf der Basis der bekannten Gene aus *P. patens* könnten *PpWRKY6* und *PpWRKY16* als paraloge Gene angesehen werden. Durch die Analyse der COGs kann dies jedoch ausgeschlossen werden. Mittels Cluster-Analyse konnte für *PpWRKY16* gezeigt werden, dass *AtWRKY47* das entsprechend orthologe Gen ist.

Dahingegen ist *AtWRKY6* das WRKY-Gen aus *A. thaliana* mit der geringsten Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  zu *PpWRKY6*. Diese liegt oberhalb der Grenze zur statistischen Trefferwahrscheinlichkeit. Deswegen kann für *PpWRKY6* kein orthologes Gen aus höheren Pflanzen identifiziert werden.



**Abb. 3.19: Cluster von orthologen Gruppen (COG) für die nahe verwandten *PpWRKY20*- und *PpWRKY5*-Gene.** Dargestellt sind orthologe Gruppen für *PpWRKY20* und *PpWRKY5* (nach Tatusov *et al.*, 1997). Die BeTs wurden mit tBLASTx (Altschul *et al.*, 1997) bestimmt. In allen Fällen wurde der *best-hit* sowie das zweitbeste Suchergebnis für *A. thaliana* in das Kreisdiagramm integriert. Symmetrische Beziehungen zwischen den *P. patens* Genen und den Orthologen wurden mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet. Unterbrochene Linien stellen asymmetrische Beziehungen oder Beziehungen oberhalb der statistisch signifikanten Trefferwahrscheinlichkeit  $p = 1e-24$  dar. Die jeweilige Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  wurde entlang der symmetrischen Beziehungen angegeben. Die jeweiligen Pflanzenfamilien wurden farbig dargestellt: Moos (rot), *A. thaliana* (dunkel blau), *Solanaceae* (hell blau), *Poaceae* (grün) und andere (grau). *Pp* – *Physcomitrella patens*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *Pc* - *Petroselinum crispum*, *Zm* - *Zea mays*, *Dg* - *Dactylis glomerata*, *Os* - *Oryza sativa*, *Nt* - *Nicotiana tabacum*, *Le* - *Lycopersicon esculentum*

### 3.6.2. Vergleichende Analyse der WRKY-Proteine aus *A. thaliana* und *O. sativa*

Das Vorhandensein der annähernd kompletten Sequenzinformation der Genome von *A. thaliana* und *O. sativa* machen vergleichende Analysen, wie z.B. die zuvor beschriebene Analyse mittels *Cluster* von orthologen Gruppen (COG), zu einer wertvollen Methode, um orthologe oder paraloge Gene zu identifizieren. Vor dem Hintergrund einer möglichen funktionellen und strukturellen Konservierung der Gene zwischen den beiden Pflanzenarten und damit einer möglichen Übertragbarkeit der Erkenntnisse von einem Modellorganismus auf den anderen, ist es essentiell, die jeweiligen paralogen oder orthologen Gene zu kennen.

Nur bei diesen Genen kommt eine natürliche Redundanz der Genfunktion in Frage, da nicht paraloge oder nicht orthologe Gene mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem anderen ancestralen Ur-Gen herrühren.

Deswegen wurden alle *A. thaliana* WRKY-Proteine mittels tBLASTn (Altschul *et al.*, 1997) mit den verfügbaren Sequenzinformationen der beiden *O. sativa* Kulturformen verglichen (Anhang A2.3). Ausgehend von den so gewonnenen Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum auf der Basis der WRKY-Domäne errechnet (siehe Anhang A2.4). Um eine möglichst gute Trennung der orthologen Gruppen zu erhalten, wurden alle Sequenzinformationen publizierter und charakterisierter WRKY-Proteine in die phylogenetische Analyse mit eingebunden. Außerdem wurde eine EST-Sequenz eines WRKY-Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden. Die abgeleitete Sequenz der WRKY-Domäne dieses EST wurde ebenfalls in den phylogenetischen Baum integriert. Diese gruppiert basal zwischen den Vertretern der Gruppe I und II (Anhang A2.3, A2.4). Der erstellte phylogenetische Baum ist aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang aufgeführt, da die Tabelle 3.4 das Ergebnis der Analyse zusammenfasst.

In Tabelle 3.4 wurden für *A. thaliana* WRKY-Proteine auf der Basis der konservierten WRKY-Domäne die entsprechenden Orthologen aus *O. sativa* aufgelistet. Dabei konnten für 23 *A. thaliana* WRKY-Gene entsprechende orthologe Gene in den öffentlich zugänglichen Datenbanken gefunden werden. In den von Syngenta / TMRI verwalteten Datenbanken konnten 34 orthologe Gene zu den 74 Genen aus *A. thaliana* identifiziert werden.

**Tabelle 3.4: Übersicht über die WRKY-Gene aus *A. thaliana*, deren Paraloge sowie deren Orthologe aus *O. sativa*.** Dargestellt ist die phylogenetische Auswertung der Stammbaum-Analyse (siehe Anhang A2.4) der *A. thaliana* und *O. sativa* WRKY-Gene auf der Basis der abgeleiteten Protein-Sequenz für die WRKY-Domäne. Die WRKY-Domänen aus *O. sativa* wurden erhalten, indem mit jeder *A. thaliana* WRKY-Domäne sowohl die öffentlichen Gen-Datenbanken als auch die Syngenta/TMRI-Datenbank mittels tBLASTn durchsucht wurden. Die WRKY-Gene wurden mittels Stammbaum-Analyse den jeweiligen Gruppen zugeordnet. *A. thaliana* Paraloge wurden zusammen aufgeführt und, so weit dies möglich war, ihren putativen *O. sativa* Orthologen gemeinsam zugeordnet. Die aminoterminalen (NTD) und carboxyterminale (CTD) WRKY-Domäne der Gruppe I wurden getrennt betrachtet.

Gruppe	WRKY-Domäne	AGI-Akzession	<i>O. sativa</i> BAC-Klone	
			öffentliche Datenbanken	Syngenta/ TMRI-Datenbank
I	AtWRKY1 CTD	At2g04880		CL017195.124
I	AtWRKY1 NTD	At2g04880	AAAA010145271	CLB6983.2
I	AtWRKY2 CTD	At5g56270	AAAA01002933.1	CL0216 CL011539.161 CLC4184
I	AtWRKY2 NTD AtWRKY34 NTD	At5g56270 At4g26440	AAAA01002933.1	CL0216
I	AtWRKY34 CTD	At4g26440		
I	AtWRKY19 CTD	At4g12020		
I	AtWRKY19 NTD	At4g12020		
I	AtWRKY20 CTD	At4g26640		
I	AtWRKY20 NTD	At4g26640		CL019774.109
I	AtWRKY25 CTD	At2g30250		CL015328.116 CLB6983.2
I	AtWRKY25 NTD	At2g30250	AAAA01005720.1	CL012313
I	AtWRKY26 CTD	At5g07100		
I	AtWRKY26 NTD	At5g07100	AAAA01000357.1 AAAA01010819.1	CL034118 CLC7592
I	AtWRKY3 CTD AtWRKY4 CTD	At2g03340 At1g13960		
I	AtWRKY3 NTD AtWRKY4 NTD	At2g03340 At1g13960		
I	AtWRKY32 CTD	At4g30930		CL017195.124
I	AtWRKY32 NTD	At4g30930	AAAA01014952.1	CL017195
I	AtWRKY33 CTD	At2g38470		CL034118.148 CLC7592
I	AtWRKY33 NTD	At2g38470	AAAA01000196.1	CLC4184

<i>O. sativa</i> BAC-Klone				
Gruppe	WRKY-Domäne	AGI-Akzession	öffentliche Datenbanken	
			Syngenta/ TMRI-Datenbank	
I	AtWRKY44 TTG2 NTD	At2g37260	AAAA01020389.1	HTC14919
I	AtWRKY44 TTG2 CTD	At2g37260		CL012313.200 CL035741
I	AtWRKY49	At5g43290		CLC4195
I	AtWRKY51	At5g64810		
I	AtWRKY58 CTD	At3g01080		
I	AtWRKY58 NTD	At3g01080	AAAA01008658.1	CL015328
I	OsWRKY CTD			CLB16270.1
I	OsWRKY CTD			CL017554.215.125
I	OsWRKY CTD			CL017554.215.125
I	OsWRKY CTD			CLB16270.1
I	OsWRKY CTD			CL021877.34
I	OsWRKY CTD			CL027984.99
I	OsWRKY NTD			CL019774.109
I	OsWRKY NTD			CL021877.34
I	OsWRKY NTD		AAAA010145271	CLB6983.2
I	OsWRKY NTD		AAAA01008946.1	CL027984.99
IIa	AtWRKY18	At4g31800	AAAA01010861.1	CLC2946
IIa	AtWRKY40	At1g80840	AAAA01009127.1 AAAA0100	
IIa	AtWRKY60	At2g25000	AAAA01006961.1	CLC2946
IIb	AtWRKY6 AtWRKY42	At1g62300 At4g04450	AAAA01000721.1 AAAA01000390.1 AAAA0100	CL004197
IIb	AtWRKY9	At1g68150		CL006430.349 CL011543.1
IIb	AtWRKY36	At1g69810		CL009757.292
IIb	AtWRKY47	At4g01720		CL021631.56 CL032764.234
IIb	AtWRKY61	At1g18860	AAAA01001635.1	
IIb	AtWRKY72	At5g15130		CL002157.61.64 CL038570
IIb	OsWRKY			CL009757.292
IIc	AtWRKY8 AtWRKY28	At5g46350 At4g18170		

<i>O. sativa</i> BAC-Klone				
Gruppe	WRKY-Domäne	AGI-Akzession	öffentliche Datenbanken	
			Syngenta/ TMRI-Datenbank	
IIc	AtWRKY13	At4g39410		
	AtWRKY12	AC003672		
IIc	AtWRKY23	At2g47260		CLB5455.86 CL012723.3
IIc	AtWRKY24	At5g41570		
IIc	AtWRKY43	At2g46130		
IIc	AtWRKY45	At3g01970		
IIc	AtWRKY48	At5g49520		
IIc	AtWRKY50	At5g26170	AAAA01009633.1	CLB12978
IIc	AtWRKY56	At1g64000		
IIc	AtWRKY57	At1g69310		CL006290.89 CL028995.26
IIc	AtWRKY59	At2g21900		
IIc	AtWRKY68	At3g62340		
IIc	AtWRKY71	At1g29860		CL036339.137 CL012065.6
IIc	AtWRKY75	At5g13080	AAAA01010165.1	CL013523
IIc	OsWRKY			CL013336.119
IIc	OsWRKY			CL002151.145
IIc	OsWRKY			CL004069.7.4
IIc	OsWRKY		AAAA01001635.1	CL0296
IIId	AtWRKY7	At4g24240		
IIId	AtWRKY11	At4g31550		
	AtWRKY17	At2g24570		
IIId	AtWRKY15	At2g23320		
IIId	AtWRKY21	At2g30590		
IIId	AtWRKY39	At3g04670		
	AtWRKY74	At5g28650		
IIId	OsWRKY		AAAA01004959.1	CL000581
IIId	OsWRKY			CL033872.4
IIId	OsWRKY		AAAA01001114.1	CL023187
IIId	OsWRKY		AAAA01014145.1	CL012567
IIe	AtWRKY14	At1g30650	AAAA01003718.1	CLB11991
	AtWRKY35	At2g34830		
IIe	AtWRKY16	At5g45050		

<i>O. sativa</i> BAC-Klone				
Gruppe	WRKY-Domäne	AGI-Akzession	öffentliche Datenbanken	
			Syngenta/ TMRI-Datenbank	
IIe	AtWRKY22	At4g01250	AAAA01007990.1	HTC11314
IIe	AtWRKY27	At5g52830		
IIe	AtWRKY29	At4g23550		
IIe	AtWRKY52 RRS1	At5g45270	BAA89560	CL027816.94
IIe	AtWRKY65 AtWRKY69	At1g29280 At3g58710	AAAA01011017.1	CL031472.87
III	AtWRKY30	At5g24110		
III	AtWRKY38 AtWRKY62	At5g22570 At5g01900		
III	AtWRKY41 AtWRKY53	At4g11070 At4g23810		
III	AtWRKY46	At2g46400		
III	AtWRKY54 AtWRKY70	At2g40750 At3g56400		
III	AtWRKY55	At2g40740	AAAA01021006.1	
III	AtWRKY63 AtWRKY64 AtWRKY67	At1g66600 At1g66560 At1g66550		
III	AtWRKY66	At1g80590		
III	OsWRKY		AAAA01008558.1	CLB463.2
III	OsWRKY		AAAA01004868.1	CL011990
III	OsWRKY		AAAA01026398.1	
III	OsWRKY		AAAA01018911.1	
III	OsWRKY		AAAA01006559.1	
III	OsWRKY		AAAA01006156.1	
III	OsWRKY		AAAA01016983.1	CL027956
III	OsWRKY		AAAA01004784.1	CL002689
III	OsWRKY		AAAA01019577.1	
III	OsWRKY		AAAA01004459.1	
III	OsWRKY		AAAA01007569	
III	OsWRKY		AAAA01006767.1 AAAA01	
III	OsWRKY		AAAA01037121.1	CL003819



### 3.6.3. Vergleich der Gruppenzugehörigkeit der *WRKY*-Gene aus den pflanzlichen Modellorganismen *P. patens*, *A. thaliana* und *O. sativa*

Auf der Basis der charakterisierten *WRKY*-Gen-Sequenzen aus den Modellorganismen *P. patens*, *A. thaliana* und *O. sativa* konnte die Anzahl von Vertretern der jeweiligen Gruppen und Subgruppen identifiziert werden. Dazu wurden die abgeleiteten Sequenzen für die *WRKY*-Domäne der *P. patens* *WRKY*-Gene sowie *WRKY*-Domänen von Proteinen anderer Pflanzenarten in den phylogenetischen Baum (siehe Anhang) integriert.

Wie in der Tabelle 3.4 zusammengefasst wurde, sind *WRKY*-Gene der Gruppen I und II phylogenetisch bereits in *P. patens* vorhanden. Im Gegensatz dazu konnten *WRKY*-Gene der Gruppe III bisher nur in höheren Pflanzen gefunden werden. Bemerkenswert ist, dass die Verteilung der Gene in den jeweiligen Gruppen für *A. thaliana* und *O. sativa*, also zwischen einer zweikeimblättrigen und einer einkeimblättrigen Pflanze, weitestgehend gleich ist.

In den beiden verfügbaren Genomen von *O. sativa* Kulturformen konnten jeweils 6 *WRKY*-ähnliche Sequenzen gefunden werden, die erheblich von dem bekannten Konsensus für die *WRKY*-Domäne abweichten. Diese zeigten weder einen perfekten *WRKYGQK*-Konsensus, noch entsprachen die Abstände der Cysteine und Histidine des Zink-Fingers den definierten *WRKY*-Domänen aus höheren Pflanzen (Eulgem *et al.*, 2000).

In einem Vergleich der Genfamilien aus *P. patens* und *A. thaliana* (Rensing *et al.*, 2002) wurde festgestellt, dass diese in *A. thaliana* durchschnittlich drei bis fünfmal größer sind als in *P. patens*. Vor diesem Hintergrund wurden in *P. patens* die erwartete Anzahl Mitglieder gefunden. Die Subgruppe IId ist jedoch rechnerisch überproportional vertreten.

**Tabelle 3.5: Übersicht über die *WRKY*-Gene aus *A. thaliana*, *O. sativa* und *P. patens*.** Dargestellt ist die Anzahl der gefundenen *WRKY*-Gene, die auf Grund ihrer *WRKY*-Domäne, insbesondere der Struktur des Zink-Fingers, der jeweiligen Gruppe geordnet werden können.

<i>Gruppe</i>	<i>P. patens</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>
<b>Gruppe I</b>	5	16	24
<b>Gruppe II</b>	11	43	31
davon Gruppe II c	4	16	14
davon Gruppe IId/HARF	5	7	4
<b>Gruppe III</b>	-	14	10
<b>Putative Pseudogene</b>	-	1	5
<b>Andere</b>	-	-	12

### 3.7. Funktionelle Konservierung der WRKY-Proteine

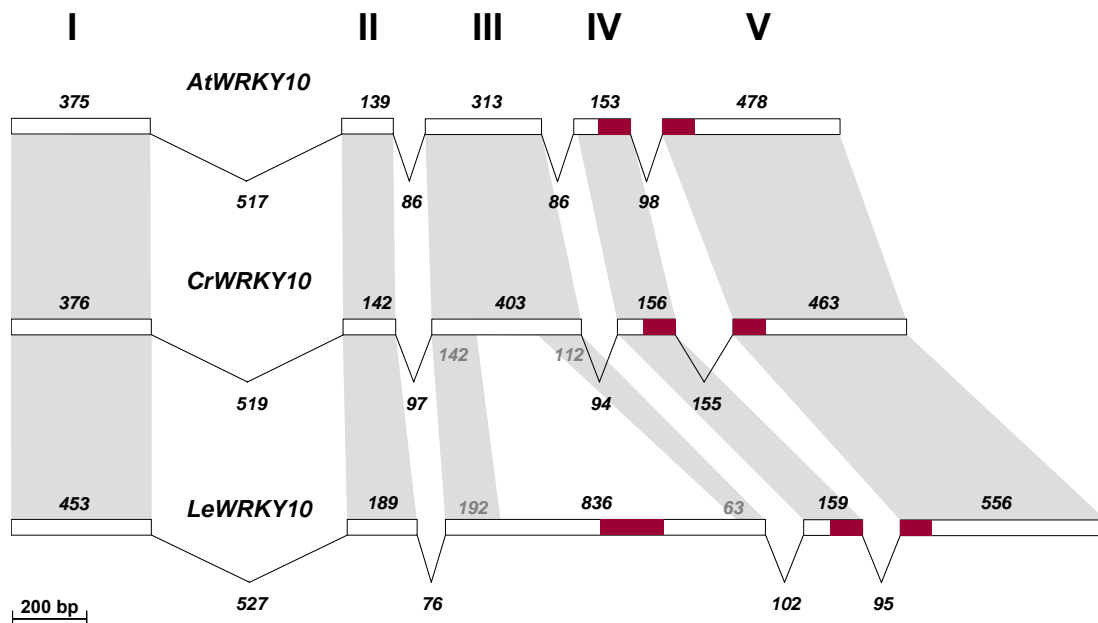
Vergleiche von orthologen Genen, die nachweislich vom selben Genlocus stammen, können Auskunft über den Grad funktioneller Konservierung geben. Untersuchungen an mikro-kolinen Sequenzbereichen zeigten, dass die Abfolge von Genen in verschiedenen Pflanzenarten oft konserviert geblieben ist (Acarkan *et al.*, 2000; Rossberg *et al.*, 2001). In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass auch die Funktion der Proteine, die in solchen Bereichen kodiert werden, selbst zwischen Arten großer evolutiver Distanz, erhalten geblieben sein können (Greb *et al.*, 2002).

#### 3.7.1. Sind WRKY-Gene schnell evolvierende Gene?

Bei einem Vergleich des *Lateral-Suppressor-Locus* aus *L. esculentum* mit den beiden verwandten *Brassicaceae* *A. thaliana* und *C. rubella* wurde ein hoher Grad an Mikro-Kolinearität zwischen den orthologen Sequenzen der drei Pflanzenarten festgestellt (Rossberg *et al.*, 2001). In der Regel evolvierten die untersuchten Gensequenzen mit der Geschwindigkeit, die nach der *molecular-clock*-Hypothese erwartet worden war. Als einzige Ausnahme davon wurde ein WRKY-Gen gefunden, dessen abgeleitete Proteinsequenz zwischen den Orthologen eine höhere Evolutionsrate als die Gene in der unmittelbaren Nachbarschaft zeigte und deswegen als ein schnell evolvierendes Gen bezeichnet wurde (Rossberg *et al.*, 2001).

Werden jedoch nur die kodierenden DNA-Sequenzen verglichen, die entsprechende Bereiche in allen drei orthologen Genen besitzen, ist festzustellen, dass der evolutive Abstand zwischen *L. esculentum* und der Linie zu den *Brassicaceae* größer ist als angenommen, der Abstand zwischen *C. rubella* und *A. thaliana* ist indes gleich den flankierenden Bereichen des WRKY-Gens. Die Intron/Exon-Struktur für die orthologen Exons I, II, IV und V ist zwischen den beiden *Brassicaceae* und *L. esculentum* entsprechend einem Zeitraum von ca. 120 - 150 Mio Jahren konserviert (Abb.3.20).

Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen zeigt, dass zwischen *A. thaliana* und *C. rubella* die Aminosäureidentitäten des WRKY10 über 90 % lagen. Zwischen den *Brassicaceae* und *L. esculentum* waren immerhin noch 60 % Aminosäuren identisch. Zu einem 581 bp langen Stück der kodierenden Sequenz im Exon III des *LeWRKY10* konnte jedoch keine Homologie gefunden werden (Abb. 3.20). Dieser Sequenzunterschied beruht auf einem oder mehreren Deletionsereignisse in einem gemeinsamen Vorfahren von *A. thaliana* und *C. rubella*. Die abgeleitete Proteinsequenzen zeigen, dass die Deletion zum Verlust der aminoterminalen WRKY-Domäne des WRKY10-Proteins, einem Vertreter der Gruppe I, in der Familie der *Brassicaceae* geführt hat.



**Abb. 3.20: Schematischer Vergleich der Intron/Exon-Strukturen der orthologen Gene *AtWRKY10*, *CrWRKY10* und *LeWRKY10*.** Die dargestellten Intron/Exon-Strukturen beruhen auf dem Vergleich genomischer DNA mit cDNA-Sequenzen. Die Darstellung der Introns und Exons ist maßstabsgerecht. Die Größen für die Exons sind oberhalb, die für die Introns unterhalb der Gen-Strukturen in Basenpaaren (bp) angegeben. Sequenzbereiche mit mindestens 50 % Nucleinsäureidentität wurden grau hinterlegt. Für das nicht konservierte Intron III sind die Größen der orthologen Sequenzen zwischen *C. rubella* und *L. esculentum* in Basenpaaren (bp) innerhalb der grau-hinterlegten Flächen angegeben. Die Beschriftung der Exons ist in römischen Zahlen angegeben. (verändert nach Rossberg, *et al.*, 2001)

Auch die abgeleiteten Sequenzen für die WRKY-Domäne der orthologen *WRKY10*-Gene wurden in den phylogenetischen Baum (siehe Anhang A2.4) integriert und es konnte herausgefunden werden, dass die zueinander paralogenen Sequenzen für *NtWRKY9* und *NtWRKY4* orthologe zu *LeWRKY10* und dadurch auch orthologe zu *AtWRKY10* und *CrWRKY10* darstellen. Das Vorhandensein von zwei WRKY-Domänen in den *Nicotiana tabacum* Proteinen ist ein weiterer Beleg dafür, dass das Deletionsereignis nach der evolutiven Abzweigung der Linie, die von den *Solanaceae* zu den *Brassicaceae* führt, stattfand.

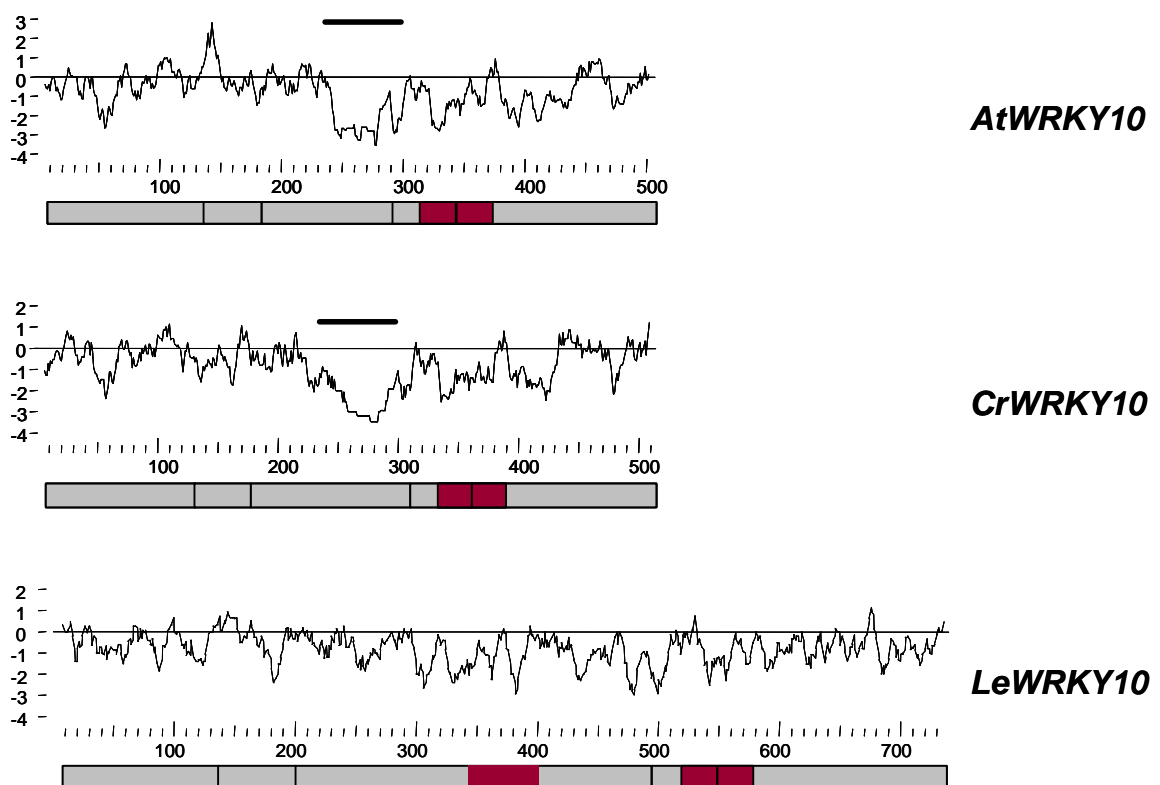
Vor diesem Hintergrund kann gesagt werden, dass die untersuchten *WRKY*-Gene, auch die orthologen *WRKY10*-Gene, keine schnell evolvierende Gene sind. Der deutliche Unterschied ist auf eine zufällige Deletion in der kodierenden Sequenz zurückzuführen. Deswegen kann die gestellte Frage, ob *WRKY*-Gene grundsätzlich schnell evolvierende Gene darstellen, verneint werden.

### 3.7.2. Strukturelle Analyse der orthologen *WRKY10*- Gene aus *A. thaliana*, *C. rubella* und *L. esculentum*

Auf Grund der stattgefundenen Deletion in einem der Vorfahren der Linie, die zu den *Brassicaceae* führte, könnten sich nicht nur die Intron/Exon-Strukturen der codierenden Sequenzen verändert haben, sondern auch die Strukturen der abgeleiteten Proteine könnten andere Eigenschaften bekommen haben.

Um einen Eindruck von der Topologie der Proteine zu erhalten, wurde mittels Kyte-Doolittle-Analyse ein Hydropathie-Diagramm erstellt (Abb. 3.21). Es ist deutlich zu sehen, dass alle drei Proteine hydrophil (Hydropathie < 0) sind.

Für *AtWRKY10* und *CrWRKY10* wurden sehr ähnliche Profile erhalten. Besonders hervorzuheben ist ein sehr hydrophiler Bereich in der Umgebung der stattgefundenen Deletion, der in *LeWRKY10* nicht zu finden ist.



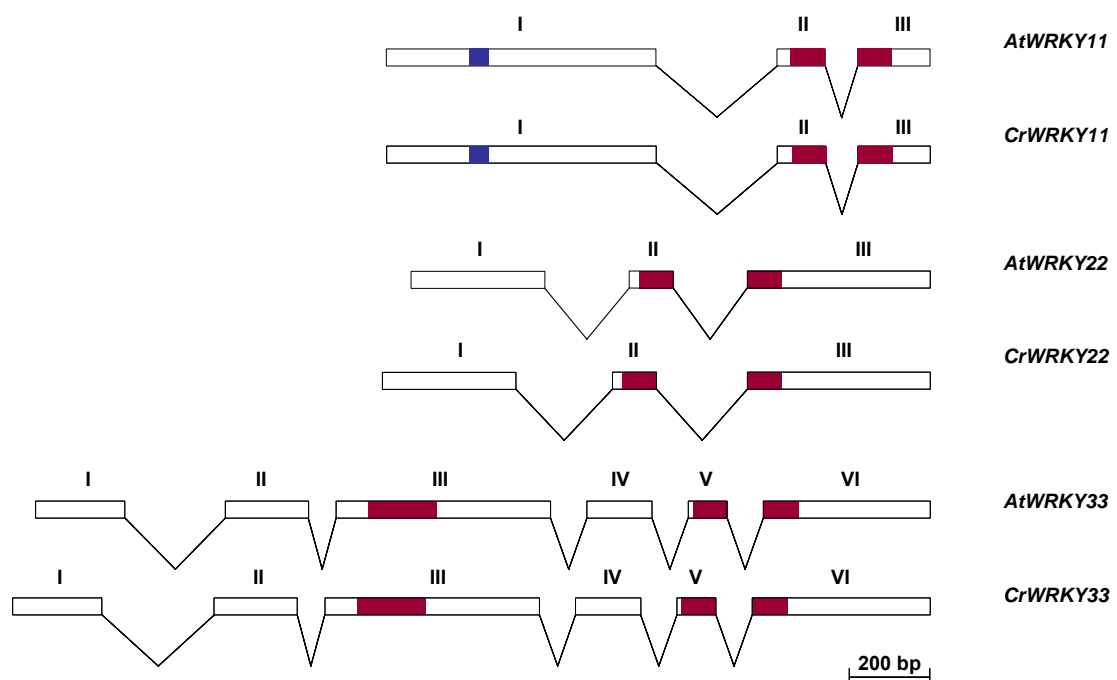
**Abb. 3.21: Vergleich der Hydropathie mittels Kyte-Doolittle-Analyse der orthologen Gene *AtWRKY10*, *CrWRKY10* und *LeWRKY10*.** Dargestellt ist die Hydropathie, mittels Kyte-Doolittle-Analyse, der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Zur Orientierung wurde die kodierende Sequenz schematisch unterhalb der Diagramme eingefügt und die Intron/Exon-Grenzen mit einer senkrechten Linie angedeutet. Ein horizontaler Balken oberhalb der Diagramme für *AtWRKY10* und *CrWRKY10* zeigt den hydrophoben Bereich, der nicht in *LeWRKY10* enthalten ist. Die Sequenz der WRKY-Domäne ist rot hervorgehoben. Hydrophobe Bereiche (> 0); hydrophile Bereiche (< 0)

### 3.7.3. Vergleich anderer *WRKY*-Gene aus *C. rubella* mit ihren orthologen in *A. thaliana*

Um die Annahme zu stützen, dass *WRKY*-Gene keine schnell evolvierende Genfamilie repräsentieren, wurden drei weitere *WRKY*-Gene aus *C. rubella* sequenziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *PpWRKY20* und *AtWRKY11* strukturell und funktionell untersucht. Deswegen lag es nahe, das entsprechende orthologe Gen zu *AtWRKY11* aus *C. rubella* zu untersuchen.

Da es sich bei den vorher untersuchten Orthologen zu *WRKY10* um ein *WRKY*-Gen der Gruppe I gehandelt hat, sollte mit *CrWRKY33*, dem orthologen zu *AtWRKY33*, ein anderes Gen der Gruppe I betrachtet werden. Außerdem wurde *AtWRKY33* in der COG-Analyse als ortholog zu *PpWRKY1* gezeigt.

Vor dem Hintergrund eines vermutlich sehr hohen Grads der Konservierung innerhalb der Subgruppe IId, wurde ein weiterer Vertreter der Gruppe II untersucht. Hier fiel die Wahl auf die Orthologen *AtWRKY22* und *CrWRKY22*.



**Abb. 3.22: Schematischer Vergleich der Intron/Exon-Strukturen der orthologen *WRKY*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana*.** Die dargestellten Intron/Exon-Strukturen beruhen auf dem Vergleich der genomischen *C. rubella*-Sequenzen mit cDNA-Sequenzen aus *A. thaliana*. Die Darstellung der Introns und Exons ist maßstabsgerecht. Die Beschriftung der Exons ist in römischen Zahlen angegeben.

Wie in Abbildung 3.22 zu sehen ist, sind die Intron/Exon-Strukturen zwischen den drei orthologen *WRKY*-Genen konserviert. Die zu verzeichnenden Unterschiede betreffen in der kodierenden Sequenz sowohl einzelne Nucleotidaustausche als auch die Insertion oder Deletion eines ganzen Basentriplets (die direkten Sequenzvergleiche sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang angeführt). Größere Sequenzunterschiede sind ausschließlich in den Introns zu finden (siehe Anhang A4.). In allen Fällen betrug die Identität in der kodierenden Sequenz zwischen den jeweiligen Orthologen 85 bis 92 %. Die abgeleitete Proteinsequenz war zwischen 90 und 94 % identisch.

Weitere orthologe Sequenzen aus *C. rubella* und *A. thaliana* (siehe Anhang A3., A4) wurden miteinander und mit den in der Literatur angegebenen Daten (Acarkan *et al.*, 2001; Rossberg *et al.*, 2001; Schmidt, 2002) verglichen. So konnte für die untersuchten *WRKY*-Gene eine gleichförmige Evolutionsgeschwindigkeit festgestellt werden.

#### **3.7.4. Das Expressionsmuster von *AtWRKY10*, *CrWRKY10* und *LeWRKY10* ist konserviert**

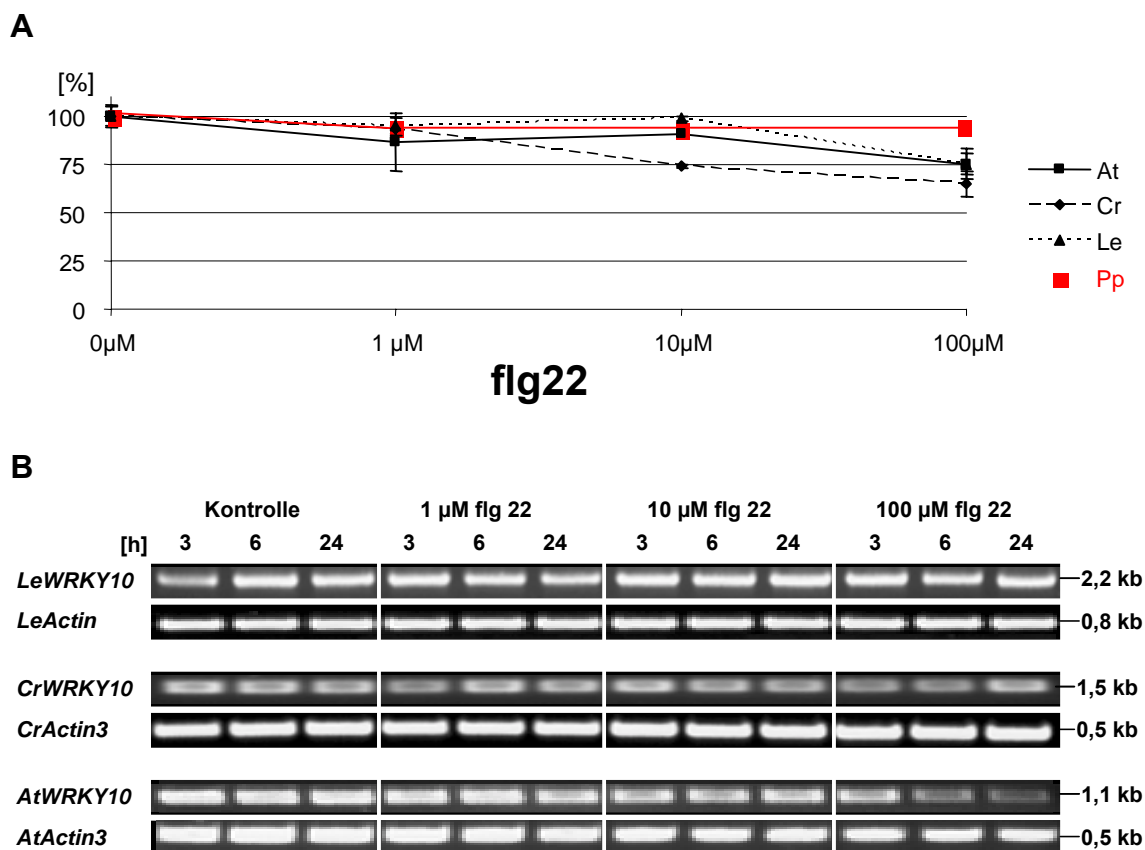
Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die orthologen *WRKY10*-Gene nur auf Grund einer Deletion in der kodierenden Sequenz strukturell deutlich unterscheiden, sollte untersucht werden, in wie weit die Expressionsmuster von einander abweichen.

Wie bereits gezeigt wurde, können gestresste Pflanzen mit einer Verlangsamung des Wachstums reagieren (z.B. Hsieh *et al.*, 2002).

Deswegen wurden eine Woche alte Pflanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von flg22 und UV behandelt. Nach zwei weiteren Wochen wurde das Gewicht als ein wachstumsabhängiger Parameter bestimmt. Die Gewichtsveränderung gegenüber den Kontrollpflanzen diente als Anhaltspunkt für die Stärke des applizierten Stresses.

Abbildung 3.23A zeigt den Gewichtsverlust bei *A. thaliana*, *C. rubella* und *L. esculentum* in Abhängigkeit von der zunehmenden flg22-Konzentration. Zwei Wochen nach der Behandlung konnte eine Wachstumsveränderung um 25 % gegenüber der Kontrolle, bei allen drei Pflanzenarten, festgestellt werden. Die Reaktion der höheren Pflanzen auf flg22 sollte auch mit der Reaktion von niederen Pflanzen verglichen werden. Deswegen wurde *P. patens* in diesen Versuch integriert. Wie zu sehen ist, konnte bei dem Moos keine Veränderung des relativen Wachstums zwischen behandeltem und unbehandeltem Protonema festgestellt werden (Abb. 3.23A).

Die nachgewiesenen Transkriptmengen (Abb. 3.23B) sind für *LeWRKY10*, *CrWRKY10* und *AtWRKY10* unter allen flg22-Konzentrationen gleich, so dass von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden kann. Die sichtbare Veränderungen der Transkriptmengen korrelierten mit der *AtActin3*-Kontrolle, was an einer grundsätzlich geringeren cDNA-Ausgangsmenge in diesen Ansätzen liegt.



**Abb. 3.23: Wachstumsanalyse und Expressionsanalyse nach flg22-Behandlung. (A)** Relatives Wachstum von *P. patens* (*Pp*), *L. esculentum* (*Le*), *C. rubella* (*Cr*) und *A. thaliana* (*At*) innerhalb von zwei Wochen nach der Behandlung mit verschiedenen flg22-Konzentrationen in Prozent. Behandelt wurden eine Woche alte Pflanzen im Keimlingsstadium oder 5 Tage altes Protonema. Das prozentuale Wachstum wurde in Form von relativer Gewichtsveränderung bestimmt. **(B)** Die Analyse der Transkripte der orthologen *WRKY10*-Gene aus *L. esculentum*, *C. rubella* und *A. thaliana* erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge des Actins. Die Primer für Actin aus *L. esculentum* wurden freundlicher Weise von Gregor Schmitz und Klaus Theres zur Verfügung gestellt.

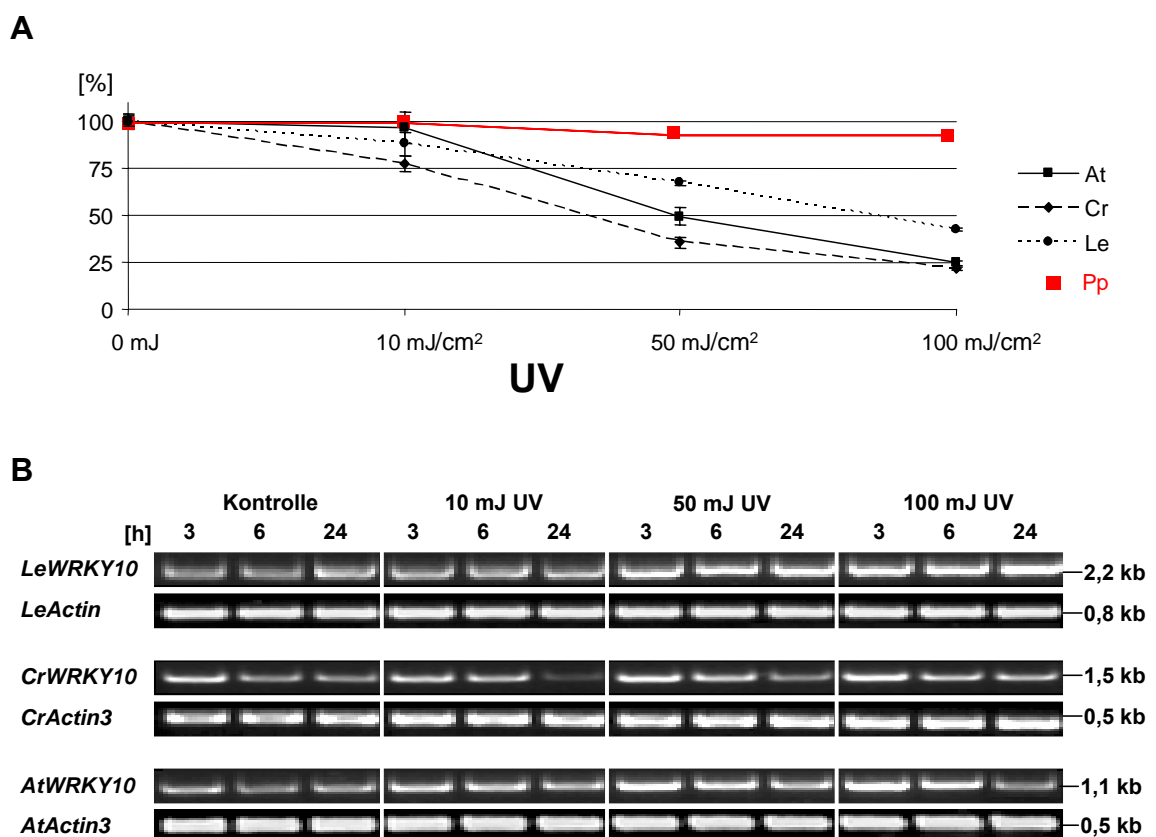
In einem Makro-Array-Experiment wurde von Ralf Stracke, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, gezeigt, dass die *AtWRKY10*-Transkriptmenge nach UV-Behandlung innerhalb der ersten 3h bis 6 h um einen Faktor 2 bis 4 zunimmt. Dieses Ergebnis wurde zum Anlass genommen, auch bei den anderen beiden Pflanzenarten die *WRKY10*-Transkriptmenge zu bestimmen (Abb. 3.23B).

Das relative Wachstum wurde auch in diesem Experiment mittels Gewichtsveränderung bestimmt.

Abbildung 3.24A zeigt den Gewichtsverlust bei *A. thaliana*, *C. rubella* und *L. esculentum* in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit verschiedenen UV-Mengen.

Zwei Wochen nach der Behandlung konnte eine Wachstumsveränderung gegenüber der Kontrolle um etwa 75 % bei allen drei Pflanzenarten festgestellt werden. Die Reaktion selbst nach hohen UV-Mengen bei der niederen Pflanzen *P. patens* zeigte überraschender Weise nur wenig Veränderung des relativen Wachstums zwischen behandeltem und unbehandeltem Protonema (Abb. 3.24A).

Die nachgewiesenen Transkriptmengen (Abb. 3.24B) unter den verschiedenen UV-Mengen waren für die jeweiligen orthologen Gene *LeWRKY10*, *CrWRKY10* und *AtWRKY10* sehr ähnlich.



**Abb. 3.24: Wachstumsanalyse und Expressionsanalyse nach UV-Behandlung.** (A) Relatives Wachstum von *P. patens* (*Pp*) *L. esculentum* (*Le*), *C. rubella* (*Cr*) und *A. thaliana* (*At*) innerhalb von zwei Wochen nach der Behandlung mit verschiedenen UV-Mengen in Prozent. Behandelt wurden eine Woche alte Pflanzen im Keimlingsstadium oder 5 Tage altes Protonema. Das prozentuale Wachstum wurde in Form von relativer Gewichtsveränderung bestimmt. (B) Analyse der Transkripte der orthologen *WRKY10*-Gene aus *L. esculentum*, *C. rubella* und *A. thaliana* erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge des Actins. Die Primer für Actin aus *L. esculentum* wurden freundlicher Weise von Gregor Schmitz und Klaus Theres zur Verfügung gestellt.



Eine Veränderung der Transkriptmenge 3 h nach der Behandlung um einen Faktor 2 bis 4 konnte im Falle von *AtWRKY10* reproduziert werden (Abb. 3.24B). Jedoch war dieser Unterschied in der Transkriptmenge nicht gut aus der Abbildung 3.24B zu erkennen. Deswegen wurden die Gel-Bilder als TIF-Datei in das Bildverarbeitungsprogramm ImageQuant importiert und dort die relativen Flächen der Banden bestimmt. Auch die Transkripte der Orthologen nahmen unter höheren UV-Dosen um etwa diesen Faktor zu.

### **3.7.5. Das Expressionsmuster orthologer WRKY-Gene ist zwischen *A. thaliana* und *C. rubella* konserviert**

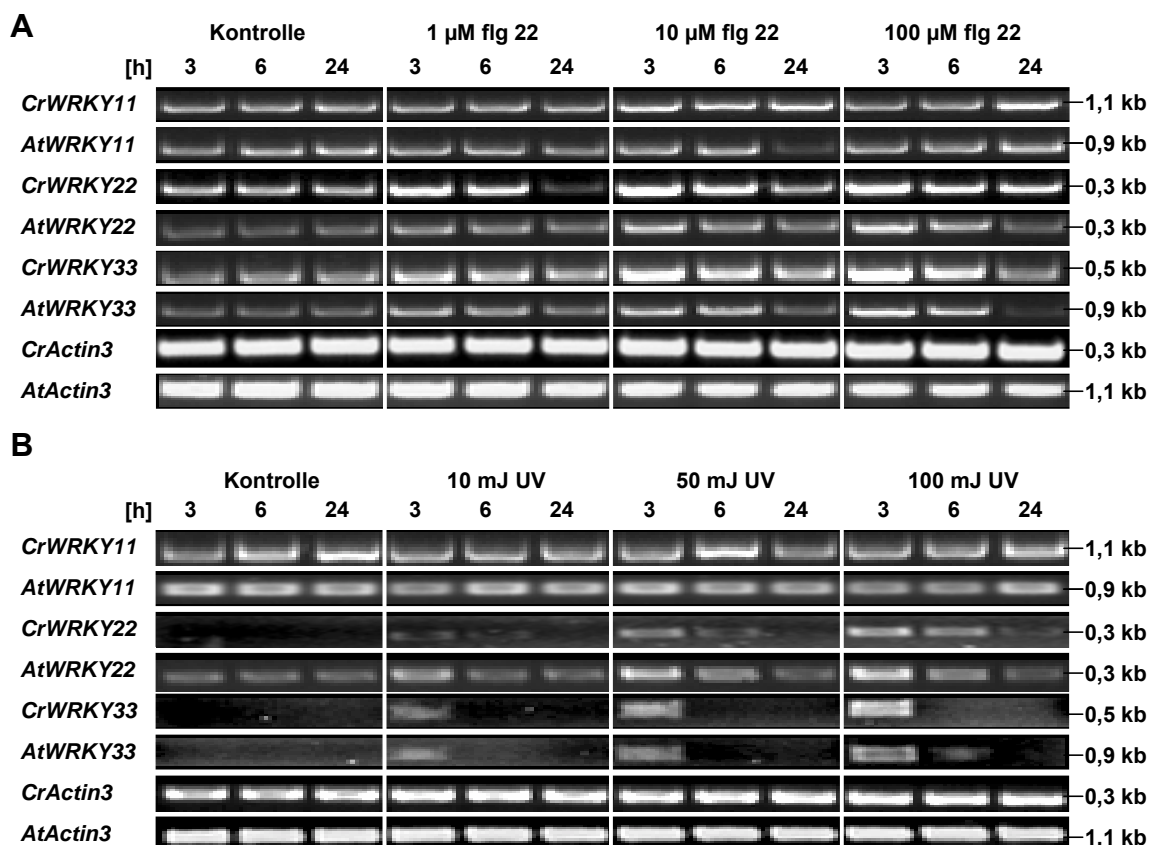
Die durchgeführten Untersuchungen der Expressionsmuster der drei orthologen *WRKY10*-Gene aus *A. thaliana*, *C. rubella* und *L. esculentum* zeigen einen hohen Grad an Ähnlichkeit. Hier sollte nun untersucht werden, ob die Transkriptmengen der anderen orthologen *WRKY*-Gene zwischen *A. thaliana* und *C. rubella* auch konserviert sind.

Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, gleichen sich die Transkriptmengen der jeweils orthologen Gene sowohl nach flg22-Behandlung, als auch nach der Bestrahlung mit verschiedenen UV-Mengen.

Für die *WRKY11*-orthologen Gene konnte eine konstitutive Expression gefunden werden.

Nach der Behandlung mit flg22-Elizitor (Abb. 3.25A) konnte sowohl für die orthologen *WRKY22*- und *WRKY33*-Gene eine Zunahme der Transkriptmengen gegenüber der Kontrolle nach 3 h bzw. 6 h gezeigt werden. Nach UV-Behandlung war die Expression für die *WRKY22*-Orthologen ebenfalls an den Zeitpunkten 3 h und 6 h höher als in der Kontrolle (Abb. 3.25B). Für die beiden orthologen *WRKY33*-Gene war die Induktion transienter. Sowohl in *A. thaliana*, als auch in *C. rubella* konnte eine dosisabhängige Zunahme der Transkriptmengen nur nach 3 h gezeigt werden. Nach 6 h waren die Transkriptmengen wieder gleich der Kontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die untersuchten *WRKY*-Gene aus *C. rubella* mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich die orthologen sind. Andererseits stützt das konservierte Expressionsmuster, die Annahme, dass die Funktion der Proteine möglicherweise konserviert geblieben ist, da sich die Gensequenzen von gemeinsamen Vorfahren ableiten lassen.



**Abb. 3.25: WRKY-Transkripte orthologer Gene nach UV- und flg22-Behandlung.** Expression nach flg22- (A) und UV- (B) Behandlung. Die Analyse der Transkripte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der RT-PCR-Produkte (28 Zyklen) in einem EtBr-gefärbten Agarosegel (0,8%). Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge des *AtActin3* und des *CrActin3*.

### 3.7.6. Analyse der Promotorsequenzen von *AtWRKY10*, *CrWRKY10* und *LeWRKY10*

Die Verfügbarkeit der orthologen, genomischen Loci der *WRKY10*-Gene bot die Möglichkeit in den orthologen Promotor-Sequenzen nach konservierten Elementen zu suchen. Da keine drastischen Veränderungen des Expressionsmusters trotz der Verschiedenheit der kodierenden Sequenz gefunden wurden, war es interessant zu untersuchen, in wie weit die Promotoren erhalten geblieben sind. Bei dieser Vorgehensweise wurde vorausgesetzt, dass nicht nur die Gensequenzen orthologer Gene konserviert sind, sondern auch die *cis*-Elemente, die sich für die Expression verantwortlich zeigen.

Mit dem Programm GAP des GCG-Programmpaketes der Genetics-Computer-Gruppe der Universität Madison (Wisconsin), konnte ein direkter Sequenzvergleich durchgeführt werden (Abbildung des Vergleiches im Anhang A5.). Während die beiden

---

Promotoren der nahe verwandten Arten *A. thaliana* und *C. rubella* problemlos zu vergleichen waren, konnte die Sequenz aus *L. esculentum* nur stückweise mit den anderen gepaart und die restlichen Sequenzbereiche mussten von Hand editiert werden.

Unter Verwendung von MEME/MAST (Bailey und Elkan, 1994) und GIBBS-Sampling (Lawrence. *et al.* 1993) konnten einige Sequenzen gefunden werden, die eine statistische Ähnlichkeit zueinander zeigten. Die gefundenen Bereiche beinhalteten jedoch keine bekannten *cis*-Elemente. Bisher wurden erst ganz wenige Sequenzvergleiche zwischen orthologen Promotoren veröffentlicht (Koch *et al.*, 2001), die jedoch nur nahe verwandte Arten behandelten.

Zur Untersuchung von orthologen Promotorsequenzen eukaryotischer Organismen, deren Vorfahren sich vor einen Zeitraum von mehr als 100 Mio Jahren getrennt haben, wie etwa *L. esculentum* und *A. thaliana*, sind keine erfolgreichen Ansätze beschrieben worden.

### **3.8. Promotor-Analyse anhand des Motif-Mapper-Programms**

Nahe verwandte Promotor-Sequenzen können mit Programmen für den direkten Sequenzvergleich, z.B. mit dem Programm GAP des GCG-Programmpaketes der Genetics-Computer-Gruppe der Universität Madison (Wisconsin), verglichen werden.

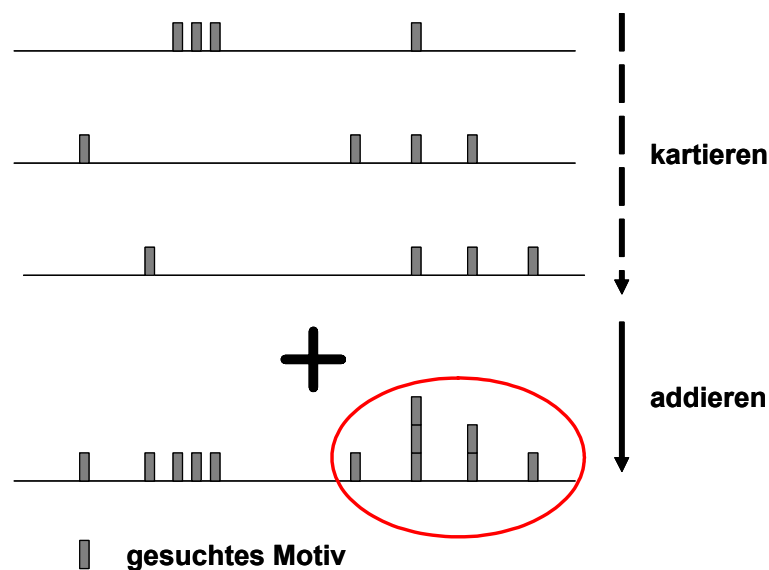
Promotoren von paralogen Genen oder von orthologen Genen entfernt verwandter Organismen - wie sich in der Untersuchung der orthologen *WRKY10*-Promotoren herausgestellt hat - können auf diese Art und Weise nicht miteinander verglichen werden. Die zu diesem Zweck entwickelten Programme analysieren die Sequenzinformation auf zwei verschiedene Arten: Bei der einen Form der Promotor-Analyse wird die Sequenz nach bekannten und charakterisierten *cis*-Elementen abgesucht (z.B. PlaCE, PlantCare). Dies hat den Vorteil, dass viele putativ funktionelle *cis*-Elemente als Ergebnis der Suche erhalten werden. In einem zweiten Schritt müssen die beiden zu analysierenden Sequenzen jedoch von „Hand“ verglichen werden. Diese Programme haben den Nachteil, dass verwandte Elemente gar nicht erfasst werden können, wenn sie nicht zuvor ausführlich Charakterisiert wurden. Die zweite Art Programm (z.B. MEME/MAST) sucht in mehreren Promotor-Sequenzen gleichzeitig nach verwandten Motiven. Bisher werden mit solchen Programmen Promotoren völlig unterschiedlicher Gene auf Gemeinsamkeiten untersucht. Dies geschieht mit einem Algorithmus der zwar Abweichungen im Konsensus toleriert aber ausschließlich frequenzorientiert arbeitet. D.h. häufige Elemente werden eher als Gemeinsamkeit hervorgehoben und seltene Elemente können hiermit nur schwer gefunden werden. Diese Art von Programmen vernachlässigt auch die Position der gefundenen Elemente in bezug auf den Transkriptions- oder Translationsstartpunkt.

### 3.8.1. Das Prinzip des *Motif-Mapper*-Programms

Für die primäre Analyse von Promotoren fehlte ein Programm, das sowohl frequenzorientiert arbeitet und die Häufigkeiten der zu untersuchenden Elemente bestimmt, als auch positionsspezifische Analysen ermöglicht und die gefundenen Häufigkeiten auf den untersuchten Sequenzabschnitt zu kartieren vermag.

Das Ziel war es eine Methode zu entwickeln, die die bestehenden Programme bei Bedarf ergänzt.

Weiterhin sollte jede Form von Sequenzen in der Art eines fortlaufenden Textes nach beliebigen Motiven durchsucht und die Position der gefundenen Motive kartiert werden können. Für die Promotor-Analyse sollte es in einem zweiten Schritt möglich sein, die kartierten Positionen und die Häufigkeitswerte zwischen einer beliebig großen Anzahl in sich konsistenter Text-Datensätze addieren zu können. So entsteht eine für die untersuchten Sequenzen typische Häufigkeits-Karte des gesuchten Motivs.



**Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Funktionsweise des „MAP+Count“-Algorithmus des *Motif-Mapper*-Programms.** Motive werden in durchgehenden Text-Datensätzen (durchgezogene horizontale Linie) gesucht und die Position gefundener Motive kartiert. Nachfolgend können die erstellten einzelnen Karten zu einer Häufigkeits-Karte des gesuchten Motivs addiert und lokale Bereiche mit veränderter Häufigkeit des Motivs (roter Kreis) identifiziert werden.

Das Grundgerüst des Programms wurde in Zusammenarbeit mit Kurt Stüber, ZWDV, MPIZ Köln, entwickelt und von ihm in PERL programmiert. Das Programm konnte jedoch nur UNIX-gestützt betrieben werden und benötigte eine große Prozessorleistung,

---

um große Datensätze, wie etwa die Analyse und Kartierung von Elementen auf Chromosomen, bearbeiten zu können.

In Zusammenarbeit mit Kurt Stüber und Kenneth W. Berendzen, Arbeitsgruppe Koncz, MPIZ Köln, konnte das Programm weiterentwickelt werden. Kenneth W. Berendzen veränderte das Programm und programmierte *Motif-Mapper* als eine Unterroutine zum Microsoft Word-Programm mittels Visual Basic, so dass für das Arbeiten keine Großrechner mehr nötig waren. Zusätzlich wurde *Motif-Mapper* um einige Unterprogramme erweitert und die Eingabe über eine grafische Oberfläche ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich das „*Map+Count*“-Unterprogramm verwendet.

### 3.8.2. Hexanucleotid Verteilung in Genomen von fünf Modellorganismen

Ähnlich dem *Motif-Mapper* arbeiten auch *Hidden-Markov-Model*-Analysen, die auf der veränderten Nucleotid-Häufigkeit zwischen der Gesamthäufigkeit in genomischer Sequenz gegenüber kodierender Sequenz beruhen. Kodierende Sequenz besitzt eine gewisse Regelmäßigkeit, da die in Codons kodierten Aminosäuren eine bestimmte Präferenz haben mit anderen Aminosäuren gemeinsam oder eher nicht aufzutreten. So ergeben sich für die kodierenden DNA-Bereiche durch ihre festgelegte Funktion nach der Transkription und während der Translation in Aminosäuren übersetzt zu werden eine andere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Hexanucleotids. So treten z.B. Nucleotid-Wiederholungen in kodierender Sequenz seltener und in Introns sowie anderen nicht kodierenden Bereichen häufiger auf.

Da für Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte, dass oft mehr als nur ein bestimmtes DNA-Motiv gebunden werden kann (Niggeweg, R. *et al.*, 2000), war die Identifizierung von putativ funktionellen Bindungsstellen mit rein frequenzbasierten Untersuchungs-Methoden wenig erfolgreich.

Da für die *Hidden-Markov-Model*-Analysen Häufigkeitsunterschiede in der Hexanucleotid-Verteilung zwischen kodierender und nicht-kodierender Sequenz bedingt durch die unterschiedliche Funktion betrachtet werden können, wurde entsprechendes auch für Promotoren angenommen. Dabei wurde von genau der umgekehrten Annahme ausgegangen, nämlich, dass die Hexanucleotid-Verteilung im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz bedingt durch das Vorkommen funktionaler Bindungsmotive lokale Häufigkeitsunterschiede im Vergleich mit kodierender Sequenz oder dem Genom zeigt. Außerdem wurde davon ausgegangen, dass sich die Verteilung der funktionellen Elemente örtlich begrenzen lassen muss.

Als Voraussetzung müssen viele Gene, von denen der 5'-Bereich vor dem Startcodon der kodierenden Sequenz bekannt ist, die Grundlage für die mit *Motif-Mapper* erstellten

---

Häufigkeits-Karten bilden, so dass auch die Verteilung seltener Motive erfasst werden kann.

Entsprechend dem Prinzip für die *Hidden-Markov-Model*-Analysen sollte auch die Annahme für die Untersuchung von Promotor-Elementen mittels dem *Motif-Mapper*-Programm auf alle Organismen übertragbar sein, solange die Promotor-Organisation erhalten geblieben ist.

Die Verfügbarkeit von annähernd vollständig sequenzierter und annotierter Genome von Modellorganismen verschiedener Organismenreiche sollte die Möglichkeit bieten, den zu erstellenden Häufigkeits-Karten eine Grundlage zu geben, um das *Motif-Mapper*-Programm zu testen und die oben gemachten Annahmen zu überprüfen.

Die vorläufigen annotierten Chromosomen-Sequenzen von *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurden von GenBank NCBI bezogen. Zusammen mit Kurt Stüber und Kenneth W. Berendzen wurden 1500 bp bzw. 600 bp DNA-Sequenz vor dem Translationsstart ATG von allen annotierten Genen aus der chromosmalen Sequenz extrahiert.

Ähnlich wurde mit 2410 annotierten BAC-Sequenzen aus *O. sativa* verfahren, die von der *O. sativa*-TIGR-Datenbank bezogen wurden. Diese enthielten 7019 offene Leseraster, von denen in 6808 Fällen DNA-Sequenzbereiche von 1500 bp bzw. 600 bp vor dem Translationsstart ATG für eine vorläufige Häufigkeits-Karte extrahiert werden konnten.

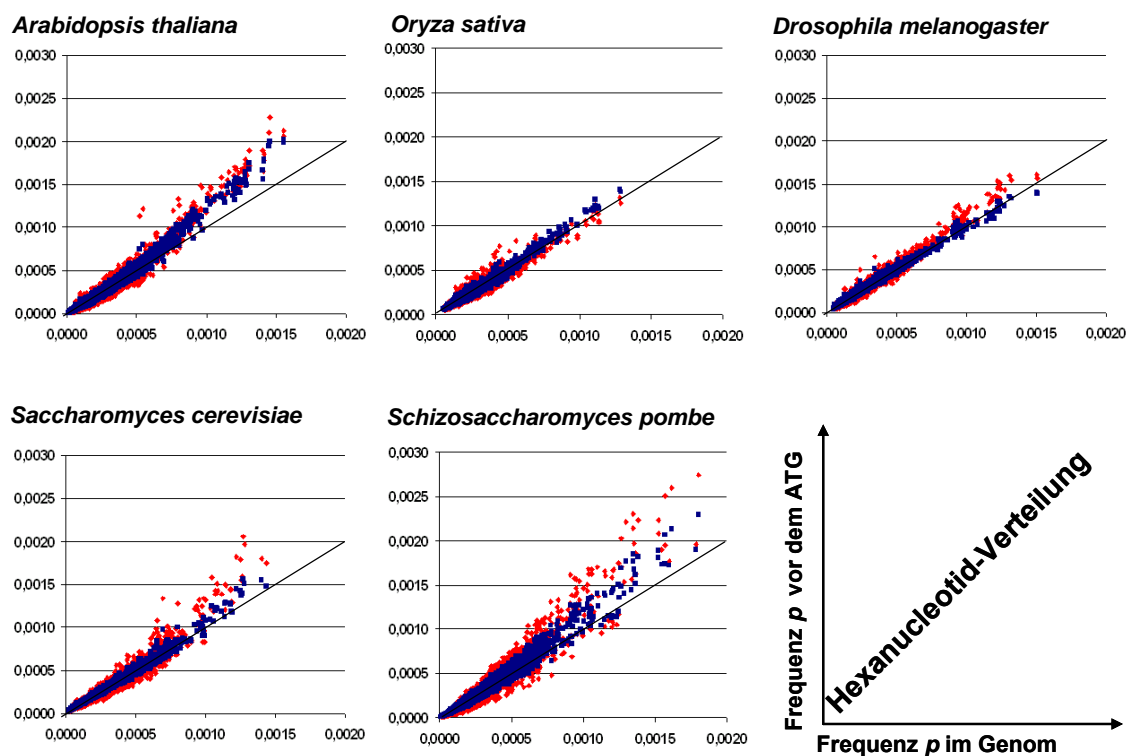
Im Folgenden wird sich auf die Datensätze, die 1500 bp bzw. 600 bp DNA-Sequenz vor dem Translationsstart ATG enthalten, als „1500 bp Promotordatensatz“ bzw. „600 bp Promotordatensatz“ bezogen.

In Abbildung 3.27 ist die Hexanucleotid-Verteilung der Frequenz  $p$  im Genom (Abszisse) gegen die Frequenz  $p$  vor dem Translationsstart (Ordinate) für alle 4096 möglichen Hexanucleotide aufgetragen. Die sich ergebenden Punktwolken sind für die fünf untersuchten Organismen leicht in Richtung Ordinate gekrümmt. Dies bedeutet, dass in allen Datensätzen ein gemeinsamer Trend vorliegt, bei dem im Genom häufig vorkommende Hexanucleotide in den Promotordatensätzen noch häufiger werden. Dieser Trend tritt im 600 bp Promotordatensatz noch stärker zu Tage. Der Datensatz aus *O. sativa* weicht von diesem generellen Trend jedoch ab, was mit einer schlechteren Annotierung des Translationsstarts zusammenhängen kann.

Trotzdem konnten die Annahmen, die aus dem Prinzip der *Hidden-Markov-Model*-Analysen abgeleitet wurden, mit dem *Motif-Mapper*-Programm bestätigt werden. Das Prinzip der Analyse scheint auf alle Organismengruppen übertragbar zu sein.

Um einen abgesicherten Signifikanzrahmen für weitergehende Untersuchungen zu schaffen, wurden nur solche Hexanucleotide als anders verteilt angesehen, wenn sie in den Promotordatensätzen um mindestens 20 % von der Häufigkeit im Genom abwichen.

Eine genauere Betrachtung der 4096 Hexanucleotide hat ergeben, dass in den meisten Fällen immer dieselben Oligonucleotide in den Promotoren der getesteten Modellorganismen häufiger waren. Die Anzahl signifikant von der Frequenz im Genom abweichender Hexanucleotide betrug nur 1 bis 3 % für den 1500 bp Promotordatensatz und 2 bis 5 % für den 600 bp Promotordatensatz. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Elementkomposition in der Nähe des Translationsstarts deutlich sowohl von der des 1500 bp Promotordatensatzes, als auch von der kodierenden Sequenz, die immerhin 20 bis 30 % der untersuchten Genomsequenz darstellt, unterscheidet.



**Abb. 3.27: Hexanucleotid-Verteilung anhand der Frequenz  $p$  im Genom gegenüber der Frequenz  $p$  vor dem Translationsstart.** Zu sehen ist die Hexanucleotid-Frequenz der Genome gegenüber ihrer Frequenz in den beiden unterschiedlich großen Promotordatensätzen. Der 1500 bp Promotordatensatz ist blau und der 600 bp Promotordatensatz rot dargestellt. Die Beschriftung der Ordinate und Abszisse ist schematisch für alle untersuchten Hexanucleotid-Verteilungen unten rechts gezeigt. Die schwarzen Geraden zeigen die jeweilige Gleichverteilung der Hexanucleotide im Genom und den Promotordatensätzen.

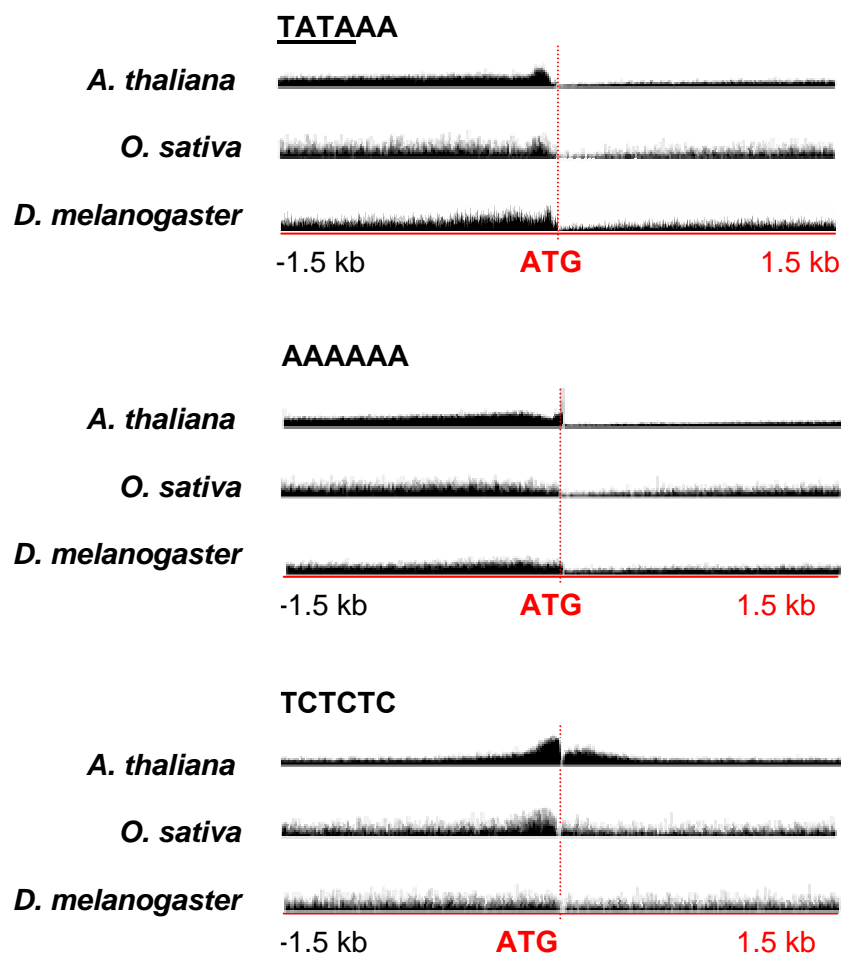
Damit ist auch die weitere Annahme bestätigt worden, die eine lokale Andersverteilung für putativ funktionelle Elemente voraussetzt (Abb.3.27).

Für die meisten unterschiedlich verteilten Hexanucleotide gilt, dass sie gemäß ihres A/T-Reichtums verteilt sind. A/T-reiche Motive sind dabei häufiger als G/C-reiche Hexanucleotide. Andere bestehen aus Dinucleotid- oder Trinucleotid-Wiederholungen.

### 3.8.4. Die Elementverteilung kann zwischen Organismenreichen konserviert sein

Nach einer genaueren Betrachtung der Häufigkeits-Karten der Hexanucleotide, konnten für die untersuchten Modellorganismen jeweils spezifische Hexanucleotide identifiziert werden, die für die eine, aber nicht für die andere Organismengruppe charakteristisch ist. In Abbildung 3.28 wurden aus den 4096 Hexanucleotid-Verteilungen einige exemplarisch gezeigt, um die Ähnlichkeit der Häufigkeits-Karten zu demonstrieren.

So ist zum Beispiel das TATA-Motiv enthaltende TATAAA-Hexanucleotid sehr ähnlich verteilt. Das TCTCTC-Motiv zeigt eine konservierte Verteilung in den beiden pflanzlichen Modellorganismen, nicht aber in *D. melanogaster*.



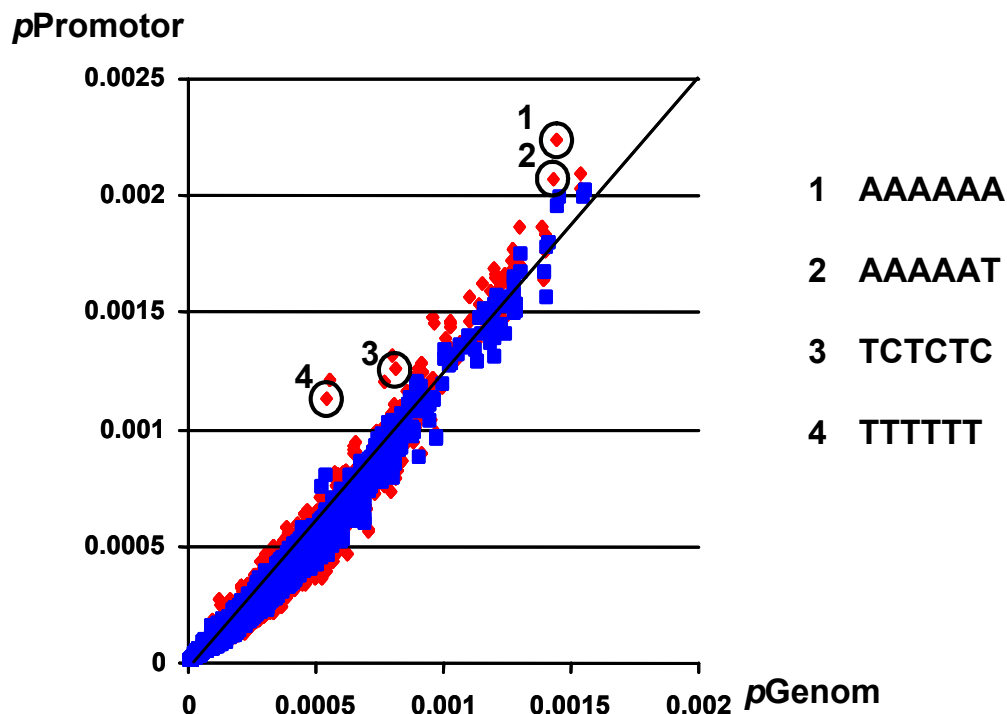
**Abb. 3.28: Schematischer Vergleich der Häufigkeits-Verteilung einiger Hexanucleotide.** Die Diagramme stellen die Häufigkeits-Karten einiger ausgewählter Hexanucleotide in einem Bereich von -1,5 kb bis +1,5 kb um den Translationsstart (ATG) dar. Als Grundlage dienten 25'957 einzelne Promotor/Gen-Bereiche, in welchen alle möglichen 4096 Hexanucleotide gezählt und kartiert wurden. Die dargestellten Häufigkeiten wurden normalisiert, damit seltene Elemente mit häufigen verglichen werden können [ $y = n / \text{Durchschnitt}$ ].



Auf Grund der Verfügbarkeit von *A. thaliana* als ein pflanzlicher Modellorganismus im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung und der nachzuweisenden Übertragbarkeit der *in silico* Daten auf ein biologisches System *in vivo*, wurde sich bei den Analysen im Folgenden auf diese Art beschränkt.

### 3.8.5. Mit Motif-Mapper können „neue“ Promoter-Elemente gefunden werden

Nach einem Vergleich mit bekannten *cis*-Elementen in der Datenbank PlaCE konnten einige, in Promotoren häufige Hexanucleotide bereits bekannten Elementen zugeordnet werden (Abb 3.29). Beispiele sind das G-Box-Element (CACGTG) und das DR5-*Auxin-Response*-Element (TGTCTC), die beide signifikant häufiger in dem 600 bp Promotordatensatz zu finden waren, als im Genom von *A. thaliana*.



**Abb. 3.29: Hexanucleotid-Verteilung anhand der Frequenz  $p$  im Genom gegenüber der Frequenz  $p$  vor dem Translationsstart in *A. thaliana*.** Zu sehen ist die Hexanucleotid-Frequenz des *A. thaliana*-Genoms gegenüber der Frequenz in den beiden unterschiedlich großen Promotordatensätzen. Der 1500 bp Promotordatensatz ist blau und der 600 bp Promotordatensatz rot dargestellt. Exemplarisch wurden vier Hexanucleotide dargestellt, die in den Promotordatensätzen signifikant anders verteilt waren.

Ein anderes Hexanucleotid, das signifikant in den Promotordatensätzen häufiger als im Genom war, besitzt die Nucleotidsequenz TCTCTC. Generell sind Elemente, die aus Dinucleotid-Wiederholungen bestehen eine Gruppe häufiger Hexanucleotide in Promotoren. Ein Vergleich mit bereits bekannten *cis*-Elementen erbrachte, dass diese

Sequenz kein bekanntes Element und auch nicht Bestandteil eines bekannten Elementes ist.

Da viele Transkriptionsfaktoren doppelsträngige DNA binden, die aus einem Sinn- und einem Gegensinn-Strang besteht, wurde auch die Verteilung des Gegensinn-Hexanucleotids GAGAGA betrachtet. Auch dieses Hexanucleotid tritt signifikant häufiger in Promotoren als im Genom auf.

### 3.8.6. Das (TC/GA)<sub>8</sub>-Element des pflanzlichen GAF ist in Promotoren häufig

Zufälliger Weise wurde von Luca Santi, MPIZ Köln, in einem unabhängigen Ansatz mittels Bindungsstudien ein (TC/GA)<sub>8</sub>-Element charakterisiert, dass von einer neuen Klasse Transkriptionsfaktoren, GAF (*GAGA-binding-faktor*), gebunden wird. Inzwischen hat auch eine andere Arbeitsgruppe das *in silico* als putativ funktionell charakterisierte Element als Bindungsmotiv für Transkriptionsfaktoren aus *Glycine max* identifiziert (Sangwan und O'Brian, 2002).

Wie in Tabelle 3.6 zu sehen ist, werden 50 bis 60 % der im Genom vorhandenen Elemente in nur 1500 bp vor dem Translationsstart gefunden. Mehr als 40 % der insgesamt vorkommenden (TC/GA)<sub>n</sub>-Elemente befindet sich in nur 600 bp vor dem ATG.

**Tabelle 3.6: Verteilung des (TC/GA)<sub>n</sub>-Elementes im *A. thaliana* Genom.** Anzahl vorkommender (TC/GA)-Elemente in den annotierten Exons und Introns sowie in den beiden unterschiedlich großen Promotordatensätzen. Die Summe gefundener Elemente aus den Exons, Introns und den Promotordatensätzen wird unter transkriptionelle Einheiten angegeben. Die Anzahl der Elemente des intergenischen Bereichs wird aus der Differenz zu den im Genom gefundenen Elementen errechnet. Getestet wurden Dinucleotid-Wiederholungen der Länge (TC/GA)<sub>6</sub> bis (TC/GA)<sub>11</sub>. Die Ergebnisse für die Promotordatensätze sind rot hervorgehoben.

(TC/GA) <sub>n</sub>	Genom	Exon [%]	Intron [%]	Promotor [%]		Transkriptionelle Einheiten [%]		Intergenischer Bereich [%]	
				-1500	-600	-1500	-600	-1500	-600
6	1436	2	13	54	39	69	54	31	46
7	837	0,9	11	61	43	73	56	27	44
8	547	0,9	13	63	48	77	62	23	38
9	308	0,6	14	63	42	77	56	23	44
10	167	0,5	10	52	40	62	50	38	50
11	106	0,9	8	51	58	60	68	40	32
<b>Gesamt</b>	<b>3401</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>58</b>	<b>42</b>	<b>72</b>	<b>56</b>	<b>29</b>	<b>44</b>

### 3.8.7. Verteilung von *cis*-Elementen im Genom.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit dem *Motif-Mapper*-Programm neue *cis*-Elemente gefunden werden konnten, stellte sich nun die Frage, ob chromosomale Bereiche identifiziert werden können, die Häufungen bestimmter *cis*-Elemente zeigen.

Für Gene ist bekannt, dass es Häufungen von Gen-Familien an bestimmten Loci gibt, die durch Tandemduplikationen entstanden sind. Entsprechendes soll hier mit vier *cis*-Elementen exemplarisch in *A. thaliana* untersucht werden.

Neben den bekannten *cis*-Elementen W-Box (Eulgen *et al.*, 2000), G-Box (Foster *et al.*, 1994) und einem GCC-Box-ähnlichen Element, AGCCRCC (Rushton *et al.*, 2002), sollte auch das neu identifizierte (TC/GA)<sub>8</sub>-Element untersucht werden.

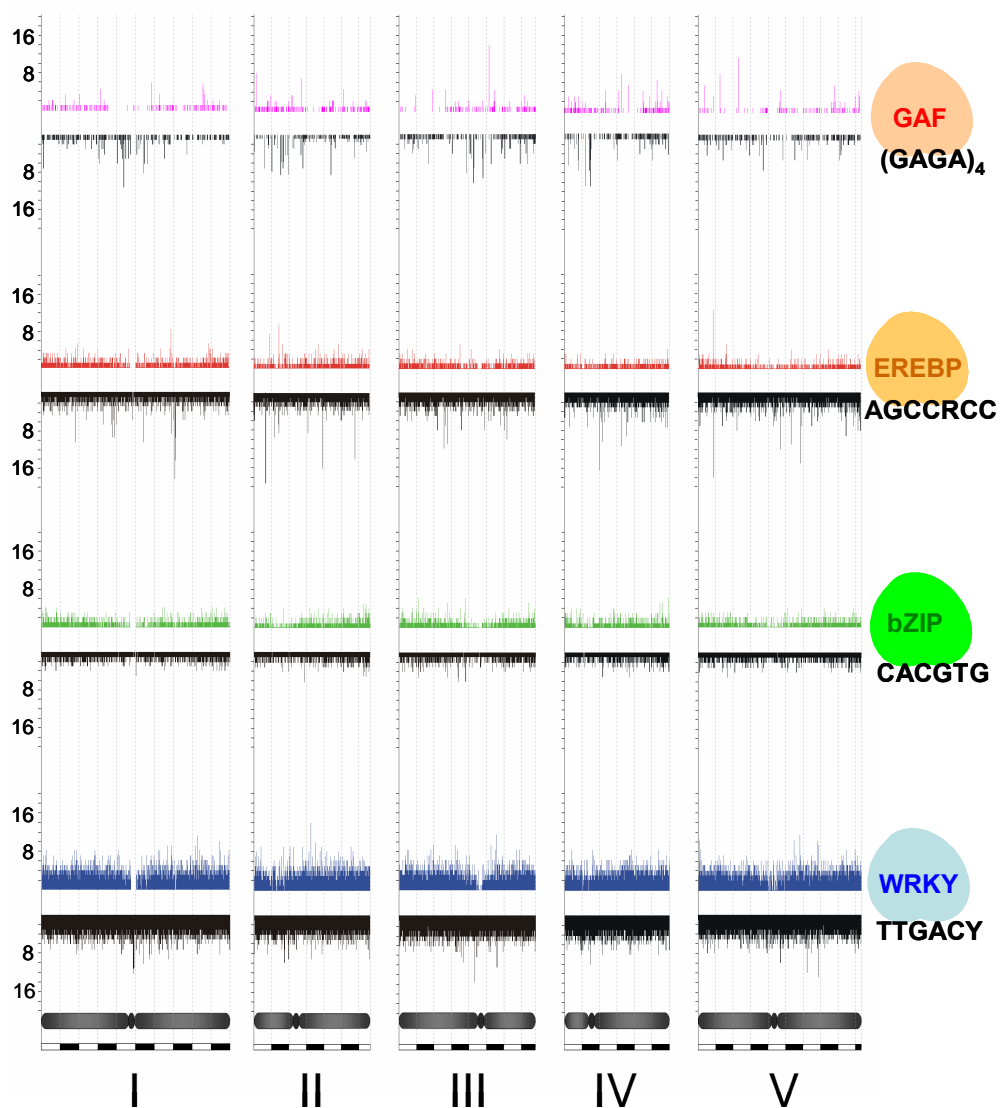
Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, ist die Anzahl von W-Box-Elementen zwischen den Promotoren und den Chromosomen gleich. Dieses Element tritt mit einer fast gleichmäßigen Verteilung auf. Entsprechendes gilt auch für das G-Box-Element, dass aber nur ein Drittel so häufig ist, wie das W-Box-Element.

Das GCC-Box-ähnliche Element tritt in den meisten Fällen als ein einzelnes Element in den Promotoren auf. Auf den Chromosomen ist es jedoch doppelt so häufig. Außerdem kommen einzelne chromosomale Sequenzabschnitte vor, an denen zehn mal so viele Elemente vorkamen, wie es der Durchschnitt ist (Abb. 3.30).

Wenn das (TC/GA)<sub>8</sub>-Element in einem Promotor vorkommt, dann tritt es durchschnittlich nur ein Mal auf. Jedoch gibt es auch einige wenige Promotoren, die Bereiche von mehr als 100 bp besitzen, die ausschließlich aus (TC/GA)-Wiederholungen bestehen.

In der chromosomalen Verteilung ist das (TC/GA)<sub>8</sub>-Element auch nur in geringer Anzahl zu finden. Jedoch tritt es in der Sequenz nahe der Zentromere häufiger auf (Abb. 3.30).

[Anzahl der Elemente]



**Abb. 3.30: Schematischer Vergleich der Verteilung verschiedener funktioneller cis-Elemente in den Promotoren und Chromosomen von *A. thaliana*.** Dargestellt ist die Anzahl der cis-Elemente pro durchsuchter Sequenz. Um eine grafische Übersicht über die Verteilung der Elemente in 1500 bp Promotor-Sequenz zu erhalten, wurden diese entsprechend ihrer Position auf den Chromosomen kartiert und farbig dargestellt. Ebenso wurden Ausschnitte der chromosomalen Sequenz durchsucht und entsprechend ihrer Position auf den Chromosomen kartiert (schwarz). In den Promotoren verteilte (TC/GA)<sub>8</sub>-Elemente ([GAGA]<sub>4</sub>; violett), GCC-Box-ähnlichen Elemente (AGCCRCC; rot), G-Box-Elemente (grün) und die W-Box-Motive (blau) sind oberhalb der jeweiligen chromosomalen Verteilung dargestellt. Spezifisch an diese Elemente bindende Proteine sind rechts zusammen mit den entsprechenden DNA-Motiven schematisch gezeigt. Die fünf *A. thaliana* Chromosomen sind am unteren Bildrand schematisch dargestellt.

### 3.8.8. Verteilung von pathogenresponsiven *cis*-Elementen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte für den biologischen Partikelbeschluss von *P. patens* Protonema enthielten *cis*-Elemente, die als pathogenresponsive Elemente charakterisiert wurden (Rushton *et al.*, 2002).

Dabei den untersuchten Bindungsstellen hat es sich vor allem um zwei Klassen von Motiven gehandelt (Rushton *et al.*, 2002), die von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren gebunden werden: Die W-Boxen (WRKY-Bindungsstellen) sowie die GCC-Box-ähnlichen Motive wie S-Box oder GCC-Box (EREBP/ERF-AP2-Bindungsstellen).

Eine weitere Klasse von pathogenresponsiven *cis*-Elementen, die nicht von Rushton *et al.* (2002) untersucht worden waren, stellen die ACGT-Motive dar (bZIP-Bindungsstellen). Für die G-Box konnte eine Stress- und Pathogen-Responsivität gezeigt werden (Foster *et al.*, 1994; Niggeweg, *et al.*, 2000).

Mit dem *Motif-Mapper*-Programm wurde untersucht, ob diese Elemente alleine oder in Kombination mit einem weiteren Motiv dieser drei Klassen in *A. thaliana* auftreten. Getestet wurden die einzelnen W-Boxen (TTGACY), S-Boxen (AGCCACC), GCC-Boxen (AGCCGCC) und G-Boxen (CACGTG) sowie Element-Paare in allen möglichen Kombinationen. Wenn zwei dieser *cis*-Elemente in einem Abstand von bis zu 30 bp zueinander vorkamen, wurde davon ausgegangen, dass es sich möglicherweise um ein funktionelles Arrangement handeln könnte. Für funktionelle Kombinationen wurde vorausgesetzt, dass diese mindestens 20 % häufiger vorkommen sollten, als es statistisch zu erwarten gewesen wäre.

Wie der Tabelle 3.7 zu entnehmen ist, sind fast 60 % der GCC- und S-Boxen, die im Genom vorkommen, ausschließlich in Exons zu finden. Entsprechend kommen auch die getesteten Kombinationen am häufigsten in Exons vor.

Bereits in der Abbildung 3.30 konnte gezeigt werden, dass sich das einzelne W-Box-Motiv annähernd statistisch verteilt. Dies konnte auch hier bestätigt werden. Jedoch tritt die Kombination aus zwei W-Boxen 30 % häufiger in Promotoren auf, als es zu erwarten gewesen wäre.

Die palindromische G-Box ist in Promotoren signifikant häufiger als erwartet. Außerdem kommen 50 % aller im Genom vorhandenen Kombination aus zwei G-Boxen in den 1500 bp Promotor-Sequenzen vor. In dem 600 bp Promotordatensatz ist das Arrangement aus zwei G-Box-Motiven mehr als zwei Mal so häufig, wie es statistisch der Fall sein dürfte.

Mehr als 30 % häufiger als erwartet sind Kombinationen aus W-Box und G-Box im 1500 bp Promotordatensatz. Im 600 bp Promotordatensatz ist dieses Arrangement sogar

70 % häufiger als statistisch angenommen. Bemerkenswert ist, dass fast 10 % der insgesamt im Genom vorhandenen G-Boxen zusammen mit W-Boxen vorkommen.

Vor dem Hintergrund der gesetzten Signifikanzgrenzen müssen die Kombinationen aus zwei W-Boxen, zwei G-Boxen und der Kombination aus W- und G-Box als vermutlich funktionelle Arrangements angesehen werden.

**Tabelle 3.7: Verteilung pathogenresponsiver cis-Elemente.** Anzahl vorkommender cis-Elemente in den annotierten Exons und Introns sowie in den beiden unterschiedlich großen Promotordatensätzen in Prozent in *A. thaliana*. Die Summe gefundener Motive aus den Exons, Introns und den Promotordatensätzen wird unter transkriptionelle Einheiten angegeben. Die Anzahl der Motive des intergenischen Bereichs wird aus der Differenz zu den im Genom gefundenen Elementen errechnet. Die Prozentangaben über den horizontalen Linien repräsentieren den Anteil der einzelnen Datensätze gegenüber dem Genom. Getestet wurden die W-Box (TTGACY), die S-Box (AGCCACC), die GCC-Box (AGCCGCC) und die G-Box (CACGTG). Außerdem wurde das Vorkommen zweier dieser cis-Elemente in einem Abstand von bis zu 30 bp in allen möglichen Kombinationen untersucht. Signifikante Ergebnisse für die Promotordatensätze sind rot hervorgehoben.

Motiv	Genom	100 %	28 %	12 %	33 %	13 %	73 %	53 %	27 %	47 %
		Exons [%]	Introns [%]	Promotor[%]		Transkriptionelle Einheiten [%]		Intergenische Bereich [%]		
				-1500	-600	-1500	-600	-1500	-600	
W	131101	28	16	34	14	78	58	22	42	
S	10902	58	9	27	9	93	75	7	25	
GCC	4160	62	4	29	12	95	78	5	22	
G	14434	30	7	45	21	81	58	19	42	
W – W	7788	21	12	40	18	73	52	27	48	
W – S	499	56	7	27	9	90	72	10	28	
W – GCC	284	56	5	33	13	95	74	5	26	
W – G	1197	23	6	46	22	75	50	25	50	
S – S	122	52	8	20	5	81	66	19	34	
S – GCC	69	83	3	17	9	103	94	-3	6	
S – G	103	57	3	25	11	85	71	15	29	
GCC – GCC	26	50	4	23	15	77	69	23	31	
GCC – G	75	59	0	27	12	85	71	15	29	
G – G	763	22	4	51	28	78	54	22	46	

### 3.8.9. Verteilung von pathogenresponsiven cis-Elementen in den Promotoren verschiedener Genfamilien

Nachdem im vorherigen Experiment der Versuch unternommen wurde, anhand von Häufigkeiten bestimmter pathogenresponsiver cis-Elemente einen genomweiten

Überblick über die örtliche Verteilung dieser Motive zu erhalten, sollte hier deren Vorkommen in verschiedenen Genfamilien untersucht werden. Dazu wurden die Akzessionen der Mitglieder einiger Genfamilie von TAIR (<http://www.arabidopsis.org/info/genefamily/genefamily.html>) bezogen. Anschließend wurden deren Promotoren in einzelnen Datensätzen zusammengefasst und Häufigkeitskarten erstellt.

Während die einzelnen W-Box-Motive in der genomweiten Untersuchung gleich verteilt sind, entsteht bei der Betrachtung der Genfamilien ein ganz anderes Bild.

In allen untersuchten Genfamilien, bis auf die CIP-Kinasen, sind einzelne W-Box-Elemente überrepräsentiert.

Das Arrangement aus zwei W-Box-Motiven ist in der MAP-Kinase-, der MAPK-Kinase und der Rezeptor-ähnliche Proteinkinase-Familie (RLK), häufiger als erwartet.

Die G-Box ist in der WRKY-, ERF-, CIP-Kinasen-, MAP-Kinasen- und ebenfalls in der Rezeptor-Kinase-Familie überrepräsentiert. Die Kombination aus einer W-Box und einer G-Box ist in der WRKY-, ERF-, CIP-Kinase- und in der MAP-Kinase-Familie häufiger als statistisch erwartet.

**Tabelle 3.8: Vorkommen pathogenresponsiver cis-Elemente in den Promotoren verschiedener Genfamilien.** Anzahl vorkommender cis-Elemente in acht Genfamilien aus *A. thaliana* in dem 1500 bp Promotordatensatz. Getestet wurden die W-Box (TTGACY), die S-Box (AGCCACC), die GCC-Box (AGCCGCC) und die G-Box (CACGTG). Außerdem wurde das Vorkommen zweier dieser cis-Elemente in einem Abstand von bis zu 30 bp in allen möglichen Kombinationen untersucht. Signifikante Ergebnisse (20 % häufiger als statistisch erwartet) sind rot hervorgehoben. Die Anzahl Mitglieder der Genfamilien sind in Klammern angegeben. WRKY – WRKY-Proteine, ERF – ERF/ERE BP-Faktoren, RLK – Rezeptor-ähnliche Proteinkinase; CIPK – CBL-interagierende Proteinkinase; MAPK – Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK – MAPK-Kinase; MRP – Multiple-Chemotherapeutika-Resistenz-Proteine

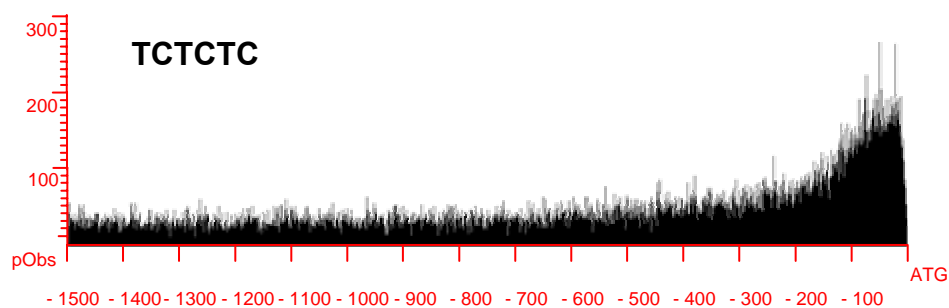
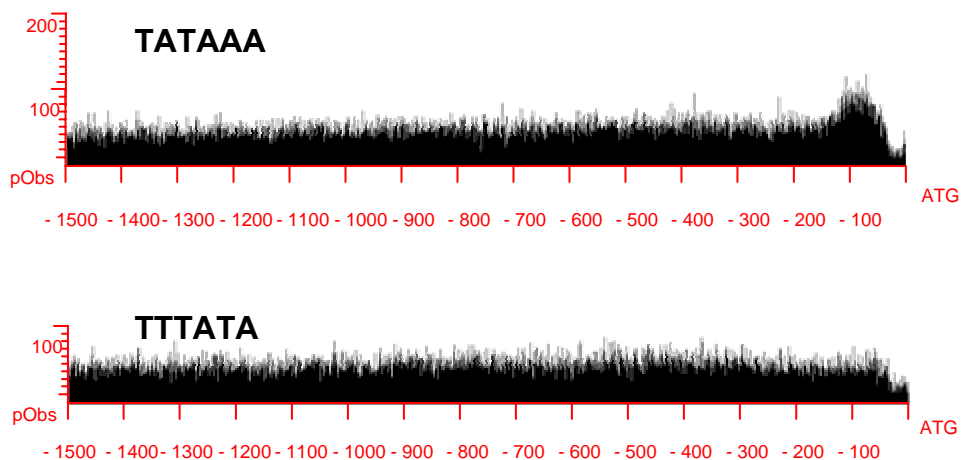
Motiv	WRKY (71)	ERF (120)	Resistenzgene (160)	RLK (605)	CIPK (25)	MAPK (20)	MAPKK (10)	MRP (15)
W	165	218	373	1520	45	45	23	30
S	4	13	14	29	2	0	1	1
GCC	7	2	9	54	2	1	1	2
G	27	62	20	104	10	9	3	8
W-W	17	18	39	142	3	5	6	0
W-S	2	0	0	3	0	0	0	0
W-GCC	0	0	3	2	0	1	0	1
W-G	11	13	3	12	0	4	0	0
S-S	0	0	0	0	0	0	0	0
S-GCC	0	0	0	0	0	0	0	0
S-G	0	0	0	1	0	0	0	0
GCC-GCC	0	0	0	0	0	0	0	0
GCC-G	0	0	1	1	0	0	0	0
G-G	0	3	0	5	0	2	0	0

### 3.8.10. Die Verteilung von Motiven ist abhängig von ihrer Orientierung

Für die untersuchten pathogenresponsiven cis-Elemente konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren an doppelsträngige DNA-Motive binden. Deswegen sollte es keinen Unterschied machen, ob ein Element in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung vorliegt.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden die Häufigkeits-Karten von Hexanucleotiden in Sinn- und in Gegensinn-Orientierung aus *A. thaliana* untersucht.

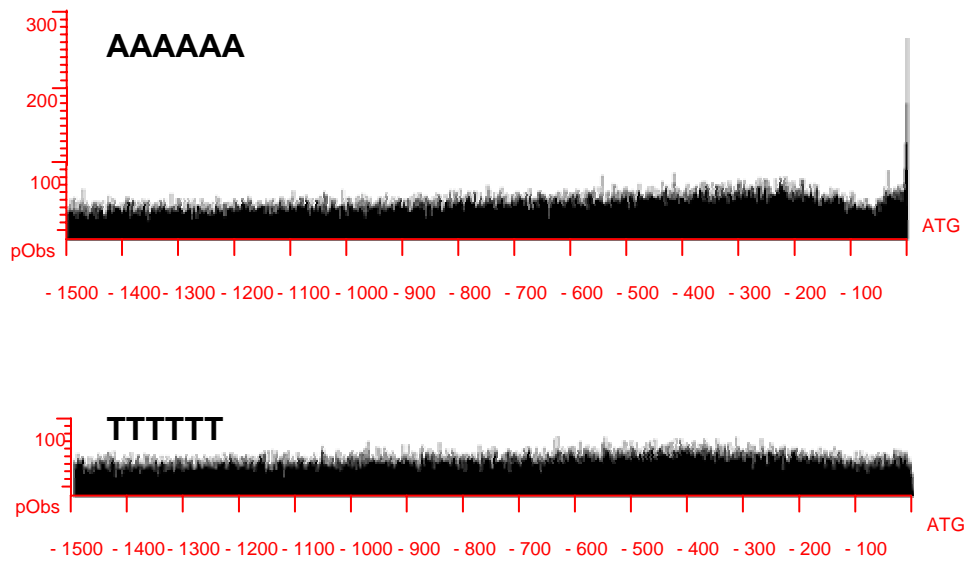
Wie die Abbildung 3.31B+C exemplarisch zeigt, gibt es deutliche Häufigkeitsunterschiede und Unterschiede in der Verteilung der Motive in dem durchsuchten 1500 bp Promotordatensatz zwischen Sinn- und Gegensinn-Orientierung.

**A****B**

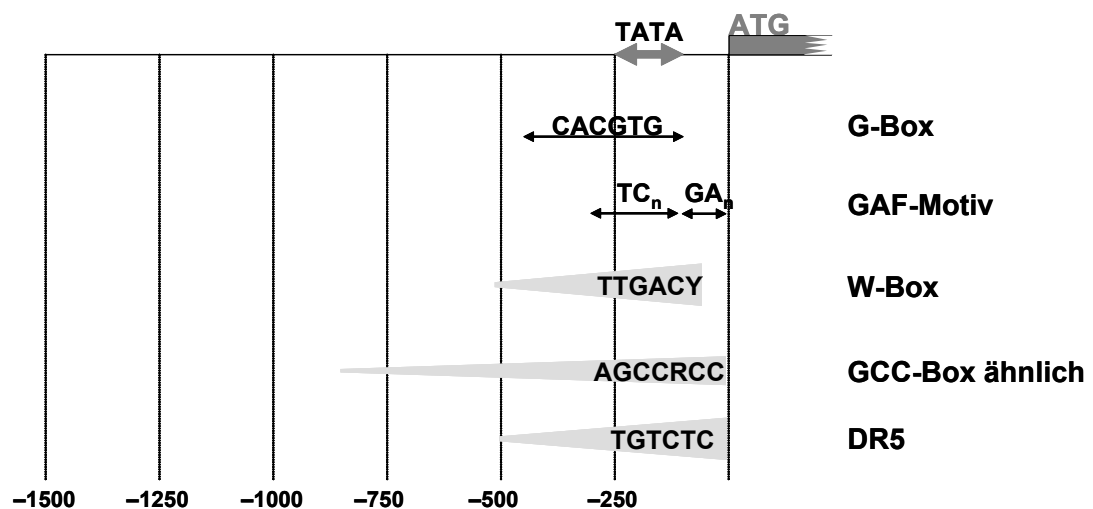
(Legendtext nächste Seite)



C



D



**Abb. 3.31: Schematischer Vergleich der Häufigkeits-Verteilung einiger Hexanucleotide im 1500 bp Promotordatensatz.** Die Diagramme (A, B, C) stellen die Häufigkeits-Karten einiger ausgewählter Hexanucleotide dar. Als Grundlage dienten 25'957 einzelne 1500 bp lange Promotor-Bereiche aus *A. thaliana*, in welchen alle möglichen 4096 Hexanucleotide gezählt und kartiert wurden. Die dargestellten Häufigkeiten wurden normalisiert [pObs = n / Durchschnitt], damit seltene Elemente mit häufigen verglichen werden können. (D) Schematischer Überblick über die Verteilung bekannter Elemente, die aus den Häufigkeits-Karten des 1500 bp Promotordatensatzes abgeleitet wurden. Für die grau hinterlegten Elemente wurde die Verteilung statistisch aus den Regressionsgeraden abgeleitet; Aus den Häufigkeits-Karten sind diese Informationen nicht gut ersichtlic, weil z.B. das W-Box-Element sehr häufig und fast gleichverteilt ist oder die GCC-Box-ähnlichen Elemente sehr selten auftreten.

---

Außerdem können auf Grund der Häufigkeits-Karten die Positionen bekannter Elemente relativ zur statistischen TATA-Box (Abb. 3.31B) analysiert werden (Abb. 3.31D).

### 3.8.11. Übertragbarkeit der *in silico* Analysen auf ein biologisches System

Die in den vorangegangenen Kapiteln durchgeführten Analysen mit dem Motif-Mapper-Programm behandeln Fragen zur statistischen Verteilung von Motiven und putativ funktionellen *cis*-Elementen.

Eine frequenz- und verteilungsorientierte Analyse von *cis*-Elementen wurde in Pflanzen noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund konnten bisher keine chromosomalen Verteilungskarten erstellt oder ein möglicher Einfluss der Orientierung von Elementen auf ihre Verteilung untersucht werden.

In diesem Experiment sollte deswegen ein anderer Ansatz gewählt werden.

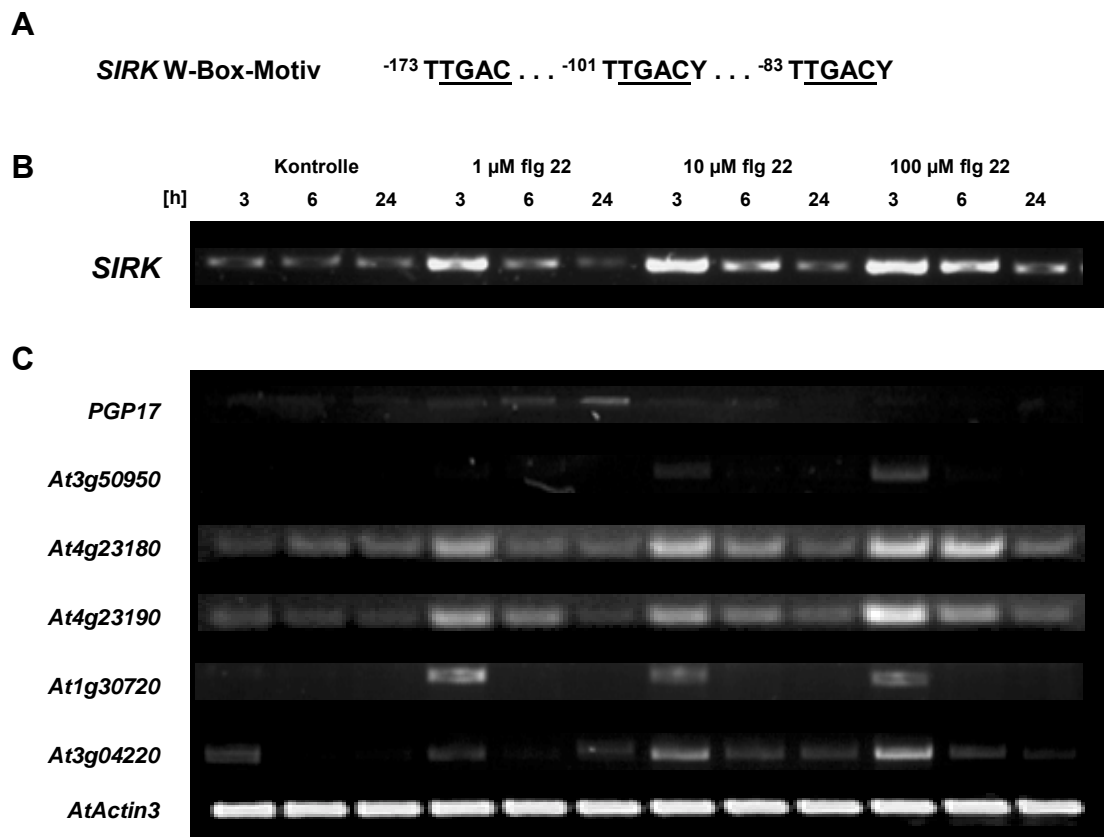
Ausgehend von funktionell charakterisierten W-Box-Arrangements im *SIRK/FRK1*-Promotor (Robatzek und Somssich, 2002) und deren Position innerhalb von nur 400 bp vor dem ATG (Abb. 3.32A), wurde ein Promotordatensatz aus 25'957 Promotoren aus *A. thaliana* erstellt, der einem Bereich von -400 bp bis -50 bp vor dem ATG entsprach. Anschließend wurde nach dem Motiv  $\text{TTGACCn}\{0, 30\}\text{TTGACYn}\{0, 30\}\text{TTGACY}$  in diesem Datensatz gesucht.

Als Ergebnis der Suche wurden 25 Promotoren erhalten. 16 von diesen gehören zu Genen, die für Transposasen oder hypothetische Proteine kodieren. Aus den verbliebenen neun Sequenzen wurden sechs Gene exemplarisch ausgewählt.

Vor dem Hintergrund, dass dieses W-Box-Arrangement auf Grund der funktionellen Beteiligung im *flg22*-abhängigen Signalübertragungsweg von *SIRK/FRK1* gefunden wurde (Robatzek und Somssich, 2002; Asai *et al.*, 2002), waren die Transkriptmengen der sechs ausgewählten Gene unter verschiedenen *flg22*-Konzentrationen untersucht worden. Wie in Abbildung 3.32B zu sehen ist, konnte für *SIRK/FRK1* ein *flg22*-abhängiges Expressionsmuster in eine Woche alten Pflanzen erhalten werden.

Bei fünf der sechs ausgewählten Gene korreliert das gefundene Expressionsmuster mit dem von *SIRK/FRK1* (Abb. 3.32C). Bei zwei paralogen Genen (Du und Chen, 2000) war die cDNA-Ausgangsmenge so hoch, dass nach 28 Zyklen in der RT-PCR die Transkriptmengen bei weitem nicht mehr im linearen Bereich lagen. Deswegen mußte die PCR mit 25 Zyklen wiederholt werden.

Überraschend war, dass die Transkriptmengen von *PGP17* (At3g28380) nur sehr schwach detektiert werden konnten. Bei diesem Gen war am ehesten davon ausgegangen worden, dass es pathogenresponsiv sein würde, da die Promotor-Sequenz eine sehr große Zahl W-Boxen enthält.



**Abb. 3.32: Expression verschiedener Gene, die in ihren Promotoren, eine dem *SIRK/FRK1*-Promotor ähnliche Anordnung von W-Box-Elementen haben, nach Flagelingabe.** (A) Arrangement aus drei funktionellen W-Box-Motiven im *SIRK/FRK1*-Promotor (Robatzek und Somssich, 2002) in einem Bereich nahe am ATG. (B) Expressionsmuster von *SIRK/FRK1* in eine Woche alten *A. thaliana* Pflanzen nach Behandlung mit verschiedenen flg22-Konzentrationen. (C) Expressionsmuster von sechs exemplarisch ausgewählten Genen mit einem ähnlichen W-Box-Arrangement an einer Position vor dem ATG, wie es im *SIRK/FRK1*-Promotor gefunden wurde. Als Kontrolle für die cDNA-Ausgangsmenge diente die Transkriptmenge von *AtActin3*. (28 Zyklen; 25 Zyklen für *At4g23180* und *At4g23190*)

## 4. Diskussion

---

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einblicke in die Partnerschaft von der pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie und ihren DNA-Zeilsequenzen zu erhalten. Als ein Modellorganismus für evolutiv frühe pflanzliche Prozesse hat sich das Laubmoos *Physcomitrella patens* als nützlich erwiesen. Das Vorhandensein der WRKY-Gene in *P. patens* und der hohe Konservierungsgrad der WRKY-Domäne, die in höheren Pflanzen die Bindung zum W-Box-Element vermittelt, legten die Möglichkeit einer konservierten Wechselwirkung zwischen WRKY-Protein und W-Box-Element nahe.

### **4.1. Die WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie in *P. patens***

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch verschiedene Methoden insgesamt 16 verschiedene *PpWRKY*-Gene identifiziert werden (3.3.). Interessanter Weise ergeben sich dabei sieben Paare nahe verwandter *WRKY*-Gene, die zueinander eine hohe Sequenzidentität besitzen und man kann davon ausgehen, dass es sich dabei um Paraloge handelt.

Die Entstehung paraloger Sequenzbereiche kann durch rezente Duplikationsereignisse erklärt werden. So haben chromosomale Sequenzvergleiche mit der verfügbaren genomischen Sequenz aus *A. thaliana* gezeigt, dass das Genom dieser Art mindestens vier Runden kompletter Duplikation durchlaufen haben muss (Simillion *et al.*, 2002). Außerdem können eine ganze Reihe paraloger Sequenzen auf Tandemduplikationen zurückgeführt werden (Kolukisaoglu *et al.*, 2002).

Die Sequenzvergleiche der *PpWRKY*-Domänen der jeweiligen Paralogen zeigen alle eine Identität von 80 % bis 90 % (3.6.1.).

Die Mitglieder einer Genfamilie liegen in der Regel im ganze Genom verstreut vor. Synchron segmentale Duplikationen, die eine Mehrheit von Genen innerhalb einer Genfamilie betreffen, sind daher selten (Lynch und Conery, 2000). Es ist deshalb

---

---

unwahrscheinlich, dass die sieben *PpWRKY*-Paraloge unabhängig voneinander duplizierten. Außerdem konnte für *PpWRKY20* ein BAC-Klon isoliert werden, in dessen Sequenz kein weiteres bekanntes *PpWRKY*-Gen nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis reduziert die Wahrscheinlichkeit von Tandemduplikationen als Grund für die beobachtete Paralogie. Vor diesem Hintergrund kann angenommen werden, dass die Ursache der duplizierten *PpWRKY*-Gene wahrscheinlich in einer polyploiden Duplikationsphase zu suchen ist, die vor evolutiv kurzer Zeit durchlaufen wurde.

Von Markmann-Mulisch *et al.* (2002) untersuchte Paraloge *PpRAD51*-Gene aus *P. patens* zeigen 94 % Aminosäureidentität zueinander, was ebenfalls der Größenordnung der *PpWRKY*-Gene entspricht. Auch diese Autoren halten es für wahrscheinlich, dass es vor kurzem zu einer Duplikation des gesamten *P. patens*-Genoms gekommen ist, obwohl sich diese Annahme nur auf den Vergleich der zwei untersuchten paralogenen Gene stützt.

Untersuchungen von 177'000 EST-Sequenzen aus *P. patens* lassen ebenfalls auf polyploide Duplikationsphasen des Genoms schließen. Jedoch ist man sich in den konkurrierenden EST-Projekten nicht einig, ob von zwei (Tomoaki Nishiiyama, persl. Mitteilung) oder mindestens drei (Jan M. Lucht und Ralf Reski, persl. Mitteilung) Duplikationsphasen ausgegangen werden muss.

Leider kann keine der Annahmen mit der beklagenswert geringen Anzahl verfügbarer genomischer Sequenzen aus *P. patens* gestützt oder widerlegt werden.

Interessanter Weise konnte mittels karyologischer Untersuchungen festgestellt werden, dass es innerhalb der Laubmose häufig Abweichungen in der Chromosomenzahl der haploiden Sporophoren kommt (Kuta und Przywara, 2001). Zum Beispiel konnte für drei Laubmoosarten aus der nahen Verwandtschaft zu *P. patens* gezeigt werden, dass natürliche Populationen ausschließlich aus diploiden und triploiden Sporophoren bestanden (Smith und Newton, 1968). Bemerkenswert war dabei, dass die polyploiden Populationen morphologisch nicht von den haploiden zu unterscheiden waren (Kuta und Przywara, 2001). In höheren Pflanzen erscheinen polyploide Formen einer Art oft größer und robuster als diploide (Stuessy, 1990). Diese Ergebnisse belegen einerseits, dass die Duplikation eines gesamten Chromosomensatzes auch bei niederen Pflanzen häufig ist und andererseits, dass ein effizientes System existiert, das die entstehenden „*gene-dosage*“-Effekte kompensiert.

Auf der Basis der „*molecular-clock*“-Hypothese, die von einer in der Regel gleichförmigen Evolutionsgeschwindigkeit für Proteinsequenzen ausgeht (Ridley, 1996), kann der Zeitpunkt einer mutmaßlichen Duplikation des *P. patens*-Genoms ausgehend von den *PpWRKY*- und *PpRAD51*-Genen (Markmann-Mulisch *et al.*, 2002) auf einen Zeitraum von vor 8 - 15 Mio Jahren datiert werden.

Der Phänotyp der von Patrick Giavalisco erstellten Null-Mutante *wrky20-ko#2* (Giavalisco, 1999) ist nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (3.1.). Auch hier wird der Verlust des Genproduktes entweder kompensiert, oder die Umstände, unter denen *PpWRKY20* essentiell sein könnte, kommen unter Laborbedingungen nicht vor. In *A. thaliana* untersuchte Null-Mutanten einzelner *WRKY*-Gene der Subgruppe II<sub>d</sub> zeigten ebenfalls keine Veränderung zum Wildtyp (Kalde, 2002). Dies stellt keine Ausnahme dar, da eine Reihe bekannter *WRKY*-Null-Mutanten aus *A. thaliana* keine Veränderung zum Wildtyp zeigt. Sogar Doppelmutanten von *AtWRKY7* und *AtWRKY11* zeigten keine detektierbare Änderung des Habitus (Bernadette Lippok, persl. Mitteilung). In einer mit cDNA-Rekombinationsvektoren generierten Mutanten-Population in *P. patens* zeigten 16,2 % der Pflanzen einen vom Wildtyp abweichenden morphologischen oder physiologischen Phänotyp (Egener *et al.*, 2002). Nur wenige der charakterisierten Mutanten aus dieser Population mit sichtbaren Veränderungen betrafen Transkriptionsfaktoren (Tanja Egener, persl. Mitteilung). Die Mutanten der ebenfalls konservierten Familie der MADS-box-Transkriptionsfaktoren aus *P. patens* (Henschel *et al.*, 2002) zeigen ebenfalls keine Veränderung gegenüber Wildtyp-Pflanzen (Katrin Henschel und Thomas Münster, persl. Mitteilung), obwohl Mutationen dieser Blüten-Identitäts-Gene in höheren Pflanzen einen sichtbaren Phänotyp besitzen und zur Entdeckung des ABC-Modells der Blütenentwicklung führten (Sommer *et al.*, 1990; Weigel und Meyerowitz 1994).

Vor dem Hintergrund einer rezenten Duplikation des *P. patens* Genoms ist zu erwarten, dass die entstandenen Paralogen überwiegend redundanter Funktion sind.

Außerdem ist eine Kompensation des *PpWRKY20*-Verlustes durch andere *PpWRKY*-Gene durchaus denkbar, da von den 16 bekannten *WRKY*-Genen bereits 5 in unbehandeltem Moosgewebe exprimiert waren (3.1.3.; 3.3.4.). Jedoch zeigte keines ein vergleichbares Expressionsmuster nach der Behandlung mit UV oder flg22-Elizitor. Außerdem kann von einer Zahl noch unbekannter *WRKY*-Gene in *P. patens* ausgegangen werden, und es ist nicht auszuschließen, dass auch deren Funktionen teilweise überlappend sein können.

Ein Beispiel für die überlappende Aktivierung von Zielgenen durch *WRKY*-Transkriptionsfaktoren ist das Rezeptorkinase-Gen *SIRK/FRK1* (Robatzek und Somssich, 2002; Asai *et al.*, 2002). Von Robatzek und Somssich (2002) hatte *SIRK/FRK1* als Zielgen für *AtWRKY6* identifiziert werden können. Unabhängig davon wurde in einem System, das Protoplasten aus Mesophyllzellen von *A. thaliana* zur transienten Expression verwendet (Kovtun *et al.*, 2000), die spezifische Aktivierung von *SIRK/FRK1* durch *AtWRKY29* gezeigt (Asai *et al.*, 2002). Außerdem wurde festgestellt, dass auch *AtWRKY22* in der Lage war, unter den selben Bedingungen die Expression von *SIRK/FRK1* zu aktivieren und somit redundant zu *AtWRKY29* ist (Asai *et al.*, 2002). Erst kürzlich ist gezeigt worden, dass der Signalübertragungsweg nur über

bestimmte der neun W-Boxen des *SIRK/FRK1*-Promotors abläuft und für die Aktivierung der Expression keine simultane Bindung von *AtWRKY6* und *AtWRKY22* oder *AtWRKY29* an mehrere W-Boxen gleichzeitig nötig ist (Aifen Zhou, persl. Mitteilung; Asai *et al.*, 2002). Interessant zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass keines dieser *AtWRKY*-Gene zueinander paralog ist (3.6.2.). Die Regulation eines Zielgenes durch eventuell konkurrierende Transkriptionsfaktoren einer Klasse mit redundanter Funktion ermöglicht eine sehr feine Abstimmung in der Kontrolle lokaler und zeitlicher Expression. Zumal für *AtWRKY6* sowie für *PcWRKY1* aus *Petroselinum crispum* gezeigt werden konnte, dass diese Faktoren an ihre eigenen Promotor binden und mittels „feedback“-Kontrolle auf ihre eigene Transkription wirken können (Robatzek, 2000; Eulgem, 1999; Eulgem *et al.*, 1999; Franziska Turck, persl. Mitteilung). Die Expression einer großen Zahl von *WRKY*-Genen unterliegt wahrscheinlich einer autoregulatorischen Kontrolle (Dong *et al.*, 2003), da auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnte, dass das W-Box-Element in den Promotoren der *WRKY*-Genfamilie überdurchschnittlich häufig vorkam (3.8.9.).

*PpWRKY20* zählt mit nur einer *WRKY*-Domäne zu den *WRKY*-Transkriptionsfaktoren der Gruppe II (Eulgem *et al.*, 2000). Charakteristisch für diese Gruppe ist der konservierte C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>23</sub>-H-X-H-Peptidkonsensus in der *WRKY*-Domäne (Rushton *et al.*, 1995), der vermutlich eine Zink-Finger-Struktur des C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Typs ausbilden kann (Takatsuji, 1998; Ordiz *et al.*, 2002). Bei anderen *WRKY*-Proteinen konnte durch die Zugabe von chelatierenden Agenzien die DNA-Bindung der *WRKY*-Domäne an das W-Box-Motiv *in vitro* unterbunden werden, was die Annahme stützt, dass eine Zink-Finger-Struktur an der DNA-Bindung beteiligt ist (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 2000). Ebenso veränderten Aminosäureaustausche in der *WRKYGQK*-Sequenz sowie Austausch der konservierten Cysteine und Histidine der C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Zink-Finger-Struktur die Bindung an W-Boxen (Maeo *et al.*, 2001).

Außerhalb der *WRKY*-Domäne sind bei den meisten *WRKY*-Proteinen nur sehr wenige Sequenz-Homologien zu finden (Eulgem *et al.*, 2000). Jedoch konnte *PpWRKY20* durch das Vorhandensein einer weiteren Domäne mit dem konservierten Konsensus GHARFRR sofort der Subgruppe IId zugeordnet werden (3.2.2.).

Die Struktur des *PpWRKY20*-Gens ist zu den verwandten Genen höherer Pflanzen hoch konserviert (3.2.1). Ein Vergleich mit den sieben *AtWRKY*-Genen der Subgruppe IId zeigt, dass diese zwei Introns in der kodierenden Sequenz besitzen, *PpWRKY20* hingegen drei. Das in höheren Pflanzen fehlende Intron ist wahrscheinlich auch in *PpWRKY5* enthalten (3.3.2). Diese Organisation der *PpWRKY*-Gene der Subgruppe IId ist einzigartig und konnte bisher in höheren Pflanzen nicht gefunden werden. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen für *PpWRKY20* und *PpWRKY5* mit den

---

Proteinen aus höheren Pflanzen hätte aber keine nennenswerten Unterschiede erbracht, was die Bedeutung von Analysen an genomischen Sequenzen unterstreicht.

Bemerkenswert ist die beinahe vollständige Konservierung des Exons, das für den aminoterminalen Bereich der WRKY-Domäne kodiert (3.2.1.). Dieses besitzt in allen untersuchten Genen der Subgruppe IId bis zu 92 % Sequenzidentität und ist exakt 126 bp groß. Der sich anschließende Intron/Exon-Übergang ist ebenfalls invariant in allen untersuchten Sequenzen der Subgruppe IId, was wahrscheinlich auf den hohen Grad an struktureller und funktioneller Konservierung in der WRKY-Domäne zurückzuführen ist. Ähnlich gut konservierte Sequenzen betreffen in der Regel aktive Zentren katalytischer Enzyme und Proteine der Photosysteme oder der Lichtperzeption (Strunkelnberg *et al.*, 2003; Mazumder *et al.*, 2002; Bennetzen, 2000). Jedoch sind in diesen Beispielen weder die Intron/Exon-Übergänge, noch die Größe der Exons über einen evolutiven Zeitraum von mehr als 400 Mio Jahren konserviert.

Außerdem traten zwei weitere Domänen auf (3.2.1.), die ebenfalls in den meisten Mitglieder der Subgruppe IId aus höheren Pflanzen vertreten waren.

Die erste Domäne kann auf Grund eines Sequenzvergleiches zwischen den „frühen“ Genen der Subgruppe IId aus *P. patens* und denen aus *A. thaliana* auf den gesamten Aminoterminus, einschließlich des GHARFRR-Konsensus, ausgedehnt werden. Folglich bezieht sich der Begriff HARF-Domäne im Folgenden auf den gesamten Aminoterminus dieser Subgruppe. Dies schließt das VSSF[K/R/K]VISLL-Motiv, welches unmittelbar vor dem GHARFRR-Konsensus beginnt, mit ein. Dieses Motiv ist sowohl in den WRKY-Proteinen der Subgruppe IId, als auch in der Gruppe III enthalten (Eulgem *et al.*, 2000; Kalde *et al.*, 2003). In diesen Gruppen beschränkt sich die Ähnlichkeit jedoch auf diesen Konsensus und erstreckt sich nicht bis zum Aminoterminus der Proteine.

Bisher konnte weder der HARF-Domäne, noch den Proteinen der Subgruppe IId eine Funktion zugewiesen werden. Obwohl für viele WRKY-Gene aus *A. thaliana* gezeigt werden konnte, dass ihre Transkriptmengen nach der Behandlung mit Salicylsäure akkumulierten, blieb die Expression der Vertreter der Subgruppe IId konstitutiv (Dong *et al.*, 2003). Null-Mutanten der Gene *AtWRKY7* und *AtWRKY11* sowie transgene Linien, in denen diese Gene ektopisch überexprimiert wurden, resultierten in keiner morphologischen oder physiologischen Veränderung zum Wildtyp (Kalde, 2002). Alleine für *AtWRKY11* ist sowohl eine seneszenzabhängige, als auch eine PHYA-abhängige Reduktion der Transkriptmenge gezeigt worden (Kalde, 2002).

Die zweite, für die Proteine der Subgruppe IId charakteristische Domäne beginnt kurz vor der WRKY-Domäne und beinhaltet bei *PpWRKY20* die benachbarten mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale (<sup>269</sup>PTPKKC<sub>X<sub>21</sub></sub> KRRK<sup>299</sup>). Eine Reihe weiterer basischer Aminosäuren werden in der Sequenz des konservierten Exons



kodiert, die auch mögliche Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) darstellen können. Diese weichen jedoch von den typischen Konsensi ab (Nakielny und Dreifuss, 1999; Jans und Hübner, 1996). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass für *AtWRKY6* eine neue NLS gefunden wurde, die nicht dem bekannten Typ entsprach (Robatzek und Somssich, 2001).

Übereinstimmend mit einer putativen Funktion als Transkriptionsfaktor konnte durch Transformationsexperimente mit Lauch- und Zwiebelzellen gezeigt werden, dass ein *PpWRKY20*-GFP-Fusionsprotein *in vivo* in den Zellkern transportiert wird. Die freie Diffusion von Proteinen in den Zellkern wird durch die Kernporenkomplexe auf ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa beschränkt. Größere Proteine benötigen Kernlokalisierungssignale um selektiv durch den Kernporenkomplex transportiert zu werden (Jans und Hübner, 1996; Yoneda, 1997). Bei einem errechneten Molekulargewicht von 68 kDa für das *PpWRKY20*-GFP-Fusionsprotein und durch Vergleich mit der Verteilung des 67 kDa GFP-GUS-Fusionsproteins in der Zelle, ist ein passiver Transport in den Zellkern auszuschließen. Die Kontrolle des Kernimportes war dabei konstitutiv, wie es bereits auch für andere WRKY-Proteine verschiedener Gruppen aus höheren Pflanzen gezeigt werden konnte (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000; Robatzek und Somssich, 2001).

In der Regel besitzen Transkriptionsfaktoren mehrere distinkte Domänen, die für die Translokation in den Zellkern, die Regulation der Transkription, eine mögliche Dimerisierung und die DNA-Bindung verantwortlich sind. Durch die heterologe Expression in Hefe wurde gezeigt, dass *PpWRKY20* in diesem System ein Aktivator der Transkription ist. Für diese Versuche wurde *PpWRKY20* mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert. Um den Bereich einer möglichen Transaktivierungsdomäne weiter einzugrenzen, wurden partielle Proteine des Amino- und Carboxyterminus sowie durch Aminosäureaustausche veränderte Proteine auf die gleiche Weise untersucht. Es wurde festgestellt, dass in *PpWRKY20* mehrere Aktivierungsdomänen vorhanden sein müssen, da alle getesteten Konstrukte transaktivierten (3.2.4.).

Vergleichbare Experimente wurden auch mit *AtWRKY11* durchgeführt. Auch hier konnte für alle erstellten Fusionsproteine gezeigt werden, dass sie transaktivierende Eigenschaften besaßen (3.2.4.).

Die Primärstrukturen von *PpWRKY20* und *AtWRKY11* tragen verschiedene potentielle Transaktivierungsdomänen (Triezenberg, 1995): Aminoterminal des GHARFRR-Konsensus ist die Sequenz in der Regel reich an Glutamin- und Serinresten, wohingegen sich carboxyterminal ein Bereich anschließt, der häufig Glutamin- und Serin-, aber vor allem Prolinreste aufweist. Obwohl für tierische und pflanzliche

---

Systeme bekannt ist, dass Glutamin- und Prolin-reiche Regionen transkriptionsaktivierend wirken, ist dies für Hefe nicht bekannt (Struhl, 1995).

Somit verbleiben nur noch die Abschnitte mit häufigen Serinresten als potentielle Transaktivierungsdomänen. Der für beide Proteine errechnete pI war sehr basisch, so dass man für eine Transaktivierung in Hefe eine Phosphorylierung der Serinreste durch Hefe-eigene Proteinkinasen voraussetzen muss (Struhl, 1995). Interessanter Weise wurde auch für *PcWRKY1* aus *Petroselinum crispum* gezeigt, dass es in einem vergleichbaren heterologen Ansatz in Hefe auch transaktivierend wirken kann (Eulgem, 1999). Hier, wie auch in *AtZAP1/AtWRKY1*, finden sich in einer in Hefe transaktivierenden Region ebenfalls nur Serin- oder Threonin-reiche Abschnitte, die als putative Transaktivierungsdomänen in Frage kommen (Eulgem, 1999; de Pater *et al.*, 1996). Für zwei aus *Nicotiana tabacum* charakterisierten WRKY-Proteine, TIZZ und WIZZ, konnte hingegen keine Transaktivierung in Hefe oder in BY-2 Zellsuspensionskulturen aus *Nicotiana tabacum* gezeigt werden (Yoda *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2000).

Dabei ist im Besonderen hervorzuheben, dass es nicht nur eine strukturelle Konservierung innerhalb der WRKY-Gene der Subgruppe IId aus *P. patens* und *A. thaliana* gibt, sondern auch eine funktionelle im Hinblick auf die Fähigkeit in Hefe zu transaktivieren.

Bisher konnte für *PpWRKY20* und *AtWRKY11* eine ganze Reihe gemeinsamer struktureller und funktioneller Eigenschaften gezeigt werden, jedoch sind die in den Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse nicht nur unterschiedlich, sondern stehen in einem klaren Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen (3.2.5.). Während rekombinantes *AtWRKY11* an W-Box-Elemente in synthetischen, doppelsträngigen Oligonucleotiden mittels EMSA bindet, konnte für rekombinantes *PpWRKY20* keine Bindung gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem Konstrukt für *AtWRKY11* gearbeitet, das nur die WRKY-Domäne enthielt, da sich dieses besonders gut in *E. coli* exprimieren ließ (Ingo Ciolkowski, persl. Mitteilung). Auch für ein voll-länges *AtWRKY11*-Protein mit 6xHis- und GST-Epitopen konnte Bindung an W-Box-Elemente nachgewiesen werden (Ingo Ciolkowski, persl. Mitteilung).

Deshalb ist zwar anzunehmen, dass das verwendete 6xHis-Epitope und die GST-Fusion einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von *PpWRKY20* haben, aber es ist unwahrscheinlich, dass diese die Bindung vollständig unterbinden.

*In vitro* Bindungsstudien wurden zum Beispiel auch mit TIZZ und WIZZ aus *Nicotiana tabacum* durchgeführt (Yoda *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2000). Dabei wurde eine aminoternale GST-Fusion verwendet. Ein Einfluss auf die Bindung konnte nicht gezeigt werden.

Weiterhin veränderten sich die Eigenschaften der Bindung an *cis*-Elemente durch die Homo- und Hetero-Multimerisierung von Transkriptionsfaktoren (Chantalat *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). Deswegen könnten für *Pp*WRKY20 bestimmte Partner notwendig sein, die *in vitro* fehlen. Ausgehend von der Primärstruktur gibt es für *Pp*WRKY20 und *At*WRKY11 nur einen Aminosäureaustausch, der einen strukturellen Unterschied an einer mutmaßlich relevanten Position in der WRKY-Domäne verursacht. Dabei handelt es sich um Isoleucin bei *Pp*WRKY20 und Phenylalanin bei *At*WRKY11 in der putativen Zink-Finger-Struktur der WRKY-Domäne (siehe Abb. 4.1).

Vor diesem Hintergrund ist die Präsenz von WRKY-Proteinen der Subgruppe IId, die nicht an W-Boxen binden, auch in höheren Pflanzen nicht auszuschließen. So besitzen *At*WRKY7 und *At*WRKY15 an dieser Position ein Valin, das den strukturellen und chemischen Eigenschaften von Isoleucin des *Pp*WRKY20 sehr verwandt ist (Abb. 4.1).

---

?

<i>Pp</i> WRKY20	KLADIP	SDEYS	SWRKY	GQKPI	KGSPH	PRGYK	CS	IRG	CPARK	HVER	S	MED	SSML	LIV	TYEG	DHN	HPQS
<i>At</i> WRKY7	KMADIP	SDEF	SWRKY	GQKPI	KGSPH	PRGYK	CS	VRG	CPARK	HVER	ALDD	AMML	LIV	TYEG	DHN	HALV	
<i>At</i> WRKY11	KIADIP	PDEYS	SWRKY	GQKPI	KGSPH	PRGYK	CS	TRG	CPARK	HVER	ALDD	PAML	LIV	TYEG	EH	RHNS	QS
<i>At</i> WRKY15	KMSD	VPPDD	YSWRKY	GQKPI	KGSPH	PRGYK	CS	VRG	CPARK	HVER	AADD	SSML	LIV	TYEG	DHN	HSLS	
<i>At</i> WRKY17	KIADIP	PDEYS	SWRKY	GQKPI	KGSPH	PRGYK	CS	TRG	CPARK	HVER	ALDD	STML	LIV	TYEG	EH	RHNS	QS
<i>At</i> WRKY21	KVADIP	PDDYS	SWRKY	GQKPI	KGSPY	PRGYK	CS	MRG	CPARK	HVER	CLED	PAML	LIV	TYEA	EH	NHPKL	
				WRKYGQK				C		C						H	H

**Abb. 4.1: Vergleich mit WRKY-Domänen der Subgruppe IId.** Der Pfeil zeigt einen AS-Austausch in einer putativ bindungsrelevanten Position im Zink-Finger zwischen *At*WRKY11 und *Pp*WRKY20.

Das Ausbleiben einer Bindung von *Pp*WRKY20 an W-Box-Elemente *in vitro* bedeutet jedoch nicht, dass die getestete Interaktion in *P. patens* selbst nicht stattfinden kann. Außerdem konnte für verschiedene WRKY-Proteine aus *A. thaliana* eine Bindung an Varianten von W-Boxen gezeigt werden. Obwohl vollständige W-Box-Konsensi in den getesteten Sequenzen vorhanden waren, konnte für einige *At*WRKY-Proteine eine starke, für andere jedoch gar keine Bindung gefunden werden (Ingo Ciolkowski und Aifen Zhou, persl. Mitteilung)

Untersuchungen zur Funktion von *Pp*WRKY20 *in vivo* ermöglichte das Etablieren des biologischen Partikelbeschusses zur Transformation von Protonema. Für zwei WRKY-Proteine aus *A. thaliana* konnte durch den gemeinsamen Beschuss des *P. patens* Protonemas mit einem Reporter- und einem Effektor-konstrukt die Aktivierung in diesem heterologen System gezeigt werden. Für *Pp*WRKY20 konnte nach dem gemeinsamen Beschuss jedoch keine Reporter-aktivität gefunden werden (3.2.7.). Auf Grund eines möglichen negativen Einflusses der verwendeten Epitope zur

Expression rekombinanten Proteins in *E.coli*, wurde für dieses Experiment auf jedwede Modifikation an *PpWRKY20* verzichtet.

Zusammenfassend zeigte *PpWRKY20* in Übereinstimmung mit der Funktion eines Transkriptions-Aktivators eine konstitutive Lokalisierung im Zellkern und sogar Transaktivierung in Hefe. Jedoch fehlte eine Bindung an das für WRKY-Proteine spezifische W-Box-Element *in vitro*, als auch die Aktivierung von Reporter genen *in vivo* (3.2.7.). Dieses Ergebnis unterstützt die Möglichkeit einer anderen Bindungsaffinität zu W-Boxen, oder zu einer Box, welche von W-Boxen in Länge und Komposition des TTGACY-Konsensus sowie dessen unmittelbare Umgebung abweicht. Wie auch für andere Transkriptionsfaktor-Familien bekannt ist, gibt es zwischen den einzelnen Mitgliedern oft Unterschiede in den gebundenen Elementen. Deswegen erscheint die Bindung von *PpWRKY20* an ein anderes, verändertes W-Box-Element durchaus möglich

Ein Beispiel ist die ERF/EREBP-Proteinfamilie, eine Untergruppe der AP2-Multigenfamilie (Riechmann und Meyerowitz, 1998), deren Vertreter unter biotischen oder abiotischen Stressbedingungen an verschiedene GCC-Box-ähnliche Elemente binden (Zhou *et al.*, 1997; Gilmour *et al.*, 1998; Menke *et al.*, 1999). So wurden AGCCGCC-Elemente aus Promotoren von Resistenzgenen charakterisiert (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995), ein AGACCGCC-Element aus Promotoren die Jasmonat-abhängig reguliert sind (Menke *et al.*, 1999), Kälte-, Trockenheit- und Salz-responsive ACCGACC-Elemente aus Promotoren von *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) und das AGCCACC-Element aus dem *Eli17*-Promotor aus *Petroselinum crispum* (Kirsch *et al.*, 2001).

Außerdem konnte auch für die aminoterminal gelegene WRKY-Domäne der WRKY-Proteine aus der Gruppe I keine W-Box-Bindung gezeigt werden (de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Wie bei *PpWRKY20*, ist das abweichende Bindungsverhalten der beiden WRKY-Domänen der Gruppe I nicht durch den Vergleich der aminoterminalen WRKY-Domäne mit der carboxyterminalen anhand der primären Proteinsequenzen zu begründen.

#### **4.2. Genaktivierung in *P. patens***

Die Verwendung des biolistischen Partikelbeschusses zur Transformation von Protonema ermöglichte ebenfalls Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung bestimmter *cis*-Elemente. Da für *P. patens* bisher keine molekularen Daten hinsichtlich der Signalübertragungswege unter biotischen und abiotischen Stressfaktoren bekannt waren, wurden in einem ersten Schritt Reporter genkonstrukte mit artifiziellen

---

Promotoren (Rushton *et al.*, 2002) in das Protonema transformiert und in einem zweiten Schritt verschiedenen Behandlungen ausgesetzt (3.4.2.).

Der Nachweis einer spezifischen Induktion der Reportergenaktivität konnte erbracht werden. Dieses Ergebnis ist aus zwei Gründen als ein großer Fortschritt für das Arbeiten mit *P. patens* zu werten. Einerseits belegt es die Funktionalität der artifiziellen Reportergenkonstrukte über große evolutive Distanzen hinweg und andererseits ist dies der erste genetische Ansatz in *P. patens*, der nicht von der Gensequenz ausgeht.

Nach der Behandlung mit sechs unterschiedlichen Agenzien konnte für zwei Konstrukte, p4xW2 und p4xGCC, signifikante Reportergenaktivität unter drei der getesteten Bedingungen nachgewiesen werden. Für die übrigen Konstrukte ist es wahrscheinlich, dass diese auch in *P. patens* funktionelle Elemente beinhalten, die verwendeten Behandlungen aber nicht einem hinreichenden Stimulus zur Aktivierung entsprechen.

Für das Konstrukt p4xGCC konnte eine signifikante Aktivierung des GUS-Reportergens nach der Behandlung mit ACC, einer physiologischen Ethylen-Vorstufe, erhalten werden (3.4.2.). In höheren Pflanzen wurde von Ohme-Takagi und Shinshi (1995) gezeigt, dass GCC-Box-ähnliche Elemente unmittelbar an der Ethylen-vermittelten Aktivierung von Genen des Ethylen-Signalübertragungsweges beteiligt sind. Auch in *P. patens* konnte die Beteiligung von GCC-Box-ähnlichen Elementen an der Aktivierung des putativen ETR1-Orthologen nach Ethylen-Begasung und „Überflutung“ bereits gezeigt werden (Kenjiro Fujiwara, persl. Mitteilung). Jedoch konnte in den von Kenjiro Fujiwara und Akio Toh-e durchgeführten Versuchen keine Aktivierung durch ACC nachgewiesen werden (persl. Mitteilung). Bei der Verwendung nativer Promotoren ist es wahrscheinlich, dass eine Vielzahl unterschiedlicher *cis*-Elemente in verschiedenen Promotorbereichen der untersuchten Gene vorhanden ist. Diese können durchaus antagonistischer Wirkung sein. Im Fall des artifiziellen p4xGCC entsteht eine lokale Häufung eines einzelnen *cis*-Elementes und es ist möglich, dass die in natürlichen Promotoren vorkommenden negativ-regulierenden Kontrollelemente in diesem Konstrukt fehlen. Das Vorkommen von GCC-bindenden Transkriptionsfaktoren der ERF/EREBP-Transkriptionsfaktorfamilie in *P. patens* hatte durch die Untersuchungen von EST-Sequenzen sowohl von den öffentlichen als auch von den wirtschaftlichen EST-Projekten bestätigt werden können (Tomoaki Nishiyama, persl. Mitteilung; Ralf Reski, persl. Mitteilung; Rensing *et al.*, 2002). Außerdem wurden bereits für weitere Komponenten der Ethylen-Signalübertragung, CTR1 und ETR1, Orthologe aus *P. patens* charakterisiert (Akita und Valkonen, 2002; Kenjiro Fujiwara, persl. Mitteilung).

Für das Konstrukt p4xW2 konnten nach Behandlung mit flg22-Elizitor und UV-Licht signifikante Änderungen zur Hintergrundaktivität gefunden werden (3.4.2.). In einem Makro-Array-Experiment konnte für WRKY-Gene aus *A. thaliana* eine Zunahme der

---

Expression unter UV-angereichertem Weißlicht gefunden werden (Ralf Stracke, persl. Mitteilung). Die Induktion der W-Box-vermittelten Reporterogenaktivität benötigt wahrscheinlich auch in *P. patens* die Aktivierung von WRKY-Genen. Die Expressionsmuster der bekannten PpWRKY-Gene zeigten nach UV-Behandlung nur wenig Änderung im Vergleich zur Kontrolle (3.5.3.), was mit der moderaten, aber signifikanten Aktivierung der Reporterogenaktivität des p4xW2 konform ist. Ähnlich konnte für die Aktivierung von *PcPRI* durch *PcWRKY1* aus *Petroselinum crispum* gezeigt werden, dass die Transkriptmengen zwischen Effektor (*PcWRKY1*) und seinem Zielgen (*PcPRI*) zeitversetzt um etwa den gleichen Faktor zunahm (Eulgem *et al.*, 1999; Franziska Turck, persl. Mitteilung).

Die nach flg22-Elizitor erhaltene Reporterogenaktivierung mit p4xW2 ist konzentrations- und W-Box-abhängig (3.4.3.; 3.4.4.). Eine W-Box-vermittelte, flg22-abhängige MAP-Kinase-Kaskade ist für *A. thaliana* beschrieben worden (Asai *et al.*, 2002), die evolutiv vergleichbar auch in tierischen Organismen zu finden ist. Vorausgesetzt, dass bestimmte WRKY-Transkriptionsfaktoren flg22-abhängig in *P. patens* an die W-Boxen des p4xW2-Konstruktes binden und die Expression des Reportergens aktivieren, könnte eine ähnliche MAP-Kinase-Kaskade auch in niederen Pflanzen existieren. Gestützt wird diese Hypothese durch das Vorhandensein von Homologen pflanzlicher Resistenzgene in *P. patens* (Akita und Valkonen, 2002), wie der MAP-Kinase-Kinase *EDR1* oder der *Pto*-Kinase (Frye *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 1993).

Veränderungen der W-Box-Umgebung im p4xW2-Konstrukt resultierten in einer deutlichen Reduktion der flg22-Responsivität. Mit den W-Box-beinhaltenen Konstrukten p4xGST1 und p4xW1 konnte keine Reporterogenaktivität erhalten werden (3.4.2.; 3.4.4.). Wie auch für WIZZ und TIZZ aus *Nicotiana tabacum* gezeigt werden konnte, ist das Bindungsverhalten von WRKY-Proteinen zu W-Box-Elementen von deren Anzahl und Abstand zueinander sowie deren Umgebung abhängig (Hara *et al.*, 2000; Yoda *et al.*, 2002). Eine Verringerung der Reporterogenaktivität durch die Veränderung einer Base hat im p4xW2MS zur Bildung eines putativ funktionellen S-Box-Elementes geführt. Hier, wie im p4xGST-Konstrukt, könnte die mutmaßliche Bindung von WRKY-Proteinen durch Transkriptionsfaktoren der ERF/ERBP-Familie, welche an das S-Box-Element binden können, verhindert werden. Es wäre somit möglich, dass beide Klassen von Transkriptionsfaktoren um die in den Konstrukten enthaltenen Elemente konkurrieren. Ebenso kann ein kooperatives Binden von WRKY- und ERF-Proteinen an benachbarte *cis*-Elemente, wie es zum Beispiel von Rushton *et al.* (2002) diskutiert wird, nicht nur rein synergistisch-aktivierender Natur sein, sondern auch synergistisch-reprimierend.

Die Transkriptmengen der bekannten *PpWRKY*-Gene sind mittels RT-PCR nach flg22- und UV-Behandlung bestimmt worden. Die Expression von *PpRAD51* zeigte eine rasche und dosisabhängige Induktion nach der Bestrahlung mit UV-Licht. Eine Änderung der Transkriptmenge im Vergleich mit der Kontrolle fällt eher verhalten aus. Die erhaltenen Expressionsmuster nach flg22 sind nicht nur komplexer als nach UV-Behandlung, sondern auch deutlich stärker (3.5.1.; 3.5.2.). Auf Grund ihres Expressionsmusters lassen sich die bekannten Gene in fünf Klassen einteilen: Eine rasche und transiente Induktion konnte für *PpEST7* festgestellt werden. Die Transkripte von *PpEST285/PpEST503* und *PpEST5* akkumulierten nicht so schnell, erreichten etwa 3 - 4 h nach der Behandlung ihre stärkste Expression und waren nach sechs Stunden kaum noch zu detektieren. Bei der dritten Klasse änderte sich an der Expression nur wenig, jedoch konnte diese Veränderung auch noch nach 24 h nachgewiesen werden (*PpEST4*). Auf ganz geringem Expressionsniveau, aber konstitutiv exprimiert, waren *PpWRKY20* und *PpEST1*. Bei allen anderen *PpWRKY*-Genen konnte kein Transkript nachgewiesen werden.

Die nach Partikelbeschuss mit p4xW2 gefundene Aktivierung des Reportergens zeigte eine klare dosisabhängige Induktion nach flg22-Behandlung. Für die Transkripte der bekannten *WRKY*-Gene konnte dies nicht gezeigt werden.

Jedoch können einige der Genprodukte dieser *WRKY*-Gene durchaus an der peptid-abhängigen Signaltransduktion in *P. patens* beteiligt sein, da über die *WRKY*-Proteine und deren Stabilität nur wenig bekannt ist. So ist *PcWRKY1*-Protein aus *Petroselinum crispum* in Zellkulturen nach der Induktion mit Pep25-Elizitor noch mehrere Stunden detektierbar, obwohl die Transkriptmengen bereits rasch nach der Induktionsphase wieder auf das Ausgangsniveau sinken (Franziska Turck, persl. Mitteilung). Leider konnte nicht gezeigt werden, dass es sich um eine flg22-abhängige Reaktion handelt, sondern um eine unspezifische Reaktion auf Peptide. Da für Moose im allgemeinen nicht bekannt ist, dass sie in der Lage sind Proteine direkt aufzunehmen und zu metabolisieren, stellt sich die Frage, ob es sich bei der Perzeption von Peptiden nicht auch um eine frühe Form der Wahrnehmung von möglichen Pathogenen handeln kann. Für Algen oder submers lebende höhere Pflanzen ist es nicht bekannt, dass sie bakterielle oder mykotische Pathogene aktiv abwehren (Scoulthroupe, 1967) und einige Signalübertragungswege fehlen, wie etwa der des Ethylens. Es gibt sogar einige aquatische Makrophyten, welche die Fähigkeit Ethylen als Stresshormon zu verwenden, wieder verloren haben (Summers *et al.*, 1996). Eine Peptid-vermittelte Signaltransduktion macht in einer wässrigen Umgebung, in der primitive Pflanzen gelebt haben und heute noch leben, nur wenig Sinn. So kann spekuliert werden, ob die Erkennung von Peptiden vielleicht eine wichtige, wenn nicht eine essentielle Rolle, in

---

der Kolonisation des terrestrischen Lebensraumes durch Pflanzen gespielt haben könnte.

### 4.3. Evolution der WRKY-Gene

Eine phylogenetische Analyse auf der Basis der WRKY-Domänen hat ergeben, dass die aus *P. patens* bekannten WRKY-Gene keiner frühen phylogenetischen Linie angehören (3.6.1.). Ohne andere Sequenzen in die Analyse zu integrieren, konnte bereits gezeigt werden, dass der Grad der Differenzierung für eine deutliche Trennung der *PpWRKY*-Gene gemäß den in höheren Pflanzen vorkommenden Gruppen und Subgruppen ausreicht. Für eine Analyse der frühen Entstehung von WRKY-Genen ist *P. patens* also nicht geeignet, da sich diese Art als zu „jung“ erwiesen hat. Dennoch können durch die Kombination verschiedener Einzelergebnisse und eines Vergleiches von WRKY-Domänen anderer Pflanzenarten neue Erkenntnisse über die Evolution dieser Multigenfamilie gemacht werden. Die bisherigen phylogenetischen Analysen der WRKY-Proteine stützten sich überwiegend auf die Sequenzinformationen aus *A. thaliana* und konnte dadurch nur für die systematische Einordnung in verschiedene Gruppen verwendet werden, wie es von Eulgem *et al.* (2000) gemacht wurde. Andere Publikationen verwendeten die Protein-Sequenzen in voller Länge aus *A. thaliana* oder sogar nur partielle, von EST-Sequenzen abgeleitete Proteinsequenzen für ihre phylogenetischen Bäume (Dong *et al.*, 2003; Lambais, 2001). Obwohl dies für bestimmte Fragestellungen sicherlich ein sinnvoller Ansatz sein kann, ergeben sich aber durch die sehr variablen Bereiche außerhalb der WRKY-Domäne zum Teil unsinnige Verwandtschaftsverhältnisse.

Vereinfacht hat diese Analyse das Vorhandensein der annähernd kompletten Sequenzinformation der Genome von *A. thaliana* und *O. sativa* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002), da jetzt orthologe und paraloge Gene dieser beiden Arten zugeordnet werden können. Daraus können nicht nur verwandtschaftliche Informationen gewonnen werden, sondern gezielt Versuchsansätze geplant oder hinterfragt werden, wie es in einem Vergleich von MAP-Kinasen zwischen *O. sativa* und *A. thaliana* bereits gezeigt werden konnte (Agrawal, 2003). Als ein Beispiel funktioneller Beziehungen, die aus der Analyse der orthologen und paralogen Proteine abgeleitet werden können, dient z.B. eine *AtWRKY52/RRS1* orthologe Sequenz in *O. sativa*. Bei *AtWRKY52/RRS1* handelt es sich um ein WRKY-Resistenzgen, welches die typische TIR-NBS-LRR-Struktur besitzt (Ellis *et al.*, 2000) und Resistenz gegenüber dem Pathogen *Ralstonia solanacearum* verleiht (Deslandes *et al.*, 2002). Obwohl die phylogenetische Analyse ausschließlich auf den Sequenzen der WRKY-



---

Domäne beruht, konnte nach näherer Untersuchung bei dem identifizierten Orthologen aus *O. sativa* ebenfalls die charakteristische Resistenzgen-Struktur gefunden werden. Vor allem konnte *AtWRKY52/RRS1* von einem putativen paralogem Gen, *AtWRKY16*, unterschieden werden, was in den bisherigen phylogenetischen Analysen nicht immer gelang (Tabelle 3.4, Dong *et al.*, 2003).

Das Fehlen der *WRKY*-Gene der Gruppe III in *P. patens* und das nahezu vollständige Fehlen von Orthologen zwischen *A. thaliana* und *O. sativa* bedeutet, dass diese Gruppe wahrscheinlich erst relativ spät entstanden war und mit nur ganz wenigen Genen in dem gemeinsamen Vorfahren der ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen vertreten gewesen war. Dabei zeichnen sich die Vertreter gerade dieser Gruppe durch ihre Responsivität gegenüber Pathogenbefall besonders aus (Dong *et al.*, 2003; Kalde *et al.*, 2003). Bisher zeigten alle Mitglieder der Gruppe III aus *A. thaliana* eine Induktion der Expression gegenüber bakterieller oder mycotischer Pathogene, Viren, Salicylsäure und verschiedenen Elizitoren (Bernadette Lipok und Monika Kalde, persl. Mitteilung). Somit scheinen die *WRKY*-Gene der Gruppe III nicht nur auf eine oder wenige Klassen von Pathogenen beschränkt zu sein, sondern initiieren eine universelle und globale Antwort auf eine mögliche Bedrohung. Das fehlen dieser *WRKY*-Gene in *P. patens* kann bedeuten, dass andere Signalübertragungswege zur Aktivierung einer basalen Pathogenabwehr existieren können. Jedoch muss auch bedacht werden, dass bisher keine Pathosysteme für *P. patens* existieren und nicht bekannt ist, wie Moose generell mit biotischen Stresseinflüssen umgehen.

Für viele *WRKY*-Gene werden orthologe *Cluster* zwischen den *WRKY*-Domänen aus *A. thaliana* und *O. sativa* gebildet (Ridley, 1996; Rauhut, 2001). Diese deuten auf eine nahe, strukturelle und funktionelle Verwandtschaft hin. Solche orthologen *Cluster* befinden sich z.B. in der Subgruppe IIa, deren Vertreter jeweils ein oder mehreren orthologen *O. sativa* Genen zugeordnet werden konnten.

Interessant war das Auffinden von *WRKY*-Domänen in *O. sativa*, die in ihrer Sequenz deutlich von den bekannten Mustern abwichen (Eulgem *et al.*, 2000). Dabei konnten in den beiden Datenbanken jeweils unterschiedliche Sequenzen gefunden werden, die keinerlei Ähnlichkeit zueinander hatten. Es kann möglich sein, dass es sich bei diesen Genen ebenfalls um Pseudogene handelt. Als Wasserpflanze hat *O. sativa* engen Kontakt mit anderen, niederen Pflanzen, so dass dies auch eine Quelle möglicher Kontaminationen mit artfremden *WRKY*-Genen aus Algen darstellen könnte. Für die Sequenzen der nicht-öffentlichen Datenbank von Syngenta / TMRI ist angegeben, dass etwa 10 % der *O. sativa*-Sequenzen bakteriellen oder anderen Ursprungs sind (Goff *et al.*, 2002).

Subgruppen, in denen nahezu keine orthologen Sequenzen zu finden waren, müssen eine artspezifische Funktion erfüllen, die nicht von einer Art auf die andere übertragbar sein muss (Lynch und Conery, 2000). So stellt die Subgruppe IId eine phylogenetisch sehr „alte“ Subgruppe dar, die bereits in *P. patens* mit einigen Genen vertreten war und die nur artspezifisch evolviert ist.

Die Gruppen I und IIc sind ebenfalls „alt“, jedoch zeigt sich, dass einige orthologe *Cluster* noch vorhanden sind, aber auch neue, artspezifische Gene hinzugewonnen wurden, zu denen keine orthologen Sequenzen gefunden werden konnten.

Eine WRKY-Domäne von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die aus einer EST-Sequenz abgeleitet worden ist, ist phylogenetisch früherer Natur, als die von *P. patens*. Interessanter Weise gruppiert diese innerhalb des Baumes zusammen mit den carboxyterminalen WRKY-Domänen der Gruppe I, aber basal am Übergang zu den WRKY-Proteinen der Gruppe II.

Vor diesem Hintergrund können zwei mögliche Wege zur Entstehung der *WRKY*-Genfamilie vorgeschlagen werden.

Der erste Weg geht von einem Ur-*WRKY*-Gen aus, das nur eine *WRKY*-Domäne besaß, welche ähnlich der carboxyterminalen Domäne der Gruppe I gewesen sein muss. Ausgehend davon gab es zwei parallele Entwicklungen von *WRKY*-Proteinen, eine Gruppe mit nur einer Domäne und eine zweite Gruppe mit zwei Domänen, die durch eine Tandemduplikation der Ur-*WRKY*-Domäne entstanden ist.

Der zweite Weg geht von einem Ur-*WRKY*-Gen aus, das nur eine *WRKY*-Domäne besaß, welche ebenfalls ähnlich der carboxyterminalen Domäne der Gruppe I gewesen sein muss. Durch Tandemduplikation entstanden nun Gruppe I-ähnliche *WRKY*-Proteine mit zwei Domänen. Durch den sekundären Verlust der aminoterminalen *WRKY*-Domäne resultierten daraus die heutigen Vertreter der Gruppe II.

Wahrscheinlich lässt sich die Vielfalt an *WRKY*-Proteinen jedoch nur aus einer Kombination aus beiden Möglichkeiten erklären.

Weiterhin kann aus der phylogenetischen Analyse geschlossen werden, dass die Subgruppe IIe und IId sowie die Gruppe III auseinander hervorgegangen sein müssen. Diese Annahme kann durch das Vorhandensein des gemeinsamen VSSF<sub>K</sub>[R/K]VISLL-Motivs im aminoterminalen Bereich gestützt werden. Es ist sogar wahrscheinlich, dass die Subgruppe IIe und Gruppe III aus der phylogenetisch „alten“ Subgruppe IId hervorgingen. Hypothetisch ist außerdem anzunehmen, dass diese *WRKY*-Proteine auf einem parallelen Weg, neben den Vertretern der Gruppe I, direkt von einem Ur-*WRKY*-Gen abstammen.

Die Annahme, dass *WRKY*-Proteine der höheren Pflanzen aus den Proteinen der Gruppe I hervorgegangen sein können, kann anhand der orthologen *WRKY10*-Gene aus

---

*L. esculentum*, *C. rubella* und *A. thaliana* nachvollzogen werden (3.7.1.; Rossberg *et al.*, 2001). Hier ist in den Vorfahren von *A. thaliana* und *C. rubella* die nicht-DNA-bindende, aminoternale WRKY-Domäne von WRKY10 durch ein Deletionsereignis verloren gegangen und es ist deshalb davon ausgegangen worden, dass es sich bei den WRKY-Genen generell um schnell evolvierende Gene handeln könnte (Rossberg *et al.*, 2001). Die Bereiche der Gene, die nicht durch die Deletion betroffen waren, entsprechen in ihrer Evolutionsgeschwindigkeit einer gleichförmigen Evolutionsrate von etwa 1 % pro einer Million Jahre. Jedoch entspricht dies der durchschnittlich zu erwartenden Evolutionsgeschwindigkeit (Koch *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999; Ridley, 1996), und deshalb können diese Gene nicht als schnell evolvierende Gene bezeichnet werden. Mittels Hydrophathie-Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen der WRKY10-Orthologen konnte gezeigt werden, dass sich im Bereich der Deletion bei *AtWRKY10* und *CrWRKY10* ein hydrophiler etwa 50 AS großer Abschnitt entwickelt hat, der in *LeWRKY10* fehlt (3.7.2.). So sind nicht nur WRKY-Proteine der Gruppe II sekundär entstanden, sondern zusätzlich hat sich ein Bereich mit anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften entwickelt.

Der hohe Grad an Sequenzidentität zwischen den WRKY-Genen kann durch den Vergleich weiterer orthologer Genpaare aus *A. thaliana* und *C. rubella* untermauert werden (3.7.3.).

Nach flg22- oder UV-Behandlung sind die Expressionsmuster der WRKY10-Gene aus *L. esculentum*, *C. rubella* und *A. thaliana* sowie der orthologen WRKY11-, WRKY22- und WRKY33-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana* zwischen den jeweiligen orthologen konserviert (3.7.4.; 3.7.5.). Für „single-copy“-Gene aus *A. thaliana* und verwandten Arten konnte gezeigt werden, dass ihre Funktion über mehrere Millionen Jahre erhalten geblieben ist (Koch *et al.*, 2001). So liegt das Chalkon-Synthase-Gen (*CHS*), ein Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese (Schulze-Lefert *et al.*, 1989), in *A. thaliana* und in einigen näher verwandten *Arabidae* als ein „single-copy“-Gen vor (Koch *et al.*, 2000). Die Expressionsmuster orthologer *CHS*-Gene zeigten in Transfektionsexperimenten in Protoplasten von *A. thaliana* keine größeren Unterschiede (Koch *et al.*, 2001). Expressionsvergleiche an Mitgliedern von Multigenfamilien, wie etwa der WRKY-Genfamilie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, fehlen bisher zwischen Arten mit relativ großer evolutiver Distanz. Die Grundlagen für solche, vergleichenden Expressionsuntersuchungen werden zur Zeit mittels Transkriptom-Analysen von *A. thaliana* sowie vergleichenden Analysen zur Genomorganisation anderer Pflanzen geschaffen (Pryer *et al.*, 2002; Vandepoele *et al.*, 2002; Laurie und Devos, 2002; Feng *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002; Zhu und Wang, 2000).

Aber nicht nur die Expressionsmuster der orthologen Gene waren bemerkenswert ähnlich, sondern auch die physiologischen Reaktionen in bezug auf das Pflanzenwachstum zeigten keine erwähnenswerten Unterschiede zwischen den höheren Pflanzen (3.7.4.). Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion des Wachstums um bis zu 75 % nach UV-Bestrahlung mit einer Dosis von mehr 10 mJ in den höheren Pflanzen zu unphysiologischen Reaktionen geführt hat. Im Gegensatz dazu zeigte das bestrahlte *P. patens* Protonema selbst bei sehr hohen UV-Dosen nahezu keine Wachstumsverzögerung. Das bedeutet, dass *P. patens* im gewissen Sinne eine „angeborene UV-Resistenz“ besitzt, die in höheren Pflanzen fehlt oder weniger effizient ist. Die bei der Reparatur der durch UV-Licht entstandenen Tymidindimere beteiligten DNA-Reparaturmechanismen könnten vor dem Hintergrund einer effizienten homologen Rekombination in *P. patens* in beiden Prozessen eine Rolle spielen (Ray und Langer, 2002; Puchta, 1999; Schaefer, 2001).

Die Wirkung des flg22-Elizitors auf das Wachstum von *A. thaliana* Keimlingen wurde bereits beschrieben (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Da bekannt ist, dass *L. esculentum* genauso sensitiv auf flg22 reagiert wie *A. thaliana* (Meindel *et al.*, 2000), verwundert es nicht, dass auch die gefundene Inhibition des Wachstums mit der von *A. thaliana* identisch ist (3.7.4.).

Eine Analyse der Promotorsequenzen der drei orthologen *WRKY10*-Gene zeigt zwischen den nahe verwandten Arten *A. thaliana* und *C. rubella* genügend Ähnlichkeiten, um mit einem direkten Sequenzvergleich konservierte Bereiche innerhalb beider Sequenzen zu finden. Vor dem Hintergrund vergleichbarer Expressionsmuster wurde angenommen, dass in allen drei Promotorsequenzen konservierte *cis*-Elemente hätten identifiziert werden können. Jedoch kann in bezug auf den Promotor von *LeWRKY10* keine Aussage gemacht werden, da die Sequenzidentität für eine solche phylogenetische „*footprint*“-Analyse nicht groß genug ist. Für nahe Verwandte Arten der Familie *Arabidae* konnten konservierte Elemente in den Promotoren von *CHS* und *Apetala3* für eine konservierte Expression verantwortlich gemacht werden (Koch *et al.*, 2001). In diesem Fall sind die verwandtschaftlichen Beziehungen noch so eng, dass sogar ein Stammbaum auf der Basis der Promotor-Sequenzen konstruiert werden konnte (Koch *et al.*, 2001). Es gibt jedoch auch andere Beispiele, in denen gezeigt werden konnte, dass die Promotorsequenzen orthologer Gene aus zwei nahe verwandten Arten keine Gemeinsamkeiten zeigten, jedoch die gleichen Expressionsmuster vermittelten (Ludwig *et al.*, 2000).

#### **4.4. Arbeiten mit dem Motif-Mapper-Programm**

Um Promotorvergleiche auch über größere evolutive Distanzen hinweg durchführen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Kenneth W. Berendzen und Kurt Stüber das Programm *Motif-Mapper* entwickelt, das Analysemethoden verschiedener bestehender Programme miteinander kombiniert oder bestehende Programme um bestimmte Aspekte in der Analyse ergänzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm ausschließlich zur Kartierung von Elementen verwendet.

Bioinformatische Analysen benutzen in der Regel zwei Ansätze, um putative, regulatorische *cis*-Elemente in Promotoren zu identifizieren: Musterbildung ausgehend von bereits bekannten Elementen oder phylogenetische „*footprint*“-Analysen von Promotoren orthologer oder koregulierter Gene (Fickett und Wasserman, 2000). Im ersten Fall wird die Position der bekannten Elemente als Ergebnis der Analyse erhalten. Im zweiten Fall besteht das Ergebnis aus Elementen, die in allen untersuchten Promotoren die häufigsten waren.

In *Motif-Mapper* ist eine Kombination aus beiden Analysemethoden erhalten.

Zunächst wurden Hexanucleotid-Verteilungen ausgehend von den fünf Modellorganismen *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *O. sativa* für den Promotorbereich erstellt (3.8.2.). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass in den Promotoren dieser fünf Arten nur etwa 1 bis 3 % der Hexanucleotide anders verteilt waren als im Genom. Dabei waren in allen Arten immer die selben Hexanucleotide anders verteilt, was bedeutet, dass der Genregulation in allen Eukaryoten weitgehendst identische, transkriptionelle Mechanismen zugrundeliegen.

Bisher sind solche Analysen nur in *S. cerevisiae* durchgeführt worden, jedoch mit dem Ziel neue regulatorische Elemente zu entdecken. Über vergleichende Analysen der Promotor-Organisation zwischen verschiedenen Stämmen von Eukaryoten ist bisher nichts berichtet worden. Interessanter Weise hatte mit ähnlichen Methoden bereits gezeigt werden können, dass die Promotoren von Prokaryoten konservierte DNA-Motive zeigten. So konnten in einem Vergleich von 17 komplett sequenzierte bakterielle Genome konservierte, regulatorische DNA-Motive identifiziert werden (McGuire *et al.*, 2000), die in allen Genomen enthalten waren. Ebenso konnten durch den Vergleich von drei Streptokokken-Genomen *cis*-Elemente identifiziert werden, die in Promotoren überproportional häufiger waren als im Genom (Mrazek *et al.*, 2002).

Trotz der einheitlichen Promotor-Architektur auf der Basis von Hexanucleotid-Häufigkeiten, konnten dennoch spezifische Elemente für die jeweiligen Organismengruppen identifiziert werden (3.8.4.).

Überraschender Weise konnte keine Publikation gefunden werden, die sich mit der systematischen Ordnung höherer Organismen auf der Grundlage von Oligonucleotid-Verteilungen beschäftigt hat. Die zu diesem Thema bestehende Literatur beschäftigt sich mit prokaryotischen Genomen und schließt die Analyse der kodierenden

---

Sequenzen mit ein. Außerdem basieren diese Genomanalysen in den meisten Fällen auf Dinucleotid-Häufigkeiten (Mrzek *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 1999).

In dem nächsten Schritt wurde gezeigt, dass mit dem *Motif-Mapper* neue *cis*-Elemente auf der Basis von Häufigkeitsverteilungen gefunden werden konnten (3.8.5.). Solche Ansätze haben zur Identifizierung von noch nicht bekannten, funktionellen *Enhancer*-Elementen in *D. melanogaster* geführt (Berman *et al.*, 2001). Gleichfalls konnten durch Häufigkeits-Analysen spezifische *cis*-Elemente charakterisiert werden, die in *S. cerevisiae* die Transkription der rDNA vermitteln (Sudarsanam *et al.*, 2002).

Für das im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierte (TC/GA)<sub>8</sub>-Element wurde zusätzlich die Anzahl der insgesamt im Genom vorkommenden Elemente bestimmt (3.8.5.; 3.8.6.). Es konnte gezeigt werden, dass ein (TC/GA)<sub>n</sub>-Element fast ausschließlich in Promotoren zu finden ist (3.8.6.). Vergleichbare Analysen haben periodisch auftretende *cis*-Elemente in direktem Zusammenhang mit der Chromatinstruktur setzen können (Ioshikhes *et al.*, 1999). Auch das neu identifizierte (TC/GA)<sub>8</sub>-Element könnte etwas mit dem Aufbau und der Stabilität der Chromatinstruktur zu tun haben, da sich diese Art von Elementen in der Nähe des Zentromers häufen (3.8.7.; Kenneth W. Berendzen, persl. Mitteilung).

Mit diesen Analysen konnte die generelle Funktionsfähigkeit des *Motif-Mapper*-Programms gezeigt werden.

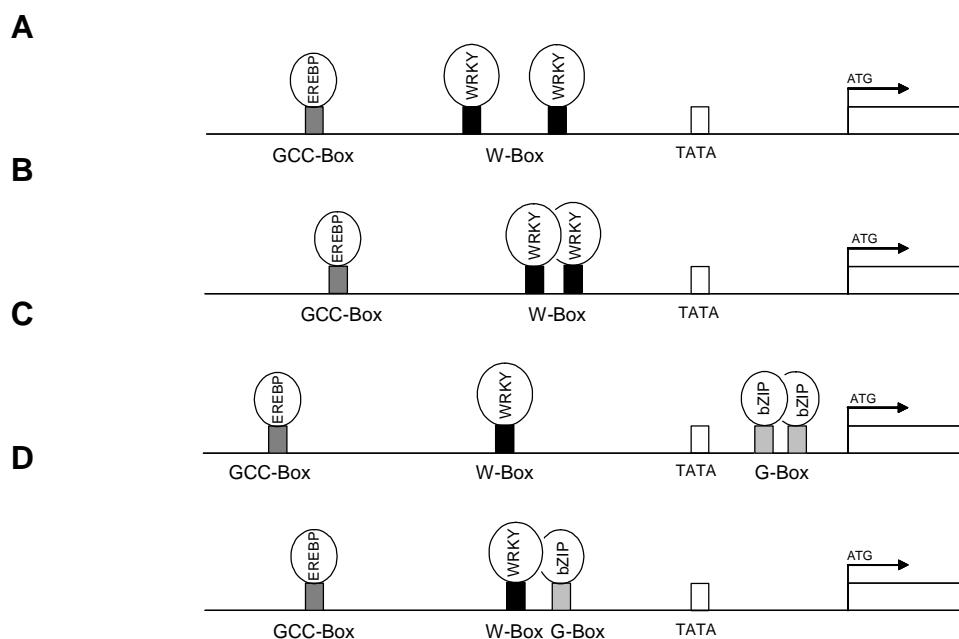
Die Analyse der pathogenresponsiven *cis*-Elemente W-Box, GCC-Box, S-Box und G-Box konnte zeigen, dass diese unterschiedlich verteilt im Genom vorliegen (3.8.8.).

Bemerkenswert war jedoch, dass benachbarte Elemente aus W-Boxen und aus G-Boxen überproportional häufig vorkamen. Das gemeinsame Auftreten von W-Box-Elementen ist bereits mehrmals beschrieben worden und es besteht die Möglichkeit, dass eine kooperative Bindung von zwei WRKY-Proteinen an diese Elemente stattfindet (Rushton *et al.*, 2002; Eulgem 1999). Ebenso wurde bereits über das häufige Vorkommen von zwei benachbarten G-Boxen in Promotoren berichtet (McKendree *et al.*, 1990; Salinas *et al.*, 1992).

Die überproportional häufige Kombination von G-Boxen und W-Boxen stellt eine neue Kombination dar, zu der bisher keine funktionalen Daten gefunden werden konnten. Jedoch wird über eine funktionelle Kombination dieser beiden Elemente gemutmaßt (Rolland *et al.*, 2002).

Obwohl für einige benachbarte GCC-Box-ähnlichen Elemente und W-Boxen spekuliert worden ist, dass diese funktionelle Kombinationen für ein kooperatives Binden von EREBP-Faktoren und WRKY-Proteinen darstellen (Rushton *et al.*, 2002; Eulgem, 1999), konnte keine signifikante Häufung benachbarter Elemente gefunden werden. Deswegen ist davon auszugehen, dass EREBP-Faktoren unabhängig von den anderen

beiden untersuchten, pathogenresponsiven Transkriptionsfaktoren fungieren. Da gezeigt worden ist, dass die Promotoren innerhalb der untersuchten Organismen und innerhalb der beiden Pflanzen *A. thaliana* und *O. sativa* sehr ähnlich organisiert waren, kann man davon ausgehen, dass diese Promotor-Architektur auch auf andere Grünpflanzenarten übertragbar ist. Deswegen kann man auch ohne genomische Sequenzinformationen mutmaßen, dass die Organisation von *P. patens*-Promotoren denen der höheren Pflanzen sehr ähnlich sein wird. Diese Ergebnisse stützen erneut die bereits diskutierten Ergebnisse der fehlenden Reporter-gen-Aktivierung von W-Box- und S-Box-enthaltenden artifiziiellen Konstrukte und die Möglichkeit von kompetierenden Transkriptionsfaktoren.



**Abb. 4.3: Modell zur kooperativen Bindung benachbarter pathogenresponsiver cis-Elemente.** Dargestellt ist die hypothetische Bindung von pathogenresponsiven Transkriptionsfaktoren an einzelne oder benachbarte cis-Elemente auf Grund der durchgeführten *Motif-Mapper*-Analyse. Für GCC-Boxen konnte keine häufige Nachbarschaft mit W- oder G-Boxen gefunden werden. Die Vertreter der EREBP-Familie fungieren wahrscheinlich unabhängig von den beiden anderen Transkriptionsfaktoren. **(A)** Bindung von einzelnen WRKY-Proteinen an einzelne Elemente oder **(B)** in kooperativer Bindung an benachbarte W-Boxen. **(C)** Kooperative Bindung von bZIP-Faktoren an benachbarte G-Box-Elemente. **(D)** Kooperative Bindung von bZIP-Faktoren und WRKY-Proteine an benachbarte W-Box- und G-Box-Elemente. Die Elemente wurden schematisch zu ihrer relativen Position zur TATA-Box dargestellt. Ähnliche Positionen konnten *in vivo* in den Promotoren von *AtWRKY33* und *PcWRKY1* (Eulgem, 1999) gefunden werden.

Die selbe Analyse wurde für die Promotoren von Genfamilien durchgeführt, um zu zeigen, dass auch die Analyse kleinerer Datensätze mit Motif-Mapper sinnvoll sein kann. Wie bereits von Dong et al (2003) publiziert, sind W-Box-Elemente in den

---

Promotoren der *WRKY*-Genfamilie sehr häufig und man kann von einer Autoregulation der *WRKY*-Genexpression über W-Box-Elemente ausgehen. Bei der Untersuchung von Genfamilien mit zahlreichen Mitgliedern, wie etwa bei den Rezeptor-Kinase-ähnlichen Proteinen, ist es wahrscheinlich sinnvoll sich kleinere Unterfamilien anzusehen.

In einer weiteren Analyse konnte gezeigt werden, dass auch die Sinn- oder Gegensinn-Orientierung einen Einfluss auf die Häufigkeits-Verteilungen von Elementen haben kann. Ähnliches wurde auch in *S. cerevisiae* gefunden und es konnte gezeigt werden, dass die Sinn-orientierte Wiederholungen eines CGG-Motivs im Gegensatz zu seinem Gegensinn-Motiv CCG in einer orientierungs-abhängigen DNA-Instabilisierung und zu hoher Frequenz von homologer Rekombination führt (Balakumaran *et al.*, 1999). Aus dem Maximum in der Häufigkeits-Karte der TATA-Box TATAAA konnte auch die relative Position zum putativen Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden. Dabei war bemerkenswert, dass die (TC/GA)-Wiederholungen des (TC/GA)<sub>8</sub>-Elementes orientierungsabhängig anders Verteilt waren: Die TCTCTC-Motiv-Verteilung zeigte eine Übereinstimmung mit dem Bereich, in dem auch die TATA-Box am häufigsten war. Das Maximum des GAGAGA-Motivs war jedoch näher am Translationsstart (ATG) gelegen und wird demzufolge im 5'-nicht-translatierten Bereich anzusiedeln sein. Für das G-Box-Element (Williams *et al.*, 1992) konnte ebenfalls ein Maximum in der Element-Verteilung mit dem 5'-nicht-translatierten Bereich gefunden werden.

Schließlich wurde das gut charakterisierte, funktionale W-Box-Motiv aus dem *SIRK/FRK1*-Promotor verwendet, um mit dem Motif-Mapper andere Promotoren zu finden, die diesen Konsensus in einer ähnlichen Position vor den Transkriptionsstart und in der selben Orientierung besitzen. Wie gezeigt werden konnte, werden fünf der sechs ausgewählten Promotoren nach flg22-Behandlung mit dem *SIRK/FRK1*-Promotor koreguliert.

Bei den Genen At4g23180 und At4g23190 handelt es sich um tandemduplizierte paraloge, Rezeptor-Kinase-ähnliche Gene. Die erhaltene Koregulation dieser Paralogen unterstreicht nur noch einmal die Wichtigkeit der phylogenetischen Analyse für die *WRKY*-Genfamilie. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass genau dieses Genpaar bereits Gegenstand einer Untersuchung zur Charakterisierung möglicher Zielgene von *WRKY*-Transkriptionsfaktoren gewesen ist (Du und Chen, 2000). Es war sogar möglich *AtWRKY18* als einen der Faktoren zu identifizieren, der an die W-Box-Elemente dieser beiden Rezeptor-Kinase-ähnliche Gene bindet (Chen und Chen, 2002). Interessant ist weiterhin, dass in dem Promotor des einzigen Gens, welches nicht durch flg22-induziert werden konnte, *PGP17* (At3g28380), beinahe genauso viele W-Box-Elemente in ähnlicher Position vorkamen (8 W-Boxen) wie im *SIRK/FRK1*-Promotor (9 W-Boxen). Dies zeigt abermals, dass die absolute Anzahl von W-Boxen kein gutes Maß für Funktionalität ist, wie es von Malek *et al.* (2000) und Dong *et al.* (2003) diskutiert wird.



### ***Ausblick***

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der *PpWRKY*-Gene zu denen aus *A. thaliana* zeigt der funktionelle Vergleich von *PpWRKY20* mit *AtWRKY11* deutliche Unterschiede auf. Beide Proteine zeigen ähnliche Fähigkeiten hinsichtlich der Transaktivierung in Hefe, aber völlig gegensätzliche Eigenschaften in der EMSA-Analyse. Das ist in sofern interessant, da *PpWRKY20* bisher das einzige WRKY-Protein ist, dass nicht an die getesteten W-Box-Elemente bindet. Dennoch bleibt die Frage zu klären, ob *PpWRKY20* gar keine W-Boxen binden kann, oder ob die getesteten Elemente eine ungünstige Umgebung der W-Boxen besitzen. Um dies zu klären, sollten weitere Elemente getestet werden.

Da sich in der COG-Analyse herausgestellt hat, dass *PpWRKY20* und *AtWRKY11* keine orthologen Gene sind, sollte die *in vitro* W-Box-Bindung mit *AtWRKY15*, dem orthologen Protein zu *PpWRKY20*, wiederholt werden. Sollte sich herausstellen, dass das orthologe WRKY-Protein aus *A. thaliana* ebenfalls keine Bindung zu W-Boxen herstellt, kann eine weiterreichende Bindungsanalyse mit völlig zufälligen Oligonucleotiden durchgeführt werden, um die spezifischen Zielsequenzen zu ermitteln. Auf der anderen Seite kann die Information der nicht-bindenden WRKY-Domäne genutzt werden, um aus funktionellen WRKY-Domänen nicht-funktionelle zu erstellen.

Bereits durch die Datenbankvergleiche konnten zwei benachbarte Motive gefunden werden, die eine Kernimport-Sequenz darstellen. In dem Abschnitt unmittelbar vor der WRKY-Domäne sind allerdings auch noch weitere basische Aminosäurereste vorhanden, die neue, noch nicht charakterisierte Kern-Lokalisations-Sequenzen darstellen könnten. Durch die Fusion an GFP und mittels Partikelbeschuss könnten diese funktionell untersucht werden. Partielle *PpWRKY20*-Fragmente mit GATEWAY-kompatiblen Extensionen, die im Rahmen dieser Arbeit für die Versuche in Hefe Verwendung fanden, können direkt zur Erstellung der GFP-Fusionskonstrukte verwendet werden.

Eine weiterführende, funktionelle Charakterisierung anderer WRKY-Proteine aus *P. patens* ist aller Wahrscheinlichkeit in den nächsten Jahren nicht zu erwarten. Die vorhandenen *PpWRKY*-Gene, die sich von den EST-Sequenzen ableiten ließen, sind induzierbar und werden im Protonema exprimiert. Da diese Sequenzinformationen erst im Oktober 2002 verfügbar waren, wurden sie in die durchgeführten Expressionsanalysen sowie in den phylogenetischen Baum integriert. Diese

---

Informationen sollten jedoch weiter genutzt werden. Es wurde bereits damit begonnen, sowohl die cDNA-Sequenzen als auch die genomischen Sequenzen dieser Gene zu isolieren.

Für diese Arbeit hat sich *P. patens* als Modellorganismus nicht bewährt. Zwar ist es von Vorteil die Möglichkeit der homologen Rekombination *in planta* auszunutzen, jedoch ist das vor dem Hintergrund der qualitativ hochwertigen Insertionsmutanten in *A. thaliana* kein großer Nutzen mehr. Erst wenn das *P. patens* Genom-vollständig sequenziert ist, kann diese Art als vollwertiges Modellsystem wie *A. thaliana* oder *O. sativa* genutzt werden.

Bei der Verwendung von *P. patens* als Modellsystem besteht der mögliche Nachteil einer rezente Duplikation des Genoms, die nur wenig Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Analyse einzelner Gene bietet. Daher könnte es sinnvoller sein auf *Ceratodon purpureus* als Modellsystem umzusteigen, da dieses Moos kein rezente dupliziertes Genom besitzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die verwandtschaftliche Nähe zu *P. patens* die vorhandenen EST-Daten genutzt werden können, um orthologe Gene aus *Ceratodon purpureus* zu identifizieren.

Ein Nachteil, der auch durch mehr Sequenzinformation nicht kompensiert werden kann, ist das Fehlen von bekannten Pathogenen für *P. patens*. Aus den EST-Projekten ist bekannt, dass viele Sequenzen mit Homologien zu den Resistenzgenen der höheren Pflanzen in *P. patens* vorhanden sind, was das Vorhandensein eines Moos-Pathogens sehr wahrscheinlich macht. Das Auffinden eines solchen Pathogens eröffnet die Möglichkeit ein Pathosystem auch für niedere Pflanzen zu etablieren.

Mit dem *Motif-Mapper*-Programm wurde eine gute Basis für neue, vergleichende Promotoranalysen geschaffen. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete „MAP+Count“-Algorithmus ist nur eines der Unterprogramme des *Motif-Mapper*-Programms. In Zusammenarbeit mit Kenneth W. Berendzen sind bereits weitere Unterprogramme erstellt worden, die jedoch noch weiter ausgebaut und erprobt werden müssen. Es bleibt zu überprüfen, ob die mit dem verwandten W-Box-Motiv gefundenen, flg22-abhängig koregulierten Gene aus *A. thaliana* auch durch die selben AtWRKY-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, wie es bei *SIRK/FRK1* der Fall ist (Robatzek und Somssich, 2002; Asai *et al.*, 2002). Dies könnte durch den gemeinsamen Partikelbeschluss von 35S::*AtWRKY<sub>n</sub>* mit Promotor-Reporterfusionskonstrukten in Blättern von *A. thaliana* überprüft werden. Auf diese Weise kann schnell herausgefunden werden, ob z.B. *AtWRKY6*, *AtWRKY22* oder *AtWRKY29* überhaupt einen Einfluss auf die zu testenden Promotoren haben.

## 5. Zusammenfassung

---

Die Mitglieder der Multigenfamilie der pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren sind zwischen den höheren Pflanzen und der niederen Pflanze *Physcomitrella patens* hoch konserviert. Heterolog exprimiertes *PpWRKY20* ist im Nucleus lokalisiert. Sowohl für *PpWRKY20* als auch für das sehr ähnliche *AtWRKY11* aus *A. thaliana* konnte Transaktivierung in Hefe festgestellt werden. Während *AtWRKY11 in vitro* an W-Box-Elemente bindet, konnte *PpWRKY20* dies nicht. Außerdem konnte *PpWRKY20* auch keine Reporterogenaktivität über W-Boxen *in vivo* induzieren.

Biolistischer Partikelbeschuss wurde etabliert, um Protonema mit Promotor-Reportergenkonstrukten zu transformieren. Eine dosisabhängige GUS-Aktivität konnte nach dem Beschuss mit einem 4xW2-Box-Konstrukt und nach sprühen mit flg22-Elizitor gefunden werden. Expressionsanalysen zeigten, dass einige der bekannten *PpWRKY*-Gene ebenfalls induziert wurden. Nach Behandlung mit nicht-funktionellem Elizitor oder mit BSA wurde herausgefunden, dass die *WRKY*-Gene generell durch Peptide induziert wurden.

Eine phylogenetische Analyse wurde anhand der Sequenzen für die WRKY-Domänen aus *P. patens*, *A. thaliana* und *Oryza sativa* durchgeführt. So konnten die paralogen und orthologen *WRKY*-Gene aus *A. thaliana* und *O. sativa* gefunden werden. Die Analyse ergab, dass die *WRKY*-Gene der Gruppe I und Gruppe II wahrscheinlich die phylogenetisch ältesten sind. Funktionelle und strukturelle Analysen von orthologen *WRKY*-Genen höherer Pflanzen zeigten große Ähnlichkeiten.

In diesem Zusammenhang erscheint es sinnvoll auch W-box-Elemente zu untersuchen. Das neu entwickelte *Motif-Mapper*-Programm wurde verwendet, um die Promotor-Architektur von fünf Modellorganismen zu untersuchen. Mit dem *Motif-Mapper* konnten neue *cis*-Elemente in Pflanzen gefunden werden. Die Frequenz und die Verteilung von pathogenresponsiven Elementen wurde gesamtgenomisch in *A. thaliana* untersucht. Dabei kamen die W-Boxen und die G-Boxen als kombinierte funktionelle Einheiten vor. Mit einem Motiv aus sich wiederholenden W-Boxen wurden ähnliche Motive in Promotoren koregulierter Gene gefunden.

---

## Abstract

---

The members of the plant specific multigene-family of WRKY transcription factors are highly conserved between the lower plant *Physcomitrella patens* and higher plants. Heterologously expressed *PpWRKY20* is localized to the nucleus. *PpWRKY20* and *AtWRKY11*, a close homolog of *PpWRKY20* from *Arabidopsis thaliana*, transactivate in yeast. *AtWRKY11* could bind to W-boxes *in vitro*, while *PpWRKY20* could not. Furthermore, *PpWRKY20* could not activate reporter gene activity via W-boxes *in vivo* as well. The analysis of a *PpWRKY20* null-mutant allele showed no visible alterations compared to wildtype moss.

Biolistic particle bombardment was established to transform protonema with promoter-reporter gene constructs. A dosage dependent increase of GUS-activity could be found after bombarding the protonema with a 4xW2-box-construct and after spraying with flg22-elicitor. Expression studies revealed that some of the known *PpWRKY*-genes were induced. Applying non-functional elicitor or BSA demonstrated that *WRKY*-gene expression is induced by peptides in general.

A phylogenetic analysis was performed using WRKY-domain sequences of *P. patens*, *A. thaliana* and *Oryza sativa*. This facilitates a method for finding proper paralogs and orthologs of *A. thaliana* and *O. sativa* *WRKY*-genes. Group I and group II *WRKY*-proteins appear to be the most ancestral *WRKY*s. Functional and structural analysis of *WRKY*-orthologs from higher plants exhibited high similarities, which imply a putatively conserved function. In this context, a study of W-box elements is sensible.

The newly developed *Motif-Mapper* program was used to investigate promoter-architecture in five model organisms. Using *Motif-Mapper*, novel *cis*-elements were discovered in plants. The frequency and distribution of pathogen-responsive elements was studied in a comprehensive and genome wide approach in *A. thaliana*. W-boxes and G-boxes were found to form combined functional units. A W-box-repeat motif was used to uncover similar motifs in promoters of co-regulated genes.

---

---

## 6. Literatur

---

**Acarkan A., Rossberg M., Koch M., Schmidt R. (2000)**

Comparative genome analysis reveals extensive conservation of genome organisation for *Arabidopsis thaliana* and *Capsella rubella*.

Plant J. 23(1):55-62.

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K.C., Busam D.A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A.D., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K.A., Howland T.J., Wei M.H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Siden-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E., Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.Y., Wassarman D.A., Weinstock G.M., Weissenbach J., Williams S.M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q.A., Ye J., Yeh R.F., Zaveri J.S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X.H., Zhong F.N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E.W., Rubin G.M., Venter J.C (2000):

The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.  
Science 287(5461):2185-2195.

**Agrawal, G.K., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2003)**

Rice MAPKs.

Biochem Biophys Res Commun.; 302(2):171-180.

---

**Akita, M., Valkonen, J.P. (2002)**

A novel gene family in moss (*Physcomitrella patens*) shows sequence homology and a phylogenetic relationship with the TIR-NBS class of plant disease resistance genes. *J Mol Evol.*; 55(5):595-605.

**Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997)**

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*; 25(17):3389-3402.

**Aparicio S., Chapman J., Stupka E., Putnam N., Chia JM., Dehal P., Christoffels A., Rash S., Hoon S., Smit A., Gelpke MD., Roach J., Oh T., Ho IY., Wong M., Detter C., Verhoef F., Predki P., Tay A., Lucas S., Richardson P., Smith SF., Clark MS., Edwards YJ., Doggett N., Zharkikh A., Tavtigian SV., Pruss D., Barnstead M., Evans C., Baden H., Powell J., Glusman G., Rowen L., Hood L., Tan YH., Elgar G., Hawkins T., Venkatesh B., Rokhsar D., Brenner S. (2002)**

Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*;297(5585):1301-1310.

**Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002)**

MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*; 415(6875):977-983.

**Bailey, T.L. und Elkan, C. (1994)**

Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* (Altmann, R., ed.), 28-36, AAAI Press.

**Balakumaran, B.S., Freudenreich, C.H., Zakian, V.A. (2000)**

CGG/CCG repeats exhibit orientation-dependent instability and orientation-independent fragility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet.*;9(1):93-100.

**Bauer, Z., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Felix, G. (2001)**

Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. *J Biol Chem.*;276(49):45669-45676.

**Bennetzen J.L. (2000)**

Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes:m microcolinearity and its many exceptions. *Plant Cell.* 12(7):1021-1029.

**Berman B.P., Nibu Y., Pfeiffer B.D., Tomancak P., Celniker S.E., Levine M., Rubin G.M., Eisen M.B. (2002)**

Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the *Drosophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(2):757-762.

**Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bako, L., Okresz, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., Koncz, C. (1999)**

Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*;96(9):5322-5327.

- 
- Brenner S., Elgar G., Sandford R., Macrae A., Venkatesh B., Aparicio S. (1993)**  
Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome.  
Nature. 366(6452):265-268.
- Buell, C.R. (2002)**  
Obtaining the sequence of the rice genome and lessons learned along the way.  
Trends Plant Sci.; 7(12):538-542.
- Campbell A., Mrazek J., Karlin S. (1999)**  
Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 3;96(16):9184-9.
- the C. elegans Sequencing Consortium (1998)**  
Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science.  
282(5396):2012- 2018.
- Chandrasekharan M.B., Bishop K.J., Hall T.C. (2003)**  
Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis.  
Plant J.;33(5):853-866.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M.J., Chambaz, E.M., Cochet, C., Dideberg O. (1999)**  
Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization.  
EMBO J.;18(11):2930-2940.
- Chen, C., Chen, Z. (2000)**  
Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco.  
Plant Mol Biol.; 42(2):387-396.
- Chen, C., Chen, Z. (2002)**  
Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor.  
Plant Physiol.; 129(2):706-716.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002)**  
Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses.  
Plant Cell.;14(3):559-574.
- Cho, S.-H., Chung, Y.-S., Cho, S.-K., Rim, Y.-W., and Shin, J.-S. (1999)**  
Particle Bombardment Mediated Transformation and GFP Expression in the Moss *Physcomitrella patens*.  
Mol. Cells 9 (1): 14-19.
- Cormack, R.S., Somssich, I.E. (1997)**  
Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA.  
Gene;194(2):273-276.
-

---

**Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Kochner, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (2002)**

Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley.

Biochim Biophys Acta.;1576(1-2):92-100.

**Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., Dangl, J.L. (1997)**

A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death.

Cell.;88(5):685-694.

**Deloukas P., Matthews L.H., Ashurst J., Burton J., Gilbert J.G., Jones M., Stavrides G., Almeida J.P., Babbage A.K., Bagguley C.L., Bailey J., Barlow K.F., Bates K.N., Beard L.M., Beare D.M., Beasley O.P., Bird C.P., Blakey S.E., Bridgeman A.M., Brown A.J., Buck D., Burrill W., Butler A.P., Carder C., Carter N.P., Chapman J.C., Clamp M., Clark G., Clark L.N., Clark S.Y., Clee C.M., Clegg S., Cobley V.E., Collier R.E., Connor R., Corby N.R., Coulson A., Coville G.J., Deadman R., Dhimi P., Dunn M., Ellington A.G., Frankland J.A., Fraser A., French L., Garner P., Grafham D.V., Griffiths C., Griffiths M.N., Gwilliam R., Hall R.E., Hammond S., Harley J.L., Heath P.D., Ho S., Holden J.L., Howden P.J., Huckle E., Hunt A.R., Hunt S.E., Jekosch K., Johnson C.M., Johnson D., Kay M.P., Kimberley A.M., King A., Knights A., Laird G.K., Lawlor S., Lehtvaslainen M.H., Leversha M., Lloyd C., Lloyd D.M., Lovell J.D., Marsh V.L., Martin S.L., McConnell L.J., McLay K., McMurray A.A., Milne S., Mistry D., Moore M.J., Mullikin J.C., Nickerson T., Oliver K., Parker A., Patel R., Pearce T.A., Peck A.I., Phillimore B.J., Prathalingam S.R., Plumb R.W., Ramsay H., Rice C.M., Ross M.T., Scott C.E., Sehra H.K., Shownkeen R., Sims S., Skuce C.D., Smith M.L., Soderlund C., Steward C.A., Sulston J.E., Swann M., Sycamore N., Taylor R., Tee L., Thomas D.W., Thorpe A., Tracey A., Tromans A.C., Vaudin M., Wall M., Wallis J.M., Whitehead S.L., Whittaker P., Willey D.L., Williams L., Williams S.A., Wilming L., Wray P.W., Hubbard T., Durbin R.M., Bentley D.R., Beck S., Rogers J. (2001)**

The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20.

Nature ;414(6866):865-871.

**Deslandes L., Olivier J., Theulieres F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J., Marco Y. (2002)**

Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes.

Proc Natl Acad Sci U S A.;99(4):2404-2409.

**Dong, J., Chen, C., Chen, Z. (2003)**

Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response.

Plant Mol Biol.;51(1):21-37.

**Du, L., Chen, Z. (2000)**

Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*.

Plant J.;24(6):837-847.

**Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. (2000)**

cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles.

Plant Cell.;12(6):963-9

77.



---

**Egener, T., Granado, J., Guitton, M.C., Hohe, A., Holtorf, H., Lucht, J.M., Rensing, S.A., Schlink, K., Schulte, J., Schween, G., Zimmermann, S., Duwenig, E., Rak, B., Reski, R. (2002)**

High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library.  
BMC Plant Biol.; 2(1):6.

**Ellis J., Dodds P., Pryor T. (2000)**

The generation of plant disease resistance gene specificities.  
Trends Plant Sci.;5(9):373-379..

**Eulgem, T. (1999)**

WRKY-Transkriptionsfaktoren als Signalüberträger in der pflanzlichen Pathogenabwehr  
Dissertation, Universität zu Köln.

**Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1999)**

Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors.  
EMBO J.; 18(17):4689-4699.

**Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000)**

The WRKY superfamily of plant transcription factors.  
Trends Plant Sci.; 5(5):199-206.

**Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983)**

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.  
Anal Biochem.; 132(1):6-13.

**Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1984)**

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.  
Addendum.  
Anal Biochem.; 137(1):266-267.

**Felsenstein J. (1997)**

An alternating least squares approach to inferring phylogenies from pairwise distances.  
Syst Biol.;46(1):101-111.

**Feng, Q., Zhang, Y., Hao, P., Wang, S., Fu, G., Huang, Y., Li, Y., Zhu, J., Liu, Y., Hu, X., Jia, P., Zhang, Y., Zhao, Q., Ying, K., Yu, S., Tang, Y., Weng, Q., Zhang, L., Lu, Y., Mu, J., Lu, Y., Zhang, L.S., Yu, Z., Fan, D., Liu, X., Lu, T., Li, C., Wu, Y., Sun, T., Lei, H., Li, T., Hu, H., Guan, J., Wu, M., Zhang, R., Zhou, B., Chen, Z., Chen, L., Jin, Z., Wang, R., Yin, H., Cai, Z., Ren, S., Lv, G., Gu, W., Zhu, G., Tu, Y., Jia, J., Zhang, Y., Chen, J., Kang, H., Chen, X., Shao, C., Sun, Y., Hu, Q., Zhang, X., Zhang, W., Wang, L., Ding, C., Sheng, H., Gu, J., Chen, S., Ni, L., Zhu, F., Chen, W., Lan, L., Lai, Y., Cheng, Z., Gu, M., Jiang, J., Li, J., Hong, G., Xue, Y., Han, B. (2002)**

Sequence and analysis of rice chromosome 4.  
Nature.;420(6913):316-320.

**Fickett J.W., Wasserman W.W. (2000)**

Discovery and modeling of transcriptional regulatory regions.  
Curr Opin Biotechnol. ;11(1):19-24..

**Foster R., Izawa T., Chua N.H. (1994)**

Plant bZIP proteins gather at ACGT elements.  
FASEB J.;8(2):192-200..

**Giavalisco, P. (1999)**

Erzeugung genetischer Null-Mutanten eines pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktors (des WRKY-Typs) im Moos *Physcomitrella patens*.

Diplomarbeit, Universität zu Köln.

**Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. (1998)**

Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression.

Plant J.; 16(4):433-442.

**Gisler, B., Salomon, S., Puchta, H. (2002)**

The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells.

Plant J.;32(3):277-284.

**Glazebrook, J. (1999)**

Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*.

Curr Opin Plant Biol.; 2(4):280-286.

**Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996)**

Life with 6000 genes.

Science 274(5287):546, 563-567.

**Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W.L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. (2002)**

A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica).

Science 296(5565):92-100.

**Gomez-Gomez, L., Felix, G., Boller, T. (1999)**

A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*.

Plant J.; 18(3):277-284.

**Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., Boller, T. (2001)**

Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*.

Plant Cell.; 13(5):1155-1163.

**Greb, T., Schmitz, G., Theres, K. (2002)**

Isolation and characterization of the Spindly homologue from tomato.

J Exp Bot.; 53(375):1829-1830.

**Hara, K., Yagi, M., Kusano, T., Sano, H. (2000)**

Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding.

Mol Gen Genet.; 263(1):30-37.

**Hedges S.B., Kumar S. (2002)**

Genomics. Vertebrate genomes compared.  
Science 297(5585):1283-1285.

**van Helden, J., Andre, B., Collado-Vides, J. (1998)**

Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies.  
J Mol Biol.; 281(5):827-842.

**van Helden, J., Rios, A.F., Collado-Vides, J. (2000)**

Discovering regulatory elements in non-coding sequences by analysis of spaced dyads.  
Nucleic Acids Res.; 28(8):1808-1818.

**Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Munster, T., Theissen, G. (2002)**

Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*.  
Mol Biol Evol.; 19(6):801-814.

**Himi S., Sano R., Nishiyama T., Tanahashi T., Kato M., Ueda K., Hasebe M. (2001)**

Evolution of MADS-box gene induction by FLO/LFY genes.  
J Mol Evol.;53(4-5):387-393.

**Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., Hattori, T. (1999)**

ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent.  
Plant J.;19(6):679-689.

**Hoecker, U, Vasil, I.K, McCarty, D.R. (1995)**

Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize.  
Genes Dev.;9(20):2459-2469.

**Hornig, J.-T., Huang, H.-D., Huang, S.-L., Yang, U.-C., Chang, Y.-C. (2002)**

Mining putative regulatory elements in promoter regions of *Saccharomyces cerevisiae*.  
In Silico Biol.;2(3):263-273.

**Hsieh, T.H., Lee, J.T., Charng, Y.Y., Chan, M.T. (2002)**

Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress.  
Plant Physiol.;130(2):618-26.

**Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M., Wada, M. (2002)**

Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*.  
Plant Cell.;14(2):373-386.

**International Human Genome Sequencing Consortium (2001)**

Initial sequencing and analysis of the human genome  
Nature 409, 860 - 921

**Ioshikhes, I., Trifonov, E.N., Zhang, M.Q. (1999)**

Periodical distribution of transcription factor sites in promoter regions and connection with chromatin structure.  
Proc Natl Acad Sci USA; 96(6):2891-2895.

**Jans, D., und Hübner, S. (1996)**

Regulation of Protein Transport to the Nucleus: Central Role of Phosphorylation.  
Physiological Reviews 76, 651-685.

**Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. (2002)**

Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling.  
Curr Opin Plant Biol.; 5(5):415-424.

**Kalde, M. (2002)**

Charakterisierung ausgewählter Vertreter der WRKY-Multigenfamilie aus *Arabidopsis thaliana* - Untersuchungen zur Expression von *AtWRKY11* und *AtWRKY54*.  
Diplomarbeit, Angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abt.Molekulare Phytopathologie, Köln.

**Kalde, M., Barth M., Somssich, I.E., Lippok, B. (2003)**

Members of the Arabidopsis WRKY group III transkription factors are part of different defense signaling pathways  
Mol. Plant-Microbe Interact. 16; *in Druck*

**Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J. (2002)**

Regulation of translational initiation in plants.  
Curr Opin Plant Biol.; 5(5):460-465.

**Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. (2001)**

A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*.  
Plant J.; 26(2):217-227.

**Knight C.D., Sehgal A., Atwal K., Wallace J.C., Cove D.J., Coates D., Quatrano R.S., Bahadur S., Stockley P.G., Cuming A.C. (1995)**

Molecular Responses to Abscisic Acid and Stress Are Conserved between Moss and Cereals.  
Plant Cell.;7(5):499-506.

**Koch, M.A., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. (2000)**

Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (*Brassicaceae*).  
Mol Biol Evol.;17(10):1483-1498.

**Koch, M.A., Weisshaar, B., Kroymann, J., Haubold, B., Mitchell-Olds T. (2001)**

Comparative genomics and regulatory evolution: conservation and function of the Chs and *Apetala3* promoters.  
Mol Biol Evol.;18(10):1882-1891.

**Kolukisaoglu H.U., Braun B., Martin W.F., Schneider-Poetsch H.A. (1993)**

Mosses do express conventional, distantly B-type-related phytochromes. Phytochrome of *Physcomitrella patens* (Hedw.).  
FEBS Lett.;334(1):95-100.

**Kolukisaoglu, H.U., Bovet, L., Klein, M., Eggmann, T., Geisler, M., Wanke, D., Martinoia, E., Schulz, B. (2002)**

Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*.  
Planta; 216(1):107-119.

---

**Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H., Redei, G.P., Schell, J. (1989)**

High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants.  
Proc Natl Acad Sci USA; 86(21):8467-8471.

**Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000)**

Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants.  
Proc Natl Acad Sci USA; 97(6):2940-2945.

**Kranz H., Scholz K., Weisshaar B. (2000)**

c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages.  
Plant J.;21(2):231-235.

**Kuta, E., Przywara, L. (2001)**

Cytotaxonomy of bryophytes in the Department of Plant Cytology and Embryology.  
IOPB Newsletter No.32.

**Lambais, M.R. (2001)**

In silico differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes.  
Genetics and Molecular Biology, 24 (1-4), 103-111.

**Laurie D.A., Devos K.M.**

Trends in comparative genetics and their potential impacts on wheat and barley research.  
Plant Mol Biol.;48(5-6):729-740.

**Lawrence C.E., Altschul S.F., Boguski M.S., Liu J.S., Neuwald A.F., Wootton J.C. (1993)**

Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment.  
Science. 8;262(5131):208-214.

**Ledent V, Vervoort M. (2001)**

The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis.  
Genome Res.; 11(5):754-770.

**Lewis, R. (2002)**

Pufferfish genomes probe human genes.  
The Scientist 16: 22-23

**Li, H., Rhodius, V., Gross, C., Siggia, E.D. (2002)**

Identification of the binding sites of regulatory proteins in bacterial genomes.  
Proc Natl Acad Sci USA; 99(18):11772-11777.

**Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., Dong, X. (1999)**

Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1.  
Cell.; 98(3):329-339.

**Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D., Brown, P.O. (2001)**

Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association.  
Nat Genet.;28(4):327-334.

- 
- Liu, L., White, M.J., MacRae, T.H. (1999)**  
Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation.  
Eur J Biochem.;262(2):247-257.
- Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R. (2002)**  
TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor.  
Plant Cell. (6):1359-1375.
- Lynch M, Conery JS. (2000)**  
The evolutionary fate and consequences of duplicate genes.  
Science. ;290(5494):1151-5.
- Maeo K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. (2001)**  
Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins.  
Biosci Biotechnol Biochem.;65(11):2428-2436.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A. (2000)**  
The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance.  
Nat Genet.; 26(4):403-410.
- Marchal, K., Thijs, G., Keersmaecker, S.D., Monsieurs, P., Moor, B.D., Vanderleyden, J. (2003)**  
Genome-specific higher-order background models to improve motif detection.  
Trends Microbiol.;11(2):61-66.
- Markmann-Mulisch, U., Hadi, M.Z., Koepchen, K., Alonso, J.C., Russo, V.E., Schell, J., Reiss, B. (2002)**  
The organization of *Physcomitrella patens* RAD51 genes is unique among eukaryotic organisms.  
Proc Natl Acad Sci USA; 99(5):2959-2964.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. (2002)**  
Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus.  
Proc Natl Acad Sci USA; 99(19):12246-12251.
- Mazumder R., Iyer L.M., Vasudevan S., Aravind L. (2002)**  
Detection of novel members, structure-function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily.  
Nucleic Acids Res. ;30(23):5229-5243.
- McCarty D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V., Lazar M., Vasil I.K. (1991)**  
The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator.  
Cell.;66(5):895-905.
- McGuire, A.M., Hughes, J.D., Church, G.M. (2000)**  
Conservation of DNA regulatory motifs and discovery of new motifs in microbial genomes.  
Genome Res.;10(6):744-757.
-

---

**McKendree W.L., Paul A.L., DeLisle A.J., Ferl R.J. (1990)**

In vivo and in vitro characterization of protein interactions with the dyad G-box of the *Arabidopsis* Adh gene.  
Plant Cell.;2(3):207-214.

**Meyerowitz,E.(1999)**

Plants, animals and the logic of development.  
Trends in CB, TIBS, Trends in Genetics; Millenium issue: M65 – M68

**Meindl, T., Boller, T., Felix, G. (2000)**

The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept.  
Plant Cell.;12(9):1783-1794.

**Menke, F.L., Champion, A., Kijne, J.W., Memelink, J. (1999)**

A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2.  
EMBO J.; 18(16):4455-4463.

**Molin, L., Mounsey, A., Aslam, S., Bauer, P., Young, J., James, M., Sharma-Oates, A., Hope, I.A. (2000)**

Evolutionary conservation of redundancy between a diverged pair of forkhead transcription factor homologues.  
Development.;127(22):4825-4835.

**Montesano, M., Brader, G., Palva, E.T. (2003)**

Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants.  
Molecular Plant Pathology 4(1), 73-79.

**Mrazek J, Gaynon LH, Karlin S. (2002)**

Frequent oligonucleotide motifs in genomes of three streptococci.  
Nucleic Acids Res.; 30(19):4216-4221.

**Nakielny, S., Dreyfuss, G. (1999)**

Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus.  
Cell.; 99(7):677-690.

**Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., Gatz, C. (2000)**

Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties.  
Plant Mol Biol.;42(5):775-788.

**Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. (1995)**

Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element.  
Plant Cell; 7(2):173-182.

**Ordiz, M.I., Barbas, C.F. 3rd, Beachy, R.N. (2002)**

Regulation of transgene expression in plants with polydactyl zinc finger transcription factors.  
Proc Natl Acad Sci USA; 99(20):13290-13295.

**de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., Kijne, J. (1996)**

Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*.  
Nucleic Acids Res.; 24(23):4624-4631.

---

**Pilpel, Y., Sudarsanam, P., Church, G.M. (2001)**

Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements.  
Nat Genet.;29(2):153-159.

**Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1996)**

Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination.  
Proc Natl Acad Sci U S A.;93(10):5055-5060.

**Puchta H. (1999)**

Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells.  
Genetics.;152(3):1173-1181.

**Pryer, K.M., Schneider, H., Zimmer, E.A., Banks, J.A. (2002)**

Deciding among green plants for whole genome studies.  
Trends Plant Sci.; 7(12):550-554.

**Ramachandran S, Hiratsuka K, Chua N.H. (1994)**

Transcription factors in plant growth and development.  
Curr Opin Genet Dev. t;4(5):642-646.

**Rauhut, R. (2001)**

*Bioinformatik - Sequenz-Struktur-Funktion.*  
Wiley-VCH, Weinheim.

**Ray, A., Langer, M. (2002)**

Homologous recombination: ends as the means.  
Trends in Plant Science, Vol.7 No.10.

**Rensing, S.A., Rombauts, S., Van de Peer, Y., Reski, R. (2002)**

Moss transcriptome and beyond.  
Trends Plant Sci.; 7(12):535-538.

**Reski, R. (1999)**

Molecular genetics of *Physcomitrella*.  
Planta 208: 301-309.

**Ridley, M. (1996)**

*Evolution* - Second Edition.  
Blackwell Science, Cambridge USA.

**Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G. (2000)**

*Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes.  
Science.;290(5499):2105-2110.

**Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M. (1998)**

The AP2/EREBP family of plant transcription factor.  
*Biol.Chem.*379, 633-646.



**Robatzek, S. (2000)**

Beteiligung eines Vertreters der *Arabidopsis* WRKY-Multigenfamilie an pflanzlichen Entwicklungsprozessen  
Dissertation, Universität zu Köln.

**Robatzek, S., Somssich, I.E. (2001)**

A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes.  
Plant J.; 28(2):123-133.

**Robatzek, S., Somssich, I.E. (2002)**

Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense.  
Genes Dev.; 16(9):1139-1149.

**Rogers, S.O. und Bendich, A.J. (1988)**

Extraction of DNA from plant tissues.  
Plant Molecular Biology Manual, Volume A6 (Gelvin, S.B., Schilperoot, R.A. and Verma, D.P.S., eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1-10.

**Rolland F, Moore B, Sheen J. (2002)**

Sugar sensing and signaling in plants.  
Plant Cell.; 14 Suppl: S185-205.

**Rosberg, M., Theres, K., Acarkan, A., Herrero, R., Schmitt, T., Schumacher, K., Schmitz, G., Schmidt, R. (2001)**

Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the lateral suppressor regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* genomes.  
Plant Cell.; 13(4):979-988.

**Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., Hooley, R. (1995)**

Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes.  
Plant Mol Biol.; 29(4):691-702.

**Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. (1996)**

Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes.  
EMBO J.; 15(20):5690-5700.

**Rushton, P.J., Somssich, I.E. (1998)**

Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens.  
Curr Opin Plant Biol.; 1(4):311-315.

**Rushton P.J., Reinstadler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I.E. (2002)**

Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling.  
Plant Cell 14(4):749-762.

**Salinas J., Oeda K., Chua N.H. (1992)**

Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco.  
Plant Cell.; 4(12):1485-93.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)**

Molecular Cloning: A Laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977)**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
Biotechnology. 1992; 24:104-108.

**Sangwan I., O'Brian M.R. (2002)**

Identification of a soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA.  
Plant Physiol. ;129(4):1788-1794.

**Sasaki, T., Matsumoto, T., Yamamoto, K., Sakata, K., Baba, T., Katayose, Y., Wu, J., Niimura, Y., Cheng, Z., Nagamura, Y., Antonio, B.A., Kanamori, H., Hosokawa, S., Masukawa, M., Arikawa, K., Chiden, Y., Hayashi, M., Okamoto, M., Ando, T., Aoki, H., Arita, K., Hamada, M., Harada, C., Hijishita, S., Honda, M., Ichikawa, Y., Idonuma, A., Iijima, M., Ikeda, M., Ikeno, M., Ito, S., Ito, T., Ito, Y., Ito, Y., Iwabuchi, A., Kamiya, K., Karasawa, W., Katagiri, S., Kikuta, A., Kobayashi, N., Kono, I., Machita, K., Maehara, T., Mizuno, H., Mizubayashi, T., Mukai, Y., Nagasaki, H., Nakashima, M., Nakama, Y., Nakamichi, Y., Nakamura, M., Namiki, N., Negishi, M., Ohta, I., Ono, N., Saji, S., Sakai, K., Shibata, M., Shimokawa, T., Shomura, A., Song, J., Takazaki, Y., Terasawa, K., Tsuji, K., Waki, K., Yamagata, H., Yamane, H., Yoshiki, S., Yoshihara, R., Yukawa, K., Zhong, H., Iwama, H., Endo, T., Ito, H., Hahn, J.H., Kim, H.I., Eun, M.Y., Yano, M., Jiang, J., Gojobori, T. (2002)**

The genome sequence and structure of rice chromosome 1.  
Nature.; 420(6913):312-316.

**Schaefer D., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J. (1991)**

Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*.  
Mol Gen Genet;226(3):418-424.

**Schaefer, D.G., Zryd, J.P. (1997)**

Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*.  
Plant J.;11(6):1195-1206.

**Schaefer, D.G., Zryd, J.P. (2001)**

The moss *Physcomitrella patens*, now and then.  
Plant Physiol.; 127(4):1430-1438.

**Schaefer, D.G. (2001)**

Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens*.  
Institute of Ecology, Laboratory of Plant Cell Genetics, University of Lausanne.

**Schaefer, D.G. (2001)**

Gene targeting in *Physcomitrella patens*.  
Curr Opin Plant Biol.; 4(2):143-150.

**Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. (2000)**

Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis.  
Proc Natl Acad Sci U S A.;97(21):11655-11660.

**Schmidt R. (2002)**

Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level.  
Plant Mol Biol.;48(1-2):21-37..

- Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F., Theres, K. (2002)**  
The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems.  
Proc Natl Acad Sci USA; 99(2):1064-1069.
- Schumacher K., Schmitt T., Rossberg M., Schmitz G., Theres K. (1999)**  
The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family.  
Proc Natl Acad Sci USA 96(1):290-295.
- Schulze-Lefert P., Dangl J.L., Becker-Andre M., Hahlbrock K., Schulz W. (1989)**  
Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene.  
EMBO J.;8(3):651-656.
- Schwechheimer, C. und Bevan, M. (1998)**  
Regulation of transcription factor activity in plants.  
Trends Plant Sci.3, 378-383.
- Scoulthrope (1967)**  
The biology of aquatic vascular plants.  
Edward Arnold Publishers, London
- Sheen, J., Zhou, L., Jang, J.C. (1999)**  
Sugars as signaling molecules.  
Curr Opin Plant Biol.; 2(5):410-418.
- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C., Zabeau, M., Van de Peer, Y. (2002)**  
The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*.  
Proc Natl Acad Sci USA. ;99(21):13627-13632.
- Singh, K., Foley, R.C., Onate-Sanchez, L. (2002)**  
Transcription factors in plant defense and stress responses.  
Curr Opin Plant Biol.; 5(5):430-6.
- Smith, A.J.E. & Newton, M., E. (1968)**  
Chromosome studies on some British and Irish mosses.III.  
Trans.Brit.Bryol.Soc.5: 462-522.
- Sommer, H., Beltran, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lonngig, W.E., Saedler, H., Schwarz-Sommer. Z. (1990)**  
Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors.  
EMBO J.; 9(3):605-613.
- Somssich, I.E., Wernert, P., Kiedrowski, S., Hahlbrock, K. (1996)**  
*Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP(+) oxidoreductase.  
Proc Natl Acad Sci USA; 93(24):14199-14203.
- Somssich, I.E. und Hahlbrock, K. (1998)**  
Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity.  
Trends Plant Sci. 3, 86-90.

**Sprenger-Haussels M., Weisshaar B. (2000)**

Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors.  
Plant J. 22(1):1-8.

**Stracke R, Werber M, Weisshaar B. (2001)**

The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana.  
Curr Opin Plant Biol. (5):447-456.

**Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997)**

Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit.  
Proc Natl Acad Sci U S A.;94(3):1035-1040.

**Struhl, K. (1995)**

Yeast transcriptional regulatory mechanisms.  
Annu Rev Genet.; 29:651-674.

**Strunkelberg M., de Couet G.H., Hertenstein A.H., Fischbach K.F. (2003)**

Interspecies Comparison of a Gene Pair with Partially Redundant Function: The *rst* and *kirre* Genes in *D. virilis* and *D. melanogaster*.  
J Mol Evol;56(2):187-97.

**Stuessy, T.F. (1990)**

*Plant Taxonomy*.  
Columbia Univ. Press, NY.

**Sudarsanam, P., Pilpel, Y., Church, G.M. (2002)**

Genome-wide co-occurrence of promoter elements reveals a cis-regulatory cassette of rRNA transcription motifs in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Genome Res.;12(11):1723-1731.

**Sugimoto, K., Takeda, S., Hirochika, H. (2000)**

MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes.  
Plant Cell.;12(12):2511-2528.

**Summers J.E., Voesenek L., Blom C., Lewis M.J., Jackson M.B. (1996)**

*Potamogeton pectinatus* Is Constitutively Incapable of Synthesizing Ethylene and Lacks 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase.  
Plant Physiol.;111(3):901-908.

**Takatsuji, H. (1998)**

Zinc-finger transcription factors in plants.  
Cell Mol Life Sci.; 54(6):582-596.

**Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. (1997)**

A genomic perspective on protein families.  
Science.;278(5338):631-637.

**Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., Quail, P.H. (2001)**

Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling.  
Proc Natl Acad Sci USA; 98(16):9437-9442.

**Tompa M. (2001)**

Identifying functional elements by comparative DNA sequence analysis.  
Genome Res.;11(7):1143-1144.

**Triezenberg, S.J. (1995)**

Structure and function of transcriptional activation domains.  
Curr Opin Genet Dev.; 5(2):190-196.

**Triglia, T., Peterson, M.G., Kemp, D.J. (1988)**

A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences.  
Nucleic Acids Res.;16(16):8186.

**Vandepoele K., Saeys Y., Simillion C., Raes J., Van De Peer Y. (2002)**

The automatic detection of homologous regions (ADHoRe) and its application to microcolinearity between Arabidopsis and rice.  
Genome Res.;12(11):1792-1801.

**Weigel, D., Meyerowitz, E.M. (1994)**

The ABCs of floral homeotic genes.  
Cell.; 78(2):203-209.

**Williams M.E., Foster R., Chua N.H. (1992)**

Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding.  
Plant Cell.;4(4):485-496.

**Woese C.R. (2002)**

On the evolution of cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A 99(13):8742-8747.

**Wolfe K.H. (2001)**

Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization.  
Nat Rev Genet.;2(5):333-341.

**Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P., Cerrutti, L. (2002)**

---

The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*.  
*Nature*;415(6874):871-880.

**Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994)**

A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress.  
*Plant Cell*; 6(2):251-264.

**Yang, P., Wang, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z.(1999)**

A pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of tobacco class I chitinase gene promoter.  
*Plant J.*18,141-149.

**Yanagisawa S. (2002)**

The Dof family of plant transcription factors.  
*Trends Plant Sci.*;7(12):555-560.

**Yoda, H., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. (2002)**

Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants.  
*Mol Genet Genomics*; 267(2):154-161.

**Yoneda, Y. (1997)**

How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus.  
*J Biochem (Tokyo)*; 121(5):811-817.

**Yu, D., Chen, C., Chen, Z. (2001)**

Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression.  
*Plant Cell.*;13(7):1527-1540.

**Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H. (2002)**

A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica).  
*Science*. 296(5565):79-92.

**Zhou, J., Tang, X., Martin, G.B. (1997)**

The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes.  
*EMBO J.*; 16(11):3207-3218.

**Zhu T., Wang X. (2000)**

Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome.  
*Plant Physiol.* 124(4):1472-6.

---

## Anhang

---

### ***A1. Verwendete Oligonucleotide***

Die Sequenzen der Primer sind jeweils in 5' → 3' Orientierung angegeben.

#### ***A1.1. Physcomitrella patens spezifische Oligonucleotide***

##### ***A1.1.1. PpWRKY20 spezifische Oligonucleotide***

W20-S1-BamHI	GCGGATCCGATGGGGGCGTTGGAGATATTAG
W20-S1-XhoI	CTCGAGATGGGGGCGTTGGAGATATTAG
W20-S2	TAGGCAGCTGCTCCAGTCCCTG
W20-A1-XbaI	GCCATCTAGATGCTATTGCGACTGCACTGTT
W20-A1-XhoI	CTCGAGCTATTGCGACTGCACTGTTAATCCG
pW20-5prime-up	CGCGTTCTCCTACGAAACCG
W20-ATG-S1-GW	(GWF)TAACCATGGGGGCGTTGGAGATATTAG
W20-/STOP-A1-GW	(GWR)ATTGCGACTGCACTGTTAATCCGCCATTAGCAG
W20-HARF-A2	(GWR)AAGCAGCGTTGCGCGTTCTCCTACGAAACCG
W20-HARF-A2-MUT	(GWR)AAGCAGCGTTGCGCGTTCTCCTTTTAGACCG
W20-HARF-A-GATWAY	(GWR)CAGCAGCGTTGCGCGTTCTCCTACG
W20-HARF-S2	(GWF)AGACCATGGGGCGGTTTCGTAGGAGAACGCG CAACGCTGCT
W20-HARF-S2-MUT	(GWF)AGACCATGGGGCGGTCTAAAAGGAGAACGCG CAACGCTGCT
W20-HARF-S-GW	(GWF)AGACCATGGGGTCACTACTGAGTCGCACTGGT CATGCACGG
W20-HARF-S-MUT-H/R	(GWF)AGACCATGGGGTCACTACTGAGTCGCACTGGT CGTGCACGG

---

---

W20-WRKY-S-GW	(GWF)CTACCATGGGGGATGAGTATTCATGGCGTAAG TATGGCCAG
W20-HNH-A-GW	(GWR)GCGGATGGTTATGATCGCCTTCG
W20-HNH-A-MUT-H/R	(GWR)GCGGATGGTTACGATCGCCTTCG
W20-WRKY-MUT-R/H	(GWF)CTACCATGGGGGATGAGTATTCATGGCATAAG TATGGCCAG
W20-WRKY-MUT-Y/H	(GWF)CTACCATGGGGGATGAGTATTCATGGCGTAAG TTTGGCCAG

#### **A1.1.2. *PpWRKY1* spezifische Oligonucleotide**

Pp1-S1	TACGGGCAAAGCCTGTAAAG
Pp1-S2	CGTTGATATTCTGGACGATGG
Pp1-A1	TTGGTTGAGGCTTGGGATGGT
Pp1-A2	TGGAGGTGATTGCCTTCGTA
Pp1-A3	CGTCCAGAATATCAACGTCAC

#### **A1.1.3. *PpWRKY2* spezifische Oligonucleotide**

Pp2-S1	GGGCAAAAAGCTGTAAAA
Pp2-A1	GTGGAGGTGATTGCCTTCGTA

#### **A1.1.4. *PpWRKY3* spezifische Oligonucleotide**

Pp3-S1	GAAGCCTATCAAAGGATCTC
Pp3-A1	TCTAGCCCATGGAGGTGATT
PpW3-iPCRS	CAGGATGTGATCTTTGCTTG
PpW3-iPCRA	GGTGATCCTTTGATAGGCTT

#### **A1.1.5. *PpWRKY4* spezifische Oligonucleotide**

Pp4-S1	GGAAGTATGGGCAGAAAG
Pp4-A1	TCTAGCCCGTGGAGGTGATTG
Pp4-A2	AAAGGGGTGTCGTGCACCTG



**A1.1.6. *PpWRKY5* spezifische Oligonucleotide**

Pp5S2	GTTGAGCGATCCATGGAAGATC
Pp5S3	TCCCATAGCGTTCAGGAATGTG
Pp5S4	ATTACTCGTGGCGCAAATACGG
Pp5S5	ACCATGTTGATTGTCACC
Pp5-S6	GATTTTCCAATTGACCAGGTGTTTC
Pp5-RT-A1	TGCTGCACTTGTAGTATCCTCTTGGG
Pp5A2	CAAGGCAAAGAGAGAGAGATTG
Pp5A3	TAACAATGTCTTTTCAACCACAG
Pp5 A4	GGAAGCAGGAGAGCTTGGAGGAAAC
Pp5-A5	GTCAACACCCTATGAGAAACTGATC

**A1.1.7. *PpWRKY6* spezifische Oligonucleotide**

Pp6-S1	TGGGCAAAGATGGCTAA
Pp6-A1	CGTAGGTTGTGATCAAATCGAAAC

**A1.1.8. *PpWRKY7* spezifische Oligonucleotide**

Pp7-S1	AGACCGCGGTATCCG
Pp7-A1	TGTAGGCTGAGGCTTAG
Pp7-A2	GCTCTAGCCCATTCTG

**A1.1.9. *PpWRKY16* spezifische Oligonucleotide (Giavalisco, 1999)**

16.2	TTAGAGTCCCTATCTGAGGAGCC
16.3	TCGAAGACATAAGTGTTGGCACA
16.4	GCGCAGCTGGGCTGCCCGAGGTG
16.5	AGGCTCCACCACCAGTGACAT
16.6	ATGTCATCTGAGCAAGCTTATTTGG
16.2rev	GCTTTTCATCGTTAAGGTTTAATCGGG

**A1.1.10. *Pp18S rDNA* spezifische Oligonucleotide**

18SF2-Reski	TTGACTCAACACGGGGAAAC
18SR-Reski	AGCTGATGACTCGCGCTTAC

**A1.1.11. *PpWRKY-EST1* spezifische Oligonucleotide**

PpEST1-S1	CGCAGGAAAAGTCAACAAGAAGTCTAAG
PpEST1-A1	CGTTAGAGGCTCTCTCAACATG
PpEST1-A2	GCCCTAGCATCATCGAAAAGTGGGATG

**A1.1.12. *PpWRKY-EST2* spezifisches Oligonucleotide**

EST2-5UTR-S1	TCGCCAGCGTGGCGTAATAG
--------------	----------------------

**A1.1.13. *PpWRKY-EST3* spezifische Oligonucleotide**

BJ184252_EST3-S1	TCCCTCCGGATTGCATTG
BJ184252_EST3-A1	TCTTGCGCCGGGTGTTGG

**A1.1.14. *PpWRKY-EST4* spezifische Oligonucleotide**

BQ039301_EST4-S1	ATCAATGGAGCAAGGGCAG
BQ039301_EST4-A1	TCACGAGTTGATATGCCATG

**A1.1.15. *PpWRKY-EST5* spezifische Oligonucleotide**

BJ176833_EST5-S1	GGCTTTTCCTCCTGTGTGTG
BJ176833_EST5-S2	TACGGATAATGCGCAGG
BJ176833_EST5-A1	CTCCAGCACCTGCGCA

**A1.1.16. *PpWRKY-EST6* spezifische Oligonucleotide**

BJ172303_EST6-S1	TGATCGAGGCCTGCATCAGG
BJ172303_EST6-A1	AGAGGGTACTACAAGTG

**A1.1.17. *PpWRKY-EST7* spezifische Oligonucleotide**

BQ040548_EST7-S1	TTCGACTCCCCTTCGGCTCTG
BQ040548_EST7-A1	CATGTTACGTTCTGAACGGG

**A1.1.18. *PpWRKY-EST281* spezifische Oligonucleotide**

BJ170281-S1	GTACATTCCTACGGATACTCG
BJ170281-A1	GAAGGCAATAAGCACTAAGTTGG

**A1.1.19. *PpWRKY-EST503* spezifische Oligonucleotide**

BJ169503-S1	CCAAGGGGAAGACTTCG
BJ169503-A1	GAGGATACTACAAGTGCAGCAG

**A1.1.20. *PpPPRP1* spezifische Oligonucleotide**

Pp-PPRP1-S1	TGCCCTCGAGGGCACCTGTGTT
Pp-PPRP1-A1	CCACTCTAGATTTTGGGCTGTGATCG
Pp-PPRP1-A2	CTAACACCTCATGTCTAGATTCCC

**A1.1.21. *PpRAD51-A* spezifische Oligonucleotide**

PpRAD51a1	GTCGAGTCTGTTGCATATTCC
PpRAD51a2	ACATCCTGTCCATTCAAGCC

Diese Primer wurden freundlicher Weise von Ulrich Markmann-Mulisch und Bernd Reis zur Verfügung gestellt.

**A1.2. *Arabidopsis thaliana* spezifische Oligonucleotide****A1.2.1. *Actin3* spezifische Oligonucleotide**

Actin3-S1	GCGACAATGGAAGTGGAAAT
Actin3-A1	GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC

**A1.2.2. *AtWRKY10* spezifische Oligonucleotide**

AtWRKY10-ATG-1	ATGAGTGATTTTGATGAAAACCTTCATC
AtWRKY10-Stop-1	TTTATGTCTACATGTGCGACACCAAAC
AtW10-S1	ATGAGTGATTTTGATG
AtW10-WRKY-A1	CGCTTTCCATCTGAAGTATG
AtW10-A2	CCAATTGGCTCAACATG
AtW10-A3	GAATCACTGACCATATTGGGAG

**A1.2.3. *AtWRKY11* spezifische Oligonucleotide**

AtWRKY11-ATG-1	ATGGCCGTCGATCTAATGCGTTTC
AtWRKY11-Stop-1	TCAAGCCGAGGCAAACACTAAATC
AtWRKY11-ATG-attB1	(GWF)TAATGGCCGTCGATCTAATGCGTTTC
AtWRKY11-nStop-attB2	(GWR)CAGCCGAGGCAAACACTAAATCATTAATG
W11-HARF-S2	(GWF)AGACCATGGGGCGGTTTCAGACGCGGACCGGTTTCAC TCCACT
W11-HARF-S2-MUT	(GWF)AGACCATGGGGCGGTCTAAACGCGGACCGGTTTCAC TCCACT
W11-HARF-A2	(GWR)AAGTGGAGTGAACCGGTCCGCGTCTGAACCG
W11-HARF-A2-MUT	(GWR)AAGTGGAGTGAACCGGTCCGCGTTTAGACCG

**A1.2.4. *AtWRKY22* spezifische Oligonucleotide**

AtWRKY22-ATG-1	ATGGCCGACGATTGGGATCTC
AtWRKY22-Stop-1	TACATATGCTCCGAGAATAATTC
AtWRKY22-ATG-attB1	(GWF)TAATGGCCGACGATTGGGATCTC
AtWRKY22-nStop-attB2	(GWR)CTATTCCTCCGGTGGTAGTGGC

**A1.2.5. *AtWRKY26* spezifische Oligonucleotide**

AtWRKY26-ATG-1	ATGGGCTCTTTTGATCGCCAAAG
AtWRKY26-Stop-1	GCTGAAATGCCAAAACCTCATTGTC
AtWRKY26-ATG-attB1	(GWF)TAATGGGCTCTTTTGATCGCCAAAG
AtWRKY26-nStop-attB2	(GWR)CTGTCTCTGTTTTTCCAAGTAACC

**A1.2.6. *AtWRKY33* spezifische Oligonucleotide**

AtWRKY33-ATG-1	ATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAAC
AtWRKY33-Stop-1	GGTTCCTTTTTTCTTCAGGGCATAAAC
AtWRKY33-ATG-attB1	(GWF)TAATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAAC
AtWRKY33-nStop-attB2	(GWR)CGGGCATAAACGAATCGAAAAATGAGGTC

**A1.2.7. Andere *Arabidopsis thaliana* spezifische Oligonucleotide**

At1g30720-S1	GCTACTACTGATCTCAACATCAG
At1g30720-A1	TCAACGATCCCGGAGCCGAAACAG

---

At3g04220-S1	ATGGATTCTTCTTTTTTACTCG
At3g04220-A1	ATTTGAAGGGCCTCTTCATAG
At3g28380-S1	GTTTTGGAAGTATAAGATCG
At3g28380-A1	TTTTATCACTTCTAAAATCCG
At3g50950-S1	ATGGTGGACGCTGTTG
At3g50950-A1	ACAAAACAGCCAACTG
At4g23180-S1	TCTCCTTCTCACGAGTTTCAG
At4g23180-A1	TGGGGCACATACTCGTAGACCAG
At4g23190-S1	CAAGAAACAATGAAGCAGAGG
At4g23190-A1	AGGTCACGATGTATGATTTTGAGCCG
AtPGP17-S1	GCGGTACTGTCTTCGTAGTCATTAG
AtPGP17-A1	CTCGTGTACCAATAGAGTTATGTTG
AtPGP17-A2	AGAAACTGGTTGTAGGACCCCAAC
SIRK-S	ATGGCGATGTAAAATCTCT
SIRK-A	TGTCCATATACGGTCATATATG

### **A1.3. *Capsella rubella* spezifische Oligonucleotide**

#### **A1.3.1. *Actin3* spezifische Oligonucleotide**

CrActin-S1	GCGACAATGGAAGTGAAT
CrActin-A1	GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC

#### **A1.3.2. *CrWRKY10* spezifische Oligonucleotide**

CrW10-S1	ATGAGTGATTTTGATG
CrW10-WRKY-A1	CGCTTCCATCTGAAGTATG
CrW10-A2	CCAATTGGCTCAACATG
CrW10-A3	GAATCACTGACCATATTGGGAG

#### **A1.3.3. *CrWRKY11* spezifische Oligonucleotide**

CrWRKY11-S1	GGTTTAGACGCGGACCTG
CrWRKY11-A1	GTAGTAATTTAATCAATGATG
CrWRKY11-A2	CAATGGTCAAACCCAGG

---

**A1.3.4. *CrWRKY33* spezifische Oligonucleotide**

CrWRKY33-S1	TTGGAAGATCTTGAG
CrWRKY33-S2	GTCATGAGTCAACGG
CrWRKY33-A2	GCACTACAATTCTAGGC

**A1.4. *Lycopersicon esculentum* spezifische Oligonucleotide****A1.4.1. *LeWRKY10* spezifische Oligonucleotide**

LeW10-ATG-S1-GW	(GWF)CCATGGGTGGATTTGATGATCATGT
LeW10-STOP-A1-GW	(GWR)ATTACATCTGAGGTCCAAGCGACAAACTG

**A1.4.2. *LeActin* spezifische Oligonucleotide**

Actintom3	GTCTGTGATGATGGAAGTGGAA
Actintom4	TCTGAACCTCTCTGCTCCAA

Diese Primer wurden freundlicher Weise von Gregor Schmitz und Klaus Theres zur Verfügung gestellt.

**A1.5. *Chlamydomonas reinhardtii* spezifische Oligonucleotide**

ChrWRKY-S1	CACAAGTGAACCGGAGCCCGCTGCGGCGCTG
Chrh_WRKY-S2	ATGCAGCGTGTGGTGG
ChrWRKY-A1	ACATTGCCGTACTGCGGGCTGGTGGGCTGCG
Chrh_WRKY-A2	TGGTAGCCGGTGGCTATG

**A1.6. Andere-Oligonucleotide****A1.6.1. Degenerierte *WRKY*-Oligonucleotide**

TYEG-HNH-attB2	(GWF)TGRTRTGTGNTBNCKTCRTANGA
WRKY-Deg-attB2	(GWR)GGYTTYTGNCRTAYTTNCKCCA
WRKY-Deg-attB1	(GWF)TGGMGNAARTAYGGNCARAARCC

Diese Primer wurden freundlicher Weise von Bekir Ülker zur Verfügung gestellt.

HxHreverse	TG(Ino)WK(Ino)TG(Ino)KY(Ino)CCTTCGTATGIWI
HXHsense	TACGAAGGY(Ino)MYCAYMWYCA
Wrkynewit	TTYTGHCRTAYTTTHCKCCA
Wrkynewib	TGGMGHAARTAYGGHCARAA

Diese Primer wurden freundlicher Weise von Franziska Turck zur Verfügung gestellt.



## A2: Phylogenetische Untersuchung an WRKY-Genen

### A2.1: Vergleich der konservierten Umgebung des GHARFRR-Konsensus der Subgruppe IId WRKY-Proteine

Die Analyse erfolgte mit dem Programm ClustalW auf der Basis von 59 AS der konservierten Umgebung des GHARFRR-Konsensus mit 18 Sequenzen aus acht Pflanzenarten.

```

PpWRKY20      ---VRSPVVDEECDVMAGAAISKFKQKVVSLLS-----RTGHARFRRRT---RNAAVAGYA  GVFLESSNFF-- 59
PpEST5        ---AQPAVVDEECDTIATAAISKFQKVVSLLG-----RTGHARFRRRA---RDSTVTGCA  GVFLESSNFF-- 59
Nt-SubD48     -----NPSVSADYTAVADVAVNKFKKFISLLDKN---RTGHARFRKGP---IS--TLP  PPKPQQQRLNQN 59
PcWRKY3       ---SSETGDTDYRAVTDVAVNKFKKFISLLDKN---RTGHARFRRGP---VQEKTVGEM  LVNPIQNQI--- 59
AtWRKY7       ---PTEKSQTEITAVTDVAVNSFKKVISLLGRS---RTGHARFRRAP---ASTQTPFKQ  TP-VVEEVE-- 59
AtWRKY15      ---SAAADLESARNTTADAASVKFKRVISLLDRT---RTGHARFRRAP---VHVISPVLL  QEEPKTTP---- 59
OSWRKY_HARF1  --AHKASPQQQPFGEIADQAVSKFRKVISILD-----RTGHARFRRGP---VESAPAAP  VAAAPPPP-- 59
OSWRKY_HARF2  --RPQEKQSSPPLGEIADQAVSRFRKVISILD-----RTGHARFRRGP---VVGAAEAAA  AAASASPS-- 59
ZmWRKY_1      --AAPHRAADQPFGEIAGQAVSKFRKVISILD-----RTGHARFRRGP---VEPPPTPP  PPPVVPGPA--- 59
ASWRKY3       ---GQQQQQVDCREITDMTVSKFKKVISLLNH---RTGHARFRRGP---VVAQSQGPS  VSEPAPVRT--- 59
OSWRKY_HARF3  --PAQEQQQVDCREITDMTVSKFKKVISMLN-----RTGHARFRRGP---VVAQSSGPA  ASEPAPVRS--- 59
AtWRKY11      --NRPEQQHNVDCEITDFTVSKFKTVISLLN-----RTGHARFRRGP---VHSTSSAAS  QKLQSQIVK--- 59
AtWRKY17      LSNRPEE-RNVDCSEITDFTVSKFKKVISLLN-----RSGHARFRRGP---VHSPPSS-S  VPPPVKVT--- 59
NtWRKY3       --QQQQQPVQLDCEITDFTLSKFKKVVSLD-----RTGHARFRRGP---VQVHPDNFT  SLSLSPSNQ--- 59
AtWRKY39      --LSQRTSDPKSLTVETGEVVSFKFRVASLLTR---GLGHGKFRSTN---KFRSS-FP  QHIFLESPIC-- 59
AtWRKY74      -LLSQQTNDKSKIMVETREAVCKFKRVSLLSR---GLGQRKIKKLNNNNYKFS SLLP  QHMF----- 59
AtWRKY21      --QDQHVGFENLVSETREAVIRFKRVSLLSS---SVGHARFRRAK---KLQSH-VS  QSLLLDPCQQ-- 59
DgWRKY        -----PHKELVEATGEAVSKFGSVATKIATNGNGRQGHARVRKKI---NQPMMPFD  SSLFLETTASA- 59

```

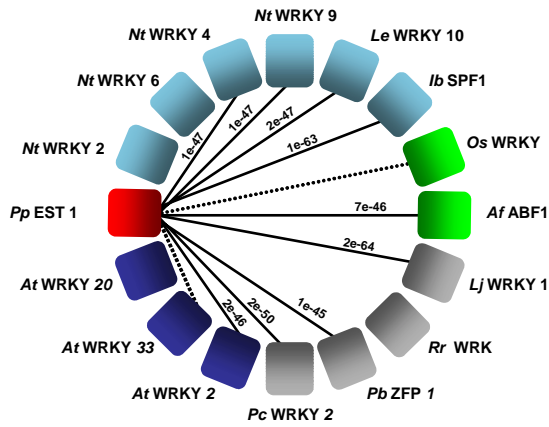
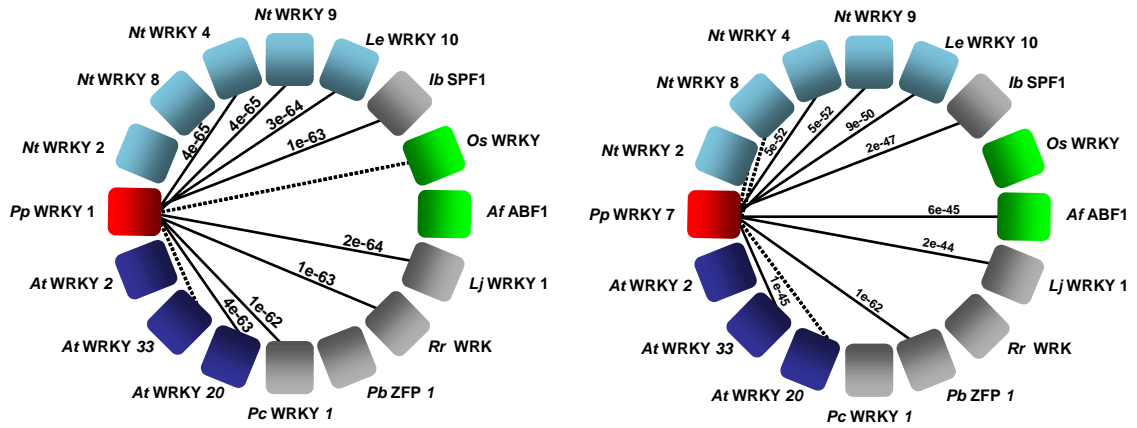
### A2.2: COG - Cluster Orthologer Gruppen aller isolierter PpWRKY-Sequenzen

Dargestellt sind orthologe Gruppen für *PpWRKY20* und *PpWRKY5* (nach Tatusov et al., 1997). Die BeTs wurden mit tBLASTx (Altschul et al., 1997) bestimmt. In allen Fällen wurden der Best Hit sowie das zweitbeste Suchergebnis für *A. thaliana* in das Kreisdiagramm integriert. Symmetrische Beziehungen zwischen den *P. patens* Genen und den Orthologen wurden mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet. Unterbrochene Linien stellen asymmetrische Beziehungen oder Beziehungen oberhalb der statistisch signifikanten Trefferwahrscheinlichkeit  $p = 1e-24$  dar. Die jeweilige Trefferwahrscheinlichkeit  $p$  wurde entlang der symmetrischen Beziehungen angegeben.

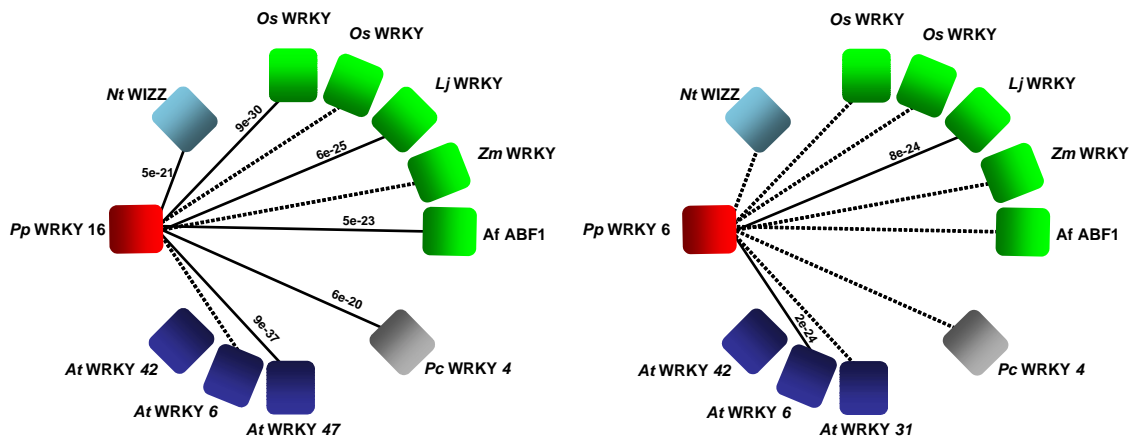
Die jeweiligen Pflanzenfamilien wurden farbig dargestellt: Moos (rot), *Brassicaceae* (dunkel blau), *Solanaceae* (hell blau), *Poaceae* (grün) und andere (grau). *Pp* – *Physcomitrella patens*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *As* - *Avena sativa*, *Af* - *Avena fatua*, *Ib* - *Ipomea batatta*, *Lj* - *Lotus japonicus*, *Rr* - *Retama raetam*, *Pb* - *Pimpinella brachycarpa* *Dg* - *Dactylis glomerata*, *Pc* - *Petroselinum crispum*, *Le* - *Lycopersicon esculentum*, *Nt* - *Nicotiana tabacum*, *Os* - *Oryza sativa*, *Zm* - *Zea mays*, *St* - *Solanum tuberosum*, *Bp* - *Betula pendula*



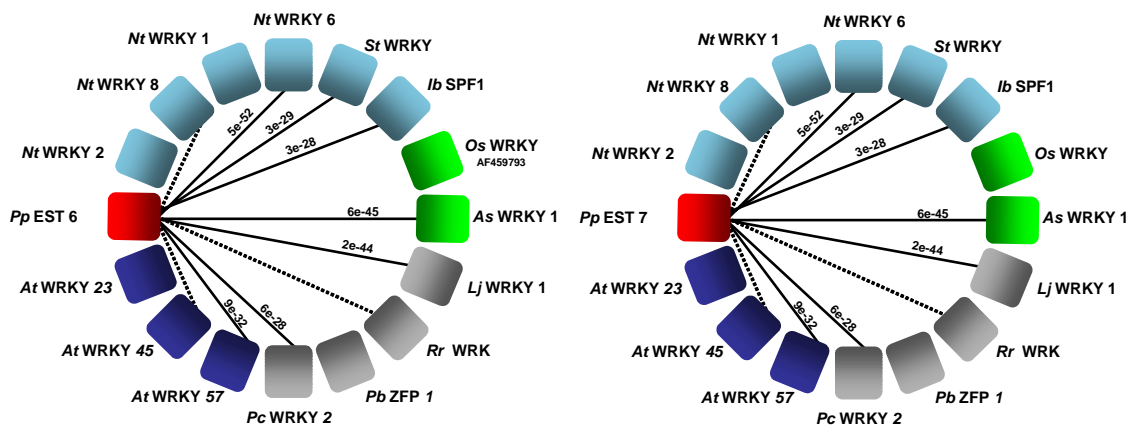
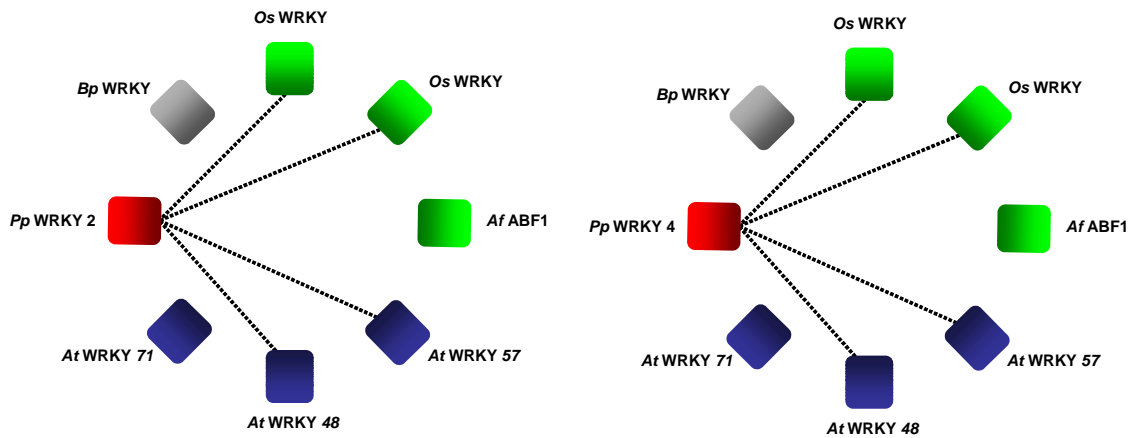
Gruppe I



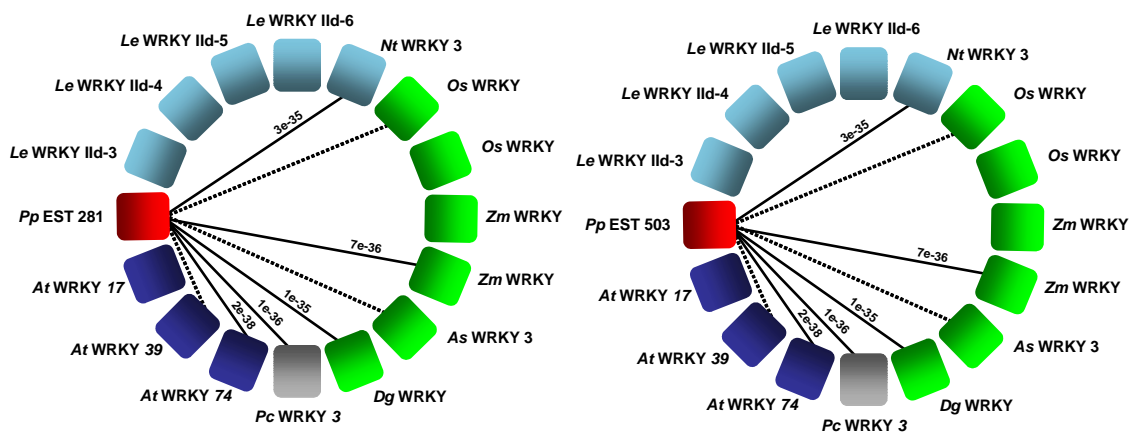
Gruppe IIb

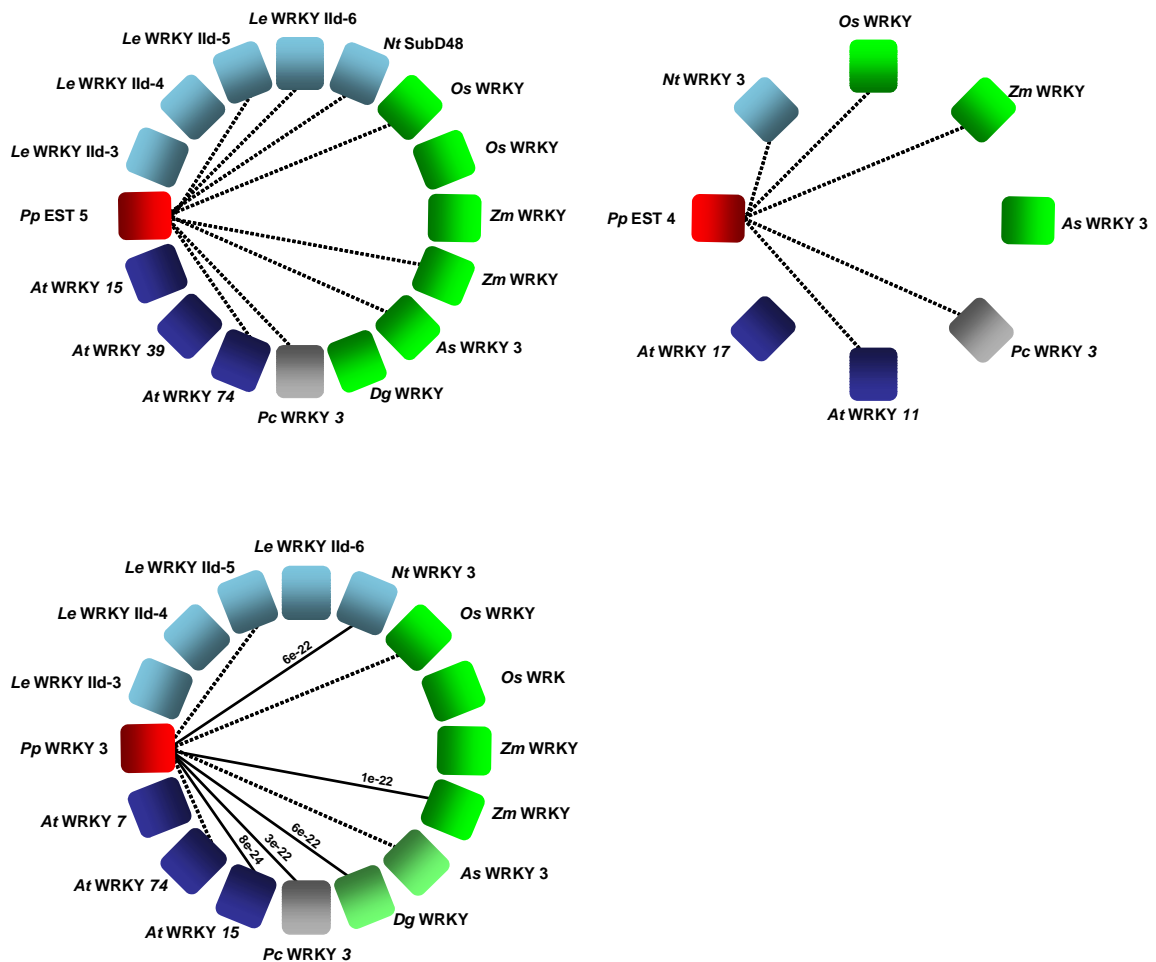


Gruppe IIc



Gruppe II d





### A2.3: Vergleich aller verwendeter WRKY-Domänen

Die Analyse erfolgte mit dem Programm ClustalW auf der Basis von 52 bis 69 AS der konservierten WRKY-Domäne mit 264 Sequenzen aus fünf Pflanzenarten.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der abweichenden Sequenzen von AtWRKY19\_At4g12020\_CTD und AtWRKY69\_At3g58710 gänzlich verzichtet, da diese WRKY-Domänen erheblich länger als 70 AS sind.

Rot hervorgehoben sind die Sequenzen der evolutiv frühen WRKY-Domänen aus *P. patens* und *Chlamydomonas reinhardtii*. *Pp* – *Physcomitrella patens*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *Cr* - *Capsella rubella*, *Os* - *Oryza sativa*

AcWRKY49_Ac5643290	SYT	HC TTP	ICMARKOVERS	IDA	STVYIIVYR-GYEHVYVY	66
OsWRKY_C1C4195	SYT	RC TTP	RCMARKOVERA	QDA	PDYIIVYR-GLEHLA	66
OsWRKY_C1017195-124_1	SYT	RC TTP	NCLARKVHEC	P-D	GRVYIIVYR-GYEN-HRPP	60
OsWRKY_AAAAD1014952-1	SYT	RC TTP	NCLARKVHEC	P-D	GRVYIIVYR-GYEN-HRPP	58
AcWRKY32_Ac4690930_NTD	SYT	RC TTY	NCLARK-IRCS	M-D	SNVYIIVYR-GLEY-HRPP	65
AcWRKY1_EAP1_Ac2404880_NTD	SYT	RC TTP	NCLARKQIAR9	A-Q	QGVYD VYVYR-GYED-HPKP	66
AcWRKY2_Ac5656270_NTD	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	A	RGEIIVYR-GAEN-HLKP	66
AcWRKY34_Ac4626440_NTD	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	A	RGEIIVYR-GDEI-HSKP	65
PpWRKY7_NTD	SYT	HC TQT	NCPVKKVYR9	H	DGQVYIIVYR-GDBA-HPKP	61
PpWRKY1_NTD	SYT	HC TEL	NCLARKVYR9	A	DGQVYIIVYR-GDBA-HPKP	63
AcWRKY20_Ac4626640_NTD	SYT	HC TTP	NCPVKKLVR9	H	DQQITD IIVYR-GYED-HPKP	65
OsWRKY_C1019774-109_1	SYT	HC TTP	MCDVKKIAR9	I	DQQITK VYR-GREN-HPKP	62
OsWRKY_C1034118-148_1	SYT	HC TTP	CCPVRKVR9S	P	DQVYIIVYR-GABS-HPKP	58
OsWRKY_AAAAD1000357-1	SYT	HC TTP	CCPVRKVR9S	P	DQVYIIVYR-GABS-HPKP	62
AcWRKY26_Ac5607100_NTD	SYT	HC TTY	NCLVKKVYR9	I-Y	RQMIIVYR-GSEN-HPKQSTPK972	72
OsWRKY_C1C7552_1	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	I	DGQITR IIVYR-GYEN-HAKP	58
OsWRKY_AAAAD1010819-1	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	I	DGQITR IIVYR-GYEN-HAKP	64
AcWRKY33_Ac2698470_NTD	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	I	DGQITR IIVYR-GSEN-HPKP	65
OsWRKY_C1C4184_1	SYT	HC TTY	NCAVKK-VYR9	Q	DGQITR IIVYR-GSEN-H	55
OsWRKY_AAAAD1000196-1	SYT	HC TTY	NCAVKK-VYR9	Q	DGQITR IIVYR-GSEN-HP13	59
AcWRKY25_Ac2690250_NTD	SYT	HC TTP	DCVSEKIVYTA	S	DGQITR IIVYR-GQEN-HPKP	65
OsWRKY_C1012313-200_1	SYT	HC TTP	CCSHKVRVYR9	I-A	DGQITQ IIVYR-GAEN-HPKP	61
OsWRKY_AAAAD1005720-1	SYT	HC TTP	CCSHKVRVYR9	I-A	DGQITQ IIVYR-GAEN-HPKP	60
AcWRKY3_Ac2603340_NTD	SYT	HC TTP	ACDPVKKVYR9	L	DGQVYIIVYR-GQEN-HE13	65
AcWRKY4_Ac1413960_NTD	SYT	HC TTP	CCPVRKVR9S	I	DQVYIIVYR-GQEN-HRPP	65
AcWRKY19_Ac4612020_NTD	SYT	HC TTY	CCPVRKVR9S	I	DQVYIIVYR-GQEN-HRPP	65
OsWRKY_HTC149197	SYT	HC TTP	TCPVVKKVYR9	P	DGRIANIVYR-GSEN-HPKP	58
OsWRKY_AAAAD1020389-1	SYT	HC TTP	TCPVVKKVYR9	P	DGRIANIVYR-GSEN-HPK	66
AcWRKY44_TT02_Ac2697260_NTD	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	Y	RQVSRIVYR-GQEN-HSKP	65
OsWRKY_C1021652-159_1	SYT	HC TTA	SCAVVKKVYR9	H	RGEVYIIVYR-GYEN-HPKP	63
OsWRKY_AAAAD102933-1_1	SYT	HC TTP	NCPVKKVYR9	A	DGQISR IIVYR-GSEN-HQRP	58
OsWRKY_C1021877-34_1	SYT	HC TEL	SCPVVKKVYR9	S	DQQITQ IIVYR-GQEN-HQRP	58
OsWRKY_C1015328-116_1	SYT	HC TEL	SCPVVKKVYR9	S	DQQITQ IIVYR-GQEN-HQRP	65
AcWRKY58_Ac3601080_NTD	SYT	HC TTY	NCPVKKVYR9	S	DQQITQ IIVYR-GQED-HE13	65
OsWRKY_C1066989-2_1	SYT	HC TEL	NCAVKKVYR9	A	DQRIVQ IIVYR-GQET-HE13	58
OsWRKY_AAAAD10145271	SYT	HC TEL	NCAVKKVYR9	A	DQRIVQ IIVYR-GQET-HE13	53
OsWRKY_C1027984-99_1	SYT	HC TTD	CCPVVKKVYR9	S	DCCIRIVYR-GREN-HPKP	59

```

0sWRRY_AAALJ0100946-1
0sWRRY_C1B16270-1_1
0sWRRY_C1B16270-1_2
0sWRRY_C1017554-215-125_1
0sWRRY_C1017554-215-125_2
0sWRRY_C1B16270-1_3
0sWRRY_C1C2946_2
0sWRRY_AAALJ0100961-1
AcWRRY19_Ac4631800
AcWRRY50_Ac2625000
0sWRRY_C1C2946_1
0sWRRY_AAALJ0100861-1
AcWRRY40_Ac1690840
0sWRRY_AAALJ01005403-1
0sWRRY_AAALJ01009127-1
0sWRRY_C1030146-246
0sWRRY_C1012884-179
AcWRRY6_Ac1962300
0sWRRY_AAALJ0100721-1
0sWRRY_C1004197-96-110
AcWRRY21_Ac4622070
0sWRRY_C1034360-94
0sWRRY_AAALJ0100390-1
AcWRRY47_Ac4601720
0sWRRY_AAALJ0100463-1
0sWRRY_C1021631-86_pseudo
0sWRRY_C1032764-234
AcWRRY26_Ac1659810
0sWRRY_AAALJ0101635-1_2
AcWRRY9_Ac1968150
0sWRRY_C1006430-349
0sWRRY_C1002157-61-64
0sWRRY_C1038870-19
AcWRRY72_Ac5616130
AcWRRY61_Ac1618860
0sWRRY_C1011543-142
:PpWRRY16
:PpWRRY6_CTD
--AKDCYB-WRRYQSKLNDJBSBR-----B-----GCPVKKIVRS-----B-----DSCIKKITVR-GRRS-HPRP-----60
--TYDGYB-WRRGQKLVQCB-CHQ-----KPY-YKSOA-----WCGAKKSVRS-----A-----DQQLHKYVGR-GSHH-HPAB-----61
--DQXB-WLGGQKRYVQCB-CHQ-----KPY-YKSOA-----WCGAKKSVRS-----A-----DQQLHKYVGR-GSHH-HPAB-----58
--DQXB-WRRGQKSTLQBLCPY-----WFB-YCALP-----WGWYKKSIVRS-----A-----DQQLITVYGR-GCHH-H-----56
--DQXB-WRRGQKSTLQSPCQI-----LKY-YCALA-----WCHYQKSVRS-----A-----DQQTTOYVGR-GPHH-H-----56
--DQYB-WRRGQKSTLQSHSDY-----LHSHQCALA-----WCVYQKIVAYT-----A-----D-----VATVYR-GRRH-HL-----55
--FYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCAYP-----SCPVKKVQRC-----A-X-----DQSHLVATVR-GRRH-H-----61
--QALFYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCAYP-----SCPVKKVQK-----Q-----EK-----
--YTLQFYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCSYP-----SCPVRSVQRS-----A-X-----DPSLAVATVR-GTHH-HLCP-----67
--DTHLTYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCSYP-----SCLVYKSVQRS-----A-X-----DPSLAVATVR-GTHH-HTCP-----67
--WDDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCAYP-----SCPVKKVQRS-----X-X-----DSSLVAVATVR-GRRH-HPDD-----62
--KDDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCAYP-----SCPVKKVQRS-----A-X-----DSSLVAVATVR-GRRH-HPHD-----61
--DTTLVYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCACP-----SCSVRSVQRS-----Y-X-----DQSVAVATVR-GRRH-HPHP-----67
--KDDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCSYP-----ACPVKKVQRS-----A-D-----DNTVTVAVT-----
--QVYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCSYP-----ACPVKKVQRS-----A-D-----DNTVTVAVTVR-GRRH-HAQP-----64
--QVYDGYC-WRRYQKXTKQBPYDR-----AYP-BCSYP-----ACPVKKVQRS-----A-X-----DNTVTVAVTVR-GRRH-HGQP-----64
--SMAFYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQVQRC-----A-X-----DABILITVYR-GRRH-HPAP-----67
--DGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQK-----
--IADGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQVQRC-----A-X-----DABILITVYR-GTHH-HPAP-----62
--SMAFYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQVQRC-----A-X-----DABILITVYR-GRRH-HPAP-----67
--IADGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQV-----
--DGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQV-----
--SDATFYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQVQRC-----A-X-----DNTLITVYR-GRRH-HPAP-----67
--DGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQV-----
--EQYDGCQ-WRRYQ-KLANWBPYDR-----AYP-CTVAV-----GCPALAVRSBS-----A-----
--IADGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQV-----
--CDDPSYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTHAI-----GCPYKQVQRC-----A-X-----YFSJAHITVYR-GRRH-HPAP-----68
--DGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYKQV-----
--CHTAYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYKQVQRC-----L-X-----DABILITVYR-GTHH-HPAP-----67
--ENDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYK-VQRC-----L-X-----DABILITVYR-GTHH-H-----58
--ENDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYR-KVQRC-----A-D-----DABILITVYR-GTHS-HPAP-----61
--CDDPYDNDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYKQVQRC-----A-D-----DABILITVYR-GTHS-HPAP-----24
--KTRVBYDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTTAA-----SCPYKQVQRC-----S-X-----DABILITVYR-GTHH-HPAP-----67
--ENDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAA-----GCPYKQVQRC-----A-D-----DABILITVYR-GTHH-H-----59
--SDAPYDNDGCQ-WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYKQVQRC-----A-D-----DABILITVYR-GTHH-HPAP-----67
--WRRYQKXLANWBPYDR-----AYP-CTVAP-----GCPYKQVQRC-----A-D-----DABILITVYR-GRRH-H-----59

```

0sWRKY_C1019333-145	ATT--ACTAA--CCPVR-KVQRC--A-R-----DRTVLITTYR-CKEN-EDLP-----61
0sWRKY_C1034360-98	VRQC--A-R-----DRTVLITTYR-CKEN-EDLP-----24
AcWRKY42_Ac4304450	ATT--ACTAA--CCPVRKVVQRC--A-R-----DRTVLITTYR-CKEN-EDLP-----57
0sWRKY_C1009257-292	STY--ACTGA--CCPVRK--VQRC--N-R-----DRTVLITTYD-CKEN-R-----58
0sWRKY_C1C7552_2	STY--ACTTA--CCPVRKVVRA-----SED-----LAAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
0sWRKY_C1034118-148_2	STY--ACTTA--CCPVRKVVRA-----SED-----LAAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
AcWRKY33_Ac2338470_CTD	STY--ACTTI--CCPVRKVVRA-----SED-----LAAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
0sWRKY_C1012313-200_2	STY--ACTTV--CCPVRKVVRA-----SED-----LAAVITTYR-CKEN-R-----57
0sWRKY_C1035741-109-84_pseudo	STY--ACTTV--CCPVR--KVVRA-----LED-----LAAVITTYA-C-----
AcWRKY44_TT02_Ac2337260_CTD	STY--ACTBA--NCRARVVRA-----SED-----PAAVITTYR-CKEN-ELLIL-----67
0sWRKY_C1021552-159_2	STY--ACTHD--CCLVKVVRA-----SED-----LRSVITTYR-CKEN-ENVP-----60
0sWRKY_AAAD1002933-1_2	STY--ACTHD--CCLVKVVRA-----SED-----LRSVITTYR-CKEN-ENVP-----60
0sWRKY_C1C4184_2	STY--ACTHD--CCSVKVVRS-----SED-----LRSVITTYR-CKEN-ENVP-----60
0sWRKY_C1011539-161	STY--ACTHD--CCSVKVVRS-----SED-----LRSVITTYR-CKEN-ENVP-----59
AcWRKY2_Ac5556270_CTD	STY--ACTHD--CCSVKVVRA-----SED-----LRSVITTYR-CKEN-EDVP-----66
0sWRKY_C1019774-109_2	STY--ACTHT--CCPVRKVVRA-----SED-----PESVITTYR-CKEN-ENVP-----60
AcWRKY26_Ac5907100_CTD	STY--ACTHT--CCPVRKVVRA-----YQD-----PESVITTYR-CKEN-EDLP-----66
0sWRKY26_homolog_CTD	STY--ACTHT--CCPVRKVVRA-----YQD-----PESVITTYR-CKEN-EDLP-----66
AcWRKY34_Ac4266440_CTD	STY--ACTAB--CCTVKVVRA-----SED-----PESVITTYI-CKEN-ENVP-----65
PpWRKY1_CTD	YY--ACTWY--CCPVRKVVRA-----SED-----PRAVITTYR-CAHL-EDRI-----65
PpWRKY1_11k_BJ188872_CTD	STY--ACTWY--CCPVRKVVRA-----SED-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY20_Ac4265640_CTD	STY--ACTAB--CCPVRKVVRA-----SED-----PKAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY3_Ac2533340_CTD	STY--ACTTD--CCSVKVVRA-----ATD-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY4_Ac1513960_CTD	STY--ACTTD--CCSVKVVRA-----ATD-----PRAVITTYR-CKEN-EDLP-----66
AcWRKY58_Ac3901080_CTD	STY--ACTTP--NCTVRKVVRA-----STD-----AKAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
0sWRKY_C1021877-34_2	STY--ACTYA--CCNVKVVRA-----SED-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
AcWRKY25_Ac2330250_CTD	STY--ACTYD--CCSVKVVRS-----AAD-----PRAVITTYR-CKEN-EDLP-----66
0sWRKY_C1027984-99_2	STY--ACTAD--CCNVKVVRA-----SAD-----PESVITTYI-CKEN-EDP-----58
0sWRKY_C1015328-116_2	STY--ACTYD--CCDVKVVRS-----SED-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
0sWRKY_C1266933-2_2	STY--ACTYI--CCDVKVVRS-----YER-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
AcWRKY1_EAP1_Ac2304880_CTD	STY--ACTYD--CCPVRKVVRS-----SED-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
Chlaeydmonae_rhainbar-ct-11_881	ATT--ACTHD--CCSVKVVRS-----AAD-----PRTVVVTVR-CTHS-EDLP-----66
0sWRKY_C1017195-124_2	STY--ACTHD--CCPVRKVVRA-----SED-----DAAVITTYR-CKEN-EDVP-----59
AcWRKY32_Ac4330930_CTD	STY--ACTBA--CCPVRKVVRA-----YER-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY10_Ac1955600	STY--ACTNI--CCSVKVVRS-----AAD-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY19_Ac4342020_CTD	STY--ACTNI--CCSVKVVRS-----AAD-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
0sWRKY_C1C405	STY--ACTNI--CCSVKVVRS-----AAD-----PRAVITTYR-CKEN-EDVP-----66
AcWRKY51_Ac5564810	STY--ACTWY--KALCKVSLCDS-----SVY-----CEKQDQLTR-REDR-----P-----66

0s0RRY_C1013823-89	RSYY--RCTHQ--CCNVKSKQVQAL--SND-----RIVVVVITR--CQHT--R-----56
0s0RRY_AAAA010165-1	RSYY--RCTHQ--CCNVKSKQVQAL--SND-----RIVVVVITR--CQHT-----36
Ac0RRY75_Ac5q43080	RSYY--RCTYQ--CCNVKSKQVQAL--YQD-----QIVVVVITR--CVHS--HPIL--66
Ac0RRY45_Ac9G01970	RSYY--RCTYR--CCNVKSKQVQAL--WQD-----RIVVVVITQ--CQHT--HAND--66
Ac0RRY24_Ac5q41570	RSYY--RCTYH--ICNVKSKQVQAL--AKD-----PQVVVVITR--CVHM--HPCX--66
Ac0RRY56_Ac1q64000	RSYY--RCTYH--ICNVKSKQVQAL--AKD-----PQVVVVITR--CVHM--HPCX--66
0s0RRY_C1B198B-3	RSYY--RCTHH--ICNVKSKQVQAL--AKD-----TILVVVVITR--CVHM--R-----37
0s0RRY_C1Q06311-145	RSYY--RCTHH--ICNVKSKQVQAL--AKD-----RILVVVVITR--CVHM--R-----42
Ac0RRY43_Ac2q46130	RSYY--RCTQH--KCNVSKKQVQAL--SKS-----TRIVVVITR--CQHM--HPCX--66
Ac0RRY8_Ac5q46350	RSYY--RCTTQ--KCNVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHM--HPIL--66
Ac0RRY28_Ac4q18170	RSYY--RCTTQ--KCNVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHM--R-----72
Ac0RRY71_Ac1q69860	RSYY--RCTTQ--KCNVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHM--HPIL--66
0s0RRY_C1Q36339-137	RSYY--RCTTQ--KCPVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPIL--61
0s0RRY_C1Q12065-65	RSYY--RCTTQ--KCPVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPIL--61
0s0RRY_C1Q12723-3	RSYY--RCTAD--KCNVSKKQVQAL--RQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSB--40
0s0RRY_C1B5465-66	RSYY--RCTAD--KCNVSKKQVQAL--RQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSB--40
0s0RRY_C1Q35333-121-78	RSYY--RCTTP--KCNVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSA--62
Ac0RRY23_Ac2q47260	RSYY--RCTTA--KCNVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSB--66
Ac0RRY48_Ac5q49520	RSYY--RCTTV--CCNVKSKQVQAL--SOD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSB--66
0s0RRY_C1Q06290-89	RSYY--RCTNB--KCNVSKKQVQAL--SOD-----PQVVVVITR--CQHS--HETV--62
0s0RRY_C1Q29995-26	RSYY--RCTNS--KCNVSKKQVQAL--SOD-----PQVVVVITR--CQHM--QON--61
Ac0RRY57_Ac1q69310	RSYY--RCTNS--KCNVSKKQVQAL--SOD-----PQVVVVITR--CQHC--HQTL--66
Ac0RRY13_Ac4q39410	RSYY--RCTQD--KCNVSKKQVQAL--ADD-----PQVVVVITR--CQHL--HSPB--66
0s0RRY_C1Q20414-113	RSYY--RCTQD--KCNVSKKQVQAL--ADD-----PQVVVVITR--CQHV--HSPB--40
Ac0RRY12	RSYY--RCTHN--KCNVSKKQVQAL--SND-----CQVVVVITR--CQHM--HPSB--66
0s0RRY_C1Q15638-69	RSYY--RCTHN--KCNVSKKQVQAL--SND-----CQVVVVITR--CQHT--R-----37
0s0RRY_C1Q26178-164	RSYY--RCTHB--KCNVSKKQVQAL--SND-----CQVVVVITR--CQHT--R-----37
0s0RRY_C1Q01692-312	RSYY--RCTHB--KCNVSKKQVQAL--SND-----CQVVVVITR--CQHT--R-----37
0s0RRY_C1Q26178-187	RSYY--RCTHB--KCNVSKKQVQAL--SND-----CQVVVVITR--CQHT--R-----37
Pp0RRY_RBT_BQ039301	RSYY--RCTTA--KCPVSKKQVQAL--IHD-----PQIVVVITR--CQHT--HDKL--66
Pp0RRY_RBT2	RSYY--RCTTA--KCPVSKKQVQAL--IHD-----PQIVVVITR--CQHT--HDKL--67
Ac0RRY68_Ac9q62340	RSYY--RCTTL--KCPVSKKQVQAL--YQD-----PQVVVVITR--CQHT--HPSB--66
Pp0RRY2	R--R--RCTRP--KCPVSKKQVQAL--ADD-----HQLVVVVITR--CQHL--HDLI--88
Pp0RRY4	R--R--RCTRP--KCPVSKKQVQAL--RSD-----AQLVVVVITR--CQHL--HDLI--63
Pp0RRY_RBT_BQ040548	RSYY--RCTNQ--ICPVSKKQVQAL--AKD-----AQLVVVVITR--CQHS--HLSP--66
0s0RRY_C1Q29693-161	RSYY--RCSAA--CCNVKSKQVQAL--SOD-----PQVVVVITD--CVHM--HATP--63
0s0RRY_AAAA0101635-1_1	RSYY--RCSAA--CCNVKSKQVQAL--SOD-----PQVVVVITD--CVHM--HATP--65
0s0RRY_C1Q04059-7-4	RSYY--RCSBT--CCNVKSKQVQAL--RSD-----HATVVVVITD--CVHM--HASPAAA--66

IO\$WRKY_C1013636-119	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	63
IO\$WRKY_C1002161-146	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	63
IO\$WRKY_CUB12978-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	59
IO\$WRKY_AAAA01009693-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
Ac\$WRKY50_Ac5626170	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	66
Ac\$WRKY59_Ac2621900	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	66
Ac\$WRKY39_Ac3604670	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Ac\$WRKY74_Ac5626660	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
IO\$WRKY_HTC136917	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	38
IO\$WRKY_CUB10336-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	38
Ac\$WRKY15_Ac2623320	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Ac\$WRKY7_Ac4624240	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Ac\$WRKY11_Ac4631550	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Ac\$WRKY17_Ac2624670	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
IO\$WRKY_C1000681-304	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
IO\$WRKY_AAAA01004969-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	58
Pp\$WRKY20_WRRY1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Pp\$WRKY_BST_B0170281	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Pp\$WRKY5	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Pp\$WRKY3	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	62
IO\$WRKY_C1033672-4	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_CUB12971-1_pseudo	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_C1023197-108	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_AAAA01001114-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_C1012667-60	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_HTC176098	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_AAAA01014146-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
Ac\$WRKY21_Ac2620690	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
IO\$WRKY_C106698	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_C1016743-167	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	60
IO\$WRKY_C1036469-9	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_CUB2912-4	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	43
IO\$WRKY_CUB299-3	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_C1000447-167	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_AAAA01006946-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
IO\$WRKY_AAAA01002674-1	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	41
Ac\$WRKY14_Ac1630660	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67
Ac\$WRKY36_Ac2624690	NYV--KCSST--CCNVKRVPRD---KDD---PBYVVVYTR--CTHM--HVP--	67



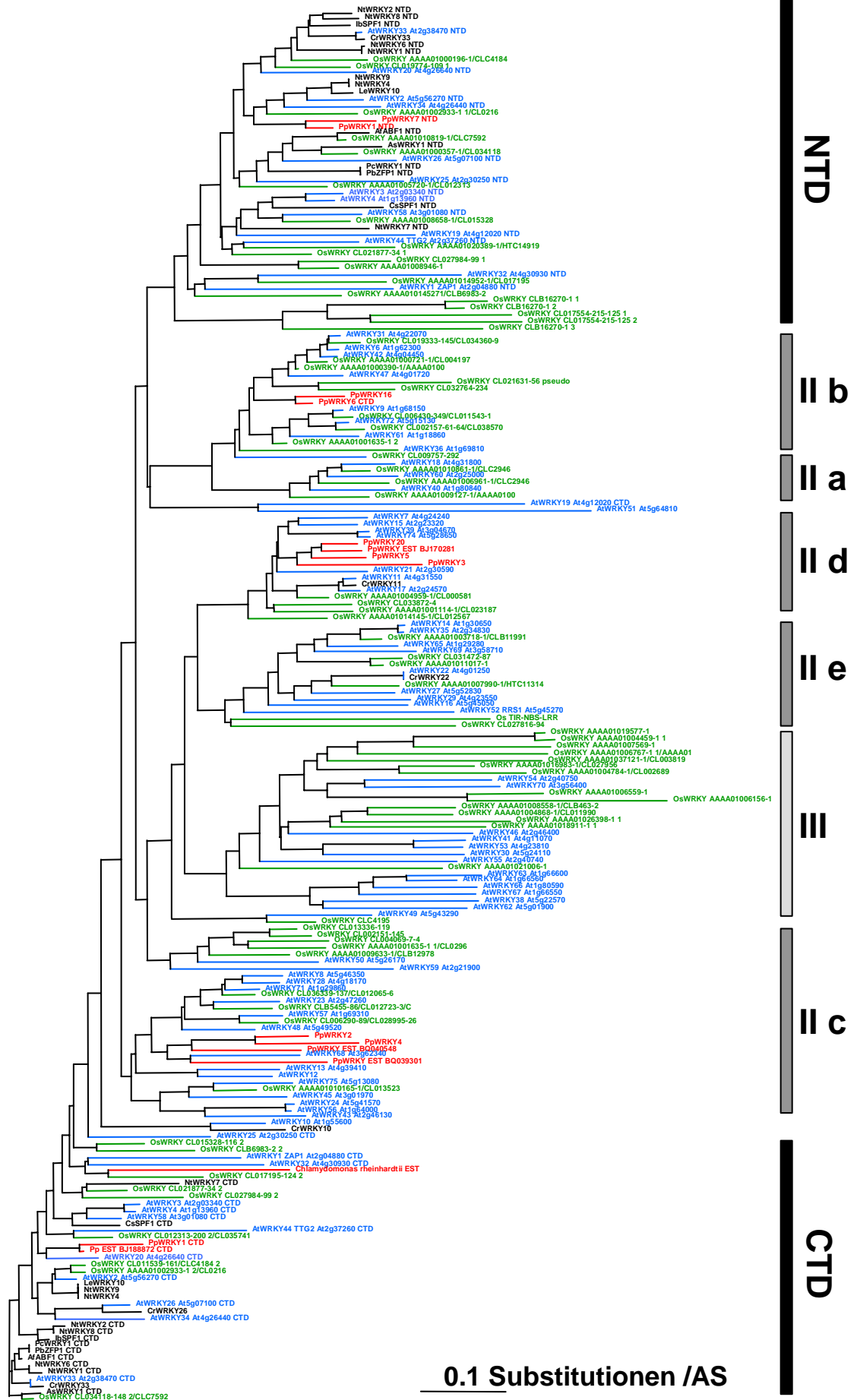
10sWRKY_GL1012431-46	R	GVY	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RSD	PKMLVITYAAKHHHPWF	41		
10sWRKY_GL111991-1	D1QA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RAD	PTMLVVTYTDKHHHPWF	60		
10sWRKY_AAAA01003718-1	D1QA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RAD	PTMLVVTYTDKHHHPWF	60		
10sWRKY_GL030479-109	R	GVY	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RAD	PTMLVVTYTDKHHHPWF	41		
AcWRKY65_Ac1429280	EDTTP9SD	8VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	T	KCCPARKOVERS	RDD	PTMLLITYTSKHHHPWF	67	
AcWRKY69_Ac3968710										
10sWRKY_GL031472-87	D1VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	N	KNCAPARKQVERC	RVD	PSFLLITYTGAHGX	67		
10sWRKY_AAAA01011017-1	D8VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	N	KNCAPARKQVERC	RVD	PSFLLITYTGAHGX	67		
10sWRKY_HTC113143	D7VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RSD	PKTFLITYTGRHHHSLP	60		
10sWRKY_AAAA01007990-1	8AD7VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKOVERS	RSD	PKTFLITYTGRHHHSLP	61		
AcWRKY22_Ac4401250	AAALNED	7VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	67	
AcWRKY27_Ac5662890	TOENL8ED	1VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	67	
AcWRKY29_Ac4423550	KXNMLSD	AMA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	67	
AcWRKY16_Ac5645050	D8G8	8ABED	10Y	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	67
AcWRKY52_DDB1_Ac5945270	IPALD	8ED	10Y	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	67
10sWRKY_GL027816-94	TPD	8VA	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	1	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
10sWRKY_GL020703-248	R	RCT	S	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66		
10sWRKY_GL026947-235	R	RCT	S	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66		
AcWRKY41_Ac4401070	AKFP	8YV	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
AcWRKY58_Ac4423910	AKFP	8YV	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
AcWRKY30_Ac5624110	AKFP	8YV	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
10sWRKY_GL8468-2	D	688	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
10sWRKY_AAAA01008558-1	ADD	688	WRKYGQEPIS9PY2R	RCS9	S	KCCPARKQVERN	RSD	PKKFLIVITYTAKHHHDLP	66	
10sWRKY_AAAA01003162-1	IK									
10sWRKY_AAAA01006099-1_2										
10sWRKY_AAAA01018911-1_1										
10sWRKY_GL030361-124										
10sWRKY_AAAA01000593-1										
AcWRKY46_Ac2946400										
AcWRKY54_Ac2940750										
AcWRKY70_Ac39656400										
10sWRKY_GL011990-27										
10sWRKY_AAAA01004868-1										
10sWRKY_AAAA01019330-1										
10sWRKY_AAAA01006099-1_1										
10sWRKY_AAAA01018911-1_2										
10sWRKY_AAAA01026398-1_1										
10sWRKY_AAAA01026398-1_2										

0sWAKF_C1027966-5	-----XIBEDGVI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCBYKDD-HGCTATHQVQJSE--	EDPS-----	JYVVIYYV-GDBXC-----	63
0sWAKF_AAAA01015983-1	-----YKARVSEDGVI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCBYKDD-HGCTATHQVQJSE--	EDPS-----	JYVVIYYV-GDBTGB-----	68
0sWAKF_C1002689-54	-----YEDDHYI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCBYKDD-HGCTATHQVQJERTADDDIAS--	PPYLIYYV-GREXC-----	PPYLIYYV-GREXC-----	67
0sWAKF_AAAA01004784-1	-----IEXAHEDDHYI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCBYKDD-HGCTATHQVQJERTADDDIAS--	PPYLIYYV-GRETCRBD-----	PPYLIYYV-GRETCRBD-----	75
0sWAKF_C1003819-10	-----YTTDGGI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCJAP-B-QGCLATKRVQQ-----	SGSQD-----	DPAAAVIAYV-GRETCRBD-----	67
0sWAKF_AAAA01037121-1	-----YB0FTTDDGVI-WKRYGQREIKK-----	SKEDRALYY--RCJAP-B-QGCLATKRVQQ-----	BQSQD-----	DPAAAVIAYV-GRETC-----	68
0sWAKF_AAAA01001128-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01019577-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01004459-1_1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01007559-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01006767-1_1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01006579-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01006767-1_2	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01015997-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_C105996	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01001598-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01012277-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01012394-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01006156-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01001291-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01002807-1_1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01008570-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01006559-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01002807-1_2	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_C1B8737-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01015643-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA01021006-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF66_Ac2940740	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
0sWAKF_AAAA0100015-1	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF98_Ac5952570	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF62_Ac5601900	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF69_Ac1966600	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF64_Ac1966650	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF67_Ac1966650	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43
AcWAKF66_Ac1980550	-----DDEQ-WKRYGQREIKK-----	-----RSTY--RCYHDD-QGCHATHQVQI-----	-----	-----SSTYVIVYV-GRETCRDP-----	43

**A2.4: Phylogenetischer Baum aus WRKY-Domänen**

Paraloge oder identische *O. sativa*-BAC-Klone sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen, redundante *O. sativa*-Sequenzen wurden entfernt. Die Analyse erfolgte mit ClustalW auf der Basis von 52 bis 69 AS (im Fall der carboxyterminalen Domäne von AtWRKY19 sind es 105 AS) der konservierten WRKY-Domäne mit 276 Sequenzen aus 11 Pflanzenarten. Die aminoterminalen (NTD) und carboxyterminalen (CTD) WRKY-Domänen der Gruppe I wurden getrennt betrachtet. Der phylogenetische Baum wurde auf der Basis eines Distanz-Matrix-Algorithmus erstellt und ist nicht gewurzelt. Die Einordnung in die jeweiligen Gruppen ist schematisch an der rechten Seite dargestellt.

*A. thaliana* ist blau, *O. sativa* ist grün und andere sind schwarz dargestellt. Rot hervorgehoben sind die Sequenzen der evolutiv frühen WRKY-Domänen aus *P. patens* und *Chlamydomonas reinhardtii*. *Pp* – *Physcomitrella patens*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *Cr* – *Capsella rubella*, *Af* – *Avena fatua*, *Ib* – *Ipomea batatta*, *Lj* – *Lotus japonicus*, *Pb* – *Pimpinella brachycarpa*, *Pc* – *Petroselinum crispum*, *Le* – *Lycopersicon esculentum*, *Nt* – *Nicotiana tabacum*, *Os* – *Oryza sativa*



0.1 Substitutionen /AS

### A3. Einträge nach GenBank

Es wurden nur die bisher eingetragenen genomischen *WRKY*-Gen-Sequenzen in Form der GenBank-*flatfile*-Darstellung angeführt. Zu allen anderen GenBank-Einträgen aus dieser Arbeit wurden lediglich die Zusammenfassungen mit Akzessionsnummer angegeben. Die Sequenzen von *CrWRKY11* und *CrWRKY33* sind noch nicht in die Gendatenbanken eingetragen worden und sind im Anschluß angegeben.

```

LOCUS       AY077757                2731 bp    DNA     linear   PLN 12-FEB-2002
DEFINITION Physcomitrella patens WRKY transcription factor 1 (WRKY1) gene,
            complete cds.
ACCESSION  AY077757
VERSION    AY077757
KEYWORDS   .
SOURCE     Physcomitrella patens.
  ORGANISM Physcomitrella patens
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Bryophyta;
            Bryopsida; Funariidae; Funariales; Funariaceae; Physcomitrella.
REFERENCE  1 (bases 1 to 2731)
  AUTHORS  Giavalisco,P., Wanke,D., Turck,F., Ciolkowski,I., Rushton,P.J. and
            Somssich,I.E.
  TITLE    WRKY transcription factors from Physcomitrella patens
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 2731)
  AUTHORS  Giavalisco,P., Wanke,D. and Somssich,I.E.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (30-JAN-2002) Plant Microbe Interaction, Biochemistry,
            Max-Planck-Institut Fur Zuchtungsforschung, Carl-von-Linne-Weg 10,
            Koeln D-50829, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..2731
            /organism="Physcomitrella patens"
            /db_xref="taxon:3218"
            /dev_stage="protonema"
   5' UTR   join(1..153,566..725)
            /gene="WRKY1"
   mRNA     join(1..153,566..1157,1288..1757,1868..1993,2144..2731)
            /gene="WRKY1"
            /product="WRKY transcription factor 1"
   gene     1..2731
            /gene="WRKY1"
   CDS      join(726..1157,1288..1757,1868..1993,2144..2303)
            /gene="WRKY1"
            /codon_start=1
            /product="WRKY transcription factor 1"
            /protein_id="AAL78680"
            /translation="MGALEILDYNNLTGKRDRDYEVKEAACMGIQNARQLLQSLTQVR
            SPVVDEECDVMAGAAISKFQKVVVSLLSRTGHARFRRTNRNAAVAGYAGVFLESNFFR
            ENSQETSRRDRIVSSGHASPSQFTPTSSKPPQSPPELQAIKYKVFPPQSSRSADATPASS
            DPASGVHHPKPLQILHSSMMQSQSIPEHILRPVASAAYRPTALPFPNPFNKQEVGSKEGV
            SGHSPDSSLSSGPPQSTTTASFPPTMSVQDARITSLQNMKTAEQPSALPPRPQPPTPKK
            KCSGQSDENGATCAILGRCHCSKRRKRLRLKRTITVRAISSKLADIPSEDEYSWRKYGQK
            PIKGSPPHPRGYKCSSIRGCPARKHVERSMEDSSMLIVTYEGDHNHPQSSSANGGLTV
            QSQ"
   3' UTR   2304..2731
            /gene="WRKY1"
BASE COUNT 726 a    670 c    668 g    667 t
ORIGIN
    1 caggatcggt tccaaggctg agacacagct tgaggtttta taagcggcat atcttcatga
    61 gcggcgagc agcaacagcg gaagcacatg aaatgagatc tctgggataa ccatgcggcc
    121 gcaactagag taacgacgcg gcgcggtgag caggtagatc ttgatctcca attcaaccca
    181 tagctacgat ctgcggggat tctgaagctc ttagactcca caaggctcgtg ttcttaaatt
    241 gcatgtgtaa agagttgccc tctaccgggt ggtctcgtgt gaatggtcca gttccaaacc
    301 atcccagagc gcaatcgctg cactgttttt ctcccagccg gtgaccagtg agaaactggc
    361 caacagctga ttgtttaaac tctatctcca aatctataca cgggtgcagt cagtccaagc
    421 ctggttaggac agaatcatgc cgcaccccga ccttcaaadc aaagttacag agctagaaac
    481 agtaacctta aaacatgtga gccagacatt gaaactggtt cttccatgct gatctagtgt
    541 gttgcgcggt tcatatgttc aacagatgtg cctcttacga actgctacag aagcttcatg
    601 aatcacacag caattggcct ttaaactcga tggcttaact tttgatagca acccttctac
    661 aagagtggag tgcttaatga aagtacgcca ataacagtat ttctcgcgac gccttcccag
    721 cgaacatggg ggcggtggag atattagatt acaacaacac tttaggaaag agagacaggg

```

```

781 actatgaagt gaaggaagcg gcatgcatgg gaatacaaaa cgctaggcag ctgctccagt
841 ccctgacgca ggtgcatct ccagtggtgg acgaagaatg cgatgtcatg gctggcgctg
901 ccatatccaa gtttcagaag gtggtgtcac tactgagtcg cactggtcac gcacggtttc
961 gtaggagaac gcgcaacgct gctgttgccg gttacgcagg cgtcttctta gagagctcca
1021 acttcttcag agaaaattcc caggagacgt cgagggacag aatcgtctcg tcgggccatg
1081 ctageccatc tcagttcacg ccgacgtcct cgtccaagcc tcctcagtca cctgaattgc
1141 aggcgatcaa atataaggta taatatcata acccttcaaa gttctcttta aagcaacca
1201 aagctcgaaa tccgtcactt caattgggta tttcaaatgt aatttttact gtatctgacc
1261 gcgttagggg gattctcaat ttttcagggt tttcctcaaa gctctcgttc cgctgatgcy
1321 acgctcgcct ccagtgacct tgcttcagga gtccatcctc caaagccact tcagatcctt
1381 cacagctcca tgatgcagca aagcattcca gaacatatac tgcgtccagt ggctagtgtc
1441 gcgtatcgcc caactgcctt tccccgaat ccggtcaaca aacaggaggt gggcagcaag
1501 gagggggtga gcggccacag tccggacagt tcggtgagct caggacctcc gcaatcaact
1561 acaacggcgt cgttcccaac catgagtggt caggatgcga ggataacgag cctgcagaat
1621 atgaaaacag ccgagcaacc tccggcgttg cccctcgcg ccagccacc aactcccaag
1681 aaaaagtgtc ccgggcaatc cgatgagaac ggtgcaactt gcgcaatcct tggccgctgc
1741 cattgttcaa aacgcaggta tttggtccac attctctgac ctgaaaacac aacatcgtaa
1801 tttactgcgt cgtagctgga cctagaaaag tgaagagggc aattctgaaa ttgaatttgg
1861 ttgacagcaa attgcggttg aagaggacaa tcacggttcg agcaatcagc tcaagttgtg
1921 ctgatatacc ttcggatgag tattcatggc gtaagtatgg ccagaagcct atcaaaggat
1981 caccacatcc gaggtacaga tgtgatcttt gcttgaacct catgtgtatg ctgaatgtcg
2041 gtccctgact gcatgtattg tttcatggct taggaaactgg tgtattgaga ctttgcttat
2101 gcagaccata gttctaaatt tggggacggt tctggatgtg cagaggatac tacaagtgc
2161 gcagcatacg aggctgtcca gcgagaaaac acgtagagcg gtcaatggaa gactcatcta
2221 tgttgattgt gacatacga ggcgatcata accatccgca atcgtcatct gctaattggc
2281 gattaacagt gcagtcgcaa tagacaacac gcacgtacat tgccttcgca ttatcgccta
2341 gtaatgagga aagcacaacac tcctctcaat ggcttacgcy tggagatgtc tgcagcatt
2401 tcaagttttt gccagtttg tgctccatgt ttttttgta ggacattacc tatggcaca
2461 tgcccccgtc cgacgaagcc cgtgacttat gttctgtagc aatgttctca tgcgtgattg
2521 gctagagaag tgtgctcgac gagtcaggaa cattaacctc ctagggtgtc ccccaaagt
2581 ggaagcgttc tgcttatcag ggatcaagag gtacgcacag acgaagatat ctacaggtga
2641 tgccttttaa ttcttcggtg ctcaatggct ccacctctgg agcggagaga gagaagaatg
2701 aatatgaatg caagtatcct tcgcatgcy c

```

//

```

LOCUS AY166719 1431 bp DNA linear PLN 21-JAN-2003
DEFINITION Capsella rubella WRKY transcription factor 22 (WRKY22) gene,
complete cds.
ACCESSION AY166719
VERSION AY166719.1 GI:27817200
KEYWORDS .
SOURCE Capsella rubella
ORGANISM Capsella rubella
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
Rosidae; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Capsella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1431)
AUTHORS Wanke,D., Ciolkowski,I., Mukhtar,M.S., Bollenbach,L., Bruemmer,J.,
Deslandes,L., Seki,H., Turck,F., Zhou,A., Ulker,B. and
Somssich,I.E.
TITLE Structure and evolution of WRKY-like DNA binding proteins
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1431)
AUTHORS Wanke,D. and Somssich,I.E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-OCT-2002) Biochemistry / Molecular Phytopathology,
Max-Planck-Institut fur Zuchtungsforschung, Carl-von-Linne-Weg 10,
Koeln D-50829, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1431
/organism="Capsella rubella"
/db_xref="taxon:81985"
gene <1..>1431
/gene="WRKY22"
mRNA join(<1..341,625..735,975..>1431)
/gene="WRKY22"
/product="WRKY transcription factor 22"
CDS join(1..341,625..735,975..1431)
/gene="WRKY22"
/note="WRKY-type DNA binding protein; similar to
Arabidopsis thaliana WRKY22"
/codon_start=1
/product="WRKY transcription factor 22"
/protein_id="AAO23324.1"
/db_xref="GI:27817201"

```

```

/translation="MADDWDLHAVVRGCSAVSSSATTSTTTVFSGGVSSHTNPFTTVG
RQSNVAVSFGIEIRDLYTPFTQESVSVSSFSLNYPEEPRKTKNQKRLSLSSASSGSVTSK
PTGSTTSRKRRIQHKVCHVAEALNSDVWAWRKYGQKPIKGSPIRGYRCSTSK
GCLARKQVERNRSDPKMFIVTYTAEHNHPAPTHRNSLAGSTRQKPSDQPMTTKSPPTT
IATYSSSPVTSADFEVLPVEDLAVGEGLDGEDLLSLSDTVVSDDFDGLLEFFAAGDS
FSGNSAPACFDLSWVNSAATTTGGI"
BASE COUNT      406 a      313 c      292 g      419 t      1 others
ORIGIN
  1 atggccgacg attgggatct ccacgccgta gttagaggct gctcagccgt aagctcatca
 61 gcaactacct ccacaaccac cgtatnttcc ggcggcggtt catctcacac gaacctacg
121 ttcaccgctc gaagacagag taatgcccgc tccttcggcg agattcgaga tctctacacg
181 ccgttcacac aagaatccgt cgtctctctg ttttcgtgtc tgaattaccc agaagaacca
241 agaaaagcaa agaaccagaa acgtcctcct tctctctctg cttctctctg tagcgtcact
301 agcaaaccce caggctccac tacctctaga tctaaaagaa ggttcggtct tttttttcca
361 ccaaccaata aagtttcaaa cttttctcaa aacctatcaa ggatttttaa attcttctg
421 ttcaaccaat caaagtattc gaattttgct gtgaagatgt ggttaaaagt ctcagttatg
481 tcggatacta tcaagaaaga aattagcata tgagaaaaat attggttttt taatttcgaa
541 atttcgaata tgattgtaca atcaagaaag ctaaaaaaag tctgtgtgtg ttttgttttg
601 tggttgcttg tttctttggt acagaaagat acagcataag aaagtgtgcc atgtagcagc
661 agaagcttta aactccgatg tctggcgctg gcgaaagtac ggacaaaaac ccatcaaagg
721 gtccccatat ccaaggaat actatctcag tatttctact tgttcctaac cataaaaaaa
781 taaaaagatt tattttttta ccaaaagtca tttattgaga gttataaatg tgtgtattct
841 tcaagacaaa aagaaacttg tctgttttgg ngattctgtc tgcttttagt ttgttaaatc
901 atctcagttt caattttggt aataatacaa ccaaaaacat tctaattttt tttttttttt
961 tttttataaa acagaggata ttacagatgt agtacatcaa aaggttggtt agcccgtaaa
1021 caagtggagc gaaatagatc cgaccogaag atgttcacgc tcacttacac ggcggagcat
1081 aacctccag caccactca cgttaactct ctcgcccga gaccccgta gaaacctct
1141 gatcaaccga tgactactaa atctcccacg accacgatcg ccacgtattc atcgtctcgc
1201 gtgacgctag cagacgaatt tgttttgccc gtggaggatc tagcgggtgg ggaagggtctc
1261 gacggagatg aggatctggt gtctctgtcc gatacgggtg tgagcgatga tttcttcgac
1321 gggttggagg aattcgcagc cggagatagc ttttcgggga actcggctcc ggcgtgtttt
1381 gatctgtctt ggggtgtaaa cagtgcgcc acgacgacc gaggaatatg a
//

AY166722 Capsella rubella putative endoplasmic reticulum retrieval protein (Rer1)
gene, partial cds
gi|27817214|gb|AY166722.1|[27817214]

AY166721 Capsella rubella putative C3HC4 zinc finger-type protein gene, partial
cds
gi|27817204|gb|AY166721.1|[27817204]

AY166720 Capsella rubella WRKY transcription factor 22 (WRKY22) mRNA, complete cds
gi|27817202|gb|AY166720.1|[27817202]

AY166719 Capsella rubella WRKY transcription factor 22 (WRKY22) gene, complete cds
gi|27817200|gb|AY166719.1|[27817200]

AY167755 Capsella rubella putative monosaccharide transporter gene, partial cds
gi|27466714|gb|AY167755.1|[27466714]

AY167754 Capsella rubella putative phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) gene,
partial cds
gi|27466712|gb|AY167754.1|[27466712]

AY167751 Capsella rubella putative WD-40 repeat protein (MSI2) gene, partial cds,
alternatively spliced
gi|27466705|gb|AY167751.1|[27466705]

AY167750 Capsella rubella putative receptor-like kinase (RLK1) and putative
cellulose synthase catalytic subunit (B1) genes, partial cds
gi|27466702|gb|AY167750.1|[27466702]

AY168201 Capsella rubella putative lactoylglutathione lyase-like protein (GLX1)
mRNA, partial cds
gi|27362907|gb|AY168201.1|[27362907]

AY168200 Capsella rubella putative lactoylglutathione lyase-like protein (GLX1)
gene, partial cds
gi|27362905|gb|AY168200.1|[27362905]

AJ507214 Hordeum vulgare bbr gene for barley B recombinant
gi|26190435|emb|AJ507214.1|HVU507214[26190435]

```

AY157065	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-6 mRNA, partial cds gi 25140469 gb AY157065.1 [25140469]
AY157064	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-5 mRNA, partial cds gi 25140467 gb AY157064.1 [25140467]
AY157063	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-4 mRNA, partial cds gi 25140465 gb AY157063.1 [25140465]
AY157062	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-3 mRNA, partial cds gi 25140463 gb AY157062.1 [25140463]
AY157061	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IIE-1 mRNA, partial cds gi 25140461 gb AY157061.1 [25140461]
AY157060	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-2 mRNA, partial cds gi 25140459 gb AY157060.1 [25140459]
AY157059	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-1 splice variant 2 mRNA, partial cds, alternatively spliced gi 25140457 gb AY157059.1 [25140457]
AY157058	Lycopersicon esculentum WRKY transcription factor IID-1 splice variant 1 mRNA, partial cds, alternatively spliced gi 25140455 gb AY157058.1 [25140455]

#### A4. Vergleiche der orthologen WRKY-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana*

In Fett und in Großbuchstaben sind die Exon-Sequenzen dargestellt. Die Intron-Sequenzen sind in Kleinbuchstaben geschrieben. Blau hervorgehoben sind die Exon-Sequenzen der *C. rubella* orthologen WRKY-Gene.

##### A4.1 Vergleich der orthologen WRKY11-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana*

AtWK11	1	ATGGCCGTCGATCTAATGCGTTTCCCTAAGATAGATGATCAAACGGCTATTCAAGAACTGCATCGCAAG
CrWK11	1	ATGGCCGTCGATCTAATGCGTTTCCCAAGATAGATGATCAAACGGCTATTCAAGAACTGCATCGCAAG
AtWK11	71	GTTTACAAAGTATGGAACATCTGATCCGTGTCCTCTCTAACCGTCCCGAACAACAACAACCGTTGACTG
CrWK11	71	GTTTACAGAGTATGGAGCATCTGATCCGCTCCTCTCTAACCGTCCCGAACAACAACAACCGTTGACTG
AtWK11	141	CTCCGAGATCACTGACTTCCACCGTTTCTAAATTCAAAACCGTCATTTCTCTCCTTAAACCGTACTGGTCAAC
CrWK11	141	CTCCGAGATCACTGATTTCCACCGTTTCCAATTCAAAACCGTCATTTCTCTCCTTAAACCGTACCAGTCAAC
AtWK11	211	GCTCGGTTTCAGACGCGGACCGGTTCACTCCACTTCTCTGCGCATCTCAGAAACTACAGAGTCAGATCG
CrWK11	211	GCCCGGTTTAGACGCGGACCTGTTCCGCT---CATCCCCGTCGTATCTCCTCCACTCC---CACAGATCG
AtWK11	281	TTAAAAATACTCAACCTGAGGCTCCGATAG-TGAGAACAACCTACGAATCACCCCTCAAATCGTTCCTCCAC
CrWK11	275	TTAAAAGTCTCCGATTGTTTCGCGACCGCTAAGAACAACGACTAATCTTCTCAAACCGCTCCTCCTC
AtWK11	350	CGTCTAGT-----GTAACACTCG-ATTTCTCTAAACCAAGCATCTTCGG
CrWK11	345	CGTCGAGCTTCGTCCTTCCGAGGCAGCCAGGCGGTCACACTCGGATTTCTCTAAACCGACCATCTTCGG
AtWK11	393	CACCAAAGCTAAGAGCGCCGAGCTGGAATTTCTCAAAGAAAACCTCAGTGTTCCTTTAAACTCCTCATTTC
CrWK11	415	TTCCAAATCCAAAAGCTCCGACCTAGAGTTCTCGAAGGAGAACTTCAGCGTCTCTTTAAACTCCTTCTAC
AtWK11	463	ATGTCGTCGGCGATAACCGGAGACGGCAGCGTCTCCAATGGAAAAATCTTCTTGTCTTGTCTCCGTTGC
CrWK11	485	ATGTCGTCGGCGATTACCGGAGACGGCAGCGTCTCAAACGGGAAAATCTTCTTGTCTTGTCTCCGTTGC
AtWK11	533	AGCCTGTTAACTCTTCCGAAAACCACCGTTGGCTGGTCACTCCTTACAGAAAGAGATGTCTCGAGCATGA
CrWK11	555	AGCCAGTTACTCTCTCAGGAAAGCCACCGTTGGCCGGTCACTCCTTACAGAAAGAGATGCCTCGAGCACGA
AtWK11	603	GCACTCAGAGAGTTTCTCCGAAAAGTCTCCGGCTCCGCCTACGGAAAGTG-CCATTGCAAGAAAAGgta
CrWK11	625	GCACTCCGAGAGTTTCTCCGCGAGAGTCTCCGGCTCAGGTCACGGGAAATGGCCATTGCAAAAAAAGgta



AtWK11 672 ttgttacgtcac-----ccacctgtcgctct-aacaac--tactca-gtgacttcagttat--  
 CrWK11 695 ttgttacgttacgttacgtcgccccgctgtcgcttttaacaaacttactcaagtgacttcagttat--

AtWK11 726 aatttcaaaagtttcaa--cccatagttgactattac-----cctcgctatatcaataattaaata  
 CrWK11 765 aatttcgatataattccaacccttggttgctattattaccctcctcgatacatcattgattaaact

AtWK11 788 gtctaataattcaattaggtgaaccgggttagtaataactgtcccggttatcggttagttgctttaa  
 CrWK11 835 acttaattattcaattaggtaaacc-----gttaacattattcc-----cggttag-----tcaata

AtWK11 858 gtcgggcatgttttggtattgcgcgccgacaatgactagaaccgggttgagctcaatgaataactcaagtt  
 CrWK11 888 gt-----tatataggttagctcgccgacaactact-----tttaaaaacctgggtt

AtWK11 928 ttgaccggtgacttttggaaaccaatgtttttccgtaattaat--atcttctatttgatttttaatga  
 CrWK11 935 ttgaccattgacttttttaaatccga-----accagctcattaattgattgtaatttttatatgaatga

AtWK11 996 agcag**GAAAAATCGGATGAAGAGAACCCTGAGAGTACCGGCGATAAGTGCAAAGATCGCCGATATCCAC**  
 CrWK11 999 agcag**GAAAAACAAGATGAAGAGAACAGTGAAGGTACCGGCGATAAGTGCAAAGATCGCCGATATCCAC**

AtWK11 1066 **CGGACGAATATTCGTGGAGGAAGTACGGACAAAAACCGATCAAGGGCTCACACACCCACG**gtaaatatc  
 CrWK11 1069 **CGGACGAGTACTCGTGGAGGAAGTACGGACAAAAGCCGATCAAAGGCTCACACACCCACG**gtaactat-

AtWK11 1136 ctacaccgctcaat-atccaccgttggtatttaatttaacgc-----gatctaacgg  
 CrWK11 1138 -----cgctatttatccaccgttgataataaattaatccattgcaatctataaagatctaacgg

AtWK11 1189 tgtttattgttttttg-cgatccag**TGGTTACTACAAGTGCAGTACATTAGAGGATGTCCAGCGAGGA**  
 CrWK11 1201 tggttattgttttatgatcgatgcag**TGGTTACTACAAGTGCAGTACGTATAGAGGATGTCCAGCAAGGA**

AtWK11 1258 **AACACGTGGAAACGAGCATTAGATGATCCAGCGATGCTTATGTGACATACGAAGGAGAGCACCGTCATAA**  
 CrWK11 1271 **AACACGTGGAAACGAGCGTTAGATGATCCAACGATGCTTATCGTTACGTACGAAGGAGAGCACCGTCACAA**

AtWK11 1328 **CCAATCCGCG-----ATGCAGGAGAATATTTCTTCTTCAGGCATTAATGATTTAGTGTTCCTCGGCT**  
 CrWK11 1341 **CCAATCCGCGGGGGGAATGCACGAGACTATTTCTTCTTCAGGCGTTAATGATTTAGTGTTCCTCGGCT**

AtWK11 1392 **TGA**  
 CrWK11 1411 **TGA**

#### A4.2 Vergleich der orthologen *WRKY22*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana*

AtW22 1 **ATGGCCGACGATTGGGATCTCCACGCCGTAGTCAGAGGCTGCTCAGCCGTAAGCTCATCA**  
 CrW22 1 **ATGGCCGACGATTGGGATCTCCACGCCGTAGTTAGAGGCTGCTCAGCCGTAAGCTCATCA**

AtW22 61 **GCTACTACC-----ACCGTATATTCCTCCCGCGGTTTCATCTCACACAAACCCTATA**  
 CrW22 61 **GCAACTACCTCCACAACCACCGTATTTCCGGCGGCGTTTCATCTCACACGAACCCTACG**

AtW22 112 **TTCACCGTCGGACGACAAAGTAATGCCGTCTCCTTCGGAGAGATTGAGATCTCTACACA**  
 CrW22 121 **TTCACCGTCGGAAGACAGAGTAATGCCGTCTCCTTCGGCGAGATTGAGATCTCTACAG**

AtW22 172 **CCGTTACACAAAGATCTGTCGTCTCTTCGTTTTCTTGATAAACTACCCAGAAGAACCT**  
 CrW22 181 **CCGTTACACAAAGATCCCGTCTCTCTTCGTTTTCTGTCGTAATTACCCAGAAGAACCA**

AtW22 232 **AGAAAGCCACAGAACCAGAAACGTCCTCTTCTCTCTGCTTCTTCGGTAGCGTCACT**  
 CrW22 241 **AGAAAGACAAAGAACCAGAAACGTCCTCTTCTCTCTGCTTCTTCGGTAGCGTCACT**

AtW22 292 **AGCAAACCCAGTGGCTCCAATACCTCTAGATCTAAAAGAAG**gttcggt--tcttcacca  
 CrW22 301 **AGCAAACCCACAGGCTCCACTACCTCTAGATCTAAAAGAAG**gttcggttcttttttttcca

AtW22 350 attttcgataaagtttaaaccttttgcataa-cccatcaacaagtttacgaaatc----  
 CrW22 361 ccaaccaataaagtttcaaaccttttgcataaacccatcaaggat--taaatctctg

AtW22 405 tgttgaaatcaaaat-tccgaatgttgctgtatagaaatggtaaaagtctcaatt  
 CrW22 419 tcttcaaccaatcaaaagtattcgaatgttgctgtgaagatgtggtaaaagtctcagtta

AtW22 464 ttgtcgaaccatcaa-----  
 CrW22 479 tgtcggatactatcaagaagaatagcatatgagaaaaatattggttttttaattctg

AtW22 480 -----atgtgattg--aatcaagaaggctaaaaataaaagtctctgtttttatt-

CrW22 539 aaatttcgaatatgatgtgtacaatcaagaaagctaa---aaaaagctctgtgtgtgttttg  
 AtW22 527 -----tggttgcttgtt-----acag**AAAGATACAGCATAAGAAAGTGTGCCATGTA**  
 CrW22 596 ttttctggttgcttgtttctttgttacag**AAAGATACAGCATAAGAAAGTGTGCCATGTA**  
 AtW22 574 **GCAGCAGAAGCTTTAAACTCCGATGTCTGGGCATGGCGAAAGTACGGACAGAAACCCATC**  
 CrW22 656 **GCAGCAGAAGCTTTAAACTCCGATGTCTGGGCGTGGCGAAAGTACGGACAGAAACCCATC**  
 AtW22 634 **AAAGGTTCCACCATATCCAAG**gtaaaacaaaaaaatt-----accagaa  
 CrW22 716 **AAAGGTTCCACCATATCCAAG**gtaataactatttcagatatttctactgttccctaaccataa  
 AtW22 678 aaaaa-----aaagtcatttattgag--ttataaatgtgtgt  
 CrW22 776 aaaaaataaaaagatttattttttaccaaaagtcatttattgagagttataaatgtgtgt  
 AtW22 713 attctttcaagacaaaagaaactgtctgtttttgtgattctgtctgattttggtttgtt  
 CrW22 836 attctttcaagacaaaagaaactgtctgttttggngattctgtctgcttttagttgtt  
 AtW22 773 aaattattatctgcgttacatttttggtaa-----aggattctaattaattc  
 CrW22 896 aa---atcatctcagtttcaattttggtaataatacaacaaaaacatttctaatttttt  
 AtW22 820 tcattttcatg---aaaacag**AGGATACTACAGATGTAGTACATCAAAGGTTGTTTAG**  
 CrW22 953 tttttttttttttataaaaacag**AGGATATTACAGATGTAGTACATCAAAGGTTGTTTAG**  
 AtW22 876 **CCCGTAAACAAGTGGAGCGAAATAGATCCGACCCGAAGATGTTTATCGTCACTTACACGG**  
 CrW22 1013 **CCCGTAAACAAGTGGAGCGAAATAGATCCGACCCGAAGATGTTTATCGTCACTTACACGG**  
 AtW22 936 **CGGAGCATAATCATCCAGCTCCGACACACCGTAATTCTCTCGCCGGAAGCACACGTCAGA**  
 CrW22 1073 **CGGAGCATAAACCATCCAGCACCCACTCACCGTAACTCTCTCGCCGGAAGCACCCGTCAGA**  
 AtW22 996 **AACCATCCGATCAACAGACGAGTA---AATCTCCGACGACCACTATTGCTACTTATTCAT**  
 CrW22 1133 **AACCATCTGATCAACCGATGACTACTAAATCTCCACGACCACGATCGCCACGTATTCAT**  
 AtW22 1053 **CGTCTCCGGTGACTTCAGCCGACGAATTTGTTTTGCCTGTTGAGGATCATCTAGCCGTTGG**  
 CrW22 1193 **CGTCTCCGGTGACGTGACGACGACGAATTTGTTTTGCCTGTTGAGGATCATCTAGCCGTTGG**  
 AtW22 1113 **GAGA---TCTTGACGGAGAAGAAGATCTGTTATCTTTGTCCGATACGGTGGTTAGCGATG**  
 CrW22 1250 **GGGAAGGTCTCGACGGAGATGAGGATCTGTTGTCTCTGTCCGATACGGTGGTGGAGCGATG**  
 AtW22 1170 **ATTTCTTCGATGGGTTAGAGGAATTCGACGACCGGAGATAGCTTTTCCGGAACTCGGCTC**  
 CrW22 1310 **ATTTCTTCGACGGGTTGGAGGAATTCGACGACCGGAGATAGCTTTTCCGGAACTCGGCTC**  
 AtW22 1230 **CGGCGAGTTTTGATCTCTCTTGGGTTGTGAACAGTGCAGCCACTACCACGGAGGAATAT**  
 CrW22 1370 **CGGCGGTTTTGATCTCTCTTGGGTTGTGAACAGTGCAGCCACTACCACGGAGGAATAT**  
 AtW22 1290 **GA**  
 CrW22 1430 **GA**

#### A4.3 Vergleich der orthologen *WRKY33*-Gene aus *C. rubella* und *A. thaliana*

AtWK33 1 **ATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAACATGAATGGTCTCTGCT-----**  
 CrWK33 1 **ATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAACATGAATGGTCTCTGCTGCTGCTAC**  
 AtWK33 43 **-AATGGTCCACAACAATCCGGAAGAACATCTACTTCTCTTTGGAAGATC**  
 CrWK33 51 **TAATTGGTCTCAACAAAACGGAAGAAGCTCCACTTCTTCTTTGGAAGATC**  
 AtWK33 92 **TTGAGATACCAAAGTTCAGATCTTTTGCTCCTTCTTCAATCTCTATCTCT**  
 CrWK33 101 **TTGAGATCCCAAAGTTCAGATCTTTTGCTCCTTCTTCCATTCTATCTCT**  
 AtWK33 142 **CCTTCTCTTGTCTCTCCTTCCACTTGTTCAGTCCCTCTCTTTTTCTCGA**  
 CrWK33 151 **CCTTCTCTTGTCTCTCCTTCCACTTGTTCAGTCCCTCTGTTTTCTCGA**  
 AtWK33 192 **TTCCCTGCTTTTGTCTCCTCCTCTGCTAAC**gtaagccctctctgtttttt  
 CrWK33 201 **TTCCCTGCTTTTGTCTCCTCCTCTGCTCAC**gtaagccctctctctctc  
 AtWK33 242 t---tctctgtttcttttgaatgaatccaattagtgatgataatctg--  
 CrWK33 251 tctctctctctttcttttgatgaatcgaactagt--ccatagtttggg  
 AtWK33 287 ---tggttgat-gtatcattgatattaacatcttgacaatgaatcgtgatc  
 CrWK33 299 gctgttgattgtatctttgatttaaaatc-tgtctattggg-ataatc  
 AtWK33 333 ggaagtgata--aagttatgggtcaacggtttcaaagagagaaaagact  
 CrWK33 347 ggaagtaataataaagtcagtgatcaacggtttcaaagagagaaaagact  
 AtWK33 381 ttttagagtaactctcgactct-----ttcttaattatgta-tt  
 CrWK33 397 ttcagagtaactcttgattctgttcttataatttcttaattataataat  
 AtWK33 420 gctatgtgtctctttcttgaagtctgaacaa-----  
 CrWK33 447 gctgtttgtctctttcttggatcctgaacaagatcottaatggttgata  
 AtWK33 452 -----ttcttgggattgttt

---

CrWK33 497 ggaaacctctggttttgattggataataatattaattcttgggatggttt

AtWK33 467 tgcagGTTCTAGCTTCTCCAACCACAGGAGCTTTAATCACAAACGTAAC  
CrWK33 547 tgcagGTTCTTGCTTCTCTACCACAGGAGCTTTAATCACAAATGAAAGT

AtWK33 517 AACCGAAAAGGTATAAATGAAGGAGACAAGAGCAACAACAACAACCTTAA  
CrWK33 597 AACACGAAACTTATAAATGAGGGAGAGAAG---AAGGACAACAACATTAA

AtWK33 567 CTTATTTCGATTTCTCATTCCACACACAATCATCAGGAGTTTCTGCTCCGA  
CrWK33 644 CTTCTTCGATTTCTCATTCCAGACACAATCGTCAGGAGTTTCTGCTCCGA

AtWK33 617 CCACAACTACAACACTACAACACTACAACAACAACAACAGTTCTATC  
CrWK33 694 CGACAACAACAACACTACAAC--CAAC-----AACAGTTCTATC

AtWK33 667 TTTCAATCTCAGgtatgtacttcatcaacagc-tcaaatcctctgttat  
CrWK33 729 TTTCAATCTCAGgtatg---ttccttaacagcctcaaatcct---ataat

AtWK33 716 gagtttttctat-----aactttgttttgagttt  
CrWK33 773 cccttttctttcatttgtatttttgttactgaactctgttttgtat

AtWK33 745 cagGAACAACAGAAGAAGAACCCAGTCAGAACAATGGAGCCAAACCGAGAC  
CrWK33 823 cagGAACAACAGAGGAAGAACCAGTCAGATCAATGGAGTCAAAACGAGTC

AtWK33 795 TCGTCCAACAATCAAGCTGTATCTTACAATGGAAGAGAGCAAAGGAAAG  
CrWK33 873 TCGTCAAAACAACCAAGCTGTCTTACAATGGAAGAGAACAAAGGAAAG

AtWK33 845 GAGAGGATGGTTACAATGGAGAAAGTACGGACAAAAACAGGTGAAAGGA  
CrWK33 923 GTGAGGATGGTTACAACCTGGAGAAAGTACGGACAGAAACAGGTGAAAGGA

AtWK33 895 AGTGAGAATCCTCGGAGTTACTATAAGTGTACTTTCCCTAATTGTCCAAC  
CrWK33 973 AGTGAGAACCCTCGGAGTTACTACAAGTGTACTTTCCCTAGTTGTCCAAC

AtWK33 945 GAAGAAGAAAGTGGAGAGATCTTTGGAAGGTCAGATCACAGAGATTGTGT  
CrWK33 1023 GAAGAAGAAAGTGGAGAGATCTTTGGAAGGTCAGATAACAGAGATTGTGT

AtWK33 995 ATAAAGGAAGCCACAACCATCCTAAACCTCAGTCTACTAGAAGATCTTCT  
CrWK33 1073 ATAAGGGAAGCCATAACCATCCCAACCTCAATCCACTAGAAGATCTTCC

AtWK33 1045 TCGTCTTCTTCG---ACTTTTCATTTCAGCTGTGTACAATGCCAGTTTGA  
CrWK33 1123 TCGTCTTCTTCTTCCACTTTTCACTCAGCTGTGTACAATGCCAGTTTAGA

AtWK33 1092 TCATAATCGTCAAGCTTCTTCTGATCAGCCTAATTCCAATAATAGCTTTC  
CrWK33 1173 TCATCATCGTCAAGCTTCTTCTGATCAACCTAATTCCAATAATAGCTTTC

AtWK33 1142 ATCAGTCTGATTCTTTGGGATGCAACAAGAGGATAATACTACTTCTGAT  
CrWK33 1223 ATCACTCTGATTCTTTGCTATGCAACAAGATGATAATACCACTTCTGAT

AtWK33 1192 TCTGTTGGTGACGATGAGTTCGAACAAGGCTCATCGATTGTGACGAGAGA  
CrWK33 1273 TCTGTTGGGAGACGACGAGTTGAAACAAGGCTCATCGATTGTGACGAGAGA

AtWK33 1242 CGAAGAAGATTGTGGGAGTGAACCTGAAGCAAAGAGATGgtacagatcat  
CrWK33 1323 CGAAGAAGATTGTGGAAAGTGAACCTGAAGCAAAGAGATGgttcatatcat

AtWK33 1292 catcacccctccaaatttgc-tactctttgaacaatcttgaatat---ga  
CrWK33 1373 catcgctc-ctatatttgcctactctttgaacaatcttgaataataaaga

AtWK33 1337 aagttotaaaatgtatgtttttttgtgttttcagGAAAGGGGACAATGAA  
CrWK33 1422 aagttotaaaatgtttttgtttattgtgttttcagGAAAGGAGAAAATGAA

AtWK33 1387 ACAAAATGGTGGGAATGGTGGTGGAAAGCAAGACAGTGAGAGAGCCGAGAAT  
CrWK33 1472 ACCAATGGTGGGAATGGTGGTGGAAAGCAAGACAGGGAGAGAGCCTAGAAT

AtWK33 1437 CGTAGTGCAGACAACGAGTGATATTGACATTTCTGACGACGGTTACAGAT  
CrWK33 1522 TGTAGTGCAAAACAACAAGTGATATCGACATTCCTTGATGACGGTTACAGAT

AtWK33 1487 GGAGAAAATACGGCCAGAAAGTCGTTAAGGGAAACCCAAATCCAAGgtaa  
CrWK33 1572 GGAGAAAATACGGCCAGAAAGTCGTTAAGGGAAACCCAAATCCAAGgtaa

AtWK33 1537 -taacataaacaattgtgcatctcaataac-----tcagaattaagg  
CrWK33 1622 ataacataaacatttgtgcttctcaataatcacaattcataatcaagct

AtWK33 1579 tcttgagaatctgacctttt-gttttcttttcatttgctgaatcttaaca  
CrWK33 1672 tcttcagaatctgaccttttgtttccttttcacttgatgaatct-aaca

AtWK33 1628 gAAGCTACTACAAGTGCACAACCATCGGTTGTCCAGTGAGGAAACATGTG  
CrWK33 1721 gAAGCTACTACAAGTGCACAACCATCGGTTGTCCAGTGAGAAAACATGTT

AtWK33 1678 GAGAGAGCATCACACGACATGAGAGCAGTAATCACAACTACGAAGGGAA  
CrWK33 1771 GAGAGAGCATCACATGATATGAGAGCAGTAATCACAACTACGAAGGGAA

AtWK33 1728 ACACAACCACGATGTTCTGCAGCTCGTGGTAGCGGTTACGCCACAACA  
CrWK33 1821 ACACAACCACGATGTACCTGCAGCTCGTGGTAGTGGTTACGCCACAACA

AtWK33 1778 GAGCACCACAGGATTCGTCTTCAGTCCCGATTAGACCAGCTGCTATTGCT  
CrWK33 1871 GAGCGCCACAGGATGCTTCTTCAGTCCCAATCAGACCAGCTGCTATTGCT

AtWK33 1828 GGTCACTCCAACACTACTACTTCTTCTCAAGCACCATATACACTTCAGAT

---

---

CrWK33 1921 **GGCCACTCCA**ACTCCACTACTTCTTCCCCAGCACCATATACTCTTCAGAC

AtWK33 1878 **GCTGCACAACAACA**ACTAATA-----CCGGGCCTTTTGGTTACGCCA  
CrWK33 1971 **GCTGCACAACAACA**ACCACAGTACTGCCAGG--TCTTGGTTACGCTA

AtWK33 1922 **TGAACAACAATAACAACA**ACAG-----CAACCTTCAAACGCAACAAAAC  
CrWK33 2019 **CGA-CAACAATAACAACA**CAATAATAACAACCCTCAAACGCTACAAAAC

AtWK33 1966 **TTTGTGGTGG**---TGGATTCTCTAGAGCAAAGGAACCAAACGAGGA  
CrWK33 2068 **TGTGTGTGGCGATGCGT**TCTCTAGAGCAACGGAAGAACCAAACGAGGA

AtWK33 2013 **GACCTCATT**TTTCGATTTCGTTTATGCCCTGA  
CrWK33 2118 **GACCTCATT**CTTCGACTCGTTTATGCC

## Vergleich der orthologen 5'Promotor-Bereiche von WRKY10 aus *Capsella rubella*, *Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum*

Die Sequenzen wurden mit dem Programm GAP des GCG-Programmpaketes der Genetics-Computer-Gruppe der Universität Madison (Wisconsin) verglichen und von Hand editiert. Zueinander ähnliche Bereiche wurden mit MEME/MAST und GIBBS-Sampling gefunden und grau hinterlegt. Die putative TATA-Box ist unterstrichen.

CrWRKY10p	A-A-AA-T-GGTTATTT-TAATAGGATTT-AAA--TTGGCCATCTACATTA-GAAATTAG	1416
AtWRKY10p	C-A-CA-TTGA--AGTT-TAA-ATGATTTTAAA--T---CAT--A-ATTAAGAAATTAA	1526
LeWRKY10p	GGAGAAGT-GA--AGGAATGACATGTTTTTACACCT--GCCCT--AGATCA--AAATTA- * * * * *	1394
CrWRKY10p	TG-TTTTAC--AAT-TAA--A-TCTA-GT--AT-TCTATT---CTATTATATA---T---	1456
AtWRKY10p	AA-T--TAC--AAC-AAA--AGTTT--GT--ATAT-TGTTT--CTCTTA-ATA---T---	1564
LeWRKY10p	TGCTTTTGTGGAATGTAATTAATTTGTGTCTAT-TTTGTTTTCTT-TTG-ATGGCTTTT * * * * *	1451
CrWRKY10p	---ATA-TATA--TATATATAT-AT--A----TATAT-GTATATAG--C--A-TATGAT-	1496
AtWRKY10p	---ATA-CAAAA-TACATAAAT-GTG-A----AAAATTGAAAACAAAACCGAGTTTGGTT	1613
LeWRKY10p	TTGATAACAAAAGTA-A-AAATGATGGAGGGGTATAT-GTGAGTA--CT-GTTATGCT- *** *	1503
CrWRKY10p	-A-ATCT-CATCA-----TGCATCTCT--AC--AA--A--AAA--AAACAAAAA---AA	1534
AtWRKY10p	CATAT-T-CATTAGTCTTTG-GTTTTTT-CTTAA--ACCGAACCGAAGTAGAAACCTAA	1667
LeWRKY10p	---GT-TGTATC---C--TG-ATTCCTTGATTTGATGAC--AATCTGAG-GGGAATCTTA * * * * *	1550
CrWRKY10p	A-AAAGGA---GGAGAAAGAAG--AA--AA-TTAAAAACACA--TTAGGGAT--TATGAC	1582
AtWRKY10p	ACAAA--ATTTGGA-AAATA-G--AG--A-TTAAAAAACCTCTTTAGGGAT--TGCTGAC	1716
LeWRKY10p	GTAG---CTCGTTAGTTG-GTTGGCTACTTGAG---CT--TT---GATCTTGTGTGGT * * * * *	1596
CrWRKY10p	-A-C-TTGGATG-----AC---GAAAGT---TTGACC-ATTAAAAGTGT-ACCATAAATA	1627
AtWRKY10p	-A-CATTGGATG-----AC---GAAAGT---TTGACC-ATAAAAATTGTT-ACCA-AATT	1761
LeWRKY10p	GAGTGTGGATGCTCACCTTGTAA-TCCCCTCCCTATCCCAA--T-TTGA--A-AATA * * * * *	1649
CrWRKY10p	AAAA--GGCAA--CGA-A--A-TT--TA-G-A--AT--ATA-AGACACCATCATCAT-C	1669
AtWRKY10p	AAAA-TGGTTA--C-A-A--ACTT--T--G-CT-AT--ATA-AGA-C-CCATAT-ATTC	1802
LeWRKY10p	AAAAATGGTAATCCAAGAGTAGTTCGTGTGCTGGTGGATATAGAGG--AG-A--AT-T *** *	1703
CrWRKY10p	-ATCATATGCAA--CAC--CCCATTGTGT-ATTCTT-CTTCTTCTCTCGTT-TCCGG-	1720
AtWRKY10p	-CTCCTATGCAATACACATCCC-CTCTGT-ATTCTT-CTT-----TCATT-T---G-	1845
LeWRKY10p	GATTA-ATGGAG---AGG-TTGTTT-TGAGATCTTTGCTC-----T-ATTAT---AT * * * * *	1745
CrWRKY10p	CTAGCTAGC-TTCTCCCTCTCAAGAACCAAAATAAAAAAATAAGGGTTTCTCTCT---T	1776
AtWRKY10p	CT-GCTAGCGTT--T---TCT---G-----AAGAAAAA-----GGTTTATCCTC---T	1881
LeWRKY10p	CTGGG-AGAATC--T---ACT---G---T---AAGAATAA-----GTT-A-CCTTAGAT * * * * *	1782
CrWRKY10p	--TTAC-A-T---CTAAGATTAA-T-T-TCATTAATTTACA-AA-TCA-TTTTCTAA--T	1821
AtWRKY10p	--T-AT-A-T---CTA---TTAA-T-T---AT--GT---C---A-TTA-TTT-C-AA--T	1911
LeWRKY10p	GATTATGAGTGGAC-A-G-CTAAGTGTCTTAT--GT---CGGAAGT-AGTTT-T-AACGT * * * * *	1831
CrWRKY10p	TCTAA--ATC--TCACAAAGTTT-TCACATAATTGTGTTTCTTGACATCT--TAGG-GA	1873
AtWRKY10p	---A--AT-----TT-----ACTAAT-----CAT-T--T---GA	1929
LeWRKY10p	CTCGAGTATCATTC-CTCC-TTTGTCA <u>TTATTA</u> --AAA-----AGCAC-TCATAAAAGA * * * * *	1880
CrWRKY10p	-TTTCTCCTTTTATATCTATCATATTTC-A-T-CAAT--TTA <b>CAAACTAT</b> ---TATTGA	1925
AtWRKY10p	-TT-----CTA-----A-----A-T-C-----T <b>CAAA--AT--TAT</b> ---	1948
LeWRKY10p	GTT-----GT-TTTA--A--AT--ACTGTAGTGGTT-TAGA--ATCTTTGT-GG * * * * *	1918
CrWRKY10p	TTCTGAATCTCACAAAAT--T--TCACTC-TCACCA-ATATTGGGTTT--C--TTGACA	1975
AtWRKY10p	-----CAC-----TT--T--T-ACAC-T-A--G-ATTTT--GTTT--C--TTGACA	1978
LeWRKY10p	CTTTATAT-TCAT---TTCGTGCT-ACTCCTCATTGCA-GTTA-ATTTGGCGTTTGA-G * * * * *	1969
CrWRKY10p	T--CTTTTAGGG-ATT--TCTTCAA-AA---ATG	2000
AtWRKY10p	T--CC--TAAGG-ATT--TGT-CAA-AA---ATG	2000
LeWRKY10p	TTGCT--CATGATACTAGTAT-CAACAATTGATG * * * * *	2000

---

**Ich versichere, daß ich die vorliegende 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 abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. K. Hahlbrock betreut worden.**

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

**Kolukisaoglu, H.U., Bovet, L., Klein, M., Eggmann, T., Geisler, M., Wanke, D., Martinoia, E. und B. Schulz (2002):** Family business: the multidrug-resistance related protein MRP) ABC transporter genes in Arabidopsis thaliana. *Planta* 216 (1): 107-119.

Weitere Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

**Santi, L., Wang, Y., Stile, M. R., Kenneth Berendzen, K., Wanke, D., Roig, C., Pozzi, C., Mueller, K., Salamini, F. und W. Rohde (2003):** The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates to the transcriptional regulation of selected plant homeobox genes. *submitted to The Plant Journal*

---

---

## Lebenslauf

Name, Vorname	Wanke, Dierk
Geburtsdatum, -ort	13.01.1971 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Roswitha Lersch, geb. Joeken, Fotolaborantin Jürgen Wanke, Service Engineer
Geschwister	Sven Bayer, Student der Ethnologie

## Schulausbildung

1977 - 1981	Gemeinschaftsgrundschule „Martin Luther“, Düren
1981 - 1991	„Städt.Gymnasium am Wirteltor“ in Düren / Erlangung der allgemeinen Hochschulreife ( Abitur ) dort am 30.06.1991

## Ausbildung / -Berufserfahrung

1991 - 1992	Zivildienst in der Sozialstation des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) in Düren einschließlich Ausbildung zum Krankenpflegerhelfer
Jan.-Sept.1993	Krankenpflegerhelfer beim DRK in Düren ( anschließend bis Sept.1998 Aushilfstätigkeit dort )
Okt.1993 – Mai 1999	Studium der Biologie an der Universität zu Köln mit den Studienfächern: <u>Botanik</u> , Zoologie und Biochemie. Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Burkhard Schulz unter Prof. Dr. Ulf Ingo Flügge im Fach Botanik.  Der Titel der Diplomarbeit lautet: „ <i>Morphologische und physiologische Untersuchung der twisted dwarf-Mutanten aus Arabidopsis thaliana</i> “
Juni – Okt.1999	angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in der AG Schulz
ab Nov. 1999	Promotion in der Abteilung von Prof. Dr. Hahlbrock und Dr. Paul Schulze-Lefert am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln.

---