

Biologikum Weihenstephan
Lehrstuhl für Botanik
Technische Universität München

Signaltransduktion des Phytohormons Abscisinsäure:
Rolle der nukleären Lokalisation der Proteinphosphatase ABI1

Danièle Moes

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 7. September 2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 6. November 2006 angenommen.

Hoffnung ist nicht die Überzeugung, dass etwas gut ausgeht, sondern die Gewissheit, dass etwas Sinn hat, egal wie es ausgeht.

Václav Havel

*Fir méng Elteren,
well sie genee richtig sin.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Zusammenfassung.....	3
Summary.....	4
1. EINLEITUNG	5
1.1. Phytohormone	5
1.2. Abscisinsäure: Wirkung und Signaltransduktionsmechanismen.....	6
1.2.1. Biosynthese von Abscisinsäure in <i>Arabidopsis</i>	8
1.2.2. Signaltransduktion von Abscisinsäure	9
1.2.3. Bewegungen des Spaltöffnungsapparates unter dem Einfluss von Abscisinsäure	10
1.2.4. Phosphorylierung und Dephosphorylierung innerhalb der ABA- Signalkaskade	13
1.2.5. Regulation der Genexpression durch Abscisinsäure	18
1.2.6. Funktion der HD-Zip-Transkriptionsfaktoren.....	21
1.2.7. Interaktion zwischen der Proteinphosphatase ABI1 und dem HD-Zip Transkriptionsfaktor ATHB6	23
1.3. Transiente Expression	23
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. Chemikalien	26
2.2. Oligonukleotide	26
2.3. Anzucht von Pflanzenmaterial.....	26
2.3.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	26
2.3.2. Sterilisation und Sterilkultur von <i>Arabidopsis</i> -Samen	27
2.3.3. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellsuspensionskultur	28
2.4. Mikroorganismen.....	29
2.4.1. <i>E. coli</i> -Bakterienstämme.....	29
2.4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme	30
2.4.3. Anzucht von Mikroorganismen	30
2.4.4. Herstellung kompetenter Zellen.....	31
2.4.5. Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA	32
2.5. DNA-Techniken.....	33
2.5.1. Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.5.2. Plasmid-Isolierung aus Mikroorganismen (<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>)	36

2.5.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen.....	39
2.5.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.5.6.	Glätten von Einzelstrang-DNA Überhängen (Klenow-Reaktion).....	41
2.5.7.	Dephosphorylierung geschnittener DNA	41
2.5.8.	Gelextraktion	42
2.5.9.	DNA-Gelelektrophorese	42
2.6.	RNA-Techniken.....	43
2.6.1.	RNA-Isolation aus <i>Arabidopsis</i> -Schüttelkulturen	43
2.6.2.	RNA-Isolation aus auf Platten angezogenen <i>Arabidopsis</i> - Keimlingen.....	44
2.6.3.	Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen	44
2.6.4.	Reverse Transkription von RNA und RT-PCR.....	45
2.7.	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>-Pflanzen	46
2.7.1.	Auswahl geeigneter <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen für die Transformation .	46
2.7.2.	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> für die „floral dip“ Transformation	47
2.7.3.	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen	48
2.8.	Transiente Expression in <i>Arabidopsis</i>-Protoplasten	49
2.8.1.	Protoplastierung von <i>Arabidopsis</i> -Blattmaterial	49
2.8.2.	Transfektion und Kultivierung der Protoplasten.....	51
2.8.3.	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	52
2.9.	Aktivitätsnachweis von Reportergenen.....	53
2.9.1.	Messung der <i>in vivo</i> β -D-Glucuronidase-Aktivität in <i>Arabidopsis</i> - Protoplasten	53
2.9.2.	Histochemischer Nachweis der <i>in vivo</i> β -D-Glucuronidase-Aktivität in <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen und <i>Arabidopsis</i> -Zellkulturen	54
2.9.3.	Nachweis der <i>Photinus pyralis</i> Luciferase-Aktivität in <i>Arabidopsis</i> - Keimlingen, -Protoplasten und –Zellkulturen	56
2.9.4.	Untersuchung von GFP- bzw. YFP-Fluoreszenz in <i>Arabidopsis</i> - Protoplasten und –Keimlingen durch Epifluoreszenz-Mikroskopie .	57
2.9.5.	Kernfärbung in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten und –Keimlingen	58
2.10.	Konfokale Mikroskopie.....	58
2.10.1.	Verwendete Laser	58
2.10.2.	Objektive	59
2.10.3.	Vorbereitung der Präparate und Zeitserien	59
2.10.4.	Markierung der Zellmembranen in <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln.....	59
2.11.	Proteinmengen-Bestimmung nach Bradford.....	60
2.12.	Ermittlung von Sauerstoff-Konzentrationen in Flüssigkultur- Überständen	60

3. ERGEBNISSE.....	63
3.1. Funktionelle Analyse eines Kernlokalisierungssignals in ABI1/abi1..	63
3.1.1. Herstellung deletierter und mutierter Versionen eines potenziellen ABI1/abi1 Kernlokalisierungssignals.....	63
3.1.2. Cotransfektion von ABA-regulierten Reportersystemen und ABI1-Effektor-Konstrukten.....	65
3.1.3. Auswirkung eines inaktivierten NLS-Motivs auf die ABI1/abi1 Funktion bei der Regulation ABA-induzierter Genexpression.....	67
3.1.4. Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen zur Lokalisierung von ABI1 und abi1 in Abhängigkeit des NLS-Motivs.....	69
3.1.5. Subzelluläre Verteilung von GFP-ABI1 und GFP-abi1 in Abhängigkeit des NLS-Motivs.....	71
3.1.6. Einfluss verschiedener GFP-ABI1- und GFP-abi1-Fusionen auf die Regulation ABA-induzierter Genexpression.....	73
3.1.7. Einfluss verschiedener GUS-ABI1- und GUS-abi1-Fusionen auf die Regulation ABA-induzierter Genexpression.....	76
3.1.8. Physiologische Charakterisierung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen mit GFP-ABI1/abi1- bzw. GUS-ABI1/abi1-Überexpression.....	79
3.1.9. Lokalisation der Fusionsproteine GFP-ABI1 und GFP-abi1 in stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	85
3.1.10. Lokalisation der Fusionsproteine GUS-ABI1 und GUS-abi1 in stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	92
3.1.11. Effekt von GUS-abi1- und GUS-abi1dNLS-Fusionen auf die Transkription ABA-induzierter Gene in transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	93
3.2. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer in <i>Arabidopsis</i>-Zellsuspensionskultur: Etablierung eines transienten Expressionssystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion.....	99
3.2.1. Optimierung der Agrobakterien-vermittelten Transfektion von <i>Arabidopsis</i> -Zellsuspensionskulturen.....	100
3.3. Funktionelle Analyse des Abscisinsäure-regulierten <i>AtHB6</i>-Promotors: Deletionsstudie in transgenen Pflanzen.....	118
3.3.1. Klonierung von 5'-deletierten <i>ATHB6::LUC</i> -Fragmenten in den binären Vektor pPCV812Meshi- <i>c-myc-LUC</i> und Generierung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	118
3.3.2. Untersuchung transgener pPCV812Meshi <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>c-myc-LUC</i> -Pflanzen.....	121
3.3.3. Klonierung neu konstruierter <i>ATHB6</i> -Promotor(Δ 1-7)- <i>LUC</i> -Fragmente in den binären Vektor pBI121 <i>LUC</i> und Generierung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	126
3.3.4. Untersuchung transgener pBI121 <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i> -Pflanzen.....	128
3.4. Identifizierung von <i>in vivo</i> Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors <i>ATHB6</i> über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation.....	134
3.4.1. Klonierung potenzieller Interaktionspartner in pflanzenkompatible YFP-Fusionsvektoren.....	135

3.4.2. Visualisierung von <i>in vivo</i> Interaktionen im transienten Protoplasten-System	137
4. DISKUSSION.....	141
4.1. Die Funktion von ABI1 und abi1 bei der Modulation der ABA-Signaltransduktion	141
4.2. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer in pflanzliche Zellkultur:..... Ein Modellsystem für transiente Expressionsstudien?	155
4.4. Untersuchung von <i>in vivo</i> stattfindenden Interaktionen zwischen Komponenten des ABA-Signalnetzwerkes über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation.....	170
5. ANHANG	174
5.1. Oligonukleotide	174
5.2. Sequenz des <i>ATHB6</i>-Gens aus <i>Arabidopsis</i> (Ökotyp Columbia) mit Positionen der <i>ATHB6</i>-Promotor-Primer ($\Delta 1$-$\Delta 7$) zur Erzeugung von <i>ATHB6</i>-Promotor-Deletionsfragmenten.....	177
5.3. Plasmide und ihre Registrierung in der Stammsammlung.....	179
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	181

Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
ABI/abi	Abscisinsäure-insensitiv
Abb.	Abbildung
ABRC	ABA-Respons-Komplex
ABRE	ABA-Respons-Element
Amp	Ampicillin
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
ATHB	<i>Arabidopsis thaliana</i> Homöobox Leucin-Zipper
ATHBΔ	ATHB6-Promotordeletionsfragmente
APS	Ammoniumper(oxodi)sulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAP	6-Benzylamino-9-methylpurin
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (engl.: <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>coupling element</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
d	Tag
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyssäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alius</i> , lateinisch für: "und andere"
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung 1 g = 9,81 m/s ²
gca	<i>growth control exerted by ABA</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
HD	Homöodomäne
Hyg	Hygromycin
IAA	Indol-3-Essigsäure
InsP ₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
InsP ₆	Inositol-Hexakisphosphat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
La-er	<i>Arabidopsis</i> Ökotyp <i>Landsberg erecta</i>
LB	Luria-Bertani-Bakteriennährlösung
LN ₂	flüssiger Stickstoff (- 196 °C)

LTI	<i>low temperature induced</i>
LUC	Luciferase
M	mol/l
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MeOH	Methanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger RNA</i>)
MS	Murashige und Skoog-Medium
MUG	4-Methylumbelliferon- β -D-glucuronid
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
Nos	Nopalinsynthase
OD	Optische Dichte
Ori	<i>origin of replication</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPase	Phosphatase
PP2C	Protein Phosphatase der Klasse 2C
RAB	<i>regulated by abscisic acid</i>
RD	<i>responsive to desiccation</i>
Rif	Rifampicin
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (thermophiler Prokaryont)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Ter	Terminator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	nicht-translatierte Region
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp
X-GlucA	engl.: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, cyclohexyl ammonium salt
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung sowie der Adaptation an Wasser-, Salz- oder Kältestress werden durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung eines Schlüsselregulators der ABA-Signaltransduktion, der PP2C Phosphatase ABI1, und ihres Interaktionspartners, des HD-Zip Transkriptionsfaktors ATHB6.

In *Arabidopsis*-Protoplasten wurde über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen ATHB6 und ATHB7 sowie die ATHB6-ABI1-Wechselwirkung beobachtet.

Anhand transient transformierter *Arabidopsis*-Protoplasten und stabiler *Arabidopsis*-Überexpressionslinien erfolgte die funktionelle Analyse eines Kernlokalisierungssignals (NLS) des als negativer Regulator der ABA-Signalkaskade fungierenden ABI1- bzw. punktmutierten *abi1*-Proteins. Sowohl die negative Wirkung von ABI1 und *abi1* auf die Induktion ABA-abhängiger Promotoren (*RD29B*, *RAB18*), als auch die in transgenen Reporterfusionslinien durch ABI1 bzw. *abi1* vermittelte ABA-Insensitivität bei physiologischen Prozessen (Keimung, Wurzelwachstum, Stomataregulation) sind direkt von der Funktionalität des untersuchten NLS-Motivs abhängig. Subzelluläre Lokalisationsstudien bei *35SS1::GFP-ABI1*- und *35SS1::GFP-abi1*-Reporterlinien ließen auf eine verstärkte nukleäre Akkumulation von GFP-*abi1* gegenüber GFP-ABI1 in Schließzellen, Zellen des Wurzelmeristems und der Wurzelepidermis schließen. Die präferentielle nukleäre Akkumulation der mutierten PP2C Phosphatase bildet eine neue Erklärungsgrundlage für den dominanten ABA-insensitiven *abi1*-Phänotyp.

Der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer in *Arabidopsis*-Zellkulturen wurde zur Untersuchung transienter Expressionsstudien optimiert. Allerdings konnte die Analyse des ABA-abhängigen *ATHB6*-Promotors aufgrund ABA-prä-induzierender Bedingungen des Systems nicht erfolgen. Die Deregulation induzierbarer Promotor-Konstrukte ist direkt mit deren agrobakteriellen Transfer in die Pflanzenzelle verbunden und lässt erstmals das Zusammenwirken bisher unbekannter pflanzlicher und agrobakterieller Mechanismen bei der Regulation der T-DNA-Genexpression erkennen.

Summary

The plant hormone abscisic acid (ABA) is involved in plant development as well as in adaptation processes to drought, high salt or water stress. The focus of this work lies on the characterisation of the PP2C phosphatase ABI1, a key regulator in ABA signalling, and its interaction partner ATHB6, an HD-Zip transcription factor.

In *Arabidopsis* protoplasts, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was used to detect homo- and heterodimerisation of transcription factors ATHB6 and ATHB7 and to confirm the ATHB6-ABI1 interaction *in vivo*.

In addition, functional analysis of a putative ABI1 nuclear localisation signal (NLS) performed in transiently transformed *Arabidopsis* protoplasts as well as in stable *Arabidopsis* overexpressing lines revealed strong dependence on the NLS functionality for the negative regulatory ABI1 function on ABA-dependent promoter activation (*RD29B*, *RAB18*) as well as on ABA-regulated physiological processes (germination, root growth or stomata regulation).

Studies on subcellular localisation of ABI1 and *abi1* reporter fusions display a stronger nuclear accumulation for GFP-*abi1* than for GFP-ABI1 in guard cells, epidermal root cells and root meristem cells of *35SS1::GFP-abi1* lines. The preferential nuclear localisation of the mutated PP2C phosphatase might provide a new explanation for the dominant ABA-insensitive phenotype of *abi1*-plants.

The agrobacteria dependent gene transfer into *Arabidopsis* cell suspension culture was optimised as a transient transformation system. However, the regulation of ABA-inducible *ATHB6* promoter could not be analysed due to the ABA-pre-inducing conditions of the system. The de-regulation of inducible promoter constructs is directly linked to their T-DNA transfer process and thereby gives a novel insight into a network of unknown plant and agrobacterial mechanisms that mediate the regulation of T-DNA gene expression.

1. Einleitung

1.1. Phytohormone

Pflanzen müssen aufgrund ihrer Ortsgebundenheit flexibel auf lokale Umweltbedingungen wie Schwerkraft, Licht, Wasser, Nährstoffe oder Pathogene mit Veränderungen in der Physiologie, zum Beispiel beim Wachstum, reagieren. Phytohormone sind wesentlich für die Steuerung und Koordination des pflanzlichen Wachstums sowie für die Adaption an wechselnde Umweltbedingungen: als pflanzeneigene organische Verbindungen, welche in niedrigen Konzentrationen wirken, integrieren sie extrazelluläre Signale in die endogenen Entwicklungsprozesse der Pflanze.

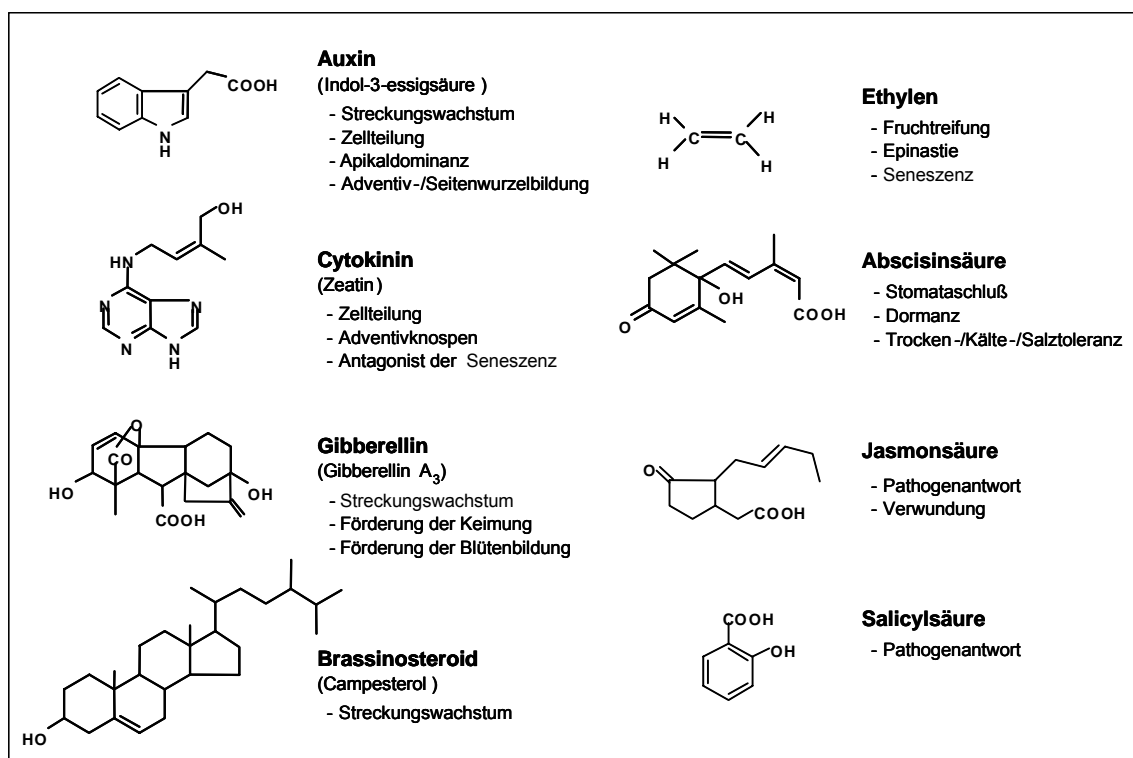


Abb. 1.1.: Struktur und Funktion von Pflanzenhormonen (verändert nach Iten *et al.*, 1999).

Pflanzenhormone werden oft unterteilt in die vorwiegend wachstumsfördernden Regulatoren Auxine, Cytokinine, Gibberelline und Brassinosteroide sowie in die wachstumshemmenden Substanzen Ethylen, Abscisinsäure, Jasmonsäure und Salicylsäure (Iten *et al.*, 1999).

Neben den hier aufgezählten niedermolekularen Substanzen (s. Abb. 1.1.), welche alle aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel hervorgehen, werden mittlerweile auch Peptide zu den Phytohormonen gezählt. So spielen beispielsweise die aus 18 Aminosäuren bestehenden Systemine eine wichtige Rolle bei der Wundsignaltransduktion in Tomate und Tabak (Ryan and Pearce, 2003).

Für die physiologische Wirksamkeit der Hormone ist meist nicht die absolute Konzentration entscheidend, sondern das Mengenverhältnis der einzelnen Phytohormone zueinander, da sie meistens nicht alleine wirken, sondern im engen wechselseitigen Zusammenspiel die pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozesse auslösen, hemmen oder fördern. Ethylen und Abscisinsäure interagieren beispielsweise bei der Regulation der Samendormanz (Beaudoin et al., 2000) sowie bei der Steuerung des Wurzel- und Sprosswachstums infolge von Wasserstress (Sharp and LeNoble, 2002). Um die genauen Zusammenhänge der von Phytohormonen gesteuerten Mechanismen verstehen zu können, bedarf es einer näheren Untersuchung der verschiedenen hormonellen Signaltransduktionswege. Als Signaltransduktion wird die Summe der Prozesse bezeichnet, mit deren Hilfe Zellen eine Art von Signal oder Stimulus in eine physiologische Reaktion umwandeln (Chory and Wu, 2001).

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Komponenten der Abscisinsäure-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert werden sollen, werden im Folgenden Abscisinsäure-abhängige physiologische Prozesse sowie das komplexe Signalübertragungsnetzwerk, das für die Steuerung solcher Prozesse verantwortlich ist, näher beschrieben.

1.2. Abscisinsäure: Wirkung und Signaltransduktionsmechanismen

Abscisinsäure (ABA) ist ein monozyklisches Sesquiterpen (s. Abb.1.1), dessen Name darauf beruht, dass die Substanz in hohen Konzentrationen in abgeworfenen Baumwollblättern gefunden wurde (Ohkuma et al., 1963). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die durch Applikation von ABA auf Blatt- und Fruchstiele hervorgerufene Abscission nicht direkt durch ABA

hervorgerufen wird, sondern durch eine von ihr hervorgerufene Ethylen-Freisetzung (Jackson and Osborne, 1972).

Abscisinsäure reguliert zahlreiche Prozesse der pflanzlichen Entwicklung, zu denen unter anderem die Samen- und Embryoentwicklung zählen. In frühen Stadien der Embryogenese fördert Abscisinsäure neben dem embryonalen Wachstum die Bildung von Speicherproteinen und -lipiden, während sie in der späten Embryogenese sowohl die Weiterentwicklung des Embryos als auch die Keimung hemmt und die Dormanz der Samen fördert (Finkelstein et al., 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005). Zudem fördert endogenes ABA in Abwesenheit von Stress das Wachstum von Keimlingen, während exogen verabreichte Abscisinsäure wachstumshemmend wirken kann (Cheng et al., 2002).

Des Weiteren spielt ABA für die Pflanze eine wichtige Rolle bei der Adaptation an Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel Trockenheit, Kälte oder Salzstress (Leung and Giraudat, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Bei Wassermangel hemmt ABA die Akkumulation von Ethylen und kann somit Wurzel- und Sprosswachstum fördern (Spollen et al., 2000; Sharp, 2002). Zusätzlich bewirkt die bei Trockenstress in den Blättern ansteigende Konzentration an ABA die Schließung der Spaltöffnungen und reduziert so die stomatäre Transpiration (Schroeder et al., 2001). Auf die Funktion von ABA bei der Steuerung des pflanzlichen Wasserhaushaltes wird später näher eingegangen (siehe Abschnitt 1.2.4.).

Da über die Zusammenhänge der an der ABA-Signaltransduktion beteiligten molekularen Mechanismen erst relativ wenig bekannt ist, wurden verschiedene experimentelle Systeme etabliert um die einzelnen ABA-gesteuerten physiologischen Prozesse näher zu untersuchen.

Eine Möglichkeit, um die an der ABA-Signalkaskade beteiligten Proteine zu identifizieren, ist die genetische Analyse des Signaltransduktionsweges. Diese erfolgt über die Untersuchung von Mutanten. Es werden zwei wesentliche Gruppen von Mutanten unterschieden: die erste Gruppe umfasst Pflanzen, bei denen die ABA-Biosynthese gestört ist und deren mutierter Phänotyp durch exogene ABA-Applikation aufgehoben werden kann. Die zweite Gruppe von

Mutanten weist Defekte in der Erkennung oder Weiterleitung des ABA-Signals auf (Finkelstein et al., 2002). Diese Störungen können ähnlich pleiotrope Phänotypen hervorrufen wie die Mutationen innerhalb der ABA-Biosynthesekette, eine Kompensation durch exogenes ABA ist jedoch bei dieser zweiten Gruppe von Mutanten nicht möglich. Die zweite Gruppe mutierter Pflanzen wird in ABA-insensitive, zum Beispiel *abi1-abi5* und *abi8* (Koornneef et al., 1984; Finkelstein, 1994; Lopez-Molina and Chua, 2000; Brocard-Gifford et al., 2004) oder *gca1-gca8* (Himmelbach et al., 1998; Allen et al., 2001) und ABA-hypersensitive Mutanten wie *era1* oder *abh1* (Pei et al., 1998; Hugouvieux et al., 2001) unterteilt .

1.2.1. Biosynthese von Abscisinsäure in *Arabidopsis*

Hauptbildungsort von Abscisinsäure sind, neben den in den Blättern lokalisierten Schließzellen, Zellen der Wurzeln und des Leitgewebes (Christmann et al., 2005; Nambara and Marion-Poll, 2005).

Während in Pilzen, wie zum Beispiel *Cercospora rosicola*, die Bildung von Abscisinsäure über Mevalonat-Biosynthese aus einem Sesquiterpen erfolgt (Hirai et al., 2000), erfolgt die ABA-Biosynthese in *Arabidopsis*-Pflanzen über die Bildung der ABA-Vorstufe Xanthoxin aus Carotenoiden, die aus dem plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Syntheseweg hervorgehen und somit unabhängig vom cytosolischen Mevalonat-Syntheseweg gebildet werden (Arigoni et al., 1997; Lichtenthaler et al., 1997). Die C₁₅-Verbindung Xanthoxin entsteht durch die oxidative Spaltung der C₄₀-Epoxy-carotenoide 9-*cis*-violaxanthin und 9'-*cis*-neoxanthin durch die plastidär lokalisierte 9'-*cis*-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED). Die C₁₅-Verbindung wird anschließend ins Cytosol transportiert und in Abscisin-Aldehyd umgewandelt. Als letzter Schritt in der ABA-Biosynthese erfolgt die Oxidation von Abscisin-Aldehyd zur Abscisinsäure, welcher durch die Molybdän-abhängige Abscisin-Aldehyd Oxidase 3 (AAO3) erfolgt (Christmann et al., 2006). Die Inaktivierung von Abscisinsäure erfolgt über oxidativen Abbau zu Phaseinsäure und Dihydrophaseinsäure oder über die Bildung von ABA-Glucose-Konjugaten (Koiwai et al., 2004; Christmann et al., 2005; Nambara and Marion-Poll, 2005).

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der ABA-Biosynthesekette haben die *Arabidopsis*-Mutanten *aba1*, *aba2* und *aba3* geleistet. Sie blockieren jeweils unterschiedliche, an der Bildung von ABA beteiligte Reaktionen (Koornneef et al., 1982; Léon-Kloosterziel et al., 1996). Während ABA1 im Xanthophyll-Zyklus als Zeaxanthin Epoxidase die Oxidation von Zeaxanthin zu Violaxanthin katalysiert (Barrero et al., 2005), greifen ABA2 und ABA3 erst spät in die Bildung von Abscisinsäure ein. ABA2 sorgt als kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase für die Bildung von Abscisin-Aldehyd (Cheng et al., 2002; Gonzalez-Guzman et al., 2002), während ABA3 als Sulfurase an der Bildung eines Molybdän Co-Faktors beteiligt ist, welchen die für den letzten Schritt der ABA-Synthese verantwortliche Abscisin-Aldehyd Oxidase AAO3 benötigt (Seo et al., 2000; Xiong et al., 2001). Die *aba*-Mutanten kennzeichnen sich durch eine nur schwach ausgeprägte Samendormanz und weisen aufgrund der gestörten Stomataregulation deutliche Welkerscheinungen auf. Zusätzlich ist die Expression ABA-regulierter Gene gestört. Diese Merkmale des ABA-defizienten Phänotyps können durch exogene ABA-Applikation aufgehoben werden.

1.2.2. Signaltransduktion von Abscisinsäure

Die Steuerung hormonregulierter Prozesse erfolgt durch ein Netzwerk aus Signaltransduktionskaskaden, welche je nach Entwicklungsstadium, Organ- oder Zelltyp stark variieren können (Finkelstein, 2006). Die Regulation der zahllosen ABA-gesteuerten Vorgänge beginnt mit der Signalperzeption, welche durch Rezeptorproteine erfolgt. Modelle, die membrangebundene oder lösliche ABA-Rezeptoren postulieren, konnten bislang nicht endgültig bestätigt werden. Neben der Identifizierung ABA-bindender Regionen in cytosolischen Proteinfractionen aus Äpfeln (Zhang et al., 2001) wurde als bisher einziger ABA-Rezeptor das in die Infloreszenzbildung von *Arabidopsis* eingreifende RNA-Bindeprotein FCA beschrieben (Razem et al., 2006). Zahlreiche intrazelluläre Faktoren sind an der Weiterleitung und Modulation des durch die Rezeptormoleküle empfangenen ABA-Signals beteiligt. Neben kleinen und heterotrimeren G-Proteinen erfüllen hierbei die sogenannten *second*

messengers wie Ca^{2+} , cADPR, InsP_3 , InsP_6 , und Diacylglycerolpyrophosphat wichtige Funktionen (Schroeder et al., 2001; Zalejski et al., 2005), aber auch Faktoren wie Redox-Status oder pH-Wert (Brault et al., 2004; Bright et al., 2006), Proteinkinasen und Proteinphosphatasen übernehmen zentrale Rollen im Netzwerk der ABA-Signaltransduktion (Fedoroff, 2002). Auf die Funktionen der einzelnen Komponenten innerhalb der ABA-Signalkaskade soll am Beispiel des Abscisinsäure-regulierten Stomataschlusses näher eingegangen werden.

1.2.3. Bewegungen des Spaltöffnungsapparates unter dem Einfluss von Abscisinsäure

Abscisinsäure-abhängige Vorgänge lassen sich in schnelle und langsame Reaktionsabläufe einteilen, wobei die schnellen Antworten hauptsächlich auf Änderungen von Ionenflüssen zurückzuführen sind, während die langsamen Reaktionen auf differenzierter Genexpression beruhen. Zu den am besten erforschten schnellen Reaktionen auf ABA gehört der Stomataschluss.

Stomata regulieren über ihre beiden Schließzellen die CO_2 -Aufnahme sowie die Wasserabgabe über Transpiration in die Atmosphäre. Die Steuerung der stomatären Bewegungen erfolgt in der Regel über einen ABA-abhängigen Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels sowie durch das daran gekoppelte Zusammenspiel mehrerer Ionenkanäle in Plasmalemma und Tonoplast (MacRobbie, 2000). Zuerst wird das ABA-Signal von Rezeptormolekülen auf die im Plasmalemma lokalisierten und ins Cytosol gerichteten Calciumkanäle übertragen. Dieser Signaltransfer wird einerseits durch das Zusammenspiel membranassoziierter Proteinkinasen und deren Antagonisten, den Proteinphosphatasen, kontrolliert (Himmelbach et al., 2003), andererseits über einen Farnesyltransferase-abhängigen Prozess gesteuert. So zeigen beispielsweise rezessive *era1*-Mutanten aufgrund eines Defekts im für die β -Untereinheit einer Protein-Farnesyltransferase codierenden *ERA1*-Gen ein ABA-hypersensitives Verhalten beim Stomataschluss sowie erhöhte Toleranz bei Trockenstress (Pei et al., 1998). Die durch *ERA1* codierte β -Untereinheit der Farnesyltransferase gilt als negativer Regulator der ABA-Signalübertragung, welcher im Anschluss an die ABA-Perzeption und oberhalb der ABA-induzierten

stomatären Ca^{2+} -Ströme agiert (Allen et al., 2002). Die Tatsache, dass in *era1/abi1*- beziehungsweise in *era1/abi2*-Doppelmutanten der ABA-insensitive Phänotyp der *abi1*- und *abi2*-Mutanten (s. 1.2.4.2.) unterdrückt wird, bekräftigt die Position von ERA1 am Anfang der ABA-Signaltransduktion (Allen et al., 2002).

Als zusätzliche Aktivatoren der im Plasmalemma lokalisierten Ca^{2+} -Kanäle wirken außerdem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie H_2O_2 und NO (Pei et al., 2000): so ist vor dem ABA-induzierten Schließen der Stomata ein Anstieg von H_2O_2 und NO zu beobachten, deren Synthese über eine ABA-induzierte membrangebundene NADPH Oxidase beziehungsweise über Nitrat Reduktasen und die NO Synthase AtNOS1 gesteuert wird. Beide Substanzen wirken aktivierend auf die ins Cytosol gerichteten Ca^{2+} -Kanäle im Plasmalemma und gelten demnach als positive Regulatoren des ABA-induzierten Stomataschlusses (Schroeder et al., 2001; Jiang and Zhang, 2002; Guo et al., 2003; Desikan et al., 2004; Bright et al., 2006; Crawford, 2006).

Der hieraus resultierende Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird gefolgt von der über zwei verschiedene Mechanismen ablaufenden Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. So sorgen durch Phospholipase C (PLC) von Lipiden abgespaltenes $\text{InsP}_3/\text{InsP}_6$ und durch die ADPR Cyclase aus NAD^+ gebildetes cADPR unabhängig voneinander für den ABA-abhängigen Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol. Dieser führt zusammen mit einer Hemmung der in der Plasmamembran lokalisierten H^+ -ATPase zu einer Membrandepolarisation (Schroeder et al., 2001; Brault et al., 2004). Als eine weitere calcium-mobilisierende Komponente der zum Stomataschluss führenden ABA-Signalkaskade gilt Sphingosin-1-Phosphat (Ng et al., 2001), welche im Zusammenspiel mit GPA1, der α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, am Stomataschluss in *Arabidopsis* beteiligt ist (Wang et al., 2001). Zusätzlich beeinflusst das entsprechende heterotrimere G-Protein die Öffnung der Stomata über Wechselwirkungen mit der Phospholipase $\text{PLD}\alpha 1$ und deren Produkt Phosphatidsäure. Während die Interaktion von GPA1-GTP mit Phosphatidsäure den ABA-vermittelten Stomataschluss fördert, sorgt die Bindung von $\text{PLD}\alpha 1$ durch GPA1-GDP für die Hemmung der positiv auf den

Stomataschluss wirkenden Phospholipase und begünstigt somit indirekt die erneute Öffnung der Stomata (Mishra et al., 2006).

Neben anderen, zum Stomataschluss führenden Stimuli wie ROS oder Kälte, löst auch Abscisinsäure in Schließzellen cytosolische Calciumoszillationen aus (Allen et al., 2000). Mutanten wie *det3*, welche unter dem Einfluss dieser Stimuli nicht mehr zum Schließen der Spaltöffnungen in der Lage sind, können durch extern induzierte Calciumoszillationen zum Stomataschluss bewegt werden. Eine wesentliche Rolle für den Schließvorgang spielen Frequenz, Anzahl der Perioden und Amplitude der Oszillationen (Allen et al., 2000; Allen et al., 2001). Auch Schließzellen der ABA-insensitiven *gca2*-Mutanten zeigen Veränderungen in Frequenz und Dauer der Ca^{2+} -Oszillationen, was hier zu einer Deregulation des Stomataschlusses führt (Himmelbach et al., 1998; Allen et al., 2000; Allen et al., 2001). Die Mutanten *gca1* bis *gca8* (*growth control exerted by ABA*) wurden aufgrund ihres ABA-insensitiven Primärwurzelswachstums identifiziert. Im Gegensatz zum pleiotropen Phänotyp der *gca2*- und *gca1*-Mutanten sind *gca3-gca8*-Pflanzen ausschließlich in ihrem ABA-abhängigen Wachstum beeinträchtigt. Neben den Störungen des ABA-abhängigen Wachstums zeigen die Mutanten *gca3-gca8* zusätzliche Defekte bei der physiologischen Antwort auf Ethylen, was auf eine Vernetzung der Abscisinsäure- und Ethylensignalkaskaden hindeutet (Himmelbach et al., 1998).

Die Ca^{2+} -induzierte Depolarisation der Membran wird über ABA-abhängige Aktivierung nach außen gerichteter Anionenkanäle zusätzlich verstärkt, wobei noch unklar ist, ob ABA direkt auf die Kanäle wirkt oder über zusätzliche Rezeptoren (Levchenko et al., 2005). Als Konsequenz der Membrandepolarisation werden nach innen gerichtete Kaliumkanäle gehemmt und es kommt gleichzeitig zu einem Efflux an K^+ -Ionen in den Apoplasten, welcher mit dem gleichzeitigen Ausstrom von Anionen gekoppelt ist. Zudem wird osmotisch wirksames Malat in Stärke umgewandelt. Das durch die Zunahme an cytosolischen Ca^{2+} -Ionen hervorgerufene Ausströmen von K^+ -Ionen aus den Schließzellen wird zusätzlich verstärkt von einer ABA-abhängigen Alkalisierung des Cytosols. Infolge des Ionenausstroms und einer passiven, osmotisch-bedingten Wasserabnahme nimmt der Turgordruck in den Schließzellen ab, die Zellen erschlaffen und der stomatäre Spalt schließt sich. Bei anhaltendem Wasserstress sorgt ABA über die Hemmung der H^+ -ATPase

und der nach innen gerichteten K^+ -Kanäle dafür, dass die Stomata geschlossen bleiben.

Bleibt das ABA-Signal aus, bewirkt die nach außen Protonen pumpende H^+ -ATPase indirekt die Aufnahme von K^+ -Ionen aus dem Apoplasten. Diese bewirken zusammen mit den resynthetisierten osmotisch aktiven Substanzen wie Malat und Saccharose die erneute Öffnung der Stomata (Leung and Giraudat, 1998; Schroeder et al., 2001).

Neben den in diesem Abschnitt beschriebenen Regulatoren übernehmen auch die im Folgenden beschriebenen Proteinphosphatasen und -kinasen wichtige Funktionen bei den zum Stomataschluss führenden Prozessen. In Abb. 1.2. sind alle hier erwähnten positiven und negativen Regulatoren des ABA-vermittelten Stomataschlusses zusammengefasst.

1.2.4. Phosphorylierung und Dephosphorylierung innerhalb der ABA-Signalkaskade

Wie viele andere biologische Signalkaskaden überträgt auch die Abscisinsäure-Signalkette wichtige Funktionen auf Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse. Zahlreiche ABA-regulierte Proteinkinase und Proteinphosphatasen sind als positive beziehungsweise negative Regulatoren in einem koordinierten Netzwerk an der Weiterleitung des ABA-Signals auf zellulärer Ebene beteiligt. Bereits die zu Beginn stattfindende Transmission des ABA-Signals vom Ort der Perzeption zu den Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran soll durch ein Zusammenspiel aus Proteinkinase und Proteinphosphatasen vom Typ PP1 und PP2A reguliert sein (Kohler and Blatt, 2002).

1.2.4.1. Proteinkinase

Die zahlreichen bereits charakterisierten, ABA-aktivierbaren Proteinkinase greifen an unterschiedlichen Stellen in die ABA-Signalkette ein. Während für die Plasmamembran-lokalisierte *Arabidopsis* LRR-Kinase RPK1 ein frühes Eingreifen in ABA-abhängige Prozesse wie Keimung, Wurzelwachstum oder Genexpression postuliert und sogar über ihre Beteiligung an einem ABA-

Rezeptor-Komplex spekuliert wird (Osakabe et al., 2005), führen andere Enzyme, wie die Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinasen CDPK1 und CDPK1a zur Aktivierung ABA-induzierbarer Promotoren (Sheen, 1996).

Proteinkinasen agieren meistens als positive Regulatoren des ABA-Signaltransfers. (Sokolovski et al., 2005). Eine ABA-aktivierte Serin-/Threonin-Kinase aus *Vicia faba*, AAPK1 (AAPK; *ABA-activated protein kinase*) ist an der ABA-abhängigen Aktivierung stomatärer Anionenkanäle beteiligt und fördert so das ABA-induzierte Schließen der Stomata (Li et al., 2000). Als *Arabidopsis*-Ortholog dieser Kinase gilt das ABA-aktivierte Enzym OST1, welches oberhalb der ROS-Bildung als positiver Regulator in der Signalkaskade des Stomataschlusses wirkt (Mustilli et al., 2002). Auch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPK; *calcium dependent protein kinase*) greifen in die Mechanismen des Stomataschlusses ein. In *Vicia faba*-Protoplasten konnte die CDPK-vermittelte Phosphorylierung des am Stomataschluss beteiligten Kalium-Kanals KAT1 nachgewiesen werden (Li et al., 1998). Zusätzlich gibt der Einsatz des Proteinkinase-Antagonisten K252A in unterschiedlichen Spezies Aufschluss über die positive Wirkung von Kinasen auf das ABA-regulierte Schließen der Spaltöffnungen: die über K252A provozierte Hemmung der Kinase-Aktivitäten inhibiert den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in Schließzellen und sorgt so für eine negative Beeinträchtigung des Stomataschlusses (Hey et al., 1997; Allen et al., 1999; Sokolovski et al., 2005). Als Beispiel für die aktivierende Wirkung von Proteinkinasen auf ABA-abhängige Veränderungen der Genexpression gelten unter anderem das Enzym PKABA1 aus Weizen und die oben bereits erwähnte Kinase AAPK aus *Vicia* (Fedoroff, 2002). Beide Proteine gehören zur Familie der SnRKs, die ihren Namen aufgrund der Homologie zu der AMP-aktivierten Proteinkinase SNF1 (SNF; *sucrose non-fermenting*) aus Hefe erhalten haben (Farras et al., 2001). PKABA1 phosphoryliert und aktiviert den samenspezifischen bZIP-Transkriptionsfaktor TaABF, der eine hohe strukturelle Homologie zum Transkriptionsregulator ABI5 aus *Arabidopsis* aufweist (Johnson et al., 2002). AAPK bewirkt über Phosphorylierung des RNA-Bindeproteins AKIP1 dessen Interaktion mit RNA-Zielmolekülen, zu denen unter anderem die durch ABA hochregulierten Dehydrin-Transkripte gehören (Li et al., 2002). Auch die bereits oben erwähnten bZIP-Transkriptionsfaktoren AREB1 und AREB2 werden erst

durch Phosphorylierung ihrer Serin- und Threoninreste aktiviert, wobei die hierfür zuständige Kinase noch nicht ermittelt werden konnte (Furihata et al., 2006).

Allerdings können Proteinkinasen auch als negative Regulatoren des ABA-Signaltransfers wirken. So kommt es unter der Anwendung von Proteinkinase-Inhibitoren in ABA-insensitiven *abi1*-Schließzellen zu einer Wiederherstellung der ABA-abhängigen Reaktionen (Pei et al., 1997).

1.2.4.2. Proteinphosphatasen

Neben den oben erwähnten PP1 und PP2A Phosphatasen übernehmen auch PP2C Phosphatasen eine negativ regulatorische Rolle bei ABA-gesteuerten Vorgängen. Zu ihnen gehören neben den weiter unten ausführlicher beschriebenen PP2C Phosphatasen ABI1 und ABI2 die zur gleichen Gruppe zählenden Enzyme AtPP2CA und AtP2C-HAB1, welche hauptsächlich in Samen aktiv sind, aber in geringerem Maße auch Wurzelwachstum und die stomatären Bewegungen beeinflussen (Saez et al., 2004; Kuhn et al., 2006; Yoshida et al., 2006).

Die durch Abscisinsäure etwa 15-fach hochregulierten Gene *ABI1* und *ABI2* codieren für Mg²⁺-abhängige Serin-/Threonin-Phosphatasen vom Typ PP2C mit identischem Aufbau und einer Aminosäure-Identität von 86% innerhalb der PP2C Domänen (Meyer et al., 1994; Leung et al., 1997). Beide Gene wurden infolge der Charakterisierung zweier dominanter ABA-insensitiver *Arabidopsis*-Mutanten, *abi1-1* und *abi2-1*, identifiziert (Koornneef et al., 1984), welche pleiotrope phänotypische Veränderungen aufweisen, wie zum Beispiel ABA-insensitive Keimung und Keimlingsentwicklung, reduzierte Dormanz und abnormale Stomataregulation (Koornneef et al., 1984; Leung et al., 1997; Allen et al., 1999). Die Ähnlichkeit zum Phänotyp der *aba*-Mutanten lässt vermuten, dass diese beiden Proteine relativ am Anfang der ABA-Signalkaskade stehen und somit eine zentrale Position in der ABA-Signalübertragung einnehmen. Neben *abi1* und *abi2* zeigt auch die *abi8*-Mutante einen pleiotropen ABA-insensitiven Phänotyp mit verschlechterter Stomataregulation, Veränderungen in der Expression ABA-regulierter Gene, verspäteter Infloreszenzbildung und

sterilen Pollen. Über die Funktion des ABI8-Proteins, das zu einer kleinen, pflanzenspezifischen Familie gehört, ist jedoch noch nichts bekannt (Brocard-Gifford et al., 2004).

Die *abi1*- und *abi2*-Mutationen beruhen auf dem singulären Austausch eines Glycin-Restes durch Asparaginsäure an äquivalenter Position (Position 180 in *abi1*, Position 168 in *abi2*) innerhalb der jeweiligen katalytischen PP2C-Domäne. Dieser Aminosäureaustausch reduziert die Phosphatase-Aktivität der beiden Enzyme auf 3% der Wildtyp-Aktivität und führt zur verminderten ABA-Sensitivität der *abi1*- und *abi2*-Mutanten (Leube et al., 1998; Rodriguez et al., 1998).

Um Aufschluss über die Funktion von ABI1 und ABI2 in der ABA-Signalkette zu erhalten wurden Suppressor-Screens mit *abi1*- und *abi2*-Mutanten durchgeführt. Dabei wurden für *abi1* sieben intragene Revertanten gefunden (*abi1-1R1* bis *abi1-1R7*). Diese rezessiven Allele von ABI1 führten zu einer erhöhten ABA-Sensitivität bezüglich der Keimung und des Wurzelwachstums. Die entsprechenden Mutationen liegen im aktiven Zentrum der Phosphatase und reduzieren die Enzymaktivität auf ein Tausendstel der Wildtyp-Aktivität. Somit kann die Hypersensitivität gegenüber Abscisinsäure durch den Verlust der ABI1-Phosphatase-Aktivität erklärt werden und dies deutet darauf hin, dass die Wildtypform der ABI1-Phosphatase als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion fungiert (Gosti et al., 1999). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten aus transienten Expressionsstudien überein, bei denen in Mais-Protoplasten konstitutiv exprimiertes ABI1-Protein die ABA-abhängige Genexpression blockiert (Sheen, 1998). Auch für *abi2* konnte eine intragene Revertante gefunden werden, welche durch Veränderungen in der Stomataregulation identifiziert wurde. Die Revertante zeigt im Gegensatz zu den *abi2*-Pflanzen wildtypartiges Verhalten bei der Transpirationskontrolle und somit eine dem Wildtyp entsprechende ABA-Sensitivität (Merlot et al., 2001). Die PP2C-Aktivität in *abi2-1R1*-Revertanten ist etwa 100-mal geringer als in Wildtyp-Pflanzen. Demnach gilt neben ABI1 auch ABI2 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion und beide könnten somit überlappende Rollen in der Kaskade besitzen.

Um die Funktionen von ABI1 und ABI2 innerhalb des ABA-Signalnetzwerkes zu ermitteln, wurden unterschiedliche transiente Systeme eingesetzt. In den oben

erwähnten Mais-Protoplasten wurden neben Wildtyp *ABI1* verschiedene mutierte Versionen des Gens transient exprimiert und der Einfluss dieser Proteine auf die ABA-regulierte Genexpression untersucht (Sheen, 1998). Da neben intaktem *ABI1* Protein auch einige mutierte Formen mit verringerter PP2C Aktivität, wie zum Beispiel *abi1*, die ABA-Signaltransduktion hemmten, beruht die negativ regulatorische Rolle von *ABI1* offensichtlich nicht ausschließlich auf einer intakten Phosphatase-Aktivität. Zusätzlich beleuchteten Mikroinjektionsstudien in Hypokotylzellen aus Tomate einen neuen Aspekt der *ABI1*-Funktion: bei einer Co-Injektion von *ABI1*- und *abi1*-Protein sorgte ein zwei- bis dreifacher Überschuss an *ABI1* für die Wiederherstellung der ABA-Sensitivität. Neben der Erkenntnis, dass *ABI1* und *abi1* um dieselben Bindestellen konkurrieren, zeigt dieses System, dass *ABI1* bei der Weiterleitung des ABA-Signals außer der hemmenden auch eine positiv regulatorische Rolle übernehmen kann (Wu et al., 2003). Welche Funktion *ABI1* übernimmt, hängt von der jeweiligen Position des Proteins in der ABA-Signalkette ab: so wird ein kurzzeitig positiver *ABI1*-Effekt für die frühe Verbreitung des ABA-Signals postuliert, während die anschließende ABA-Desensibilisierung der Pflanze mithilfe des negativen Regulators *ABI1* erfolgt und mit der Interaktion von *ABI1* mit Transkriptionsfaktoren verbunden ist (Christmann et al., 2003). Ein bereits identifizierter Interaktionspartner von *ABI1* ist der oben beschriebene Transkriptionsfaktor *ATHB6* (siehe 1.2.6. und 1.2.8.).

Wie es der welke Phänotyp der *abi1*- und *abi2*-Mutanten bereits vermuten lässt, sind beide PP2C Phosphatasen an der Regulation des Stomataschlusses beteiligt. So ist in *abi1*- und *abi2*-Schließzellen der ABA-induzierte Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels stark reduziert. Beide Mutationen hemmen außerdem die ABA-abhängige Aktivierung stomatärer Anionenkanäle (Pei et al., 1997; Allen et al., 1999) und Plasmalemma-lokalisierter K^+ -Kanäle (Armstrong et al., 1995).

Zusätzlich interagiert *ABI1* mit der als positiver Regulator des Stomataschlusses wirkenden *Arabidopsis* Kinase *OST1* (s. auch Abschnitt 1.2.4.1.), deren ABA-abhängige Aktivierung in *abi1*-Pflanzen stark inhibiert wird (Yoshida et al., 2006). Über seine Interaktion mit Phosphatidsäure (PA) greift *ABI1* zudem in den stomatären Schließvorgang ein: die durch Phospholipase *PLD α 1* als Reaktion auf ABA gebildeten Phosphatidsäure (PA)-Moleküle binden

ABI1 und verankern das Enzym in der Plasmamembran. Auf diese Weise wird die inhibierende Wirkung von ABI1 auf den Schließvorgang der Spaltöffnungen abgeschwächt (Zhang et al., 2004) und somit ein positiver Effekt auf die Schließbewegung der Stomata ausgeübt. (Zhang et al., 2004; Mishra et al., 2006). Diese beiden Interaktionen zeigen, dass ABI1 sowohl als positiver als auch als negativer Effektor auf die zum Stomataschluss führenden Prozesse einwirken kann (Yoshida et al., 2006).

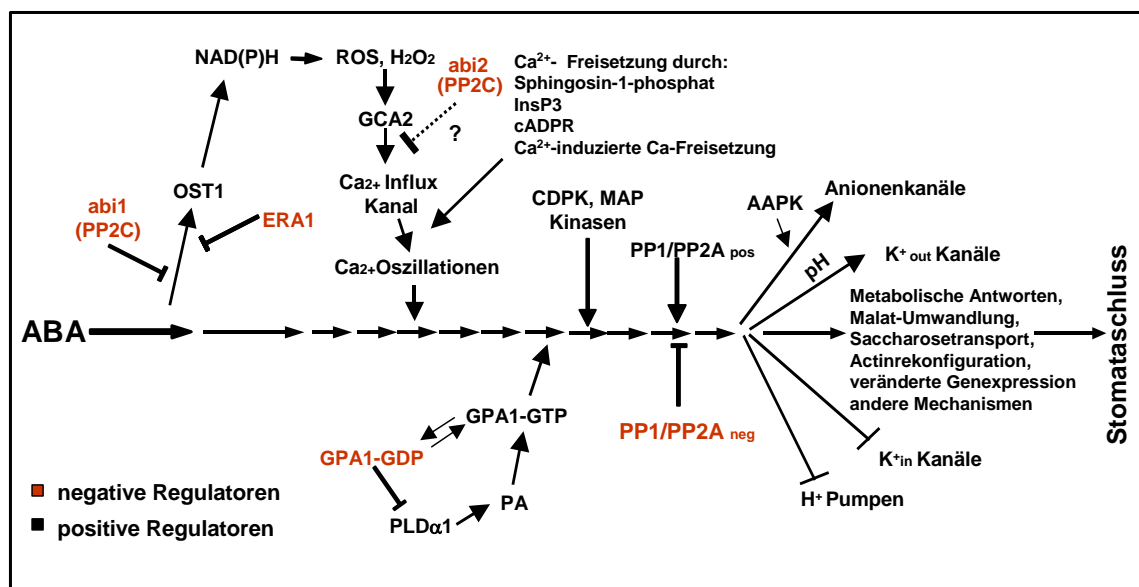


Abb. 1.2: Vereinfachtes Modell zur Wirkungsweise positiver und negativer Regulatoren der ABA-Signaltransduktion (Schroeder et al., 2001; Mäser et al., 2003).

1.2.5. Regulation der Genexpression durch Abscisinsäure

Die meisten der ABA-abhängigen Reaktionen wie Samenreifung, Dormanz oder vegetatives Wachstum, aber auch die Anpassung an Stresssituationen wie Kälte-, Trocken- oder Salzstress sind durch langsamere Abläufe gekennzeichnet und häufig mit einer ABA-abhängigen Regulation der Genexpression verbunden.

Da über die an der ABA-gesteuerten Genexpression beteiligten Komponenten bisher nur wenig bekannt ist, wurden mithilfe von cDNA-Mikroarray Analysen Gene identifiziert, die eine ABA-induzierte Veränderung ihrer Expression aufwiesen (Seki et al., 2002). Aufgrund der beschränkten Anzahl an Genen auf

den ersten *Arabidopsis* DNA-Chips wurde außerdem über Massive Parallele Signatur Sequenzierung (MPSS) der Versuch gestartet, die Gesamtheit der ABA-regulierten Gene im *Arabidopsis*-Genom zu ermitteln (Hoth et al., 2002). Auf diese Weise wurden in *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen 1354 Gene identifiziert, deren Expression unter dem Einfluss von ABA induziert beziehungsweise reprimiert wurde. Unter diesen Genen befanden sich zahlreiche putative Komponenten der ABA-Signalkaskade, wie Proteinkinasen oder -phosphatasen (z. B. *ABI1*, *ABI2*), aber es konnten auch Genfamilien identifiziert werden, die bis dahin nicht als ABA-reguliert galten, so zum Beispiel Gene ribosomaler Proteine oder Gene, deren Produkte proteolytische Aktivität aufweisen. Zusätzlich wurden etwa 100 Abscisinsäure-regulierte Gene beschrieben, welche für diverse Typen von Transkriptionsfaktoren, wie bZIP, AP2, B3, bHLH oder HD-Zip codieren (Finkelstein et al., 2002).

Die durch Abscisinsäure aktivierten Transkriptionsfaktoren erkennen spezifische *cis*-Elemente innerhalb der Promotorsequenz ihrer Zielgene. So binden zum Beispiel bZIP-Transkriptionsfaktoren als Dimere an ein als ABRE (*ABA-responsive element*) bezeichnetes, 8-10 bp langes *cis*-Element, welches durch eine ACGT-Kernsequenz gekennzeichnet ist (Hattori et al., 2002). Dieses Motiv wurde unter anderem in ABA-induzierbaren Genen wie *Em* aus Weizen (Marcotte Jr et al., 1989), *RAB16A* und *OsEm* aus Reis (Mundy et al., 1990; Hattori et al., 2002) oder *Dc3* aus Karotte gefunden (Siddiqui et al., 1998). Ein ABRE-Element allein ist jedoch nicht ausreichend für die ABA-vermittelte Geninduktion. Zusätzliche Motive, wie zum Beispiel die sogenannten *coupling elements CE1* und *CE3* der Gene *HVA1* und *HVA22* aus Gerste (Shen et al., 1996), bilden jeweils mit dem ABRE-Element zusammen einen ABA-responsiven Komplex (*abscisic acid response complex*, ABRC).

Die Funktion des CE-Element kann jedoch auch durch ein zweites, im Promotor vorhandenes ABRE-Motiv ersetzt werden (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). So enthält der Promotor des *RD29B*-Gens aus *Arabidopsis* zwei ABRE-Elemente, welche als Bindestellen der bZIP-Transkriptionsfaktoren AREB1 (*ABA-responsive element binding protein*) und AREB2 fungieren (Uno et al., 2000).

Daneben existiert eine Gruppe ABA-regulierter Gene, die kein *ABRE* enthalten, wie zum Beispiel das *C1*-Gen aus Mais, dessen ABA-Regulation über ein *Sph*-Element erfolgt. Die *RY/Sph*-Motive fungieren als Bindestelle für B3-Transkriptionsfaktoren (Suzuki et al., 1997). Zu dieser Gruppe gehört auch das bei Trockenstress aktivierte *Arabidopsis*-Gen *rd22*, dessen Promotor eine MYC- und eine MYB-Bindestelle enthält. Diese Motive werden von den bHLH-Transkriptionsfaktoren AtMYC2 beziehungsweise AtMYB2 erkannt (Abe et al., 2003).

Auch die Aktivierung des *Arabidopsis*-Gens *HB6* erfolgt, zumindest teilweise, ohne Beteiligung eines *ABRE*-Elements: der Homöodomän-Leucin-Zipper (HD-Zip) Transkriptionsfaktor *HB6* erkennt eine palindromische Sequenz im Promotor seines eigenen Gens und kann durch die Bindung dieses Elements die ABA-abhängige Expression des *HB6*-Gens aktivieren (Himmelbach et al., 2002). Auf die Funktion von HD-Zip-Transkriptionsfaktoren im Besonderen wird im nächsten Abschnitt (1.2.6.) eingegangen.

All diese Befunde weisen auf ein Netzwerk unterschiedlicher Transkriptionsregulatoren hin, welche am Ende der ABA-Signaltransduktionskette den Stimulus auf die Expression der von ihnen regulierten Gene übertragen und auf diese Weise die ABA-abhängigen Prozesse steuern.

Zu den bereits näher charakterisierten, an der ABA-Signalkaskade beteiligten Transkriptionsregulatoren zählen neben den später genauer beschriebenen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren die Proteine *ABI3*, *ABI4* und *ABI5*. Die entsprechenden ABA-insensitiven Mutanten *abi3*, *abi4* und *abi5* wurden aufgrund ihres Keimungsverhaltens selektiert: ihre Samen keimten bei für Wildtyp-Pflanzen stark inhibitorischen Abscisinsäure-Konzentrationen (Finkelstein, 1994; Lopez-Molina and Chua, 2000; Brocard-Gifford et al., 2004). Die *ABI3*-, *ABI4*- und *ABI5*-Gene codieren für Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen, welche ihren größten Einfluss auf die Genregulation während der Samenreifung haben, jedoch in geringerem Maße auch an unterschiedlichen Prozessen des vegetativen Wachstums beteiligt sind (Rohde et al., 2000; Lopez-Molina et al., 2002). So wird *ABI3*, Ortholog des Transkriptionsregulators *VP1* aus Mais, zur Gruppe der B3-Transkriptionsfaktoren gezählt (Rohde et al., 1999; Rohde et al., 2000), *ABI4*

enthält eine AP2-ähnliche DNA-Bindedomäne (Finkelstein et al., 1998), während ABI5 zur Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren gehört (Finkelstein and Lynch, 2000). Zu den Zielsequenzen des ABI3-Proteins gehört unter anderem das *RD29B*-Gen (Nakashima et al., 2006). Pflanzen, die jeweils einen dieser drei Transkriptionsfaktoren überexprimieren, zeigen hypersensitives Verhalten gegenüber ABA (Brocard et al., 2002).

Diese Transkriptionsfaktoren sind nicht jeweils an einer einfachen linearen Signalkette beteiligt, sondern bilden über Interaktion untereinander und mit weiteren Transkriptionsfaktoren ein Netzwerk, welches die Expression der einzelnen Gene reguliert (Soderman et al., 2000). Der genaue Zusammenhang zwischen der ABA-Signaltransduktion und der Regulation ABA-abhängiger Genexpression ist jedoch noch nicht bekannt.

Zusätzlich deutet die Charakterisierung der Mutanten *ABH1*, *SAD1* und *HYL1* auf einen direkten Zusammenhang zwischen mRNA-Prozessierung und ABA-Signalübertragung hin. Die *Arabidopsis*-Mutante *abh1* ist charakterisiert durch verstärkte Keimungsinhibierung und ABA-hypersensitiven Stomataschluss. Das entsprechende Gen *ABH1* codiert für ein mRNA-Cap-Bindeprotein, welches Bestandteil eines heterodimeren Komplexes ist, der die mRNA-Cap-Struktur bindet (Hugouvieux et al., 2001). Auch die Gene *SAD1* und *HYL1*, deren mutierte Versionen für ABA-hypersensitives Verhalten bezüglich Keimung und Wurzelwachstum verantwortlich sind, codieren für RNA-bindende Proteine. *SAD1* zeigt hohe Homologie zu einem der am mRNA-Spleißvorgang beteiligten snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), während es sich bei *HYL1* um ein dsRNA-bindendes Protein handelt (Lu and Fedoroff, 2000; Xiong et al., 2001).

1.2.6. Funktion der HD-Zip-Transkriptionsfaktoren

Die HD-Zip-Transkriptionsfaktoren (HD-Zip; *homeodomain-leucine zipper*) sind durch eine DNA-bindende Homöodomäne und ein C-terminal direkt angrenzendes Leucin-Zipper-Motiv gekennzeichnet (Ruberti et al., 1991; Schena and Davis, 1992). Letzteres ist für die Bildung von Transkriptionsfaktor-Dimeren zuständig, welche Voraussetzung für die Bindung der DNA-Erkennungssequenzen ist (Sessa et al., 1993). Neben Homodimeren können sich auch Heterodimere bilden, wobei die Heterodimer-Bildung zwischen

Proteinen derselben Klasse am wahrscheinlichsten ist (Sessa et al., 1993; Johannesson et al., 2001). Die innerhalb des *Arabidopsis*-Genoms identifizierten 47 HD-Zip-Gene werden je nach Sequenzhomologien und Ähnlichkeiten in der Exon-Intron-Struktur in 4 Klassen (HD-Zip I-IV) unterteilt (Henriksson et al., 2005). Im Folgenden wird jedoch nur auf die Mitglieder der Klasse I eingegangen, da einige dieser Proteine (unter anderem *ATHB5*-*ATHB7*, sowie *ATHB12* und *ATHB16*) nicht nur an der pflanzlichen Entwicklung, sondern auch an der Reaktion auf Umwelteinflüsse wie Trocken- und Salzstress sowie an der ABA-Signalübertragung beteiligt sind. Dementsprechend erfolgt die Induktion der jeweiligen HD-Zip-Gene durch Trockenstress (*ATHB6*, *ATHB7*, *ATHB12*, *ATHB16*), osmotischen Stress (*ATHB6*, *ATHB7*, *ATHB16*) sowie durch ABA (*ATHB5-ATHB7*, *ATHB12* und *ATHB16*) (Söderman et al., 1996; Söderman et al., 1999; Johannesson et al., 2003; Olsson et al., 2004).

Verschiedene experimentelle Systeme belegen die Verstrickung der HD-Zip-Proteine *ATHB5*, *ATHB6*, *ATHB7* und *ATHB12* im Netzwerk der ABA-Signaltransduktion. So kann beispielsweise in transgenen *ATHB6::LUC*-Pflanzen eine mehr als 1000-fache ABA-abhängige Induktion des *ATHB6*-Promotors erzielt werden (Himmelbach et al., 2002). Des Weiteren wird beispielsweise in *abi1*-Mutanten die Genexpression aller eben genannten Transkriptionsfaktoren erheblich gehemmt (Söderman et al., 1999; Hoth et al., 2002; Johannesson et al., 2003). In *abi2*-Mutanten wird die Induktion der Gene *ATHB6*, *ATHB7* und *ATHB12* reduziert, während die Transkription des *ATHB5*-Gens in *abi3*-Pflanzen verschlechtert ist (Söderman et al., 1999; Johannesson et al., 2003; Olsson et al., 2004). Studien mit HD-ZIP-überexprimierenden transgenen Pflanzen geben weiteren Aufschluss über die Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren. Die ektopische Expression von *ATHB6* führt beispielsweise zu reduzierter ABA-Sensitivität bezüglich Keimung und Stomataschluss, während *ATHB5*-überexprimierende Pflanzen ABA-hypersensitives Verhalten bei Keimung und Wurzelwachstum zeigen (Himmelbach et al., 2002; Johannesson et al., 2003). *ATHB6* gilt demnach als negativer Regulator der ABA-Signalübertragung, während für *ATHB5* eine positiv regulatorische Rolle angenommen wird. Auch *ATHB7* und *ATHB12* gelten, aufgrund des gehemmten Wurzel- und Keimlingswachstums in den

entsprechenden überexprimierenden Pflanzen, als positive Regulatoren der ABA-vermittelten Reaktionen innerhalb der Pflanze (Olsson et al., 2004).

Die Tatsache, dass die Proteine ATHB6, ATHB7 und ATHB12 jeweils *in vitro* Heterodimere mit ATHB5 bilden können (Johannesson et al., 2001) und ATHB7 seinerseits mit ATHB6 und ATHB16 interagiert (Wang, 2001), deutet an, dass die HD-Zip-Transkriptionsfaktoren sich zu einem Netzwerk zusammenschließen, welches es der Pflanze erlaubt, unterschiedliche Stimuli zu integrieren und somit auf wechselnde Umwelteinflüsse zu reagieren.

1.2.7. Interaktion zwischen der Proteinphosphatase ABI1 und dem HD-Zip Transkriptionsfaktor ATHB6

Um Aufschluss über die unterschiedlichen Funktionen von ABI1 innerhalb der ABA-Signalkette von *Arabidopsis* zu erhalten, wurde über ein *yeast two-hybrid screening* (Fields and Song, 1989) nach ABI1-Interaktionspartnern gesucht. Dabei konnte die spezifische Bindung zwischen ABI1 und dem HD-Zip-Protein ATHB6 nachgewiesen werden, welche anschliessend durch *in vitro* Bindungsassays bestätigt wurde. Die Bindung zwischen ABI1 und HB6 korreliert stark mit der Phosphatase-Aktivität von ABI1: eine Punktmutation im katalytischen Zentrum von ABI1 unterbindet jegliche Wechselwirkung mit ATHB6. Andere HD-Zip-Proteine, wie ATHB5 oder ATHB7, interagieren nicht mit ABI1 (Himmelbach et al., 2002). Die Interaktion mit ATHB6 gilt als Hinweis für eine Beteiligung von ABI1 an nukleären Prozessen der ABA-Signaltransduktionskaskade.

1.3. Transiente Expression

Die Identifikation von Komponenten eines Signalweges erfolgt über die Analyse charakteristischer Signalantworten oder spezifischer Interaktionen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden. Im Fall der Abscisinsäure-Signaltransduktion dienen z.B. Mutanten und ihre verändertes Verhalten gegenüber ABA der

Aufklärung des Signalübertragungsnetzwerkes (Koornneef et al., 1984; Finkelstein, 1994; Himmelbach et al., 1998; Zhang et al., 2004). Die zum Verständnis der Funktion eines Signalweges wesentliche Anordnung der einzelnen Komponenten kann unter anderem durch die Untersuchung der Signal-abhängigen Genregulation erreicht werden. Neben Expressionsstudien auf RNA-Ebene können hierfür Signal-abhängige Reportergenkonstrukte verwendet werden, deren Anwendung sowohl in transgenen Linien als auch in transienten Expressionssystemen erfolgen kann.

Aufgrund des im Vergleich zu stabil transformierten Linien geringen Zeitaufwandes wurden bereits zahlreiche Methoden für den direkten Gentransfer in Pflanzenzellen und die darauffolgende transiente Expression entwickelt. Hierzu zählen unter anderem die ballistische Transformation pflanzlicher Gewebe oder Zellsuspensionen über DNA-beschichtete Gold- oder Wolframpartikel (Klein et al., 1987), der Transfer von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen über Elektroporation (Fromm et al., 1985; Callis et al., 1987; Koscianska and Wypijewski, 2001) oder das Verfahren der Mikroinjektion (Schnorf et al., 1991; Wu et al., 2003), durch dessen Verwendung bspw. die cADPR-Abhängigkeit der ABA-regulierten Genexpression gezeigt werden konnte (Wu et al., 1997). Des Weiteren kann mit Hilfe des Agrobakterienvermittelten DNA-Transfers in pflanzliche Zellkulturen die subzelluläre Lokalisation und Aufreinigung sowie der immunologische Nachweis von mit Epitopen versehenen, transient *in planta* exprimierten Genen erfolgen (Mathur et al., 1998; Ferrando et al., 2000).

Auch Protoplasten sind aufgrund der freien Zugänglichkeit ihres Plasmalemmas für den direkten Gentransfer geeignet. Die DNA-Aufnahme in Protoplasten kann durch verschiedene Verfahren wie Elektroporation oder Behandlung mit Polyethylenglykol erfolgen (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984).

Neben der Anwendung transienter Expressionssysteme zur Untersuchung des ABA-Signaltransduktionsweges können auch Lokalisationsstudien von vorübergehend exprimierten Reporter-Fusionsproteinen im transienten System durchgeführt werden (Hwang and Sheen, 2001; Hoth et al., 2002). Um jedoch Ergebnisse, die im transienten System erzielt wurden, auf ganze Pflanzen übertragen zu können, sind entsprechende Kontrollen in stabil transgenen Pflanzen in jedem Fall unbedingt notwendig.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In Pflanzen werden wichtige Prozesse der pflanzlichen Entwicklung sowie der Adaptation an Umweltbedingungen wie Kälte, Trockenheit oder Salzstress durch Abscisinsäure reguliert. Obwohl bereits einige Komponenten der ABA-Signaltransduktion identifiziert und somit Einblicke in die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung gewonnen wurden, ist erst wenig über die jeweilige Positionierung der einzelnen Prozesse im Netzwerk des ABA-Signaltransfers bekannt.

Die im Rahmen dieser Arbeit geplante funktionelle Analyse der mit dem HD-ZIP-Transkriptionsfaktor *ATHB6* interagierenden PP2C Phosphatase *ABI1* sollte die Möglichkeit eröffnen, einen Zusammenhang zwischen der ABA-Signalübertragung und den damit verbundenen Änderungen der Genexpression herzustellen. Hierfür sollte neben der Charakterisierung eines potenziellen *ABI1*-Kernlokalisierungssignals der Einfluss von *ABI1* bzw. *abi1* auf die ABA-abhängige Genexpression sowie auf ABA-regulierte, physiologische Prozesse wie Samenreifung, Stomataregulation oder Wurzelwachstum untersucht werden. Als entsprechende Testsysteme wurden stabile *Arabidopsis*-Transformanten sowie das transiente *Arabidopsis*-Protoplastensystem gewählt. Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des *ABI1*-Interaktionspartners *ATHB6*. Um die in transgenen Pflanzen mehr als 2000-fache ABA-Induktion des *ATHB6*-Promotors zu untersuchen, sollte anhand von Promotordeletionsstudien in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen die Kartierung ABA-regulierter *cis*-Elemente erfolgen. Als Ergänzung zu diesen stabilen Transformanten sollte zudem ein alternatives Modellsystem in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen erstellt werden, welches infolge von Agrobakterien-vermittelter Genübertragung die transiente Expression ABA-regulierter Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte ermöglicht.

Des Weiteren wurden über die Methode der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation *in vivo* stattfindende Protein-Wechselwirkungen für *ABI1* und *ATHB6* in transient transformierten *Arabidopsis*-Protoplasten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel stammten – soweit nicht anders angegeben - von Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, München), Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und Serva (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Bei Prozentangaben handelt es sich –wenn nicht anders vermerkt- um Massenprozent (w/v).

2.2. Oligonukleotide

Die bei PCRs und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide (*primer*) stammten – soweit nicht anders vermerkt - von der Firma MWG. Die in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide wurden in ‚low EDTA TE‘-Puffer (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) so gelöst, dass eine Konzentration von 100 pmol/µl erreicht wurde. Die Aufbewahrung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei –20 °C. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.3. Anzucht von Pflanzenmaterial

2.3.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

In dieser Arbeit wurden mit Reschiev (RLD), Columbia (Col) und Landsberg *erecta* (La-er) verschiedene *Arabidopsis thaliana* Ökotypen verwendet. Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22 °C, 65% Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (17 °C, 75% Luftfeuchtigkeit) in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T). Unter diesen Bedingungen lag die Generationszeit bei 6-8 Wochen.

2.3.2. Sterilisation und Sterilkultur von *Arabidopsis*-Samen

Material:

Stocklösungen:

10 × MS-Makrosalze

16,5 g/l NH₄NO₃

19 g/l KNO₃

3,32 g/l CaCl₂ × 2 H₂O (ohne H₂O: 4,4 g/l)

1,7 g/l KH₂PO₄

3,7 g/l MgSO₄ × 7 H₂O

4 g/l MnSO₄ × 4 H₂O

400 × B5-Mikrosalze

0,01 g/l CoCl₂ × 6 h₂O

0,01 g/l CuSO₄ × 5 H₂O

14,6 g/l Na₂EDTA

1,2 g/l H₃BO₃

0,3 g/l KI

0,1 g/L Na₂MoO₄ × 2 H₂O

0,8 g/l ZnSO₄ × 4 H₂O

11,2 g/l FeSO₄ × 7 H₂O

400 × B5-Vitamine

0,4 g/l Nicotinsäure

0,4 g/l Pyridoxin-HCl

4 g/l Thiamin-HCl

40 g/l Myo-Inositol

für die Sterilisation: 80% (v/v) EtOH mit 0,1% (v/v) Triton-X 100

4% (v/v) Natriumhypochlorit mit 0,1% (v/v) Triton-X 100

steriles Wasser

für die Selektionsplatten: MS/B5-Kombinationsmedium für Agarplatten

100 ml/l 10 × MS-Makrosalze

2,5 ml/l 400 × B5-Mikrosalze

2,5 ml/l 400 × B5-Vitamine

10 g/l Saccharose

1 g/l MES

pH auf 5,7 einstellen (KOH), autoklavieren

ABA-Stocklösung

10 mM ABA in 1% MES (≡ 47 mM), pH 7,5

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 10 g/l Agar zugeben. Die Zugabe von Antibiotika (50 mg/ml Kanamycin od. Rifampicin) bzw. ABA (0,1-25 μ M) erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C.

Für die Anzucht auf Agar-Platten wurden *Arabidopsis*-Samen zunächst in einer Lösung aus 80% (v/v) Ethanol und 0,1% (v/v) Triton-X 100 für 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte eine zweite, 1-2-minütige Sterilisation mit 3% (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung. Die abschließend mindestens fünf Mal mit sterilem Wasser gewaschenen Samen wurden auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgebracht.

Um die eventuell noch vorhandene Dormanz zu brechen, wurden die Samen vor der Kultivierung 1-2 Tage bei 4 °C bzw. ÜN bei -20 °C gelagert. Die Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen auf Agar-Platten erfolgte im Zellkulturraum unter Dauerlicht ($100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 22 °C) auf einem kombinierten Pflanzenwachstumsmedium (s. oben), das neben 1% Saccharose und 0,1% MES-Puffer Makrosalze entsprechend dem 1 \times MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) sowie Mikrosalze und Vitamine entsprechend dem 1 \times B5-Medium (Gamborg et al., 1968) enthielt. Hormon- beziehungsweise Antibiotika-Zusätze erfolgten nach dem Autoklavieren. Alle Platten wurden vor Benutzung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Für die Anzucht in Schüttelkulturen wurden 100 ml-Erlenmeyerkolben mit je 30 ml MS/B5-Medium vorbereitet. Nach dem Sterilisieren wurden die Samen in diese Kolben pipettiert (30 Samen pro 100 ml-Kolben) und im Zellkulturraum bei 105 rpm kultiviert. Nach 8-10 Tagen wurden die entsprechenden Keimlinge geerntet, bzw. vorher noch ÜN mit unterschiedlichen ABA- oder Agrobakterienkonzentrationen behandelt.

2.3.3. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionskultur

Material: Gamborg B5-Medium für *Arabidopsis*-Suspensionskultur

100 ml/l 10 \times B5-Medium-Salze

2,5 ml/l 400 \times B5-Vitamine (s. oben)

20 g/l Saccharose

pH 5,7, einstellen mit KOH, NaOH oder HCl

1 ml/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) zugeben (Stock
1 mg/ml in EtOH), autoklavieren
zur Herstellung von Agar-Platten vor dem Autoklavieren 10 g/l
Agar zugeben

10 × B5-Medium-Salze

1,726 g/l NaH ₂ PO ₄	7,5 mg/l KI
1,5 g/l CaCl ₂ × 2 H ₂ O	100 mg/l MnSO ₄ × H ₂ O
1,34 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	30 mg/l H ₃ BO ₃
2,5 g/l MgSO ₄ × 7 H ₂ O	30 mg/l ZnSO ₄ × 7 H ₂ O
25 g/l KNO ₃	2,5 mg/l Na ₂ O ₄ Mo × 2 H ₂ O
0,256 g/l FeSO ₄ × 7 H ₂ O	3,91 mg/l CuSO ₄ × 5 H ₂ O
0,38 g/l Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	2,5 mg/l CoCl ₂ × 6 H ₂ O

Das autoklavierte Medium für die Flüssigkulturen wurde in 30 ml-Aliquots auf sterile 250 ml-Erlenmeyerkolben bzw. in 15 ml-Aliquots auf sterile 100 ml-Kolben verteilt. Nach dem Überführen der Kalli von Agarplatten in Erlenmeyerkolben wurden die *Arabidopsis*-Zellkulturen unter Dauerlicht (100 µE × m⁻² × s⁻¹) bei 22 °C und 105 rpm kultiviert. Die Umsetzung in neues Medium erfolgte alle 6-7 Tage. Hierfür wurde der Inhalt eines Erlenmeyerkolbens unter der Sterilbank durch Umschütten auf drei neue Kolben verteilt.

2.4. Mikroorganismen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und klonierten Plasmide sowie die entsprechenden Agrobakterien- und *E. coli*-Stämme sind der Stammsammlung sowie dem Anhang 5.3. zu entnehmen.

2.4.1. *E. coli*-Bakterienstämme

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden folgende *E.coli*-Bakterienstämme verwendet:

- XL-1 Blue (Stratagene GmbH, Heidelberg) mit Tetracyclin-Resistenz

- DH5 α (Stratagene GmbH, Heidelberg) ohne Resistenz

2.4.2. *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Die Agrobakterien-vermittelte stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte unter Verwendung des Agrobakterienstammes C58 pGV3101 (Larebeke et al., 1974). Als Ti-Plasmid wurde pMP90 mit bakteriellen Resistenzmarkern gegen Rifampicin und Gentamycin verwendet (Koncz and Schell, 1986; Ferrando et al., 2000). Die Stämme wurden von Dr. Csaba Koncz zur Verfügung gestellt.

2.4.3. Anzucht von Mikroorganismen

Material:	<u>LB-Medium (Luria-Bertani)</u>	NaCl	10 g/l
		Bactotrypton	10 g/l
		Hefeextrakt	5 g/l
		pH 7 einstellen (NaOH)	
		autoklavieren	

Für Agarmedium wurde vor dem Autoklavieren zusätzlich 15 g/l Agar zugegeben. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C wurden Antibiotika eingerührt.

Ampicillin: 50 mg/l (Stocklösung 50 mg/ml in A. bidest)

Kanamycin: 25-50 mg/l (Stocklösung 50 mg/ml in A. bidest)

Rifampicin: 50 mg/l (Stocklösung: 50 mg/ml in MeOH oder DMSO)

Carbenicillin: 50 mg/l (Stocklösung: 100 mg/ml in A. bidest)

Die Anzucht erfolgte auf Platte ÜN bei 37 °C (*E. coli*) bzw. bei 28-30 °C (*A. tumefaciens*). Das Anziehen von Vorkulturen (*E. coli*: 4-5 ml; *A. tumefaciens*: 10-20 ml) erfolgte ÜN bei 190 rpm unter den für Agarplatten angegebenen Temperaturbedingungen. Die Lagerung von *E. coli*- bzw. *Agrobacterium*-Stämmen erfolgte in Form von Glycerolstocks (je 1 ml Flüssigkultur mit 400 μ l 87% (v/v) Glycerol steril) bei -80 °C.

2.4.4. Herstellung kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen (*E. coli*):

<u>Material:</u>	<u>Medium A</u>	<u>TB-Medium</u>
	20 g/L Bacto Trypton	10 mM PIPES pH 6,4
	5 g/L Hefeextrakt	55 mM MnCl ₂
	10 mM NaCl	15 mM CaCl ₂
	2,5 mM KCl	250 mM KCl
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄	

Eine 250 ml-Kultur von DH5 α -Zellen (Stammsammlung #62) wurde in Medium A bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert (ca. 48 h). Nach 10-minütigem Abkühlen der Kultur auf Eis wurden die Zellen 15 min in einem Beckman JA-10 Rotor bei 4000 rpm (2500 \times g) und 4 °C abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. Nach einer zweiten Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugieren und in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert. In die Zellsuspension wurde 0,7 ml DMSO eingerührt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 250 μ l-Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Elektrokompetente Zellen (*E. coli* bzw. *A. tumefaciens*)

Material: 10% (v/v) Glycerol (autoklaviert)
A. bidest steril

Nach Anziehen von 500 ml-ÜNK (Stammsammlung #844 bzw. 845) wurden diese bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1 zuerst auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eiskaltem A. bidest gewaschen und erneut 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung dieses Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurden die Pellets jeweils in 20 ml 10% (v/v) Glycerol (steril) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 3

ml 10% (v/v) Glycerol (steril) aufgenommen und als Aliquots von 250 µl nach Schockgefrieren in flüssigem N₂ bei -80 °C gelagert.

2.4.5. Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen:

Vor der Transformation wurden die kompetenten DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut, mit der entsprechenden DNA gemischt und 30 min auf Eis stehen lassen. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C im Wasserbad, danach wurde jeder Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 µl LB-Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 1-2 h unter Schütteln bei 37 °C wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Konzentrationen ausplattiert.

Transformation von *E. coli*-/*A. tumefaciens*-Zellen über Elektroporation:

<u>Material:</u>	<u>YM-Medium</u>	<u>SOC-Medium</u>
	0,4 g/l Yeast extract	20 g/L Bacto Trypton
	10 g/l Mannitol	5 g/L Hefeextrakt
	1,7 mM NaCl	10 mM NaCl
	0,8 mM 1M MgSO ₄ *7H ₂ O	2.5 mM KCl
	2,2 mM K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	10 mM MgCl ₂
	pH 7,0 mit 0,1 N NaOH	10 mM MgSO ₄
	oder 0,1 N HCl einstellen,	20 mM Glucose
	autoklavieren	autoklavieren

Die in Wasser oder in salzarmen Puffern gelöste DNA wurde in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Von der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension wurde 80 µl (*E. coli*) bzw. 100 µl (*A. tumefaciens*) zur DNA zugegeben und der ganze Ansatz gemischt. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Bei einem Abstand der Küvettelektroden von 0,2 cm wurden folgende Elektroporationsparameter eingestellt:

E. coli:

V = 1800 V

C = 25µF

R = 200 Ω

T = 5 ms

A. tumefaciens

V = 2500 V

C = 25 µF

R = 700 Ω

T = 17,5 ms

Nach dem Impuls wurden 800 µl YM- oder SOC-Medium zugegeben, gemischt und in das Mikroreaktionsgefäß zurücküberführt. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 2 h bei 29 °C (*A. tumefaciens*) im Heizblock geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*A. tumefaciens*) inkubiert.

2.5. DNA-Techniken

2.5.1. **Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana***

DNA-Isolation im kleinen Maßstab (einzelne Pflanzenorgane):

Diese oftmals mit einzelnen Blättern durchgeführte Isolierung genomischer Pflanzen-DNA (modifiziertes Protokoll nach (Murray and Thompson, 1980) wurde verwendet um transgene Pflanzen auf die jeweils eingebrachten Konstrukte zu testen.

Material:

2 × CTAB Puffer

2% Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromid (CTAB)

1,4 M NaCl

100 mM Tris HCl pH 8,0

20 mM EDTA

1% PVP

lösen bei 65 °C, nicht autoklavieren!

1 × TE-Puffer

10 mM Tris HCl pH 8

1 mM EDTA

1%-ige RNase-Stocklösung 10 mg/ml RNase in 0,1 M Na-Acetat pH 5,2

Chloroform-Isoamylalkohol (IAA) im Verhältnis 24:1

Isopropanol (unverdünnt)

70% (v/v) EtOH

Eine geringe Menge Pflanzenmaterial (z. B. ein *Arabidopsis*-Blatt oder einige *Arabidopsis*-Keimlinge) wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mit einem Glasstab zu Pulver zerrieben. Direkt im Anschluss wurde 300 µl vorgewärmter 2 × CTAB Puffer zugegeben und die Ansätze bei 65 °C inkubiert (10 min oder mehrere Stunden möglich), dann das Ganze auf Eis abgekühlt für die darauffolgende Zugabe von 300 µl IAA-Chloroform. Um wässrige und organische Phase voneinander zu trennen wurden die Ansätze gevortext und bei 16000 × g (14000 rpm) zentrifugiert, dann die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Zur Fällung der pflanzlichen DNA wurde 300 µl Isopropanol zugegeben, gut gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min). Der darauffolgende Waschschrift wurde mit 70% (v/v) Ethanol durchgeführt, das Pellet gründlich getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum Abbau vorhandener RNA wurde pro Ansatz je 2 µl 1%-ige RNase zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Von der so erhaltenen DNA wurde 1-3 µl als Templat bei PCR-Ansätzen verwendet.

DNA-Isolation im Großansatz (mehrere Pflanzen):

Material:

2 x CTAB-Lösung siehe oben

10 x CTAB-Lösung 10% CTAB
700 mM NaCl, lösen bei 65 °C, nicht autoklavieren

CTAB-Präzipitationspuffer 1% CTAB
50 mM Tris-HCl (pH=8,0)
10 mM EDTA (pH=8,0), nicht autoklavieren

<i>high salt</i> -TE :	10 mM Tris-HCl (pH=8,0)
	1 mM EDTA
	1 M NaCl
0,1 x TE:	1 mM Tris-HCl (pH=8,0)
	0,1 mM EDTA

Chloroform-Isoamylalkohol (IAA) im Verhältnis 24:1
Isopropanol (unverdünnt)
70% (v/v) EtOH

Genomische Pflanzen-DNA wurde über die CTAB-Methode isoliert (Rogers and Bendich, 1994). Neben Blattmaterial von in Erde angezogenen Pflanzen wurden auch steril angezogene Keimlinge verwendet (Anzucht auf Agar-Platten oder in Schüttelkulturen). Um die Zellwände aufzubrechen und das Pflanzenmaterial zu homogenisieren wurde dieses zunächst in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Anschließend wurde das feine Pulver in bei 65 °C vorgewärmtes 2 x CTAB aufgenommen (1 ml/g Frischgewicht Pflanzenmaterial) und resuspendiert. Die CTAB-Phase wurde zur Entfernung von Proteinen und Chlorophyllen zweimal mit Chloroform extrahiert. Vor der zweiten Extraktion wurde die Lösung mit 1/10 Volumen vorgewärmtem (65 °C) 10 x CTAB versetzt. Nach der Fällung des CTAB-DNA-Komplexes unter Niedrigsalz-Bedingungen mit 1,3 Volumen CTAB-Präzipitationspuffer wurde die DNA in *high salt* TE aufgenommen worden. Die schließlich mit Ethanol präzipitierte DNA wurde phenolisiert und in 0,1 x TE gelöst. Die mit 0,05% RNase versetzte DNA wurde für PCR-Analysen eingesetzt.

2.5.2. Plasmid-Isolierung aus Mikroorganismen (*E. coli*, *A. tumefaciens*)

DNA-Minipräparation aus *E. coli* über alkalische Lyse

Material:

<u>Lösung 1</u>	50 mM Glucose 10 mM EDTA (pH=8,0) 25 mM Tris-HCl (pH=8,0) alternativ : 5 × TE
<u>Lösung 2</u>	0,2 M NaOH 1% SDS
<u>Lösung 3</u>	3 M Kac (4,8-5,5)

Ethanol, Isopropanol

0,1 × TE-Puffer

Für die Isolierung von Plasmid-DNA über alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurde 4 ml einer Bakterien-Übernachtskultur 5 min bei 4000 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl GTE-Puffer (Lösung 1) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl stark alkalischem Lysepuffer (Lösung 2) wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 250 µl 3M Kaliumacetat, pH 4,8 (Lösung 3) wurden genomische DNA und Proteine ausgefällt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 16000 × g (14000 rpm) und 4 °C wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte 15 min lang bei –20 °C. Anschließend wurde 15 min bei 14000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen und nach 5-minütiger Zentrifugation bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl Aqua bidest. oder 0,1 × TE-Puffer, der 25 µg/ml RNase enthielt, rückgelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch oder über ein Agarosegel bestimmt.

Modifiziertes Protokoll zur Plasmidpräparation aus Agrobakterien

Material:

Lösung 1, 2 und 3 (s. oben)

Lysozym-Stock 40 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris-HCl pH 8,0

Phenol, pH 7,0; äquilibriert mit TE (Sambrook and Russell, 2001)

Chloroform

Die Isolierung von DNA aus Agrobakterien erfolgte über ein adaptiertes Protokoll der alkalischen Lyse. Neben einer größeren Ausgangskultur (25 ml) wurde Lösung 1 (200 µl) zum besseren Aufschluss der agrobakteriellen Zellmembran mit Lysozym (10 µl) versetzt. Nach Lyse der Zellen mit 250 µl Lösung 2, sowie darauffolgender Neutralisierung (Zugabe von 350 µl Lösung 3) und Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand durch Zugabe von 1 Vol. Phenol und anschließender Zentrifugation zusätzlich aufgereinigt. Daraufhin wurde der abgezogenen wässrigen Phase 1 Vol. Chloroform zugegeben und erneut zentrifugiert. Der so gereinigte Überstand wurde anschließend durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wie oben beschrieben gefällt und gewaschen (s. alkalische Lyse *E. coli*) und am Ende in TE-Puffer resuspendiert.

DNA-Maxipräparation über Silica

Material:

Solution 1 (5 × TE)

50 mM Tris

5 mM EDTA, pH 8,0

Solution 2

200 mM NaOH

1% SDS

Solution 3

3 M KAc

pH 5,5

GuSCN-Lösung

3 M GuSCN

4% (v/v) Triton-X 100

Silica

Silicon Dioxid (SIGMA S-5631)

Dieses Protokoll wurde in leicht abgewandelter Form von Myakishev et al. übernommen. Es dient der Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (500 µg-1 mg DNA/l Kultur), welche für Klonierungszwecke eingesetzt werden kann. Die Verwendung entsprechend gereinigter DNA in transienten Expressionssystemen kann jedoch aufgrund eventuell verbleibender Silica-Rückstände im allgemeinen nicht empfohlen werden.

Für die Maxiprep wurde eine 500 ml-ÜNK 10 min bei $5000 \times g$ (Beckman-Rotor JA-10) und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Solution 1 resuspendiert, dann wurde 20 ml frisch zubereitete Solution 2 zugeben, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 15 ml Solution 3 zugegeben, gemischt und erneut 5 min bei RT inkubiert. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei $10000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert und der Überstand durch Papierfilter (Schleicher&Schuell, \varnothing 210 mM; # 10311649) in einen 250 ml-Zentrifugenbecher filtriert. Nach Zugabe von 30 ml Isopropanol wurde 30 min bei $10000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und das Pellet in 2 ml $0,1 \times \text{TE}$ gelöst. Nach Zugabe von 8 ml 5 M LiCl erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation (Beckman Rotor JLA-16.25) bei $10000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Überstand wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit 10 ml Bindmix versetzt und 3 min inkubiert. Als Bindmix wurde ein 3 M GuSCN/Silica-Gemisch verwendet, wobei für *high copy* Plasmide 100 mg Silica pro 100 ml ÜNK und für *low copy* Plasmide 20 mg Silica pro 100 ml Übernachtkultur eingewogen wurden. Nach Zugabe der Bindmix-Lösung wurde gemischt und 3 min bei $2000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert (Beckman Rotor JA-14). Das Pellet wurde in 10 ml 3 M GuSCN und 4% (v/v) Triton-X 100 aufgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet zweimal mit je 10 ml 50% (v/v) EtOH gewaschen, dann getrocknet und in 2 ml TE resuspendiert. Zur Elution der DNA von der Silica-Matrix wurde das Gemisch 5 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und dann 10 min bei $7500 \times g$ (JA-14) zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses letzten Schrittes wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und erneut 10 min bei $7500 \times g$ zentrifugiert um restliche Silica-Spuren zu entfernen. Mit dem auf diese Weise gründlich gereinigten Überstand wurde optional zur Aufkonzentrierung der DNA eine 95% EtOH/5 M NaCl-Fällung durchgeführt.

Für Anwendungen wie Sequenzierungen und Protoplasten-Transformationen, die Plasmide in reiner Form erforderten, wurden Aufreinigungskits mit Silicagel-Säulen benutzt (JETSTAR® Plasmid Purification Midi Kit, GENOMED; NucleoSpin® Plasmid Macherey&Nagel).

2.5.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration von Plasmidlösungen wurde nach 300-facher Verdünnung mit H₂O eine Absorptionsmessung bei 260 nm gegen A. bidest. in einem Zweistrahlphotometer durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes $c=A d^{-1} \epsilon^{-1}$. Bei einer Schichtdicke (d) von 1 cm und einem Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA von $\epsilon=20 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ergibt sich beispielsweise bei $A_{260\text{nm}}=1$ eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für eine unverdünnte DNA-Lösung.

2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Anhand unterschiedlicher PCR-Techniken können DNA-Fragmente mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* exponentiell vermehrt werden.

Material:

10 mM dNTPs: je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
verdünnt in sterilem A. bidest

DNA-Polymerasen: Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas)

weitere Komponenten: 10 x PCR-Reaktionspuffer
25 mM MgCl₂-Stocklösung

Ein typisches PCR-Programm lautete:

Dauer	Temperatur	Vorgang	Anzahl der Zyklen
5 min	94 °C	Denaturierung (Prä-Zyklus)	1
1 min	94 °C	Denaturierung	35
1 min	58 °C	Primer-Annealing	35
1 min	72 °C	Elongation	35
10 min	72 °C	Elongation (Post-Zyklus)	1

Typischer PCR-Ansatz:

1-50 ng Templat
 je 25 pmol *sense*- und *antisense*-Primer
 0,1 mM dNTPs (0,025 mM each)
 1 x PCR-Reaktionspuffer
 1-2 mM MgCl₂
 0,5-1 U Taq-Polymerase
 ad 25 µl A. bidest

Um die Anzahl fehlerhaft eingebauter Nukleotide möglichst gering zu halten erfolgte die Amplifikation von Fragmenten, die anschließend für Klonierungen eingesetzt wurden, unter Verwendung von Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (*proof reading*) (High Fidelity[®] Polymerase, Roche; TaKaRa LA Taq[™]). Eventuell darauffolgende Restriktionsspaltungen wurden – wenn es die enzymatischen Optimalbedingungen zuließen - direkt im PCR-Ansatz oder im Anschluß an eine DNA-Aufreinigung über Gelextraktion durchgeführt (s. 2.5.8.).

2.5.5. DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Für das Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (NEB) und von MBI Fermentas verwendet. Für Analysen zur Überprüfung von Plasmidgrößen und einligierten Fragmenten wurde 0,5–1 µg, im präparativen Maßstab 5-15 µg DNA eingesetzt. Beim Verdau von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte, vorher über Gelextraktion (s. 2.5.8.) gereinigte

PCR-Ansatz (25-50 μ l) verwendet. Jeder Verdauansatz enthielt neben dem entsprechenden Puffer 1-2 U Restriktionsenzym pro μ g Plasmid-DNA. Beim Verdau genomischer DNA wurden 5 U pro μ g DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für mehrere Stunden oder ÜN bei der entsprechenden optimalen Temperatur (meist 37 °C). Manche Enzyme konnten nach dem Verdau durch Hitze inaktiviert und durch anschließende Fällung entfernt werden, während Enzyme, die nicht hitzeinaktivierbar sind, vor der Ligation durch erneute Gelextraktion und anschließende Reinigung entfernt werden mussten. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde über 1%-ige Agarosegele überprüft.

2.5.6. Glätten von Einzelstrang-DNA Überhängen (Klenow-Reaktion)

Um durch Restriktionsverdau entstandene einzelsträngige DNA-Überhänge am 3'- und am 5'-Ende zu glätten, wurde das Klenow Fragment (DNA Polymerase I *Large Fragment*, MBI Fermentas) benutzt, welches aufgrund seiner 3'-5'-Exonuklease-Aktivität Einzelstrangüberhänge am 3'-Ende entfernen und aufgrund seiner 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität Überhänge am 5'-Ende auffüllen kann. Diese Reaktion erfolgte 15 min bei 37 °C unter empfohlenen Pufferbedingungen und wurde anschließend durch Zugabe von 20 mM EDTA sowie eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

2.5.7. Dephosphorylierung geschnittener DNA

Um die Religation linearisierter DNA-Fragmente einzuschränken, wurden die entsprechenden komplementären DNA-Enden dephosphoryliert. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz enthielt 1-2 μ g linearisierte DNA, 1-2 U Alkalische Phosphatase (CIAP, *calf intestinal alkaline phosphatase*, Roche) sowie 1 \times CIAP-Puffer in einem Gesamtvolumen von 15 μ l. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C für 1 h, anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 20 mM EDTA sowie durch eine 20-minütige Hitzeinaktivierung bei 65 °C gestoppt.

2.5.8. Gelextraktion

Damit nachfolgende Reaktionen, wie zum Beispiel Sequenzierungen oder Ligationen, möglichst ungestört ablaufen konnten, wurden PCR-Produkte sowie Restriktionsverdau über Gelextraktion gereinigt. Hierfür wurde die Probe auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnte die Probe mittels Skalpell unter schwachem UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits (QIAquick Gel Extraction Kit[®], Qiagen) aus dem Gel isoliert werden. Die Elution der geextrahierten DNA von der Reinigungssäule erfolgte entweder mit dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer, mit ‚low EDTA TE‘-Puffer (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) oder mit A. bidest. (pH 7-7,5).

2.5.9. DNA-Gelelektrophorese

Material:

Matrix- und Laufpuffer 50 × TE: 242 g/l TRIS-Base
 57,1 ml/l Eisessig
 100 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,0
 mit A. bidest. auf 1 Liter auffüllen

Gel: 0,7–1,0% Agarose (in 1 × TAE)

6 × DNA-Auftragspuffer 5 × TAE
 50% (v/v) Glycerin
 0,1% Orange G
 Auffüllen mit A. bidest

Größenstandards λ DNA, verdaut mit HindIII [50 ng/μl]
 1 kb-DNA-Ladder (MBI Fermentas)

EtBr-Stocklösung 10 mg/ml EtBr (in A. bidest)

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA wurde diese in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Aufkochen der Agarose in 1 × TAE und Abkühlen auf etwa 60 °C wurde EtBr in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben und die Agarose in ein Gelbett gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol. 5 × Auftragspuffer versetzt. Der Gellauf erfolgte bei 400 mA sowie 100 V-180 V.

2.6. RNA-Techniken

2.6.1. RNA-Isolation aus *Arabidopsis*-Schüttelkulturen

Material:

<u>Lösung D</u>	4 M Guanidinium-Thiocyanat
	25 mM Natriumcitrat, pH 7,0
	0,5% Natriumlaurylsarcosin
	0,75% (v/v) β-Mercaptoethanol
Natriumacetat:	2 M, pH 4,0
Phenol:	wassergesättigt, pH ≈ 3,0
Chloroform/Isopentanol:	49:1
DEPC behandeltes H ₂ O :	H ₂ O mit 0,001 Vol. DEPC versetzt bei RT 24 h inkubiert, autoklaviert

RNA wurde aus 14 Tage alten, in Schüttelkulturen angezogenen Keimlingen isoliert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg gefrorenes Pulver wurde mit 0,5 ml Lösung D versetzt und homogenisiert. Zu der erhaltenen Suspension wurden 50 µl Natriumacetatlösung gegeben. Nach Mischen wurde mit wassergesättigtem Phenol und Chloroform/Isopentanol extrahiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (12000 rpm; 20 min; 4 °C) wurde der wäßrige Überstand zur RNA-Fällung mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Nach 1-2 h bei -20°C wurde wie oben zentrifugiert, der Rückstand in 300 µl Lösung D resuspendiert und erneut mit gleichem Volumen Isopropanol

präzipitiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC behandeltem Wasser gelöst.

Zur weiteren Reinigung schloss sich ein LiCl-Fällungsschritt an mit 0,2 Volumen 8 M LiCl zur selektiven Präzipitation großer RNA (Sambrook und Russell, 2001).

2.6.2. RNA-Isolation aus auf Platten angezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen

Für Experimente, die RNA-Material mit hohem Reinheitsgrad erforderten, wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Agarose-Platten angezogene, 10 d alte Keimlinge zur Isolierung von Gesamt-RNA benutzt. Dabei wurden pro Probe 60 mg Pflanzenmaterial aus Keimlingen verwendet, deren RNA über die Säulen eines RNA-Isolationskits (Aurum™ Total RNA Sample Pack, BIORAD, #732-6820S) gereinigt wurde.

2.6.3. Konzentrationsbestimmung RNA-haltiger Lösungen

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden zuerst photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption einer 1:100 (alternativ: 1:250) Verdünnung jeweils bei 260 und 280 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte im Anschluss anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für RNA, $\epsilon=25 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Die Verunreinigung mit Proteinen wurde über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt, der im Optimalfall im Bereich von 1,8-2 liegen sollte. Optional wurde die anschließend synthetisierte cDNA (s. 2.6.4.) zur Qualitätsprüfung auf ein 0,7-1%-iges Agarosegel aufgetragen (s. 2.5.9.). Alle RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.6.4. Reverse Transkription von RNA und RT-PCR

Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte unter Nutzung eines cDNA-Synthese-Kits (First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas, #K1612). Als Ausgangsmaterial für RT-PCRs wurde bei der reversen Transkription jeweils 500 ng Gesamt-RNA zum Umschreiben in cDNA eingesetzt.

Die hier aufgeführte Anleitung wurde für die cDNA-Erststrang-Synthese befolgt.

- Folgende Reaktionsansätze wurden in einem Eppendorf-Gefäß auf Eis zusammenpipettiert:

Gesamt-RNA 0,1-5 µg

Oligo dT-Primer [0.5 µg/µl] 1 µl

Auffüllen auf 11 µl mit Nuklease-freiem, deionisiertem H₂O

- Ansätze mischen, 3-5 s abzentrifugieren
- Für 5 min bei 70 °C inkubieren, auf Eis abkühlen lassen, kurz abzentrifugieren
- Ansätze auf Eis lagern, hinzupipettieren von:

5 × Reaktionspuffer 4 µl

RNase-Inhibitor (20 U/µl) 1 µl

10 mM dNTP mix 2 µl

- Ansätze mischen, 3-5 s abzentrifugieren
- Für 5 min bei 37 °C inkubieren (bei *random* Hexamer-Primern: 5 min 25 °C)
- Zugabe von:

M-MuLV Rev. Transkriptase (20 U/µl) 2 µl (Gesamtvolumen somit 20 µl)

- Für 60 min bei 37 °C inkubieren (bei Hexamer-Primern erst 10 min 25 °C, dann 60 min 37 °C)
- Abstoppen der Reaktion durch Inkubieren der Ansätze für 10 min bei 70 °C
- Auf Eis abkühlen lassen und bei -20 °C aufbewahren

Zur Überprüfung der umgeschriebenen cDNA wurde von den Ansätzen jeweils 0,5 µl auf ein 0,7-1%-iges Agarosegel aufgetragen. Vor ihrer Anwendung als

Templat in RT-PCR-Experimenten wurde die cDNA mit Nuklease-freiem, deionisiertem H₂O 1:10 verdünnt.

Das bei anschließenden RT-PCR-Analysen angewendete PCR-Programm entsprach, soweit nicht anders vermerkt, dem unter 2.5.4. angegebenen Standard-Lauf. Dabei wurde als Templat je nach cDNA-Konzentration 1-2 µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA erfolgte, zur Berücksichtigung der linearen Phase bei der DNA-Vermehrung, meist in 28 Zyklen (3.1.11.). Für die Untersuchung von ABA-abhängigen Veränderungen der Gen-Transkription wurden für jedes Gen spezifisch ausgewählte *forward* und *reverse* Primer verwendet (siehe Anhang 5.1.).

Der Nachweis der aus den cDNA-Templaten erhaltenen PCR-Amplifikate erfolgte, wie in 2.5.9. beschrieben, über Auftrennung in 0,7-1%-igen Agarosegele mit anschließender EtBr-Färbung.

2.7. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die Methode des „floral dip“ dient dazu, *Arabidopsis thaliana* einfach und schnell stabil zu transformieren (Clough and Bent, 1998). Da die „gedipten“ Pflanzen transformierte Samen liefern, welche direkt selektiert werden können, entfällt bei dieser Methode die Regeneration von Pflanzen aus Gewebekultur.

2.7.1. Auswahl geeigneter *Arabidopsis*-Pflanzen für die Transformation

Für die Transformation wurden 5-6 Wochen alte, *Arabidopsis*-Pflanzen vom Ökotyp RLD verwendet (9 × 9 cm Töpfe mit je 15-20 Pflanzen), welche im Idealfall möglichst viele, nur teilweise geöffnete oder noch geschlossene, und deshalb grüne Infloreszenzen besaßen.

2.7.2. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* für die „floral dip“ Transformation

Material:

LB-Medium (Luria-Bertani) s. 2.4.3.

YEB-Medium (alternativ)

Hefeextrakt	10 g/l
Rinderextrakt	5 g/l
Pepton	5 g/l
Saccharose	5 g/l
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,246 g/l
<u>Antibiotika</u>	Kanamycin 50 µg/ml
	Rifampicin 50 µg/ml
	Carbenicillin 100 µg/ml

Für die Transformation der *Arabidopsis*-Pflanzen wurden vorher über Elektroporation (2.4.5.) transformierte Agrobakterien (s. 2.4.2.) verwendet. Als binäre Ausgangsvektoren wurden dabei pBI121 (Jefferson et al., 1987) bzw. der von Olaf Groß (2003) modifizierte Vektor pPCV812Meshi (Ferrando et al., 2000) verwendet. Für die Anzucht der für die „floral dip“-Transformation verwendeten Agrobakterien wurden 5 ml-Vorkulturen mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht in LB bzw. YEB-Medium mit Rifampicin (25-50 µg/ml) und Kanamycin (pBI121) bzw. Carbenicillin (pPCV812) (beide 50 µg/ml) bei 28-30 °C inkubiert. Ausgehend von diesen frischen Vorkulturen wurde eine Hauptkultur von 400 ml LB-Medium ohne Selektion für 24 h bei 28-30 °C angezogen.

2.7.3. Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen

Material:

Infiltrationsmedium

50 ml/l 10 × Makrosalze

1.25 ml/l 400 × Mikrosalze

1.25 ml/l 400 × Vitamine

50 g/l Saccharose (5% Endkonzentration)

0,5 g/l MES

auf 1l mit Wasser auffüllen, pH 5,8 einstellen

10 µl/l BAP (Stocklösung 1 mg/ml in DMSO oder EtOH)

500 µl/l VAC-IN-Stuff (Silwet L-77; Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA; Endkonzentration 0,05%)

Die stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen durch Agrobakterien startete mit der Ernte der unter 2.7.2. beschriebenen agrobakteriellen 400 ml-Hauptkultur durch Zentrifugation (3000 × g, 4 °C, 10 min). Anschließend wurden die Bakterien erst in 5 ml, dann in insgesamt jeweils 300 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die eigentliche *in planta* Transformation wurde mit 5-6 Wochen alten, gerade blühenden Pflanzen (9 x 9 cm Töpfe mit 15-20 Pflanzen) durchgeführt. Die Infloreszenzen wurden kopfüber in die *Agrobacterium*-Zell-Suspension eingetaucht und für 3 min mit den Zellen infiltrierte, so dass alle Blüten mit der Zell-Suspension benetzt wurden. Gleichzeitig wurde der Kontakt der Agrobakterien-Suspension mit anderen Pflanzenteilen möglichst vermieden. Nach den 3 min Inkubationszeit wurden die Pflanzen hochgebunden. Zur Steigerung der Transformationsrate wurden die Pflanzen anschließend über Pipetten mit der Agrobakterien-Suspension beträufelt.

Diese Transformationsprozedur wurde nach drei Tagen identisch wiederholt, so dass auch Zellen transformiert werden konnten, die sich erst zu diesem Zeitpunkt im richtigen Entwicklungsstadium für die Transformation befanden. Eine zweite Wiederholung der Transformation nach 6-7 Tagen sollte die Transformationseffizienz noch weiter erhöhen.

Die infiltrierten Pflanzen wurden 2-4 Wochen bis zur Samenreife kultiviert. Die geernteten Samen (T_1) wurden mit Hilfe von Hygromycin (pPCV812Meshi-Konstrukte) bzw. Kanamycin (pBI121-Konstrukte) nach Transgenen selektioniert.

2.8. Transiente Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten

Die unter 3.1.11. beschriebene Untersuchung der Regulation ABA-induzierter Genexpression sowie deren Beeinflussung durch verschiedene Effektoren erfolgte unter Nutzung von *Arabidopsis*-Protoplasten als transientes Expressionssystem. Im Folgenden werden die Verfahren zur Herstellung von Protoplasten sowie zu deren Transformation beschrieben.

2.8.1. Protoplastierung von *Arabidopsis*-Blattmaterial

Material:

<u>Enzymlösung</u>	1% Cellulase „Onozuka“ R-10 (#216001, Yakult , Tokyo, Japan) 0,25% Macerozym R-10 (#202039, Yakult , Tokyo, Japan) 400 mM Mannit 8 mM CaCl_2 1% BSA (Fluka #05488) 5 mM MES-KOH (pH=5,6)
--------------------	--

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook and Russell, 2001). Dabei wurde eine Stammlösung mit 2% Cellulase, 0,5 % Macerozym und 10 mM MES-KOH (pH=5,6) gegen 10 mM MES-KOH (pH=5,6) zweimal für je 40 min dialysiert und mit PMSF (0,5 mM) behandelt. Die für die Dialyse benötigten Schläuche wurden nach Standardprotokoll vorbereitet und bei 4 °C aufbewahrt (Sambrook and Russell, 2001). Anschließend wurde Mannit und CaCl_2 zugesetzt und die Lösung bei 55 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Zusatz von BSA und der Kontrolle des pH-Wertes wurde die fertige Lösung durch 0,22 μm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

<u>WIMK</u>	0,5 M Mannit 5 mM MES-KOH (pH=5,8-6,0), autoklavieren
<u>MaMg</u>	400 mM Mannit 15 mM MgCl ₂ 5 mM MES-KOH (pH=5,6-5,8), autoklavieren
<u>FDA-Lösung</u>	1 mg/ml in Aceton

Die Protoplastenpräparation erfolgte nach den modifizierten Protokollen von T. Hoffmann (2002), Abel und Theologis sowie J. Sheen (Abel and Theologis, 1998; Sheen, 2001). Zur Protoplastierung wurden etwa 4 Wochen alte, in Erde angezogene Pflanzen vom Ökotyp Columbia oder La-er verwendet. Von diesen Pflanzen wurden 20-30 Blätter (2-3 g Frischgewicht) abgeschnitten und sofort in eine Petrischale mit 15-20 ml Enzymlösung überführt. Der Verdau des Blattmaterials erfolgte auf einem Kippschüttler bei 23-28 °C für 2-4 h. Die entstandene Protoplasten-Suspension wurde durch ein Netz mit 150 µm Maschenweite zur Abtrennung unverdaulichem Materials filtriert. Nach einer Zentrifugation bei RT und 60 × g für 2 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig in 10 ml WIMK resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde mit gleichen Zentrifugationsbedingungen und erneuter Zugabe von 10 ml WIMK wiederholt bis die Protoplasten schließlich nach nochmaliger Zentrifugation in 5 ml MaMg aufgenommen wurden. Dieses Endvolumen wurde an die anschließend bestimmte Protoplasten-Konzentration angepasst. So wurden die Zellen zur Kontrolle ihrer Vitalität mit Fluoresceindiacetat angefärbt. Hierfür wurde 0,5 µl FDA zu 20 µl einer 1:5 verdünnten Protoplasten-Suspension gegeben. Mittels eines Hematocytometers wurde die Anzahl der fluoreszierenden Protoplasten pro Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop und einem FITC Filtersatz (480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter) ermittelt. Als Richtwert entsprach 1 Protoplast/Quadrat 4×10^6 Protoplasten/ml. Anschließend wurde mit MaMg der Zählung entsprechend eine Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ Protoplasten pro ml eingestellt. Zur Erzielung besserer Transformationsraten wurde die fertige

Protoplasten-Suspension anschließend für mindestens 30 min bei 4 °C aufbewahrt.

2.8.2. Transfektion und Kultivierung der Protoplasten

Material:

DNA-Verdünnungslösung 0,5-1M Mannitol, autoklaviert

PEG-Lösung 300 mM CaCl₂
 40% PEG-4000
 0,5% MES-KOH (pH=5,8)
 (unbedingt nur sterilfiltrieren!)

WIMK s. 2.8.1.

ABA-Stocklösung 10 mM ABA (Sigma-Aldrich, München #862169)
 in 1 % MES, pH 7,0-7,5

Zur Förderung der DNA-Aufnahme in die Protoplasten wurde Polyethylenglycol (PEG-4000) verwendet. In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die zu transfizierende DNA in gleichem Volumen sterilem 0,5-1M Mannit vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde 100 µl 0,5-1 × 10⁶ Protoplasten/ml in MaMg gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Nach dem Zusatz von einem Volumen PEG-Lösung (entspricht 130-150 µl (Vol._{Protoplasten}+Vol._{DNA}+Vol._{Mannitol})) wurde wieder vorsichtig gemischt und die Suspension für 3-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 700-800 µl WIMK zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei RT und 60 × g für 2 min zentrifugiert und in WIMK resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet wieder in WIMK aufgenommen (je nach Ansatz 100-300 µl Gesamtvolumen). Je nach Experiment wurde die Protoplastensuspension gesplittet und mit Zusätzen wie Abscisinsäure versehen. Im Falle von co-transformierten Effektor-Plasmiden erfolgte die Zugabe von ABA erst nach 4-6 h phänotypischer Expression. Die verschiedenen Proben wurden schließlich

im Dunkeln bei 22-25 °C und Schütteln mit 30-50 U/min bzw bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Bei mikroskopischen Analysen von bspw. fluoreszierenden Proteinen konnte die Protoplasten-Verwendung bereits nach 8-12 h oder – wie bei Reporteraktivitäts-Messungen - nach ÜN-Inkubationen von bis zu 24 h erfolgen.

2.8.3. Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis*-Protoplasten

Material:

CCLR-Extraktionspuffer

25 mM Tris-Phosphatpuffer (pH=7,8)

2 mM DTT

2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (DCTA)

10% (v/v) Glycerin

bei –20 °C aufbewahren und bei Bedarf 1% (v/v) Triton X-100 zugeben

Für verschiedene Reporterassays wurden Proteinextrakte ausgehend von transfizierten Protoplasten hergestellt. Dabei wurde je nach getestetem Reporter-Protein unterschiedlich vorgegangen.

Für die schnelle Messung der β -Glucuronidase (GUS)-Aktivität konnte 20-50 μ l Protoplasten-Suspension direkt, vermischt mit 100 μ l in CCLR angesetztem GUS-Substratpuffer, verwendet werden. Für eine direkt im Anschluss folgende Luciferase (LUC)-Messung im Luminometer wurde der Protoplastenextrakt aus den Mikrotiter-Platten in die Luminometer-Röhrchen überführt, welchen über das Gerät automatisch je 100 μ l LUC-Substratlösung zugesetzt wurden. Diese schnelle Aufschlussmethode setzte allerdings voraus, dass die LUC- und GUS-Substratpuffer zur Lyse der Zellen 1% Triton X-100 enthielten (für Reporter-Messungen s. 2.9.).

Alternativ erfolgte der Aufschluss der Protoplasten über eine 2-minütige Zentrifugation bei 60 \times g. Die auf diese Weise möglichst weit eingeeengte Protoplastensuspension wurde schließlich in 100 μ l CCLR-Extraktionspuffer aufgenommen und eventuell gevortext. Nach Zentrifugation (14.000 U/min; 5

min) wurde der erhaltene Überstand wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für Reporter-genassays oder Protein-Gele benutzt.

2.9. Aktivitätsnachweis von Reportergenen

2.9.1. Messung der *in vivo* β -D-Glucuronidase-Aktivität in *Arabidopsis*-Protoplasten

Material:

CCLR-Puffer siehe 2.8.3.

20 × MUG-Substrat-Lösung 4 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG) in CCLR lösen

Die β -D-Glucuronidaseaktivität (GUS) wurde nach den Angaben von Jefferson (1987) bestimmt. In transienten Expressionsexperimenten wurde, wenn ausschließlich Glucuronidase-Aktivität untersucht werden sollte, mit GUS-Extraktionspuffer nach oben beschriebener Vorgehensweise (2.8.3.) extrahiert. Für die Bestimmung von Luciferase- und GUS-Aktivität nebeneinander wurde zur Extraktion CCLR benutzt (Luehrsen et al., 1992). Für die Extraktion aus ganzen Pflanzen oder Zellkulturen wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren, gemörsert und in GUS-Extraktionspuffer aufgenommen (etwa 50 mg Pflanzenmaterial pro 200 μl Extraktionspuffer). Von dem nach Zentrifugation (10 min, 14.000 U/min) erhaltenen klaren Überstand wurde 50 μl für den GUS-Nachweis eingesetzt. Bei Protoplasten wurde entweder 50 μl Suspension direkt mit 100 μl Substratpuffer versetzt oder der Aufschluss erfolgte über eine 2-minütige Zentrifugation bei $60 \times g$. Die so aufkonzentrierte Protoplastensuspension wurde schließlich in 100 μl CCLR-Extraktionspuffer aufgenommen und eventuell gevortext. Nach Zentrifugation (14.000 U/min; 5 min) wurde der erhaltene Überstand für Reporter-genassays verwendet (s. auch 2.8.3.).

Die im Extrakt vorhandene Glucuronidaseaktivität wurde fluorimetrisch erfasst. Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid verwendet. Die β -D-

Glucuronidase katalysiert die Esterhydrolyse und damit die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon. 4-Methylumbelliferon kann fluorimetrisch (365 nm Anregung; 460 nm Emission) quantifiziert werden. Die Messung wurde in schwarzen Mikrotiterplatten (Nunc GmbH & Co. KG) im HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader von Perkin Elmer durchgeführt. Zu 50 µl Extrakt wurden 100 µl Assaypuffer gegeben. Nach 10 s Schütteln im Bioassayreader wurde bei 25-38 °C über 25 Zyklen und somit über 8 min alle 20 s die Fluoreszenz gemessen, wobei die Anregung bei 360 nm und die Emission bei 465 nm erfolgte. Die gemessene Zunahme der relativen Fluoreszenz pro Zeiteinheit ist direkt proportional zur Enzymaktivität.

2.9.2. Histochemischer Nachweis der *in vivo* β-D-Glucuronidase-Aktivität in *Arabidopsis*-Pflanzen und *Arabidopsis*-Zellkulturen

Der Nachweis der β-Glucuronidase erfolgte durch ein histochemisches Verfahren, bei dem in Anwesenheit der aktiven β-Glucuronidase deren Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronid (X-GlucA) gespalten wird. Dabei entsteht mit ClBr-Indigo ein wasserunlösliches Endprodukt. Diese Reaktion kann durch die Zugabe von Kalium (II)- und Kalium (III)-Hexacyanoferrat beschleunigt werden.

Material:

<u>X-Gluc-Waschlösung</u>	50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆
<u>X-Gluc-Färbelösung</u>	50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 2 mM X-GlucA
eventuell zusätzlich:	1% DMSO
<u>X-Gluc-Stocklösung</u>	100 mM X-GlucA in DMFA, bei –20 °C aufbewahren, vor Licht schützen, bei Gelbfärbung verwerfen
90% Aceton	

alternativ: Fixierlösung 150 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0
 1% Formaldehyd
 0,1% Triton X-100

100 × DAPI-Stock 300 µM DAPI
 in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,2
 aufbewahren bei 4 °C

Für die Färbung von Keimlingen wurden nach einem abgewandelten Protokoll (Rodrigues-Pousada et al., 1993) 2-3 Pflänzchen in 2 ml-Gefäßen mit 500 µl 90% Aceton auf Eis fixiert (20 min oder länger). Die Fixierung kann alternativ mit Fixierlösung 20 min auf Eis erfolgen. Nach dem Entfernen des Acetons werden die Pflanzen mit je 1 ml X-Gluc-Waschlösung gewaschen. Der Waschpuffer wurde verworfen und durch X-Gluc Färbelösung ersetzt, wobei soviel Färbelösung eingesetzt wurde, dass alle Keimlinge vollständig bedeckt waren. Nach einer optionalen Vakuuminfiltration zum besseren Eindringen der Färbelösung wurden die Keimlinge bei 37 °C mehrere Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Um auch schwächere Blaufärbung sichtbar zu machen, wurde anschließend mit 80%-igem Ethanol bei 80 °C das Chlorophyll aus dem Gewebe extrahiert.

Zur Markierung der Zellkerne im fixierten Gewebe wurde ausschließlich DAPI verwendet, wobei das Gewebe für 10 min mit 3 µM DAPI inkubiert und dann unter Fluoreszenz (DAPI)- bzw. Durchlicht (GUS) am Mikroskop untersucht wurde (Zeiss, Axioskop). Die DAPI-Fluoreszenz wurde mit einem 365 (40) nm Anregungs-, 395 nm Sperr- und 420 nm Langpassemissionsfilter erfasst. Aufnahmen erfolgten mit einer Nikon Coolpix 990 Kamera. Als Objektive wurden die folgenden verwendet:

- 10er: Plan-Neofluar 10x/0,3
- 20er: Plan-Neofluar 20x/0,5
- 40er: Plan-Neofluar 40x/0,75
- 100er: Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil

2.9.3. Nachweis der *Photinus pyralis* Luciferase-Aktivität in *Arabidopsis*-Keimlingen, -Protoplasten und -Zellkulturen

Material:

<u>Substratpuffer (LAR)</u>	20 mM Tricin (pH=7,8, einstellen mit NaOH) 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 2,7 mM MgSO_4 0,1 mM Na_2EDTA 33,3 mM DTT 0,27 mM Coenzym A 0,47 mM D-Luciferin (PJK GmbH, Kleinblittersdorf) 0,53 mM ATP
<u>Luciferinlösung</u>	1 mM D-Luciferin (PJK GmbH, Kleinblittersdorf) in 10 mM MES (pH 7,0) mit 0,01% Tween 80
<u>CCLR-Puffer</u>	optional mit 1% Triton X-100, siehe 2.8.3.

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Proteinextrakten wurde nach der Methode von (Luehrsen et al., 1992) durchgeführt, bei der die Lichtemission durch die Verwendung von Coenzym A über einen längeren Zeitraum stabil bleibt und nicht wie bei Verwendung von Substratlösungen ohne Coenzym A nur von vergleichsweise kurzer Dauer ist (0,3 s). Für den Luciferasenachweis alleine oder neben β -D-Glucuronidase wurde erfolgte die Herstellung von Proteinextrakten wie unter 2.8.3. beschrieben. Ganze Pflanzen bzw. Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, gemörsert und in Extraktionspuffer (etwa 50 mg Pflanzenmaterial oder 2 Spatelspitzen in 300 μl CCLR mit 1% Triton X-100) aufgenommen. Luciferase wurde im, durch Zentrifugation (5-10 min, 14.000 U/min) erhaltenen, klaren Überstand bestimmt. Dieser wurde zur Hemmung des Enzym-Abbaus auf Eis aufbewahrt und innerhalb einer Stunde verarbeitet. Die Luciferaseaktivität der gewonnenen Extrakte wurde im *flash`n glow* Luminometer von Berhold in *light units* (LU) pro 90 s gemessen. 50 μl des jeweiligen Extraktes wurden vorgelegt. Die Hintergrundstrahlung wurde direkt nach der Injektion des Substratpuffers über 20 s und das infolge der Luciferase-Aktivität emittierte Licht über 90 s

gemessen. Alternativ konnte die Licht-Emission auch nur 20 s und die Hintergrundstrahlung dann entsprechend nur 10 s gemessen werden. In die Proben wurden jeweils 100 µl des Substratpuffers injiziert. Bei *in vivo* Messungen an Keimlingen wurde die Aktivität der Luciferase mit einer hochsensitiven Kamera (ARGUS-50 System mit einer C2400-47 Kamera; Hamamatsu Photonics, Herrsching) nach (Ramagli, 1985; Millar et al., 1995) nachgewiesen. Auf Agarplatten angezogene Keimlinge wurden mit Luciferinlösung besprüht.

Anschließend wurde je nach Signalintensität bis zu 30 min die Biolumineszenz aufgenommen.

2.9.4. Untersuchung von GFP- bzw. YFP-Fluoreszenz in *Arabidopsis*-Protoplasten und –Keimlingen durch Epifluoreszenz-Mikroskopie

Material:

1000 × H33342-Lösung 10 mg/ml H33342 in H₂O, sterilfiltriert
(zur Kernmarkierung) (Fluka, #14533)

Zur zellulären Lokalisation wurden GFP- bzw. YFP-Fusionsproteine transient in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert. Die Untersuchung der in WIMK oder MaMg-Lösung resuspendierten Protoplasten im Epifluoreszenz-Mikroskop erfolgte in der Zählkammer oder auf Objektträgern unter Nutzung eines FITC-Filtersatzes, der für GFP 480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter enthielt. Für die Untersuchung von YFP am wurde ein FITC-Filtersatz aus 500 (20) nm Anregungs-, 515 nm Sperr- und 535 (30) nm Emissionsfilter verwendet.

Die GFP-Lokalisation in transgenen Keimlingen der T₂- bzw. T₃-Generation erfolgte unter Verwendung der gleichen Filtersätze. Die Untersuchung der Keimlinge erfolgte unter Zugabe von Wasser auf mit Deckgläsern abgedeckten Objektträgern. Die Objektive entsprechen denen, die bei der GUS-Untersuchung benutzt wurden (s. 2.9.3.)

2.9.5. Kernfärbung in *Arabidopsis*-Protoplasten und –Keimlingen

Zur Markierung der Zellkerne im pflanzlichen Gewebe wurde aufgrund der besseren Diffusion durch lebendes Gewebe ausschließlich das in die DNA interkalierende Bisbenzimid H33342 verwendet, welches mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml zu den Protoplasten zugegeben wurde. Nach 10 min Einwirkzeit bei 25-28 °C konnten die Zellkerne im Epifluoreszenz-Mikroskop mit dem für DAPI verwendeten Filtersatz (s. 2.9.3.) bzw. im Konfokalmikroskop mit den entsprechenden Parametern unter Verwendung des 405 nm-Lasers lokalisiert werden. Um ein Überlappen der GFP- bzw. der YFP- und der H33342-Fluoreszenz zu vermeiden, wurden am Konfokalmikroskop die entsprechenden Signale sequentiell, also zeitlich hintereinander aufgenommen. Zur Markierung der Zellkerne in Protoplasten wurde DAPI oder H33342 verwendet. Bei DAPI-Färbungen wurde wie unter 2.9.3., bei H33342 wie oben beschrieben verfahren.

2.10. Konfokale Mikroskopie

Bei dem verwendeten Mikroskope, handelt es sich um inverses konfokales Mikroskope der Firma Olympus: Fluoview FV1000.

2.10.1. Verwendete Laser

Folgende Laser mit Angabe der Emissionswellenlängen wurden verwendet:

Argonlaser mit $\lambda = 405$ nm (DAPI, H33342)

Argonlaser mit $\lambda = 488$ nm (GFP, FM 4-64)

Argonlaser mit $\lambda = 515$ nm (YFP)

2.10.2. Objektive

Verwendete Objektive:

- 10er: UPLFLN 10x/0,3 Working distance: 10 mM
20er: UPFLN 20x/0,5 Working distance: 2,1 mm
40er: PLABPO: 40x/0,8 Wasser Working distance: 0,16 mm
60er: LUMPLFL: 60x/1,1 Wasser Working distance: 2 mm

2.10.3. Vorbereitung der Präparate und Zeitserien

Protoplasten:

Zur Untersuchung der subzellulären GFP- bzw. YFP-Lokalisation im inversen Konfokalmikroskop wurden *Arabidopsis*-Protoplasten auf möglichst dünnen, durch Anbringen einer Vertiefung modifizierten Deckgläsern aufgetragen und unter Verwendung des 488 nm- (GFP) bzw. des 515 nm-Lasers (YFP) untersucht.

Keimlinge:

Die GFP-Lokalisation in transgenen Keimlingen der T₂- bzw. T₃-Generation erfolgte unter Verwendung des gleichen Lasers. Die zu untersuchenden Keimlinge wurden vorsichtig mit einer Federpinzette von den Agarplatten zwischen zwei Deckgläser mit Wasser transferiert. Für Zeitreihen wurden - zwecks besserer Zugabe von ABA - die mit Vertiefung versehenen Deckgläser benutzt.

2.10.4. Markierung der Zellmembranen in *Arabidopsis*-Wurzeln

Material:

- 300 × FM 4-64-Lösung 1,5 mg/ml in DMSO (Molecular Probes #T3166)
(zur Membranmarkierung) Endkonzentration: 5 µg/ml FM 4-64 in H₂O (evtl.
mit 0,05% Silwet

Zur Visualisierung der zellulären Membranen in der Wurzelspitze von *Arabidopsis*-Keimlingen wurden die frisch abgeschnittenen Wurzeln auf einem Objektträger in eine wässrige FM 4-64-Lösung gelegt und nach 5-10 min Inkubation im Konfokalmikroskop angeschaut. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge für FM 4-64 betrug 515 bzw. 640 nm. Zur Anregung unter dem Konfokalmikroskop wurde der 480 nm-Laser benutzt.

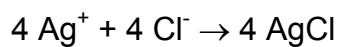
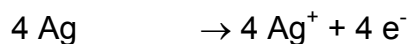
2.11. Proteinmengen-Bestimmung nach Bradford

Die in Extrakten aus transgenen Pflanzen oder Zellsuspensionen gemessene Reporteraktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt des Extraktes bezogen. Der Proteingehalt wurde über einen modifizierten Bradford-Nachweis nach (Ramagli, 1985) bestimmt. Hierfür wurden Standardproteinlösungen mit bekannten BSA-Konzentrationen von 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 8,0; 10 µg/10µl erstellt. Nach Erstellen der Eichkurve über Messung der Absorptionen bei einer Wellenlänge von 595 nm im HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader von Perkin Elmer erfolgte die Mengenbestimmung in den eigentlichen Proben. Hierfür wurde jeweils zu 1 µl (bei Bedarf verdünnter) Proteinlösung 9 µl 0,11 M HCl und 200 µl des 1:3 verdünnten Bradford-Reagenz zugegeben. Nach 5 min Inkubation wurde parallel zum Erstellen der Eichkurve die Absorption gemessen.

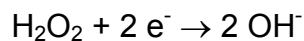
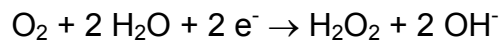
2.12. Ermittlung von Sauerstoff-Konzentrationen in Flüssigkultur-Überständen

Die Messung der Sauerstoff (O_2)-Konzentration im Überstand von *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur erfolgte mit Hilfe einer Sauerstoff-Elektrode (Multichannel Oxygen Detector, model 2610, Orbisphere Laboratories, Geneva, Switzerland). Die Sauerstoffelektrode besteht aus einer Silber- und einer Platinelektrode, welche über eine gesättigte KCl-Lösung (KCl-Brücke) miteinander verbunden sind. Die Platinelektrode ist außerdem mit einer Teflonmembran überzogen (Dicke: 0,0125 mm), welche den Reaktionsraum mit dem O_2 -haltigen Gemisch

von ihr abtrennt (s. Abb. 2.1.). Diese Membran stellt für Wasser und die darin gelösten Substanzen einen sehr hohen Diffusionswiderstand dar, während sie für Sauerstoff sehr permeabel ist. Wird die Platinelektrode mit dem negativen und die Silberelektrode mit dem positiven Pol einer Batterie verbunden, so lädt sich die Platinelektrode negativ auf und wird zur Kathode, während die Silberelektrode ihre Elektronen abgibt und damit zur Anode wird. Unter diesen Umständen können in der Gegenwart von Sauerstoff an der Platinelektrode folgende chemische Vorgänge an der an der Silberelektrode formuliert werden (s. Abb. 2.1.):



Infolge dieser Reaktionskette lagert sich Silberchlorid an der Oberfläche der Anode ab und es werden Elektronen bereitgestellt, die über den externen Stromkreis zur Platinelektrode gelangen und den Sauerstoff reduzieren:



Der Strom, der durch den über die KCl-Brücke geschlossenen Kreislauf fließt, ist direkt proportional zur Sauerstoffmenge in der direkten Umgebung der Platinelektrode. Da die Reaktionen an der Kathode irreversibel sind, fließt nach vollständiger Reduktion des Sauerstoffs kein weiterer Strom mehr. Die Messung des Stroms erfolgt über ein an die Elektrode angeschlossenes Amperemeter und wird mit Hilfe eines Schreibers registriert.

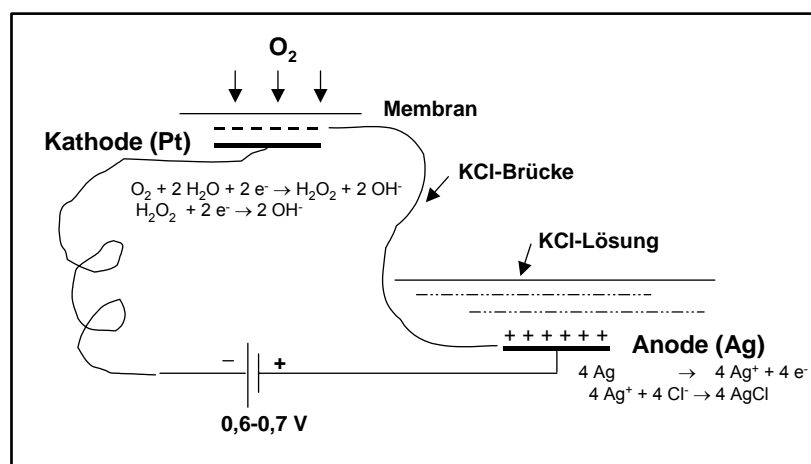


Abb. 2.1.: Reaktionen in einer Sauerstoffelektrode während der Messung von O₂

Um die Veränderung der Sauerstoff-Konzentration in mit Agrobakterien infizierten Zellkulturüberständen zu messen, wurden die Kolben auf einen Magnetrührer gestellt und die vorher geeichte und mit frischem Wasser kalibrierte Sonde zur Messung der O₂-Konzentration unter gleichmäßigem Rühren der Lösung in die Sonde getaucht. Um den Verbrauch des Sauerstoffs in den mit Agrobakterien belasteten Zellkulturüberständen über die Zeit zu dokumentieren, wurde in einem Zeitraum von bis zu 3 min alle 10 s die O₂-Konzentration bestimmt (für Details siehe Bedienungsanleitung Multichannel Oxygen Detector, model 2610, Orbisphere Laboratories).

3. Ergebnisse

3.1. Funktionelle Analyse eines Kernlokalisierungssignals in ABI1/abi1

Die meisten der ABA-abhängigen Reaktionen wie Samenreifung oder vegetatives Wachstum, aber auch die Anpassung an Stresssituationen sind mit einer ABA-abhängigen Regulation der Genexpression verbunden. Analysen zur Identifikation ABA-regulierter Gene in *Arabidopsis* ergaben für zahlreiche Komponenten der ABA-Signalkaskade eine Abscisinsäure-abhängige Veränderung der Genexpression (Hoth et al., 2002; Seki et al., 2002).

Obwohl über den genauen Zusammenhang zwischen ABA-Signaltransduktion und Regulation ABA-abhängiger Genexpression bisher wenig bekannt ist, konnte mit der PP2C Phosphatase ABI1 bereits ein wichtiger Regulator der ABA-abhängigen Genexpression beschrieben werden, der die Induktion ABA-regulierter Gene in Mais- (Sheen, 1998) und *Arabidopsis*-Protoplasten negativ beeinflusst (Hoffmann, 2002).

Um weiteren Aufschluss über die Rolle von ABI1 innerhalb der ABA-gesteuerten Genexpression von *Arabidopsis* zu erhalten, wurde über ein *yeast two-hybrid screening* nach ABI1-Interaktionspartnern gesucht. Dabei konnte die spezifische Bindung zwischen ABI1 und dem nukleär lokalisierten HD-Zip-Protein ATHB6 nachgewiesen werden, welche zusätzlich durch *in vitro* Bindungsassays bestätigt wurde (Himmelbach et al., 2002).

3.1.1. Herstellung deletierter und mutierter Versionen eines potenziellen ABI1/abi1 Kernlokalisierungssignals

Zusätzlich zu seiner Wechselwirkung mit dem HD-Zip-Transkriptionsfaktor ATHB6 konnte für ABI1 in unterschiedlichen transienten (Hoth et al., 2002; Zhang et al., 2004) und stabil transformierten Systemen (Himmelbach, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse) neben einer cytosolischen auch eine nukleäre Lokalisation festgestellt werden. Auf der Suche nach möglichen Kernlokalisierungssignalen (NLS, *nuclear localisation site*) innerhalb der ABI1 Sequenz wurde an deren C-Terminus ein kurzer Arginin- und Lysin-reicher

Bereich (s. Abb. 3.1.) gefunden, welcher hohe Ähnlichkeit mit der NLS des großen SV40 T-Antigens aufweist (SV40, *simian virus 40*) (Kalderon et al., 1984). Des Weiteren enthält der ausgewählte ABI1-Bereich eine Sequenz aus drei Aminosäuren, die exakt einem der zwei NLS-Motive des O2-Proteins aus Mais entspricht (Varagona et al., 1992).

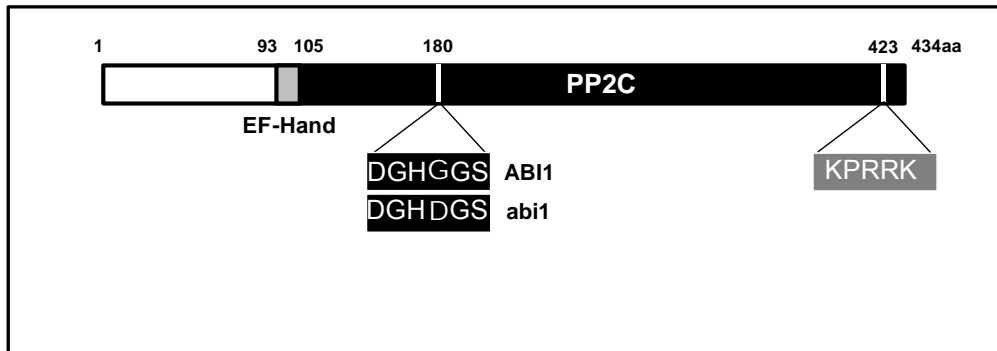


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von ABI1 und *abi1*. Die Gesamtlänge der beiden Proteine beträgt 434 Aminosäuren. Der C-terminale Bereich (schwarz hinterlegt) enthält die PP2C Domäne, der N-Terminus weist eine potenzielle Ca^{2+} -Bindedomäne auf (EF-Hand). Die *abi1*-Mutation beruht auf dem Austausch des Glycins durch Asparagin an Position 180 (verändert nach Yi, 2000).

Um den Einfluss dieses C-terminalen Motivs auf die subzelluläre Lokalisation und die Funktion von ABI1 und *abi1* zu ermitteln, wurde eine mutierte (ABI1mtNLS bzw. *abi1*mtNLS) und eine deletierte Version (ABI1dNLS bzw. *abi1*dNLS) dieser basischen Region konstruiert. Die Mutation beziehungsweise Deletion der ursprünglichen, 15 bp langen Sequenz erfolgte über PCR mit Hilfe spezieller Primer (s. Anhang). Die Deletion der potenziellen NLS erfolgte durch PCR-Amplifikation der am C-Terminus um 51 bp verkürzten ABI1-Sequenz. Da die auch in Pflanzen funktionstüchtige NLS des großen SV40 T-Antigens über den Austausch eines Lysin-Restes durch Asparagin deaktiviert werden kann (Lanford and Butel, 1984; Hicks and Raikhel, 1993; Merkle et al., 1996), wurde dementsprechend für die mutierte Version der ABI1-NLS ein Primer konstruiert, der durch seine modifizierte Sequenz für den Austausch der basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) durch die polaren, aber ungeladenen Bausteine Asparagin (N) bzw. Glutamin (Q) sorgte (für Primer s. Anhang 5.1.).

	419	434
ABI1 (Arabidopsis)	... <u>VVDLKKPRRKLKSKPLN</u>	
ABI1 mutiert	... <u>VVDLKKPQNNLQSKPLN</u>	
	127	131
O2 (Mais)	... <u>LRRKL</u> ...	
	126	132
SV40 T-Antigen	... <u>PKKKRK</u> ...	
SV40 T-Antigen (mutiert)	... <u>PKNKRK</u> ...	

Abb. 3.2.: Wildtyp und mutiertes NLS-Motiv in ABI1 bzw. abi1 im Vergleich zu den NLS-Motiven des O2-Proteins aus Mais bzw. des SV40 T-Antigens. Neben der pflanzlichen O2-NLS ist die in Pflanzen funktionsfähige NLS des SV40 T-Antigens sowie deren nachweislich inaktive, mutierte Version (Merkle et al., 1996) angegeben. Des Weiteren sind Position und Sequenz der letzten 16 Aminosäuren am C-Terminus von ABI1 aufgeführt. Letztere wurden für die Konstruktion von ABI1dNLS bzw. abi1dNLS deletiert. Das 12 Aminosäuren vom C-Terminus entfernte, putative NLS-Motiv ist durch Unterstreichen gekennzeichnet und die für die Mutation der NLS eingeführten Aminosäure-Austausche sind angegeben (ABI1mtNLS).

Alle hier erwähnten Variationen des NLS-Motivs von ABI1 sind in Abb. 3.2. im Vergleich zu den NLS-Versionen des O2-Proteins und des SV40 T-Antigens dargestellt.

3.1.2. Cotransfektion von ABA-regulierten Reportersystemen und ABI1-Effektor-Konstrukten

Um die mit der Deaktivierung des NLS-Motivs in ABI1 verbundenen Konsequenzen zu ermitteln, wurde als erstes untersucht, ob der beschriebene negative Effekt von ABI1 auf die Aktivierung ABA-regulierter Gene (Sheen, 1998) auch bei Ausfall der möglichen NLS-Funktion zu beobachten ist.

Als transientes experimentelles System für die Untersuchung von ABI1 und abi1 mit jeweils intakter bzw. nicht funktionaler NLS wurde die PEG-abhängige Transformation von *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten genutzt. Hierfür wurden die verschiedenen ABI1/abi1-Konstrukte jeweils zusammen mit einem ABA-induzierbaren Reportergenkonstrukt in den Protoplasten exprimiert. Außerdem wurde mit ABI1 NAP eine ABI1-Version ohne Phosphatase-Aktivität als bereits beschriebene inaktive ABI1-Effektor-Version getestet. Die zur

Inaktivierung der katalytischen Aktivität in ABI1 NAP führende Sequenzabweichung besteht im Austausch eines Asparaginsäure-Restes durch einen Alanin-Baustein an Position 177 (Sheen, 1998; Himmelbach et al., 2002). Als Reporterkonstrukte wurden die von Thomas Hoffmann (2002) bereits in pSKAscI klonierten, ABA-induzierbaren Reporterengenkonstrukte *RAB18::LUC* und *RD29B::LUC* genutzt (s. Abb. 3.3.).

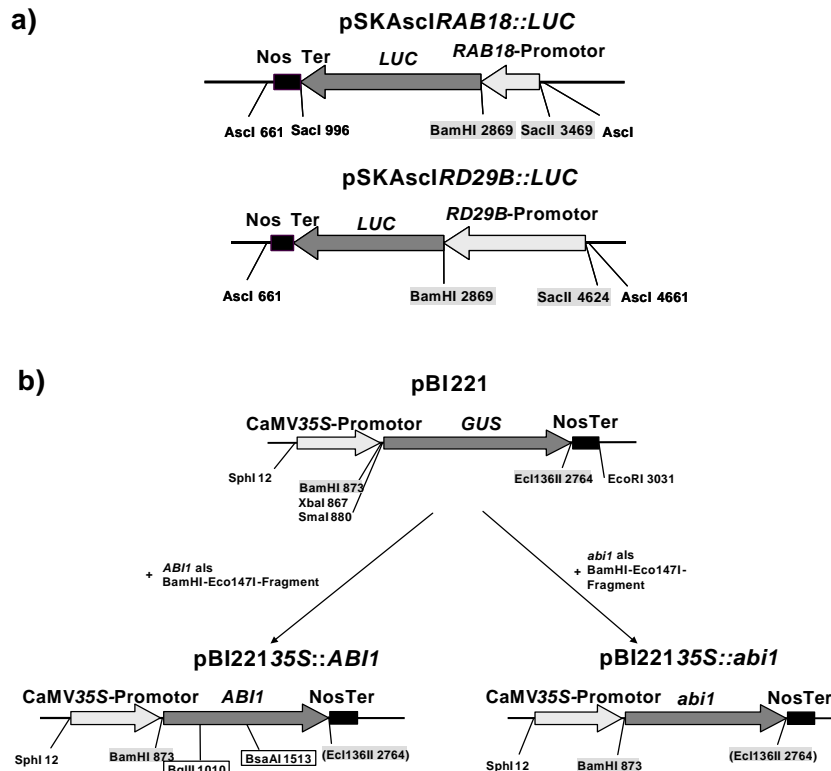


Abb. 3.3.: Konstrukte für die Co-Expression ABA-induzierbarer Reporter (*RAB18::LUC* und *RD29B::LUC*, dargestellt in a) und verschiedener ABI1 bzw. *abi1* Effektoren (b) im transienten Protoplasten-System (verändert nach T. Hoffmann, 2002). Da alle ABI1- und *abi1*-Effektoren auf die gleiche Weise kloniert wurden sind hier exemplarisch die Kassetten für ABI1 und *abi1* dargestellt. Informationen zur *ABI1* NAP Effektor-kassette sind der Dissertation von T. Hoffmann zu entnehmen. Zur Anwendung der *RD29B::LUC*-Reporter-kassette siehe 3.1.6.

Das *RAB18*-Gen (*At5g66400*) codiert ein glycinreiches, hydrophiles Protein, welches durch Kälte, Trockenheit oder exogen applizierte Abscisinsäure induziert wird (Lang and Palva, 1992). An der Induktion des *RD29B*-Gens (*At5g52300*), welche durch Dehydration, osmotischen Stress oder exogene ABA-Applikation herbeigeführt wird, sind bZIP-Transkriptionsfaktoren beteiligt

(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Uno et al., 2000). Das *RD29B*-Gen entspricht dem durch Lang und Palva (1992) beschriebenen *LT165*-Gen.

Die von Axel Himmelbach zur Verfügung gestellten Effektor-Konstrukte entstanden durch Ligation der *ABI1*- bzw. *abi1*- oder *ABI1 NAP*-Sequenz als BamHI-Eco147I Fragment in den von Thomas Hoffmann konstruierten, BamHI- und Ecl1136II-verdauten Vektor pBI221 (Jefferson et al., 1987). Um die deaktivierte NLS-Version von *ABI1* und *abi1* zu testen wurden die von Axel Himmelbach in pSK klonierten *35S::ABI1mtNLS*- und *35S::abi1mtNLS*-Kassetten verwendet.

Alle Effektorgene standen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *CaMV 35S*-Promotors sowie des *NOS*-Terminators. Detaillierte Informationen zu Effektor- und Reporter-genkonstrukten sind Abb. 3.3. sowie dem Anhang 5.3. zu entnehmen.

Die Effektor-Plasmide pBI22135S::*ABI1*, pBI22135S::*abi1*, pBI22135S::*ABI1NAP* sowie pSK35S::*ABI1mtNLS* und pSK35S::*abi1mtNLS* wurden transient in *Arabidopsis*-Protoplasten eingebracht um ihren Effekt auf die ABA-Regulation des *RAB18::LUC*-Reporterkonstruktes zu testen.

3.1.3. Auswirkung eines inaktivierten NLS-Motivs auf die *ABI1/abi1* Funktion bei der Regulation ABA-induzierter Genexpression

Für die Analyse der Auswirkungen verschiedener *ABI1*- und *abi1*-Effektoren auf die *RAB18::LUC*-Regulation wurden Columbia (Col) Protoplasten mit 15 µg pSKAscI*RAB18::LUC* sowie jeweils unterschiedlichen Mengen (0-10 µg) des jeweils getesteten Effektor-Plasmids (pBI22135S::*ABI1*, pBI22135S::*abi1*...) cotransfiziert. Als interner Standard wurde 5 µg pSK35S.Ω::*GUS* eingesetzt. Zur Expression des Effektors wurden die Protoplasten nach der Transfektion zunächst 4-6 h ohne Abscisinsäure inkubiert, anschließend wurde die Ansätze gesplittet und zur Induktion des Reporters 30 µM ABA bzw. das entsprechende Volumen an 10 mM MES (pH 7,0) zugegeben. Vor der Messung der LUC- und GUS-Aktivität wurden die Protoplasten für weitere 14-16 h inkubiert.

In Abbildung 3.4. sind die über β-Glucuronidase (GUS) standardisierten, ABA-induzierten LUC-Werte für *RAB::LUC* bei ansteigender Menge an Effektor-

Plasmid dargestellt. Die ABA-Induktion des Reporter-Konstruktes unter dem Einfluss des jeweiligen Effektors wurde relativ zur Reporter-Aktivität in Abwesenheit von Abscisinsäure berechnet und in Prozent ausgedrückt, wobei die ABA-induzierte Reporteraktivität in Anwesenheit einer leeren Vektor-Kontrolle als 100%-Wert angesehen wurde.

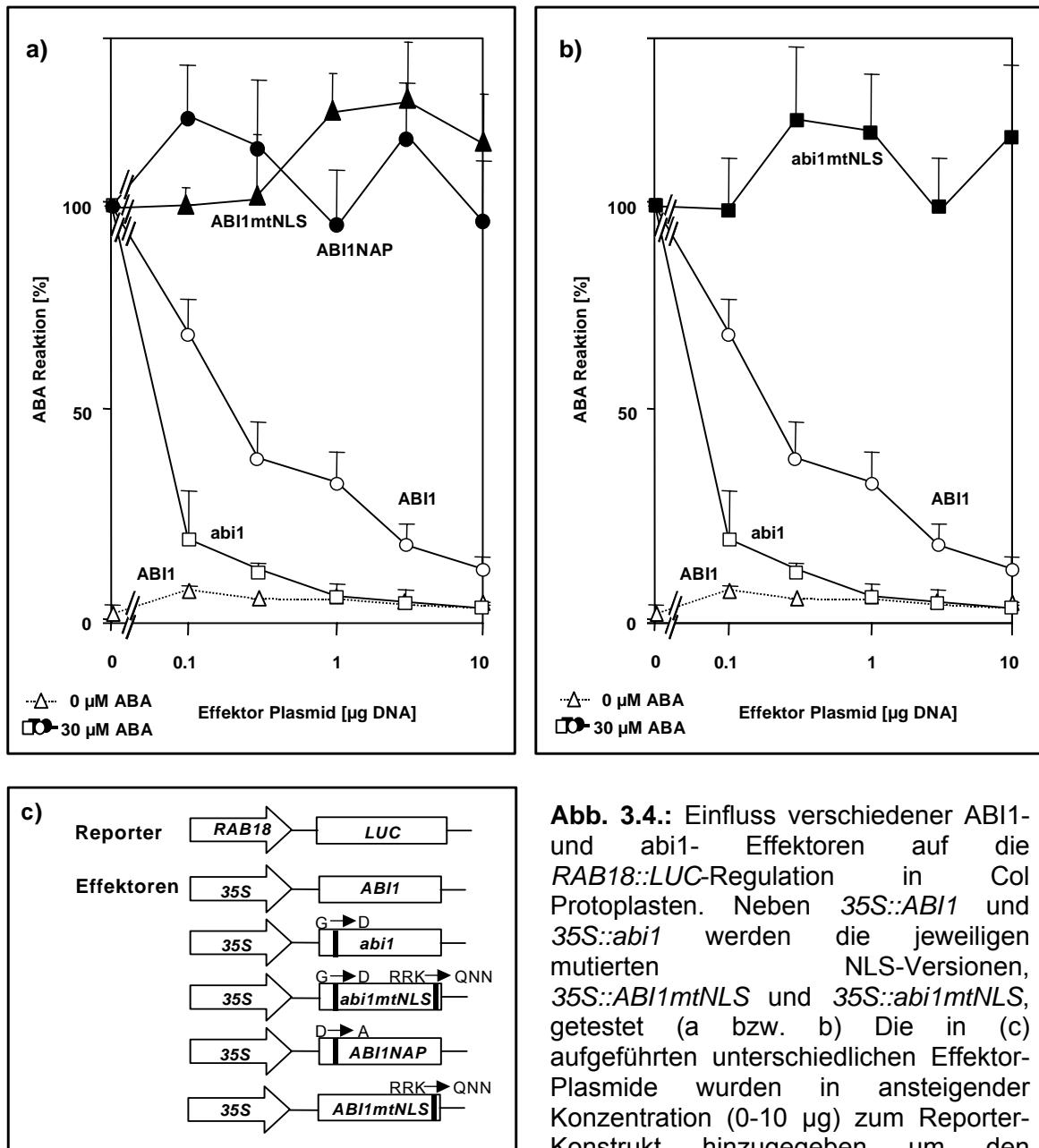


Abb. 3.4.: Einfluss verschiedener ABI1- und abi1- Effektoren auf die *RAB18::LUC*-Regulation in Col Protoplasten. Neben *35S::ABI1* und *35S::abi1* werden die jeweiligen mutierten NLS-Versionen, *35S::ABI1mtNLS* und *35S::abi1mtNLS*, getestet (a bzw. b) Die in (c) aufgeführten unterschiedlichen Effektor-Plasmide wurden in ansteigender Konzentration (0-10 μg) zum Reporter-Konstrukt hinzugegeben um den jeweiligen Effekt der Proteine auf die Reporter-Expression in An- oder Abwesenheit von Abscisinsäure zu untersuchen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie).

Mit steigender Menge sowohl von *35S::ABI1* als auch von *35S::abi1* zeigte sich eine verstärkende Abnahme der ABA-vermittelten Reporter-Induktion, wobei sich für das mutierte Protein *abi1* ein stärkerer negativer Effekt auf die Induktion ergab als bei Überexpression des Wildtyp-Proteins *ABI1*. Bei Cotransfektion von *35S::abi1* sank die Induktion des *RAB18*-Promotors bei einer maximalen Effektorplasmid-Menge von 10 µg auf 3% ab, während die unter dem Einfluss von 10 µg *35S::ABI1*-Plasmid verbleibende *RAB18::LUC*-Induktion noch 13% des ursprünglichen, vollen Induktionswertes betrug (s. Abb. 3.4.a und b).

Während also die ein intaktes NLS-Motiv besitzenden *ABI1*- und *abi1*-Proteine die ABA-abhängige Induktion des *RAB18*-Promotors erwartungsgemäß hemmten, nahmen die Effektoren *ABI1mtNLS* (a) und *abi1mtNLS* (b) jeweils keinen inhibierenden Einfluss auf die durch Abscisinsäure verursachte Gen-Induktion. Sie verhielten sich damit wie die katalytisch inaktive Phosphatase *ABI1 NAP* (Abb. 3.4.a), deren Überexpression zu keiner im transienten System erfassbaren Veränderung der Reporter-Induktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Effektor führte. Die erkennbaren Schwankungen der aus sieben unterschiedlichen Transformationsansätzen zusammengestellten Messwerte sind auf die bei unabhängigen Transfektionen auftretenden Abweichungen zurückzuführen.

3.1.4. Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen zur Lokalisierung von *ABI1* und *abi1* in Abhängigkeit des NLS-Motivs

Als zusätzliche Bestätigung der durch die defekte NLS verursachten Aufhebung des inhibitorischen Einflusses von *ABI1/abi1* auf die ABA-abhängige Genregulation sollte die subzelluläre Lokalisation von *ABI1* und *abi1* in Abhängigkeit des NLS-Motivs untersucht werden. Sowohl in Zwiebel Epidermiszellen (Hoth et al., 2002) als auch in Protoplasten von *Arabidopsis* (Zhang et al., 2004) oder Mais (Himmelbach, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse) wurden bereits transient exprimierte GFP-Fusionsproteine von *ABI1* bzw. *abi1* im Kern nachgewiesen.

Um die Lokalisationsstudien in *Arabidopsis* zu unterstützen und um den Einfluss der ABI1/abi1-NLS auf die subzelluläre Verteilung des jeweiligen Proteins zu untersuchen, wurden verschiedene ABI1- und abi1-Versionen in den von Thomas Hoffmann konstruierten Vektor pBIGFP-fusion kloniert (Hoffmann, 2002). Bei diesem Vektor handelt es sich um ein pBI221-Derivat mit *CaMV* 35S-Promotor, S1 *enhancer* (Futterer et al., 1990) und *smRS-GFP*-Sequenz (*soluble modified red shifted GFP*) mit mutiertem STOP-Codon (Davis and Vierstra, 1998). Er wurde für die Expression von GFP-Fusionsproteinen im transienten System und als Zwischenstufe für die Klonierung dieser Reporter-Fusionen in den binären Vektor pBI121 genutzt.

Neben den bereits bezüglich der ABA-abhängigen Genregulation in *Arabidopsis* Protoplasten getesteten ABI1/abi1-Versionen (s. 3.1.3.) wurden zusätzlich ABI1 und abi1 mit jeweils deletierter NLS-Version in den Vektor pBIGFP-fusion kloniert (*ABI1dNLS* bzw. *abi1dNLS*, siehe 3.1.1.).

Alle ABI1- und abi1-Sequenzen wurden als Amplifikat einer *proof reading* PCR mit Hilfe von XhoI-Überhängen in die hinter dem GFP-Gen eingefügte XhoI-Schnittstelle ligiert (Primer s. Anhang 5.1.). Dadurch handelte es sich bei den angefertigten GFP-Fusionsklonen ausschließlich um N-terminale Reporter-Fusionen (s. Abb. 3.5.). Alle GFP-Konstrukte sind dem Anhang 5.3. zu entnehmen.

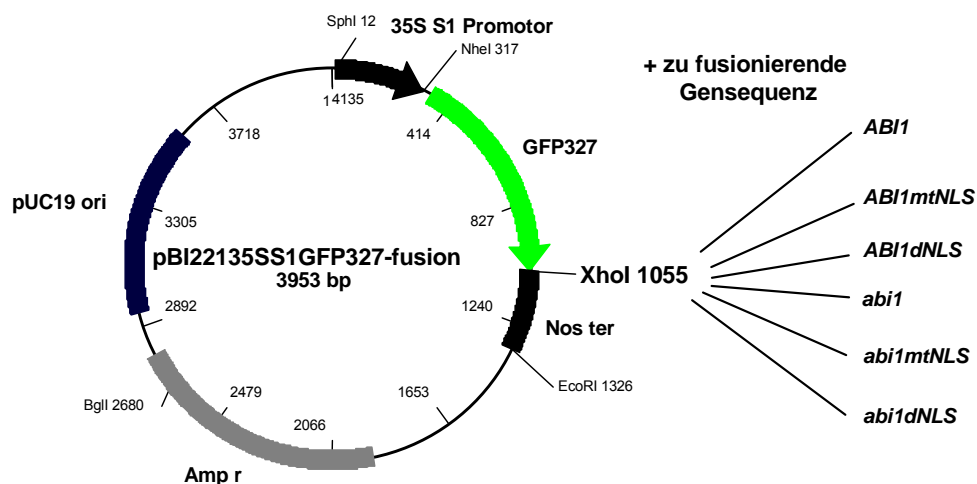


Abb.3.5.: Klonierungsvektor pBIGFP-fusion für die Expression verschiedener GFP-ABI1 und GFP-abi1 Fusionsproteine im transienten System

3.1.5. Subzelluläre Verteilung von GFP-ABI1 und GFP-abi1 in Abhängigkeit des NLS-Motivs

Die Lokalisation der GFP-Fusionen von ABI1, abi1, ABI1mtNLS, abi1mtNLS, ABI1dNLS und abi1dNLS wurde in RLD Protoplasten untersucht, die mit jeweils 5-15 μg des jeweiligen Expressionsvektors transfiziert wurden. Die Co-Transformation mit je 5 μg pSK35S Ω ::GUS diente zur Überprüfung der Transformationseffizienz. Nach Zugabe von 0 μM ABA bzw. 30 μM ABA und anschließender 14-20-stündiger Inkubation im Dunkeln wurden die Protoplasten zuerst mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops analysiert. Zur Kontrolle der Kernlokalisierung wurden die Zellen vor dem Mikroskopieren 5 min mit DAPI bzw. mit dem Bisbenzimid H33342 behandelt. Obwohl nur jeweils ein geringer Anteil der untersuchten Protoplasten (3-4 Protoplasten unter 10^4) ein sich deutlich vom Hintergrund abzeichnendes Signal zeigte, konnte sowohl die GFP-Fluoreszenz als auch die Fluoreszenz der nukleären Marker DAPI und H33342 nachgewiesen werden. In Abbildung 3.6. sind jeweils GFP- und DAPI-Fluoreszenzaufnahmen einander gegenübergestellt.

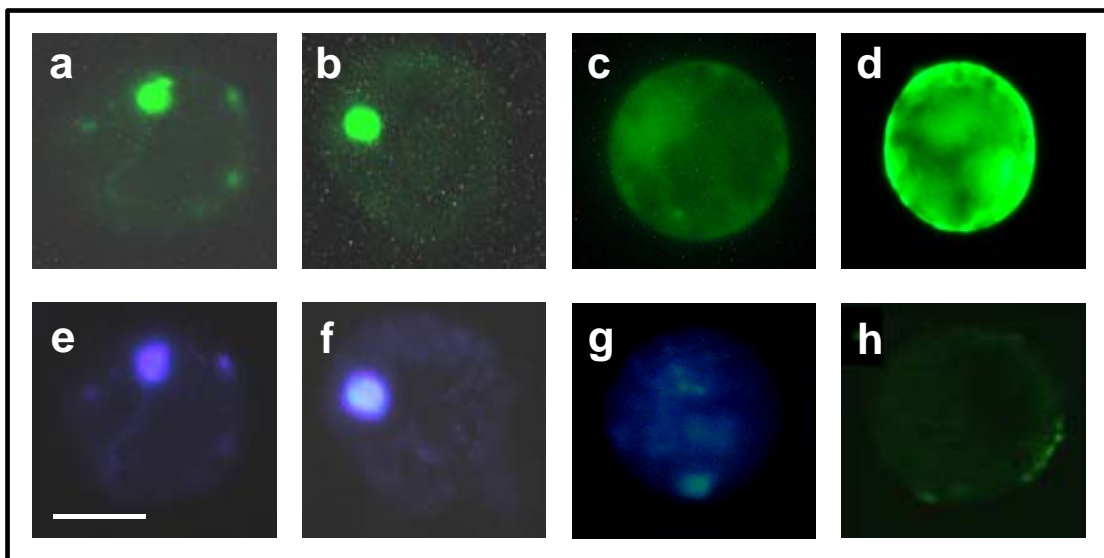


Abb. 3.6.: Subzelluläre Lokalisation verschiedener GFP-ABI1- und GFP-abi1-Fusionen in transient transformierten RLD-Protoplasten unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop. Die Protoplasten wurden transfiziert mit 35SS1::GFP-ABI1 (a), 35SS1::GFP-abi1 (b), 35SS1::GFP-abi1mtNLS (c) oder 35SS1::GFPnoSTOP. Die unter dem Mikroskop in untransformierten bzw. kaputten Protoplasten zu beobachtende Hintergrundfluoreszenz ist in (h) dargestellt. Zur Markierung der Zellkerne wurde DAPI (e-g) oder H33342 verwendet. Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μm .

Während für die ABI1- und *abi1*-Fusionsproteine eine klare nukleäre Lokalisation zu erkennen war (a bzw. b), schien das GFP-Signal von GFP-*abi1mtNLS*, ähnlich wie bei unfusioniertem GFP-Protein gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt zu sein (c). Zwischen ABA-behandelten und ABA-unbehandelten Protoplasten waren, bezüglich der Signalverteilung, insgesamt keine Unterschiede zu erkennen.

Da unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop das Untersuchen der GFP- und DAPI-Fluoreszenz oftmals durch das überlagernde Signal der Chlorophyllfluoreszenz erschwert wurde, erfolgten zusätzliche Analysen der Protoplasten unter Nutzung eines konfokalen Mikroskops (CLSM; *confocal laser scanning microscope*). Dieses ermöglicht zudem eine bessere Trennung der sich teilweise überlagernden Emissionsspektren von DAPI und GFP bzw. H33342 und GFP und somit eine exaktere Zuordnung der Signale als das Epifluoreszenz-Mikroskop.

Die Proben für das Konfokalmikroskop wurden auf die gleiche Weise vorbereitet wie die unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop untersuchten Proben. Auch hier war für die ABI1- und *abi1*-Reporterfusionen mit intakter NLS hauptsächlich eine nukleäre Lokalisation, sowie eine im Ausmaß variierende, cytosolische Verteilung des jeweiligen Fusionsproteins zu erkennen (s. Abb. 3.7.a, d).

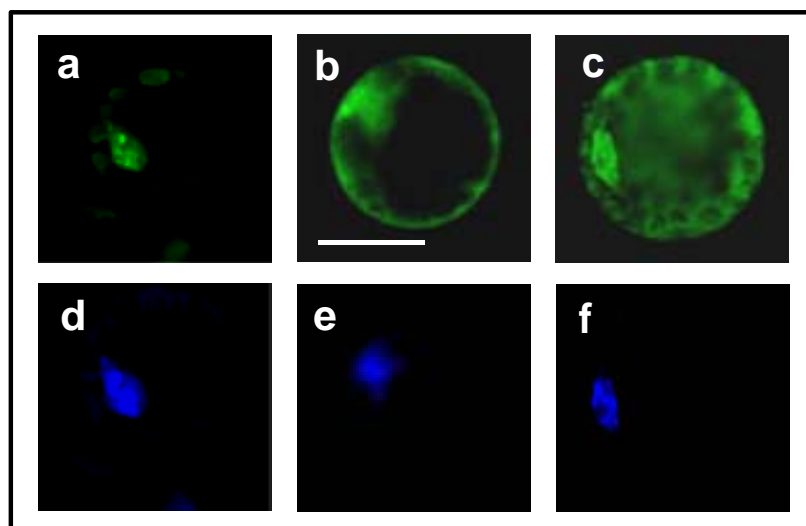


Abb. 3.7.: Konfokale Mikroskopie zur subzellulären Lokalisation verschiedener GFP-ABI1- und GFP-*abi1*-Fusionen in transient transformierten RLD-Protoplasten. Die Protoplasten wurden transfiziert mit *35SS1::GFP-abi1* (a), *35SS1::GFP-ABI1dNLS* (b) oder *35SS1::GFPnoSTOP* (c). Zur Markierung der Zellkerne wurde H33342 (d-f) verwendet. Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μm .

Die mit der Expression von GFP-ABI1dNLS näher untersuchte Deletion des NLS-Motivs führte, ähnlich wie die mutierte NLS in GFP-abi1mtNLS, zu einer meist regelmäßigen Verteilung des GFP-Signals im Cytosol und im Kern (Abb. 3.7.b, e), welche erwartungsgemäß auch für unfusioniertes GFP (Abb. 3.7.c) beobachtet werden konnte (Haseloff et al., 1997; Hoth et al., 2002).

Sowohl bei GFP-ABI1 als auch bei GFP-abi1 führte demnach das Ausschalten des NLS-Signals zu einer subzellulären Umverteilung des Reportersignals und damit des Proteins in *Arabidopsis*-Protoplasten.

3.1.6. Einfluss verschiedener GFP-ABI1- und GFP-abi1-Fusionen auf die Regulation ABA-induzierter Genexpression

Um die Funktionalität der für die Lokalisationsstudien herangezogenen GFP-ABI1- bzw. GFP-abi1-Fusionen zu überprüfen, wurde die Auswirkung der entsprechenden Expressionsklone auf die Regulation ABA-abhängiger Genexpression im transienten *Arabidopsis* Protoplasten-System untersucht.

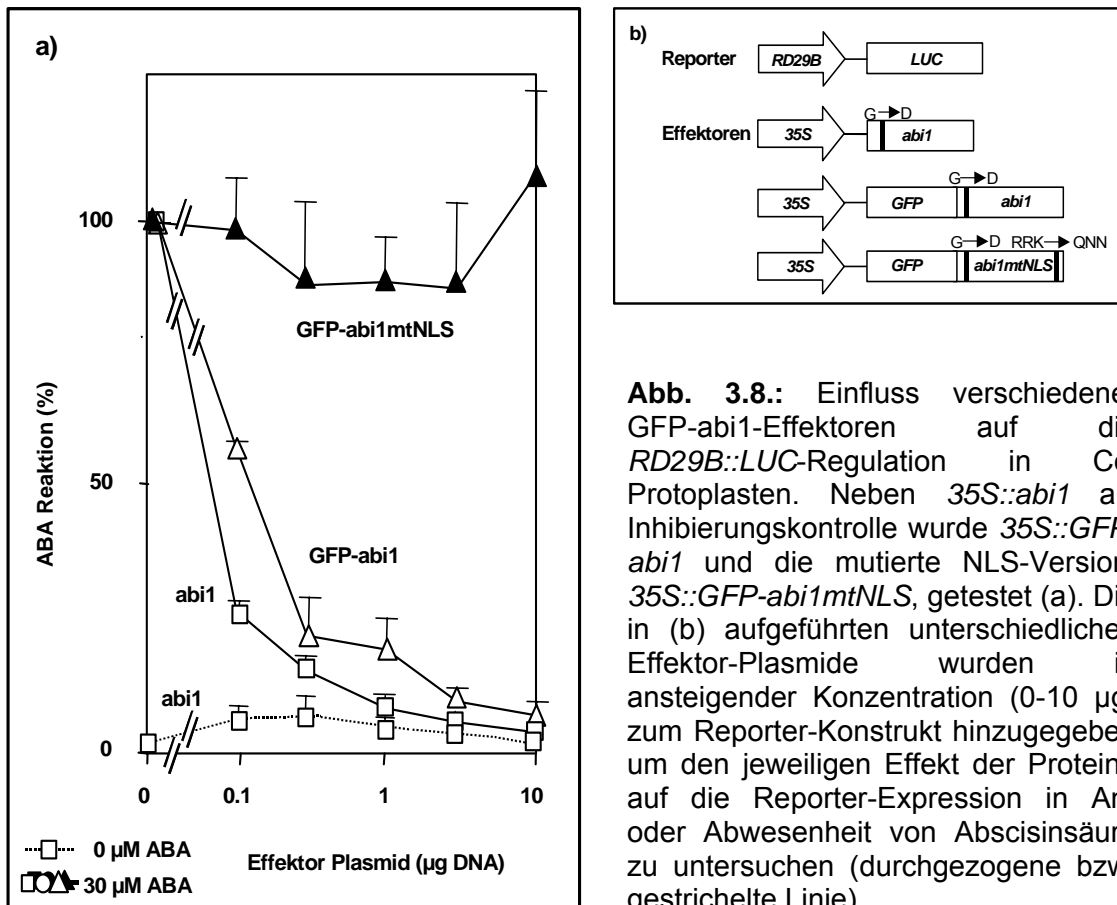


Abb. 3.8.: Einfluss verschiedener GFP-abi1-Effektoren auf die *RD29B::LUC*-Regulation in Col Protoplasten. Neben 35S::*abi1* als Inhibierungskontrolle wurde 35S::*GFP-abi1* und die mutierte NLS-Version, 35S::*GFP-abi1mtNLS*, getestet (a). Die in (b) aufgeführten unterschiedlichen Effektor-Plasmide wurden in ansteigender Konzentration (0-10 µg) zum Reporter-Konstrukt hinzugegeben um den jeweiligen Effekt der Proteine auf die Reporter-Expression in An- oder Abwesenheit von Abscisinsäure zu untersuchen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie).

Die unter 3.1.4. beschriebenen Effektorplasmide pBIGFP-ABI1, pBIGFP-abi1, pBIGFP-ABI1mtNLS sowie pBIGFP-abi1mtNLS wurden transient in Col-Protoplasten eingebracht und ihr Effekt auf das ABA-induzierbare Reporterkonstrukt *RD29B::LUC* (s. Abb. 3.3.) getestet. Pro Transformation wurden, wie bereits oben beschrieben, 15 µg pSKAscI*RD29B::LUC*, 5 µg pSK35S Ω ::*GUS* als interner Standard und unterschiedlichen Mengen (0-10 µg) des jeweils getesteten Effektorplasmids (pBI221*GFP-ABI1*, pBI221*GFP-abi1*...) eingesetzt.

Zur Expression des Effektors wurde die Transfektion erst für 4-6 h ohne Abscisinsäure inkubiert, anschließend wurden die Ansätze geteilt und zur Induktion des Reporters 30 µM ABA bzw. das entsprechende Volumen an 10 mM MES (pH 7,0) zugegeben und für weitere 14-16 h inkubiert.

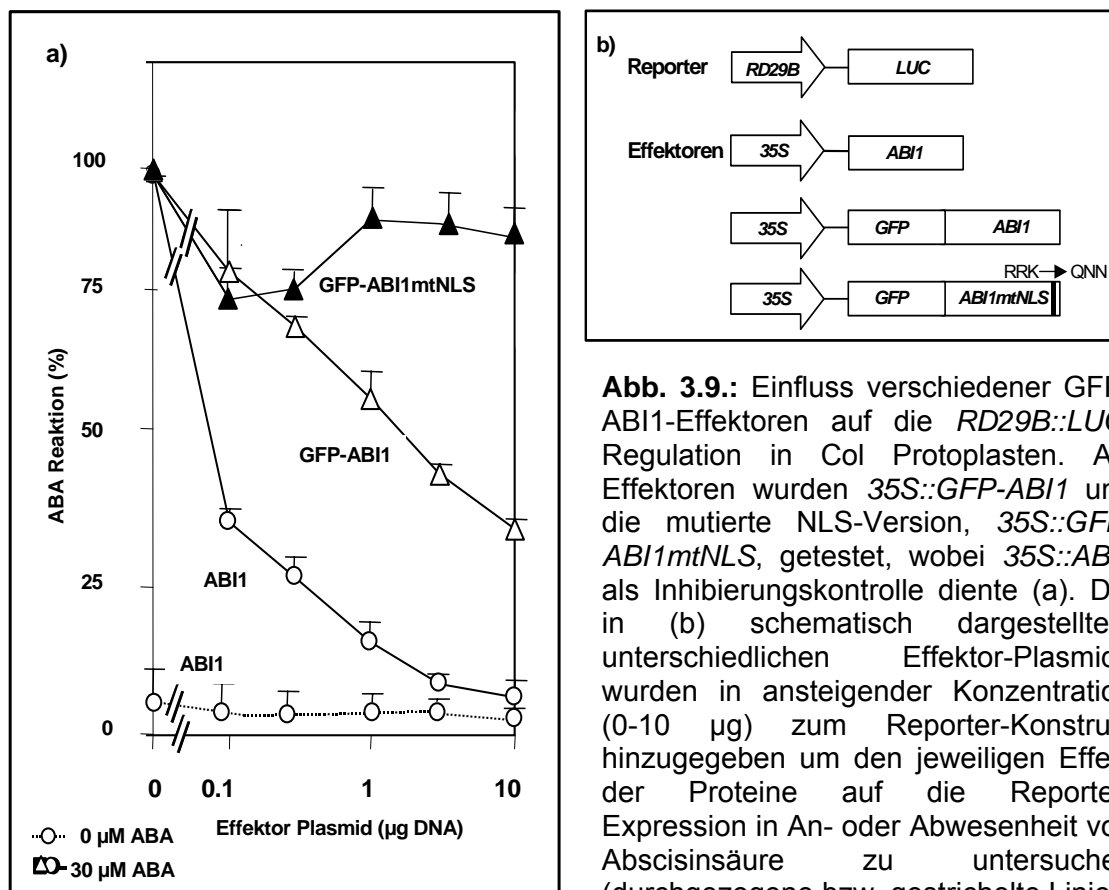


Abb. 3.9.: Einfluss verschiedener GFP-ABI1-Effektoren auf die *RD29B::LUC*-Regulation in Col Protoplasten. Als Effektoren wurden 35S::*GFP-ABI1* und die mutierte NLS-Version, 35S::*GFP-ABI1mtNLS*, getestet, wobei 35S::*ABI1* als Inhibierungskontrolle diente (a). Die in (b) schematisch dargestellten, unterschiedlichen Effektor-Plasmide wurden in ansteigender Konzentration (0-10 µg) zum Reporter-Konstrukt hinzugegeben um den jeweiligen Effekt der Proteine auf die Reporter-Expression in An- oder Abwesenheit von Abscisinsäure zu untersuchen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie).

Die für die GFP-abi1- und GFP-ABI1-Effektoren erzielten Ergebnisse sind in getrennten Abbildungen dargestellt: in Abb. 3.8. und Abb. 3.9. sind die über β -

Glucuronidase (GUS) standardisierten, ABA-induzierten Luciferase (LUC)-Werte für *RD29B::LUC* in Abhängigkeit der Menge an eingesetztem *abi1*- (Abb. 3.8.) bzw. *ABI1*- (Abb. 3.9.) Effektor gezeigt. Die ABA-Induktion des Reporter-Konstruktes unter Einfluss des jeweiligen Effektors wurde relativ zur Reporter-Aktivität in Abwesenheit von Abscisinsäure berechnet und in Prozent ausgedrückt, wobei die ABA-induzierte Reporteraktivität in Anwesenheit einer leeren Vektor-Kontrolle als 100%-Wert angesehen wurde.

Beim Vergleich der Effektor-Wirkung von GFP-ABI1- und GFP-*abi1*-Konstrukten zeigte sich, dass der stärkste negativ regulatorische Effekt von der GFP-*abi1*-Fusion ausging: bei Cotransfektion von *35S::GFP-abi1* sank die Induktion des *RD29B*-Promotors bei 10 µg Effektor-Plasmid bis auf 5% des ursprünglichen Induktionswertes ab, womit die *abi1*-Reporter-Fusion genauso effizient hemmte wie das unfusionierte *abi1* Protein (Abb. 3.8.a). Die durch GFP-ABI1 vermittelte Hemmung fiel hingegen mit einer Restinduktion von 37% bei 10 µg Effektor-Plasmid deutlich schwächer aus als die inhibierende Wirkung des nicht fusionierten ABI1 Proteins, welches nur 7% der ursprünglichen Induktion zuließ (Abb. 3.9.a).

Insgesamt zeigte sich jedoch in jedem Fall eine negative Beeinflussung der ABA-abhängigen Genregulation, was für eine mit der Wirkung der nicht fusionierten ABI1- und *abi1*-Formen vergleichbare Funktionalität der GFP-Fusionen im transienten Expressionssystem spricht. Auch die Protein-Fusionen mit defekter NLS-Sequenz, also GFP-ABI1mtNLS und GFP-*abi1*mtNLS, verhielten sich im Großen und Ganzen wie die entsprechenden nicht fusionierten Effektoren, indem sie keine (Abb. 3.8.a) oder eine nur schwache inhibitorische Wirkung (11% Inhibition für GFP-ABI1mtNLS im Vergleich zur Kontrolle, Abb. 3.9.a), auf die durch Abscisinsäure verursachte Gen-Induktion ausübten.

Aufgrund der bei unabhängigen Transfektionen auftretenden Schwankungen wurden die in Abb. 3.8. und Abb. 3.9. gezeigten Messreihen aus bis zu fünf unabhängigen Transformationsereignissen erstellt. Das als Negativkontrolle eingesetzte unfusionierte GFP-Protein aus pBIGFP-fusion zeigte keinen Einfluss auf die *RD29B*-regulierte Reporter-Expression.

3.1.7. Einfluss verschiedener GUS-ABI1- und GUS-abi1-Fusionen auf die Regulation ABA-induzierter Genexpression

Da bereits generierte, stabile *Arabidopsis*-Transformanden (Ökotyp RLD) mit ektopischer Expression der GUS-Fusionen von ABI1, abi1, ABI1dNLS und abi1dNLS zur Verfügung standen (s. Anhang 5.3.), wurde zusätzlich die Funktionalität der entsprechenden GUS-fusionierten Effektoren im transienten Protoplasten-System mit *RD29B::LUC* getestet. Diese Analyse fand parallel zu den unter 3.1.8. beschriebenen Untersuchungen der GFP-Fusionen statt, wird jedoch zwecks einer übersichtlicheren Darstellungsweise im Folgenden als getrennter Teil dargestellt.

Die Konstruktion der von Axel Himmelbach für die Herstellung stabiler GUS-Transformanden verwendeten GUS-Kassetten begann in pBI221. Dabei wurde ein über Pwo-PCR mit spezifischen Primern erhaltenes Teilfragment des *GUS*-Gens über die im Amplifikat enthaltene BstBI-Stelle sowie *blunt* über die im *reverse* Primer integrierte, ungeschnittene, XhoI-Schnittstelle in die über BstBI und Ecl136II geöffnete GUS-Sequenz von pBI221 ligiert (Primer s. Anhang 5.1.). Dadurch wurde das STOP-Codon des *GUS*-Gens mutiert und gleichzeitig die XhoI-Schnittstelle des *reverse* Primers am 3'-Ende der *GUS*-Sequenz eingefügt. Diese Schnittstelle diente als Eintrittsstelle für alle *ABI1*- und *abi1*-Sequenzen in die so kreierte *35S::GUSnoSTOP*-Kassette. Dabei wurden die gleichen XhoI-Überhang-Primer verwendet wie für die Konstruktion der oben erwähnten GFP-Fusionen in pBI221 (s. 3.1.4.). Das Einfügen der verschiedenen *ABI1*- und *abi1*-Sequenzen erfolgte jedoch erst nach Überführen der modifizierten *35S::GUSnoSTOP*-Kassette als HindIII-EcoRI-Fragment in den binären Vektor pBI121.

Die so konstruierten GUS-ABI1-, GUS-ABI1dNLS-, GUS-abi1- und GUS-abi1dNLS-Plasmide wurden zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen (RLD) benutzt. Der erfolgreiche Transfer der DNA in die Pflanzen wurde in der T₁-Generation über PCR aus genomischer Pflanzen-DNA bestätigt.

Um die Funktionstüchtigkeit der in den transgenen Pflanzen überexprimierten GUS-ABI1- und GUS-abi1-Fusionen zu überprüfen, wurden die entsprechenden pBI121-Derivate im transienten *Arabidopsis*-Protoplasten-System bezüglich ihrer Auswirkung auf die Expression der ABA-induzierbaren *RD29B::LUC*-

Kassette untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte, wie in 3.1.6. bereits beschrieben, mit je 15 μg Reporterkonstrukt pSKAscI*RD29B::LUC*, 5 μg pSK35S Ω ::*GUS* als interner Standard sowie 0-10 μg des jeweils getesteten Effektorplasmids (pBI121*GUS-ABI1*, pBI221*GUS-abi1*...).

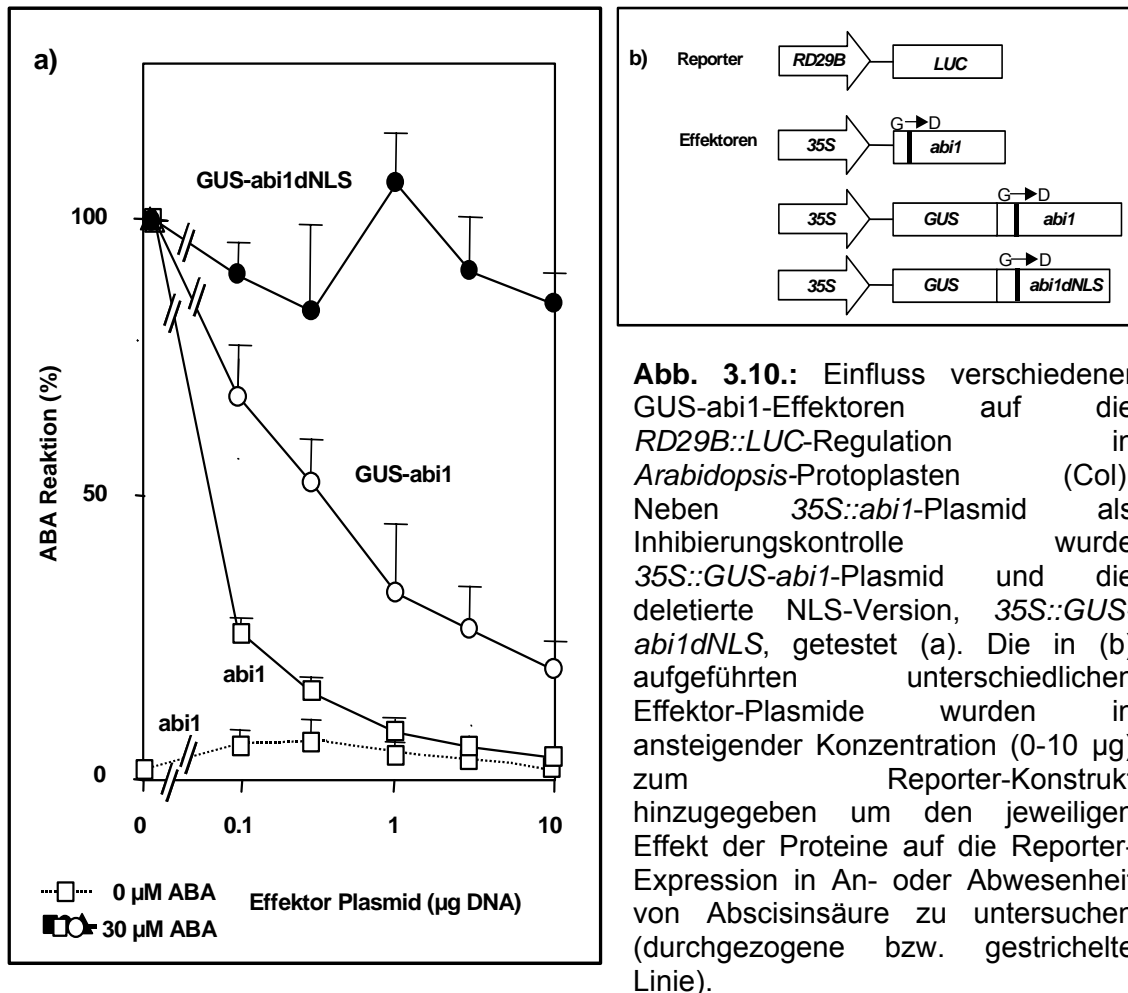


Abb. 3.10.: Einfluss verschiedener *GUS-abi1*-Effektoren auf die *RD29B::LUC*-Regulation in *Arabidopsis*-Protoplasten (Col). Neben 35S::*abi1*-Plasmid als Inhibierungskontrolle wurde 35S::*GUS-abi1*-Plasmid und die deletierte NLS-Version, 35S::*GUS-abi1dNLS*, getestet (a). Die in (b) aufgeführten unterschiedlichen Effektor-Plasmide wurden in ansteigender Konzentration (0-10 μg) zum Reporter-Konstrukt hinzugegeben um den jeweiligen Effekt der Proteine auf die Reporter-Expression in An- oder Abwesenheit von Abscisinsäure zu untersuchen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie).

Zur phänotypischen Expression des jeweiligen Effektors wurde die Transfektion erst für 4-6 h ohne Abscisinsäure inkubiert, dann wurden die Ansätze geteilt und zur Induktion des Reporters 30 μM ABA bzw. das entsprechende Volumen an 10 mM MES (pH 7.0) zugegeben. Nach weiteren 14-16 h Inkubation erfolgte die Messung der Reporter-Aktivitäten von *LUC* und *GUS*. Zur besseren Übersicht sind die für die *GUS-ABI1*- und *GUS-abi1*-Effektoren erzielten Ergebnisse in getrennten Abbildungen (s. Abb. 3.10. bzw. 3.11.) dargestellt.

Für die *GUS-ABI1*- und *GUS-abi1*-Effektoren ergab sich ein ähnliches Bild wie für die entsprechenden GFP-Fusionen. Auch hier war die inhibitorische Wirkung

von GUS-*abi1* stärker als die von GUS-ABI1, wobei jedoch im Vergleich zu den GFP-Fusionen insgesamt eine Abschwächung des hemmenden ABI1- bzw. *abi1*-Effekts festzustellen war. So bewirkte 10 μg 35S::*GUS-abi1* nur noch eine Hemmung des *RD29B*-Promotors von 19% des ursprünglichen Induktionswertes (Abb. 3.10.a), die GUS-ABI1 vermittelte Hemmung lag für die maximale Menge an eingesetztem Plasmid sogar nur noch bei 46% der Ausgangsinduktion (Abb. 3.11.a).

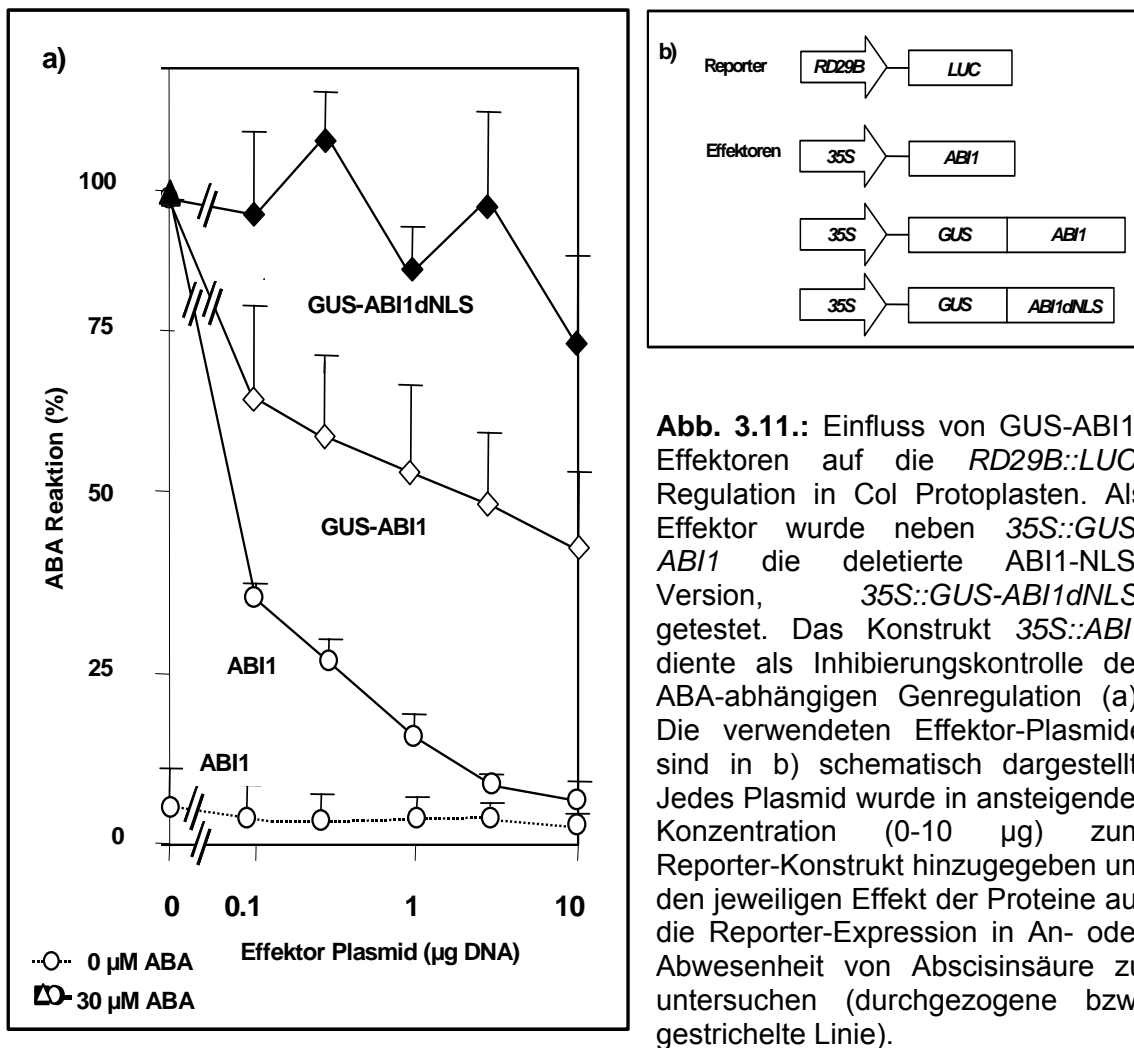


Abb. 3.11.: Einfluss von GUS-ABI1-Effektoren auf die *RD29B*::*LUC*-Regulation in Col Protoplasten. Als Effektor wurde neben 35S::*GUS-ABI1* die deletierte ABI1-NLS-Version, 35S::*GUS-ABI1dNLS*, getestet. Das Konstrukt 35S::*ABI1* diene als Inhibierungskontrolle der ABA-abhängigen Genregulation (a). Die verwendeten Effektor-Plasmide sind in b) schematisch dargestellt. Jedes Plasmid wurde in ansteigender Konzentration (0-10 μg) zum Reporter-Konstrukt hinzugegeben um den jeweiligen Effekt der Proteine auf die Reporter-Expression in An- oder Abwesenheit von Abscisinsäure zu untersuchen (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie).

Obwohl es bei den getesteten GUS-Fusionen im Vergleich zu den unfusionierten Effektor-Konstrukten zu einer eindeutigen Verschlechterung der ABI1- und *abi1*-Effizienz bei der Regulation der ABA-vermittelten Genexpression kam, waren die ABI1- und *abi1*-vermittelten negativen Effekte auf die *RD29B*::*LUC*-Expression immer noch klar erkennbar. Auch die Protein-

Fusionen mit defekter NLS-Sequenz, GUS-abi1dNLS und GUS-ABI1dNLS, zeigten mit 85% (GUS-abi1, Abb. 3.10.a) bzw. 78% Restinduktion (GUS-ABI1, Abb. 3.11.a) ein den nicht fusionierten Versionen einigermaßen entsprechendes Bild. Die GUS-Fusionen von *ABI1*, *abi1*, *ABI1dNLS* und *abi1dNLS* konnten somit – zumindest im transienten System - als funktionsfähig angesehen werden.

Auch bei den hier beschriebenen Versuchsansätzen kam es zu starken Schwankungen der Messwerte unabhängiger Transfektionen, weshalb die in Abb. 3.10. und Abb. 3.11. gezeigten Ergebnisse aus bis zu fünf unabhängigen Transformationsereignissen zusammengestellt wurden. Das als Negativkontrolle eingesetzte unfusionierte GUS-Protein aus pBI121 zeigte keinen Einfluss auf die *RD29B*-regulierte Reporter-Expression.

Die sowohl bei Reporterfusionen von ABI1 als auch von abi1 klar erkennbare Abschwächung der effektorischen Wirkung lässt sich wohl durch die angehefteten Reporter erklären. So werden ABI1 und abi1 offensichtlich durch das 66 kD große, tetramere GUS-Protein in ihrer Wirkung als Effektor stark beeinträchtigt. Die Behinderung durch das mit 34 kD vergleichsweise kleine und nur bei hohen Konzentrationen zur Dimerisierung neigende GFP-Protein, fällt dagegen schwächer aus.

3.1.8. Physiologische Charakterisierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen mit GFP-ABI1/abi1- bzw. GUS-ABI1/abi1-Überexpression

Um Funktion und Einfluss der in ABI1/abi1 vorhandenen NLS-Sequenz genauer zu ermitteln, sollten in Pflanzen durch Abscisinsäure regulierte, physiologische Prozesse untersucht werden. Hierzu zählen beispielsweise die Ermittlung der Keimungsrate unter ABA-Einfluss, die Untersuchung des Wurzelwachstums bei Keimlingen sowie die Messung der stomatären Transpiration über Wasserverlust. Im folgenden Abschnitt ist die Generierung der für diese Untersuchungen benötigten Pflanzen beschrieben.

3.1.8.1. Konstruktion transgener *Arabidopsis*-Pflanzen mit ektopischer Expression verschiedener ABI1/abi1-Reporterfusionen

Neben den bereits unter 3.1.7. beschriebenen GUS-Pflanzen wurden stabile *Arabidopsis*-Transformanten mit ektopischer Expression der verschiedenen, im transienten System getesteten GFP-ABI1 bzw. GFP-abi1-Konstrukte generiert. Hierzu wurden die in pBIGFPfusion zusammengestellten Kassetten von GFP-ABI1, GFP-abi1 und GFP-abi1dNLS mittels *proof reading* PCR und Primern mit AscI-Überhängen amplifiziert und dann anhand der AscI-Schnittstellen als 35S::GFP-Fusion-Nos-Fragment in den AscI-linearisierten Vektor pBI121 ligiert (Primer siehe Anhang 5.1.).

Diese pBI121-GFP-Fusionen wurden über Agrobakterien-vermittelten Transfer in *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp RLD) eingebracht und die transgenen Samen anschließend auf Kanamycin-Platten selektiert. Bei den nachfolgenden Untersuchungen der GFP-ABI1-, GFP-abi1- und GFP-abi1dNLS-Pflanzen wurden je Reporterkonstrukt mindestens zwei unabhängige heterozygote Linien mit 3:1-Segregation verwendet. Die von Axel Himmelbach bereitgestellten GUS-Linien, von denen pro Konstrukt auch mindestens zwei verwendet wurden, waren alle homozygot.

3.1.8.2. Keimungsrate, Wurzelwachstum und stomatäre Regulation bei GUS-ABI1/abi1-Pflanzen in Abhängigkeit von ABA

Um die Keimungsrate der homozygoten 35S::GUS-ABI1-, 35S::GUS-abi1-, 35S::GUS-ABI1dNLS- und 35S::GUS-abi1dNLS-Linien zu ermitteln, wurden 80-100 sterilisierte Samen auf MS-Agarplatten mit ansteigenden ABA-Konzentrationen (0-10 μ M) ausgebracht und nach 48 h Lagerung bei 4 °C für 4 d bei 21 °C inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums wurde mehrmals die Anzahl gekeimter Samen ermittelt, wobei das Erscheinen der Primärwurzel als Keimungsvorgang gewertet wurde (Bewley, 1997). In Abb. 3.12.a. sind die nach 4 Tagen ermittelten Keimungsraten dargestellt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Während die GUS-ABI1 und GUS-ABI1dNLS-überexprimierenden Linien eine parallel zur ansteigenden ABA-Konzentration sinkende Keimungsrate und somit keine Unterschiede zu – hier nicht gezeigten - RLD Wildtyp-Pflanzen aufwiesen, konnte bei GUS-abi1-Samen für alle ABA-Konzentrationen eine für *abi1*-Mutanten typische, ABA-insensitive Keimung (Koorneef et al., 1984) beobachtet werden (Abb. 3.12. a.).

Im Gegensatz dazu zeigten GUS-abi1dNLS-Samen ein den GUSABI1- und GUS-ABI1dNLS-Linien sowie den Wildtyp-Pflanzen entsprechendes, ABA-sensitives, Keimungsverhalten.

Des Weiteren wurde bei homozygoten *35S::GUS-ABI1*-, *35S::GUS-abi1*-, *35S::GUS-ABI1dNLS*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Keimlingen das Wurzelwachstum unter ABA-Einfluss getestet (s. Abb. 3.12.b). Dazu wurden 5 d alte Keimlinge, die zuvor auf MS-Agarplatten angezogen worden waren, auf Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen (0-100 μM) transferiert.

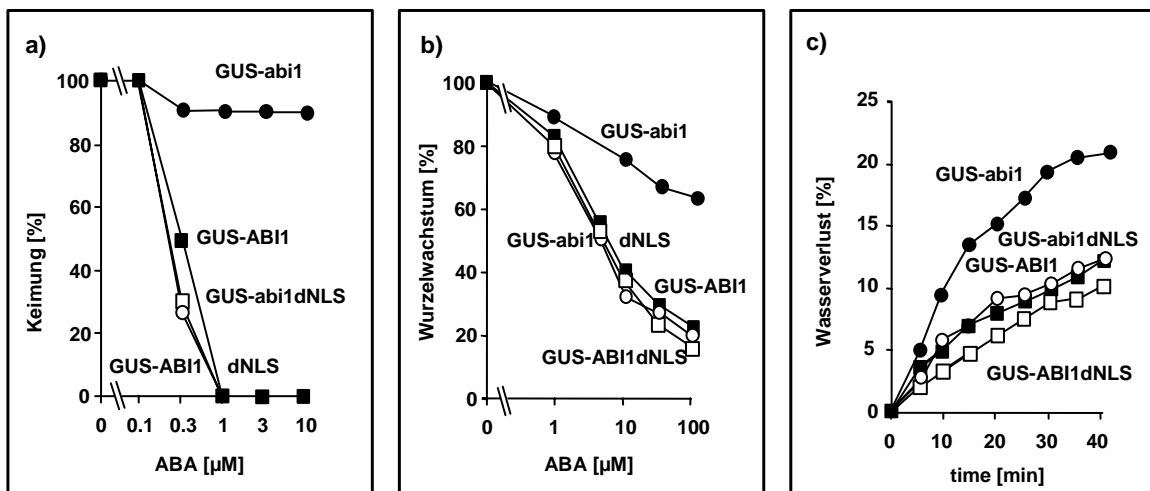


Abb. 3.12.: Analyse ABA-abhängiger Reaktionen in *Arabidopsis*-Pflanzen mit ektopischer Expression verschiedener GUS-ABI1- bzw. GUS-abi1-Konstrukte.

a) Zur Ermittlung der Keimungsrate wurden die Samen von GUS-abi1- (schwarzer Kreis), GUS-ABI1- (schwarzes Quadrat), GUS-ABI1dNLS- (weißes Quadrat) und GUS-abi1dNLS-Linien (weißer Kreis) untersucht. Die Anzahl gekeimter Samen wurde ermittelt und der Prozentsatz relativ zur Gesamtzahl an Samen berechnet ($n = 80-100$, mittlere Standardabweichung bei 2 Versuchswiederholungen $\pm 10\%$). b) Das relative Wurzelwachstum unter ABA-Einfluss wurde für 5 d alte Keimlinge ($n = 25$) ermittelt, die vor der Messung 4 d auf Platten mit 0-100 μM ABA gewachsen waren. c) Als Maß für das stomatare Öffnungsverhalten gilt die Messung des in Blättern stattfindenden Wasserverlustes über die Zeit. Dafür werden in Größe und Entwicklung vergleichbare Blätter ($n = 8$) abgeschnitten und der prozentuale Verlust ihres Frischgewichts bei RT über die Zeit ermittelt (mittlere Standardabweichung bei 2 Wiederholungen $\pm 12\%$).

Das Wachstum der Wurzeln betrug auf Kontrollplatten ohne ABA 16 ± 2 , 17 ± 2 , 17 ± 2 and 16 ± 2 mm für GUS-ABI1-, bzw. GUS-ABI1dNLS-, GUS-abi1- und GUS-abi1dNLS-Pflanzen (mittlere Stabweichung $\pm 16\%$). Der Versuch wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die jeweilige Zunahme der Wurzellänge wurde 4 Tage nach dem Transfer auf ABA- bzw. Kontrollplatten gemessen. Auch hier verhielten sich GUS-ABI1- und GUS-ABI1dNLS-Linien wie Wildtyp-Pflanzen, indem sie ein bei ansteigender ABA-Konzentration zunehmend gehemmtes Wurzelwachstum zeigten. Ektopische Expression von GUS-abi1 führte hingegen zu einem deutlich unempfindlicheren Verhalten gegenüber ABA: während das relative Wurzelwachstum unter dem Einfluss von $100 \mu\text{M}$ ABA bei GUS-ABI1- und GUS-ABI1dNLS-Pflanzen nur 22% bzw. 19% betrug, war das Wachstum der Wurzel von GUS-abi1-Keimlingen mit 65% bei $100 \mu\text{M}$ ABA deutlich weniger gehemmt. Transgene GUS-abi1dNLS-Pflanzen zeigten wiederum eine dem Wildtyp- oder den GUS-ABI1-Pflanzen entsprechende Wachstumshemmung von 20% bei $100 \mu\text{M}$ ABA.

Um die Regulation des ABA-induzierten Stomataschlusses in den verschiedenen GUS-Pflanzen zu untersuchen, wurde zudem der Wasserverlust abgeschnittener *Arabidopsis*-Blätter über den Zeitraum von 60 min analysiert. Hierfür wurde bei frisch abgetrennten Blättern von vergleichbarer Größe und aus demselben Entwicklungsstadium der prozentuale Verlust des Frischgewichts bei Raumtemperatur über die Zeit ermittelt (Abb. 3.12.c). Dabei zeigten die Linien mit ektopischer GUS-abi1-Expression im Vergleich zu den GUS-ABI1-, GUS-ABI1dNLS- und GUS-abi1dNLS-Pflanzen den stärksten Wasserverlust: nach 40 min war das Frischgewicht um mehr als 20% reduziert, während der Gewichts- und somit der Wasserverlust der restlichen GUS-Linien bei 10-12% lag. In Abbildung 3.13. ist zudem der fortschreitende Wasserverlust über den damit einhergehenden Welkvorgang von GUS-abi1-Blättern im Vergleich zu GUS-abi1dNLS-Blättern dokumentiert: während die ABA-insensitiven GUS-abi1-Blätter nach 3 Stunden ausgetrocknet sind, schreitet der Wasserverlust in den GUS-abi1dNLS-Blättern vergleichsweise langsam voran. Als Kontrollen fungierten neben Wildtyp-Blättern die Blätter der entsprechenden ABI1-Fusionen. Die Dokumentation des Gewichtverlustes über die Zeit wurde noch zweimal mit jeweils unterschiedlichem Pflanzenmaterial wiederholt.

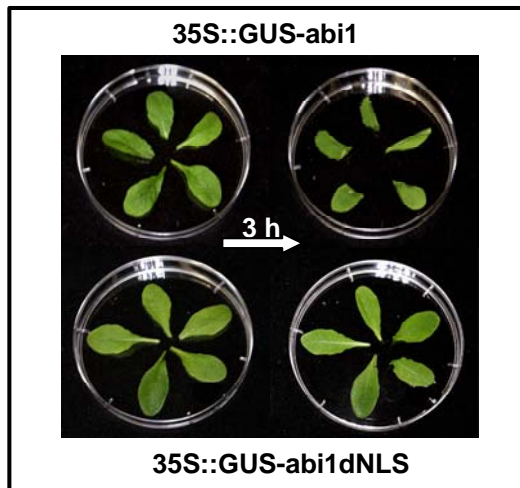


Abb. 3.13.: Zeitreihe des Wasserverlustes und des damit verbundenen Welkvorgangs als Indikator für die Regulation stomatärer Bewegungen. Frisch abgeschnittene GUS-abi1- und GUS-abi1dNLS-Blätter gleicher Größe und aus demselben Entwicklungsstadium Pflanzen wurden über eine Zeit von 3 h alle 15 min photographiert und ihr fortschreitendes Welken anhand der Bilder dokumentiert.

Demnach zeigten die homozygoten GUS-abi1-Pflanzen in allen hier durchgeführten physiologischen Assays ein deutliches, ABA-insensitives Verhalten, welches jedoch mit einer deletierten NLS nicht aufrechterhalten werden konnte. Die Überexpression von GUS-ABI1 und GUS-ABI1dNLS hatte hingegen keinerlei Effekt auf das Verhalten der entsprechenden Pflanzen bei den getesteten, ABA-abhängigen Reaktionen. Diese Ergebnisse wurden auch vom äußeren Erscheinungsbild der unter Standardbedingungen (s. 2.3.1.) angezogenen, homozygoten, transgenen GUS-Linien gestützt. Während GUS-ABI1-, GUS-ABI1dNLS- und GUS-abi1dNLS-Pflanzen sich von pBI121-Kontrollpflanzen äußerlich nicht unterscheiden, konnte für GUS-abi1-Pflanzen jedes Mal ein deutlich retardiertes Wachstum beobachtet werden (vgl. Abb. 3.14.a-d mit e).

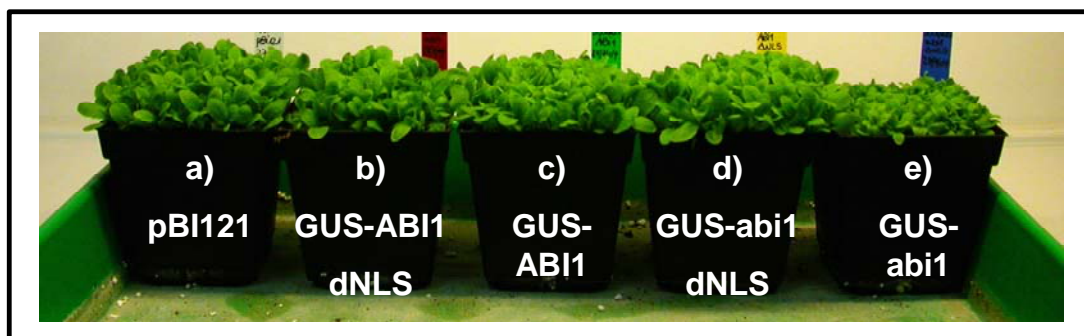


Abb. 3.14.: Wachstumsverhalten homozygoter GUS-Reporterlinien. Während die unter Langtagbedingungen angezogenen GUS-ABI1dNLS-, GUS-ABI1- und GUS-abi1dNLS-Pflanzen (b bzw. c und d) sich in ihrer Entwicklung von den Vektor-Kontrollpflanzen (a) nicht unterscheiden, zeigen die GUS-abi1-Pflanzen (e) ein verzögertes Wachstum.

3.1.8.3. Vergleich der phänotypischen Merkmale von GFP-ABI1/abi1-Pflanzen und GUS-ABI1/abi1-Pflanzen über das Keimungsverhalten

Um zu überprüfen ob, ähnlich wie im transienten Protoplasten-System, die Funktionalität der GFP- und GUS-ABI1/abi1-Fusionen auch in transgenen Pflanzen vergleichbar ist, wurde auf ABA-Platten (0 bzw. 15 μM ABA) das Keimungsverhalten der GFP- und GUS-Reporterlinien parallel untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des mit 10 Aminosäuren vergleichsweise kurzen Anhangs c-myc auf die Wirkungsweise von ABI1 getestet. Hierfür wurden transgene Pflanzen verwendet, welche das von Yulin Tang klonierte Konstrukt pMESH135S::*c-myc-ABI1* enthielten (siehe Tang, 2003).

Zur Ermittlung der Keimungsrate wurden die entsprechenden Samen (T_2 -Generation) wie unter 3.1.8.2. beschrieben auf Agarplatten mit 0 bzw. 15 μM ABA ausgebracht. In Abb. 3.15.a. sind die nach 4 Tagen ermittelten Keimungsraten aus drei unabhängigen Versuchsreihen dargestellt.

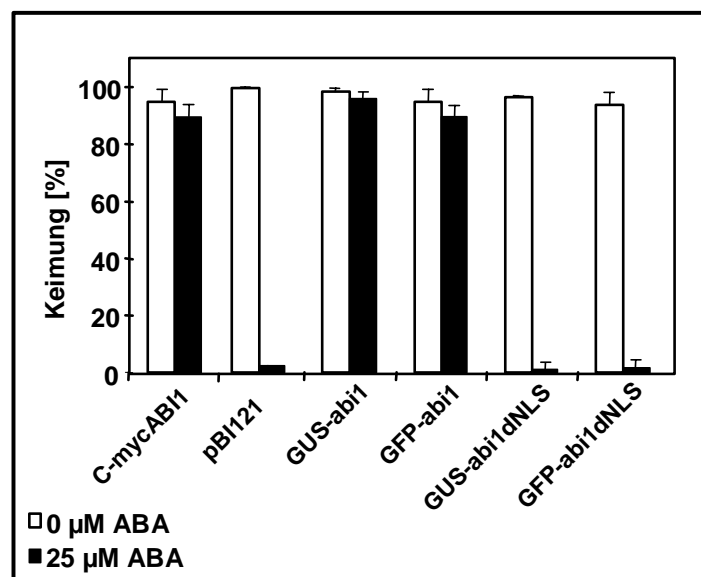


Abb. 3.15.: Vergleich des Keimungsverhaltens zwischen transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit ektopischer Expression verschiedener ABI1- und abi1-Fusionsproteine. a) Zur Ermittlung der Keimungsrate wurden die Samen von 35S::*GUS-abi1*-, *GUS-abi1dNLS*, 35SS1::*GFP-abi1*, 35SS1::*GFP-abi1dNLS*- sowie 35S::*c-myc-ABI1*-Linien untersucht. Als Kontrolle dienten Pflanzen mit ektopischer pBI121-Expression. Die Anzahl gekeimter Samen ($n = 90-120$) wurde in 3 unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt und der Prozentsatz relativ zur Gesamtzahl an Samen berechnet.

Während die GFP-*abi1dNLS*-überexprimierenden Linien, ähnlich wie die entsprechenden GUS-Linien, eine parallel zur ansteigenden ABA-Konzentration sinkende Keimungsrate und somit keine Unterschiede zu – hier nicht gezeigten – RLD Wildtyp-Pflanzen aufwiesen, konnte auch bei GFP-*abi1*-Samen in Gegenwart von ABA die für *abi1*-Mutanten typische – und hier bereits für GUS-*abi1*-Pflanzen beobachtete – ABA-insensitive Keimung (Koornneef et al., 1984) gezeigt werden. Des Weiteren zeigten GFP-ABI1-Pflanzen, genau wie GUS-ABI1-Pflanzen, ein Wildtyp-ähnliches, ABA-sensitives Keimungsverhalten. Im Gegenteil hierzu und auch zu früheren Befunden bei ABI1-überexprimierenden Pflanzen (Wu et al., 2003) steht die für *35S::c-myc-ABI1*-Pflanzen dokumentierte, ABA-insensitive Keimung. GUS- und GFP-Fusionen der ABI1- und *abi1*-Proteine zeigen also sowohl im transienten als auch im stabil transformierten System vergleichbare Eigenschaften, die jedoch für *c-myc*-Fusionen, zumindest im Fall von ABI1, nicht bestätigt werden können.

3.1.9. Lokalisation der Fusionsproteine GFP-ABI1 und GFP-*abi1* in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen

Zusätzlich zu den physiologischen Antworten auf ABA wurde in den transgenen *35SS1::GFP-ABI1*-, *35SS1::GFP-abi1*- und *35SS1::GFP-abi1dNLS*-Pflanzen die Verteilung des jeweiligen Fusionsproteins untersucht.

Hierfür wurden von den transgenen-Linien Samen auf MS-Agarplatten angezogen und die Keimlinge nach 5-7 Tagen (T_2 -Generation) zunächst auf Gewebesebene unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop angeschaut. Dabei konnte das GFP-Signal für *35SS1::GFP-ABI1*-, *35SS1::GFP-abi1*- und *35SS1::GFP-abi1dNLS*-Pflanzen in den Wurzeln (Abb. 3.16.), im Hypokotyl (Abb. 3.17.) sowie in den Epidermiszellen (Abb. 3.18.) und Stomata (Abb. 3.19.) der Blätter lokalisiert werden. Zur Überprüfung des GFP-Emissionsspektrums wurden die Keimlinge zusätzlich mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert.

In Abb. 3.16. ist das unter dem Konfokalmikroskop detektierbare Fluoreszenzsignal in den Hauptwurzeln von *35SS1::GFP-ABI1*-, *35SS1::GFP-abi1*- und *35SS1::GFP-abi1dNLS*-Pflanzen dargestellt. Dabei zeigten sowohl

GFP-ABI1- (Abb. 3.16.a-c) als auch GFP-abi1-Keimlinge (Abb. 3.16.e-g) eine Verteilung des Reporters in den Kalyptra-Stammzellen sowie der inneren, dritten Zellschicht der Kalyptra.

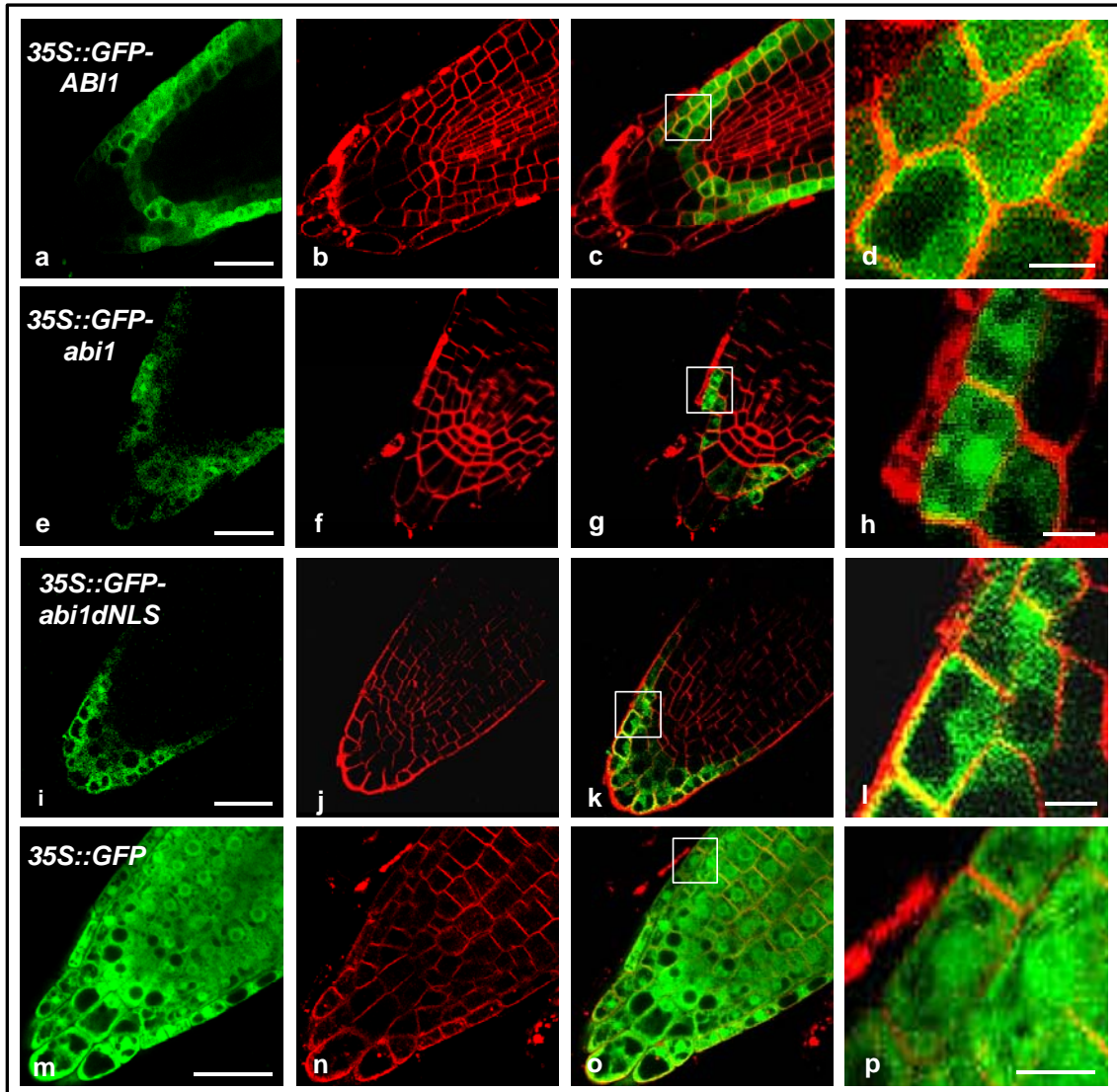


Abb. 3.16.: GFP-Fluoreszenz in den Hauptwurzeln verschiedener GFP-Reporterfusionen. Mittels Konfokalmikroskop wurde die GFP- (a, e, i, m) und FM 4-64-Fluoreszenz (b, f, j, n) in *35SS1::GFP-ABI1*- (a-d), *35SS1::GFP-abi1*- (e-h) und *35SS1::GFP-abi1dNLS*-Keimlingen (i-l) untersucht. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Signale in *35S::GFP*-Keimlingen dokumentiert (m-p). Zur Erleichterung der zellulären Zuordnung wurden die für GFP und FM 4-64 erhaltenen Signale anschließend überlagert (d, h, l, p) und die dabei markierten Bereiche zusätzlich vergrößert dargestellt (d, h, l, p). Die am linken Bildrand der überlagerten Aufnahmen eingefügten Bilder stellen eine 2-fache Vergrößerung des jeweils hervorgehobenen Bereichs dar. Die angegebene Maßeinheit entspricht 30 μm in den Bildern der drei ersten Spalten von links (a-m, b-n, c-o) sowie 5 μm in den Bildern der vierten Spalte (d-p).

Außerdem konnte eine Lokalisation der GFP-Fusionen in den meristematischen Zellen der Epidermis und der lateralen Wurzelhaube festgestellt werden (Sabatini et al., 1999). Diese Signal-Verteilung entsprach auch der GFP-Fluoreszenzverteilung in GFP-abi1dNLS-Pflanzen, welche sich hier jedoch zusätzlich auf die äußeren Zellreihen der Kalyptra ausweitete (Abb. 3.16. i-k). Während die subzelluläre Lokalisation von GFP-ABI1 sich auf das Cytosol und die Zellmembranen beschränkte (s. Abb. 3.16.c und d), konnte in den Zellen von GFP-abi1- und GFP-abi1dNLS-Keimlingen zusätzlich eine Akkumulation der GFP-Fusionen im Kern festgestellt werden (s. Abb. 3.16.g und h bzw. k und l). Entsprechende GFP-Verteilungsmuster wurden in den jeweiligen Seitenwurzeln detektiert. Die als Kontrolle eingesetzten *35S::GFP*-Reporterlinien von A. Christmann zeigten in den Wurzelzellen ein im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiertes Signal (Abb. 3.16.m-p), während in Wildtyp-Wurzeln nur schwache Hintergrund-Fluoreszenz auftrat.

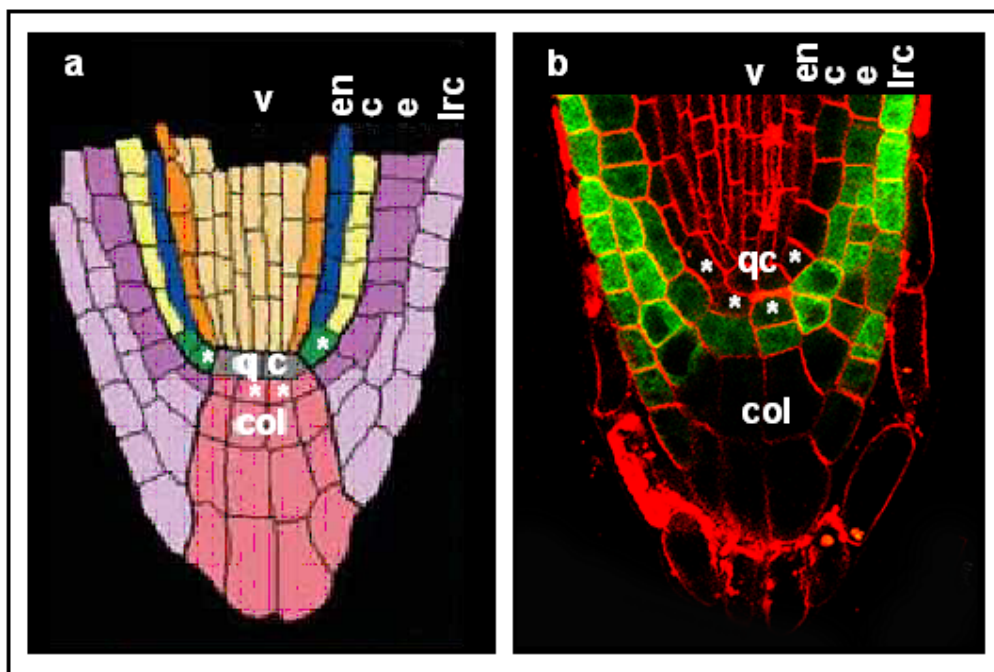


Abb. 3.17.: Zuordnung der GFP-Färbung in *35SS1::GFP-ABI1*-Wurzelgewebe. Die in ihrer Funktion voneinander abweichenden Bereiche der Wurzel sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. In der schematischen Darstellung (Aida et al., 2004) und in der konfokalen Wurzel-Aufnahme sind zu erkennen: Leitgewebe (v), Endodermis (en), Kortex (c), Epidermis (e), seitliche Fortsätze der Wurzelhaube (lrc, *lateral root cap*), ruhendes Zentrum (qc) und Wurzelhaube (Col, *columella*). Die mit * versehenen Zellen kennzeichnen die Stammzellen der Kalyptra- bzw. der Endodermis und des Kortex.

In Abbildung 3.17. wurde die emittierte Fluoreszenz exemplarisch für *35SS1::GFP-ABI1*-Pflanzen den unterschiedlichen Wurzelgeweben zugeordnet (Aida et al., 2004).

Für das Reporter-Signal in Zellen des Hypokotyls waren keine großen Unterschiede zwischen den *GFP-ABI1*-, *GFP-abi1*- und *GFP-abi1dNLS*-Pflanzen zu erkennen (s. Abb. 3.18.).

Alle drei GFP-Fusionsproteine verteilten sich in Kern und Cytoplasma, wobei das von nukleär lokalisiertem GFP ausgehende Signal in *GFP-abi1*-Keimlingen stärker erschien als in den *GFP-ABI1*- und *GFP-abi1dNLS*-Pflanzen (s. Abb. 3.18.c). Die als Kontrollpflanzen verwendeten *35S::GFP*-Keimlinge zeigten ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der GFP-Fluoreszenz im Cytosol und im Zellkern von Hypokotylzellen (Abb. 3.18.d), während in Wildtyp-Pflanzen nur ein sehr schwaches Hintergrund-Signal zu detektieren war.

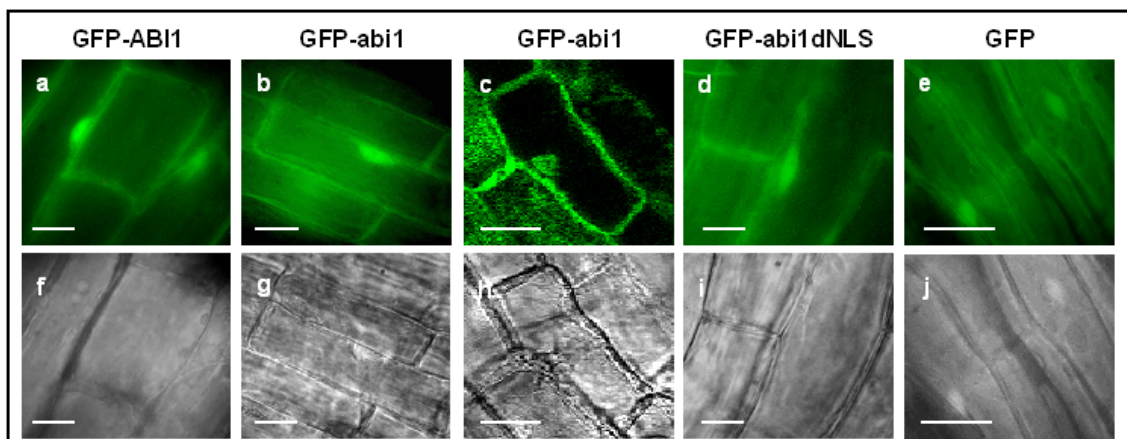


Abb. 3.18.: GFP-Fluoreszenz im Hypokotyl von GFP-Reporterlinien. Es wurden *35SS1::GFP-ABI1*-(a, f), *35SS1::GFP-abi1*- (b, c, g, h) und *35SS1::GFP-abi1dNLS*-Keimlinge (d, i) unter Fluoreszenz- (a, b, d) und Durchlicht (f, g, i) bzw. im Konfokalmikroskop (c, h) aufgenommen. Als Kontrolle wurden außerdem *35S::GFP*- bzw. Wildtyp-Keimlinge unter der Fluoreszenzlampe (e) und im Durchlicht dokumentiert (j). Die angegebene Maßeinheit entspricht jeweils 20 μm .

In den Blättern der transgenen *35SS1::GFP-ABI1*- und *35SS1::GFP-abi1*-Linien zeigten die Zellen der Epidermis eine starke GFP-Expression (s. Abb. 3.19). Diese war für jede der Reporterlinien im Zellkern und im dünnen, zwischen Plasmalemma und Vakuole erkennbaren, cytoplasmatischen Film am stärksten detektierbar.

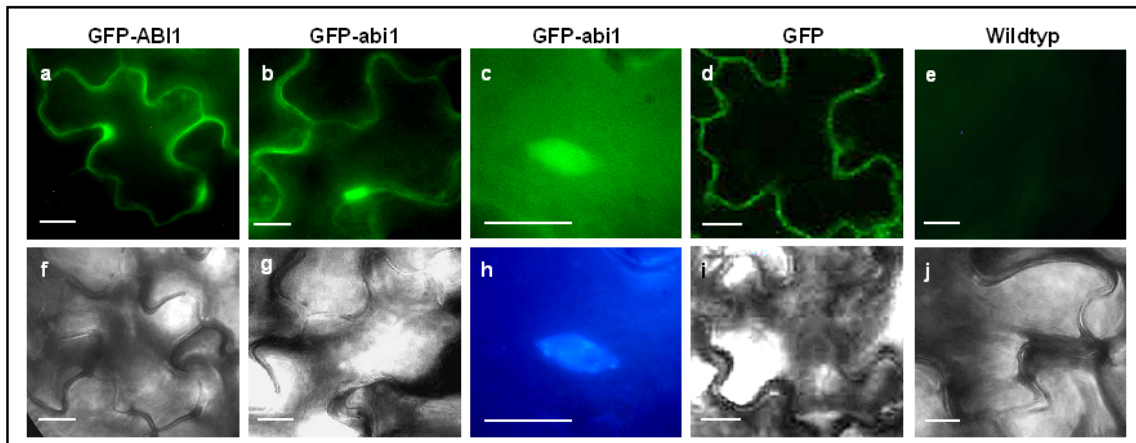


Abb. 3.19.: GFP-Fluoreszenz in der Epidermis von GFP-Reporterlinien. Es wurden *35SS1::GFP-ABI1* (a, f) und *35SS1::GFP-abi1*-Keimlinge (b, c, g, h) unter Fluoreszenz- (a-c, h) und Durchlicht (f, g) aufgenommen. Zur Markierung des Zellkerns in Hypokotyl-Zellen von *35SS1::GFP-ABI1*-Pflanzen wurde das Bisbenzimid H33342 (h) verwendet. Als Kontrollen wurden zusätzlich *35S::GFP*- bzw. Wildtyp-Keimlinge unter der Fluoreszenzlampe (d, e) und im Durchlicht dokumentiert (i, j). Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μm .

Die Markierung der Zellkerne, welche hier am Beispiel von *35SS1::GFP-abi1*-Blattgewebe demonstriert wird, erfolgte vor dem Mikroskopieren mit dem in die DNA interkalierenden Bisbenzimid H33342 (Abb. 3.19.c und h). Signifikante Unterschiede bezüglich der Signalverteilung von GFP-ABI1 und GFP-abi1 (Abb. 3.19.a bzw. b und c) waren für die Zellen der Epidermis nicht zu erkennen. Die als Kontrollpflanzen verwendeten *35S::GFP*-Pflanzen zeigten ebenfalls eine in Zytoplasma und Zellkern verteilte GFP-Fluoreszenz (Abb. 3.19.d). In den Epidermiszellen von Wildtyp-Blättern konnte erwartungsgemäß kein Signal detektiert werden.

Neben den Epidermiszellen in den Blättern von *35SS1::GFP-ABI1*- und *35SS1::GFP-abi1*-Keimlingen zeigten auch die Schließzellen (s. Abb. 3.20.) in diesen Keimlingen eine deutlich erkennbare GFP-Expression.

Anders als jedoch bei den Epidermiszellen oder den Zellen des Hypokotyls waren hier eindeutige Unterschiede zwischen der Verteilung der GFP-ABI1- (Abb. 3.20.a und b) und der GFP-abi1-Fusionsproteine (Abb. 3.20.c und d) festzustellen. Während GFP-abi1 innerhalb der Schließzellen primär im Kern lokalisiert war, konnte für die entsprechende ABI1-Reporter-Fusion des Öfteren eine Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma festgestellt werden.

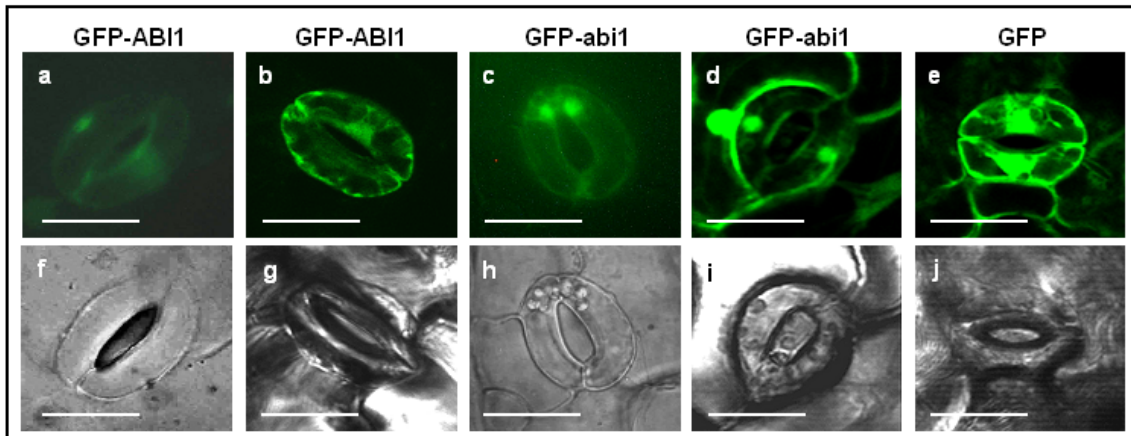


Abb. 3.20.: GFP-Fluoreszenz in den Stomata von GFP-Reporterlinien. Es wurden Blätter von GFP-ABI1-(a, f) und GFP-abi1-Keimlingen (c, h) unter Fluoreszenz (a und c) und Durchlicht (f und h) im Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. Zusätzlich erfolgten Aufnahmen von GFP-ABI1 (b, g) und GFP-abi1 (d, i) unter dem Konfokalmikroskop. Als Kontrollen wurden zusätzlich die Stomata von GFP-Kontrolllinien über konfokale Lasermikroskopie (e) und entsprechend im Durchlicht dokumentiert (j). Die angegebene Maßeinheit entspricht 50 μm .

Die Kontroll-Reporterlinien mit ektopischer GFP-Expression zeigten ein starkes, ebenfalls im Cytoplasma und im Zellkern der Schließzellen verteiltes Signal (Abb. 3.20.e und j). Das Reporter-Signal in den Blättern von GFP-abi1dNLS-Pflanzen fiel wesentlich schwächer aus als in GFP-ABI1- und GFP-abi1-Pflanzen, zeigte jedoch die gleiche cytoplasmatische und nukleäre Verteilung wie das GFP-Signal in GFP-ABI1-Pflanzen. Wildtyp-Pflanzen zeigten auch in Schließzellen kein GFP-Signal.

Um die zwischen GFP-ABI1 und GFP-abi1 bestehenden Unterschiede in der Signalverteilung quantitativ ausdrücken zu können, wurde der Quotient von cytosolischer zu nukleärer GFP-Signalintensität für jeweils 50 Schließzellen ermittelt (s. Abb. 3.21.). Das jeweils daraus resultierende mittlere Verhältnis von zytosolischer zu nukleärer Signalintensität spiegelt den in Abb. 3.20. angedeuteten äußeren Eindruck wider.

So beträgt das Verhältnis von cytosolischem zu nukleärem GFP-Signal für das hauptsächlich im Kern akkumulierende GFP-abi1-Protein (Abb. 3.21., grauer Balken) ein Drittel des für die GFP-ABI1-Fusion (Abb. 3.21., schwarzer Balken) ermittelten Wertes ($3,8 \pm 1,3$ bzw. $10,7 \pm 4,4$). Der für die *35S1::GFP*-Kontrollpflanzen gebildete mittlere Quotient ($6,7 \pm 2,8$; Abb. 3.21. weißer Balken) lag zwischen den für GFP-abi1- und GFP-ABI1-Schließzellen

ermittelten Werten. Die Signifikanz der errechneten Mittelwerte war mit $p < 0,001$ sehr hoch.

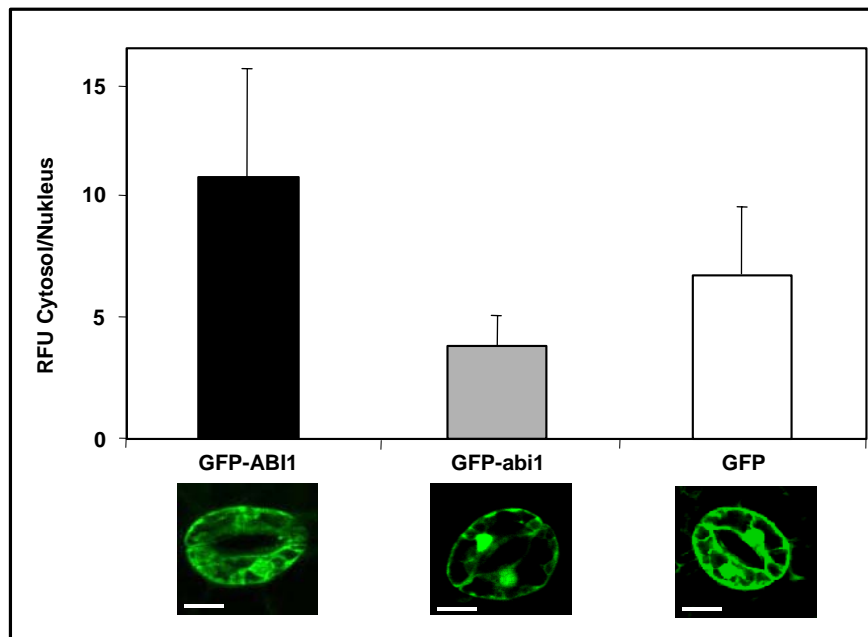


Abb. 3.21.: GFP-Signalverteilung in den Schließzellen transgener *35SS1::GFP-ABI1*- und *35SS1::GFP-abi1*-Keimlinge. Um das Verhältnis zwischen nukleärer und cytosolischer GFP-Verteilung statistisch abzusichern wurde für je 50 Schließzellen der GFP-ABI1- (schwarzer Balken) und GFP-abi1-(grauer Balken) Linien der Quotient der cytosolischen und nukleären GFP-Signalintensität errechnet und der entsprechende Mittelwert gebildet. Als Kontrolle wurde der entsprechende Quotient für unfusioniertes GFP (weißer Balken) in *35S::GFP*-Keimlingen gebildet. Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μm .

Bei allen hier aufgeführten Lokalisationsstudien der GFP-Fusionsproteine wurde zusätzlich der Einfluss von ABA auf die Verteilung der Proteine in den Schließzellen getestet. Mehrere unabhängige Zeitreihen, welche unmittelbar nach ABA-Zugabe gestartet und bis zu 120 min fortgesetzt wurden, ergaben keine signifikanten Unterschiede für die subzelluläre Verteilung der GFP-Fusionsproteine.

3.1.10. Lokalisation der Fusionsproteine GUS-ABI1 und GUS-abi1 in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen

Neben der unter 3.1.9.3. beschriebenen subzellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in transgenen Keimlingen wurde die Verteilung der GUS-ABI1-, GUS-abi1-, und GUS-abi1dNLS-Fusionen im Gewebe der entsprechenden Reporterlinien von A. Himmelbach getestet.

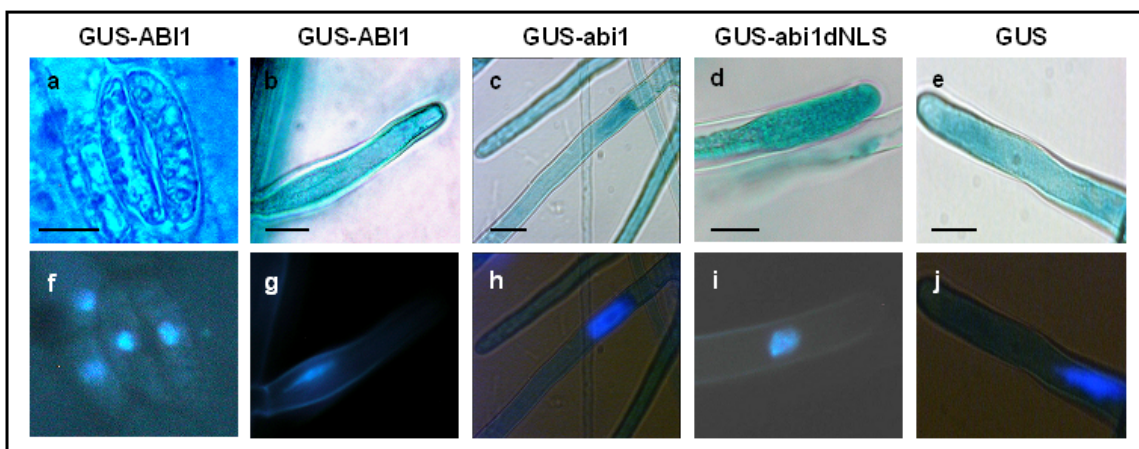


Abb. 3.22.: Histologische GUS-Färbung von 35S::GUS-Reporterfusionen. Es wurden 35S::GUS-ABI1- (a, b, f, g), 35S::GUS-abi1- (c, h) und 35S::GUS-abi1dNLS-Keimlinge (d, i) unter Durchlicht (a-d) bzw. Fluoreszenz (f-i) aufgenommen. Als Kontrolle wurden 35S::GUS-Keimlinge unter Durchlicht (e) und Fluoreszenz (j) dokumentiert. Die Markierung des Zellkerns in den Schließzellen (a) bzw. Wurzelhaaren (b-e) erfolgte über DAPI (f-j). Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μ m.

Hierfür wurden Keimlinge über Nacht mit 0 μ M bzw. 50 μ M ABA behandelt und dann fixiert. Nach 3-5-stündiger GUS-Färbung wurden die Pflanzen unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Während GUS-ABI1 im Cytosol von Wurzelhaarzellen und Schließzellen verteilt (s. Abb. 3.21.a und b) und - zumindest bei Wurzelhaaren - auch im Nukleus auszumachen war, konnte für die GUS-abi1-Konstrukte in Wurzelhaaren neben der cytosolischen Lokalisation auch eine deutliche nukleäre Akkumulation festgestellt werden (Abb. 3.22.c). Die GUS-abi1dNLS-Proteinfusionen entsprachen in ihrer Lokalisation dem zur Kontrolle eingesetzten, unfusioniertem GUS-Protein (Abb. 3.22.e): beide GUS-Fusionen waren im Cytosol und im Zellkern von Wurzelhaaren zu finden.

3.1.11. Effekt von GUS-abi1- und GUS-abi1dNLS-Fusionen auf die Transkription ABA-induzierter Gene in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Wie in Abschnitt 3.1.8. bereits beschrieben wurde, zeigten die transgenen GUS-abi1-Linien bei den ABA-abhängigen physiologischen Prozessen wie Keimung, Wurzelwachstum und Stomata-Regulation ABA-insensitives Verhalten und unterschieden sich somit deutlich von den GUS-ABI1-, GUS-ABI1dNLS- und GUS-abi1dNLS-Pflanzen. Da durch Abscisinsäure verursachte physiologische Veränderungen meist mit Modifikationen in der Genexpression verbunden sind, wurde in den transgenen GUS-Pflanzen die Expression verschiedener ABA-regulierter Gene auf RNA-Ebene analysiert. Dabei sollte untersucht werden, ob der weiter oben für GUS- und GFP-abi1 in Protoplasten beschriebene, negative Einfluss auf die Regulation ABA-abhängiger Gene auch in transgenen Pflanzen mit einer funktionsfähigen NLS verbunden ist. Hierzu wurden Gene ausgesucht, welche bezüglich ihrer ABA-abhängigen Induktion oder Reprimierung deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanze und der *abi1*-Mutante zeigten (Hoth et al., 2002).

Als ABA-induzierte Gene wurden neben den in Abschnitt 3.1.2. bereits beschriebenen Genen *RAB18* (Lang and Palva, 1992), und *RD29B* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) die für HD-Zip-Transkriptionsfaktoren codierenden Gene *ATHB6* (*At2g22430*) und *ATHB12* (*At3g61890*) ausgewählt. *ATHB6* und *ATHB12* zeigen, ähnlich wie *RD29B*, eine durch Trockenheit, Osmostress und exogenes ABA hochregulierte Genexpression (Söderman et al., 1999; Olsson et al., 2004). Des Weiteren wurde die Expression des für einen Kalium-Kanal codierenden, ebenfalls ABA-induzierbaren *KCO6*-Gens (*At4g18160*) und das Gen des Zink-Finger-Proteins *ZFP2* (*At5g57520*) analysiert (Hoth et al., 2002). Zur Gruppe der hier getesteten ABA-reprimierten Gene zählt, neben des die Aldehyd-Oxidase *AAO2* codierenden Gens (*At3g43600*), das *NAI1*-Gen (*At2g22770*), bei dessen Produkt es sich um ein bHLH-Protein handelt. Zudem wurde die ABA-reprimierte Expressions-Regulation für ein putatives RNA-bindendes Protein untersucht (*At1g09340*) (Hoth et al., 2002).

Zur Untersuchung der ABA-abhängigen Expression dieser Gene in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden *35S::GUS-ABI1*-, *35S::GUS-ABI1dNLS*-, *35S::GUS-abi1*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Samen auf ½ MS-Agarose-Platten ausgebracht und die Keimlinge 10 d später für 4 h auf entsprechende Agarose-Platten mit 0 µM bzw. 50 µM ABA überführt. Als Wildtyp-Kontrolle dienten RLD-Keimlinge, als ABA-insensitive Kontrolle wurden *abi1*-Pflanzen verwendet. Die RNA von je 30 Keimlingen wurde isoliert und 500 ng Gesamt-RNA wurde über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben.

Bei der anschließenden RT-PCR-Analyse wurden zur Amplifikation der DNA, wenn nicht anders angegeben, 28 Zyklen gewählt, womit die lineare Phase der DNA-Vermehrung berücksichtigt wurde. Für die Analyse der ABA-abhängigen Expression wurden für jedes Gen spezifisch ausgewählte *forward* und *reverse* Primer verwendet (s. Anhang 5.1.). Als interner Standard wurde bei jedem Ansatz das Actin-Gen *ACT1* (*At2g37620*) mit Hilfe der entsprechenden Primer amplifiziert. Hierfür wurden nur 25 PCR-Zyklen durchgeführt. Für jedes PCR-Amplifikat wurde die Intensität der Ethidium-Bromid-gefärbten Bande im Agarosegel gemessen und über die Intensität der jeweiligen Actin-Bande abgeglichen. Anschließend wurde für jedes Gen der in den einzelnen transgenen Linien erhaltene ABA-Induktionsfaktor ermittelt. Um die für die verschiedenen Linien erhaltenen Induktionswerte eines einzelnen Gens miteinander vergleichen zu können, wurde die in diesem Fall höchste ABA-Induktion als 100%-Wert festgelegt und die restlichen Induktionsfaktoren wurden jeweils relativ zu diesem Wert ausgedrückt.

Bis auf die mit *ATHB6*-Primern erzielten PCR-Daten sind die für alle ABA-induzierbaren Gene erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 3.23. dargestellt.

Während bei Wildtyp-Keimlingen für alle ausgewählten Gene eine deutliche, durch 50 µM ABA ausgelöste Induktion der Genexpression zu beobachten war, wurde in *abi1*-Mutanten die ABA-abhängige Aktivierung bei fast allen getesteten Genen aufgehoben. Somit zeigte *ATHB12* als einziges Gen im *abi1*-Hintergrund eine Hochregulation durch ABA, wobei diese deutlich schwächer ausfiel als die entsprechende Induktion in Wildtyp-Pflanzen.

Die in homozygoten *35S::GUS-abi1*-Linien bei physiologischen Assays beobachtete ABA-Insensitivität setzte sich auch bei der Regulation der Gen-Transkription fort. So konnte für die Gene *RAB18* (*AT5g66400*), *RD29B*

(*At5g52300*), *ATHB12* (*At3g61890*), *KCO6* (*At4g18160*) und *ZFP2* (*At5g57520*) eine im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächte ABA-Induktion festgestellt werden, doch der ABA-insensitive Effekt fiel für diese Gene in *GUS-abi1*-Transgenen deutlich schwächer aus als in den *abi1*-Mutanten.

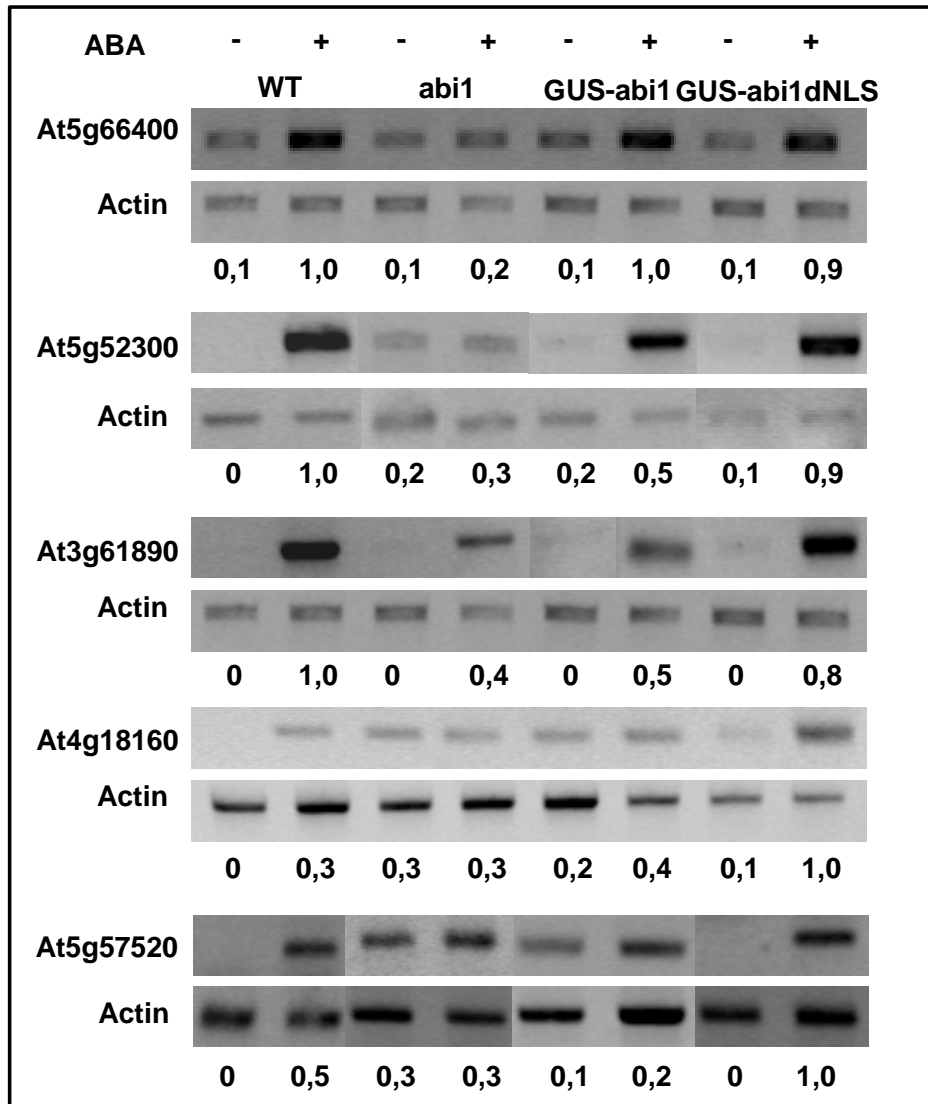


Abb. 3.23.: RT-PCR zur vergleichenden Analyse der Expression ABA-induzierter Gene in *35S::GUS-abi1*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Pflanzen. 500 ng Gesamt-RNA aus für 4 h mit 0 μ M (-) bzw. 50 μ M (+) ABA behandelten Keimlingen wurde in cDNA umgeschrieben und für die Untersuchung der Gene *RAB18* (*At5g66400*), *RD29B* (*At5g52300*), *ATHB12* (*At3g61890*), *KCO6* (*At4g18160*) und *ZFP2* (*At5g57520*) als Templat eingesetzt. Die EtBr-gefärbte Actin-Bande wurde als ABA-unabhängiger Standard und zum internen Mengenabgleich der im Agarosegel erhaltenen Gen-Banden genutzt. Für jedes Gen wurde das jeweils stärkste Signal auf 1,0 gesetzt und die restlichen ABA-Induktionsfaktoren relativ zu diesem Wert ausgedrückt.

Die in Keimungsverhalten, Wurzelwachstum und Stomataregulation keine Abweichung zum Wildtyp zeigenden GUS-*abi1dNLS*-Pflanzen verhielten sich auch bei der Regulation der, in Abb. 3.23 dargestellten, ABA-induzierten Gene dem Wildtyp entsprechend. Für GUS-*ABI1*- und GUS-*ABI1dNLS*-Pflanzen wurde exemplarisch die Regulation des ABA-induzierten *RAB18*-Gens (*At5g66400*) getestet. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse entsprachen der Transkriptionsregulation des *RAB18*-Gens in Wildtyp-Pflanzen.

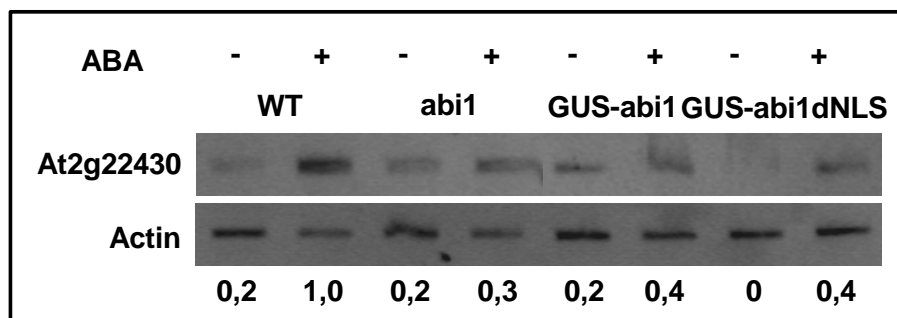


Abb. 3.24.: RT-PCR zur vergleichenden Analyse der Expression des *ATHB6*-Gens in *35S::GUS-abi1*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Pflanzen. 500 ng Gesamt-RNA aus für 4 h mit 0 μ M (-) bzw. 50 μ M (+) ABA behandelten Keimlingen wurde in cDNA umgeschrieben und für die Untersuchung *ATHB6* (*At2g22430*) als Templat eingesetzt. Die Zyklenzahl der PCR variierte zwischen 28 (a) und 34 (b). Die EtBr-gefärbte Actin-Bande wurde als ABA-unabhängiger Standard und zum internen Mengenabgleich der im Agarosegel erhaltenen Gen-Banden genutzt. Es wurde das stärkste Signal auf 1,0 gesetzt und die restlichen Induktionsfaktoren relativ zu diesem Wert ausgedrückt.

Aufgrund der *in vivo* und *in vitro* Interaktion von *ABI1* mit dem HD-Zip-Transkriptionsfaktor *ATHB6* (*At2g22430*) und der bereits beschriebenen *abi1*-vermittelten Hemmung der ABA-induzierten *ATHB6*-Promotoraktivität (Himmelbach et al., 2002) wurde zusätzlich zu den ABA-induzierbaren Genen in Abbildung 3.24. die Expression des *ATHB6*-Gens in *abi1*-Mutanten sowie in transgenen *35S::GUS-abi1*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Pflanzen getestet. Auch hier dienten RLD-Keimlinge als Wildtyp-Kontrolle. Eine über 28 Zyklen laufende PCR ergab für *ATHB6* eine ABA-induzierte Erhöhung der Transkriptmenge in Wildtyp- und GUS-*abi1dNLS*-Pflanzen, sowie die Aufhebung dieser Induktion in *abi1*-Mutanten und GUS-*abi1*-Pflanzen (s. Abb. 3.23). Diese Regulation der *ATHB6*-Expression konnte mit einer PCR über 34 Zyklen jedoch nicht produziert werden, so dass beim Nachweis der ABA-abhängigen *ATHB6*-

Regulation die Zyklenzahl der PCR-Läufe als kritischer Parameter angesehen werden musste.

Neben den ABA-induzierbaren Genen wurden mit den oben bereits beschriebenen Genen *AAO2* (*At3g43600*) und *NAI1* (*At2g22770*) sowie dem für ein RNA-Bindeprotein codierenden Gen *At09340* zudem drei ABA-reprimierbare Gene auf ihre Regulation in *35S::GUS-abi1*- und *35S::GUS-abi1dNLS*-Keimlingen getestet.

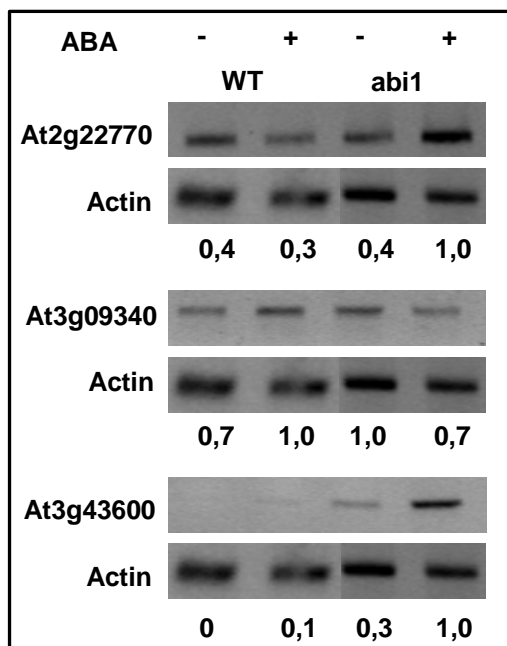


Abb. 3.25.: RT-PCR zum Vergleich der Expression ABA-reprimierter Gene in *GUS-abi1*- und *GUS-abi1dNLS*-Pflanzen. Es wurde 500 ng Gesamt-RNA aus Keimlingen isoliert, die für 4 h mit 0 μ M (-) bzw. 50 μ M (+) ABA inkubiert wurden. Nach reverser Transkription der RNA in cDNA erfolgte die Untersuchung der Gene *NAI1* (*At2g22770*) und *AAO2* (*At3g43600*), sowie das Gen eines RNA-Bindeproteins (*At3g09340*) über PCR mit 28 Zyklen. Die EtBr-gefärbte Actin-Bande wurde als ABA-unabhängiger Standard und zum internen Mengenabgleich der im Agarosegel erhaltenen Gen-Banden genutzt. Für jedes Gen wurde das jeweils stärkste Signal auf 1,0 gesetzt und die restlichen ABA-Induktionsfaktoren relativ zu diesem Wert ausgedrückt.

Trotz der für die Expression von *At2g22770* und *At09340* angegebenen 50- bzw. 60-fachen ABA-abhängigen Repression konnte im Rahmen dieser Arbeit für diese beiden Gene, sowie für das nur 4-fach herunterregulierte Gen *At3g43600* (Hoth et al., 2002) bereits in den Wildtyp-Kontrollen (Ökotyp RLD) selbst unter Verwendung unabhängig isolierten RNA-Materials nur eine schwache (*At2g22770*) bzw. gar keine ABA-Reprimierung (*At3g09340* bzw. *At3g43600*) festgestellt werden (s. Abb. 3.25.).

Somit fiel bereits für die Wildtyp-Kontrolle die in der Literatur als deutlich angegebene, ABA-bedingte Hemmung aus. Auch die sich ansonsten wie Wildtyp-Pflanzen verhaltenden *35S::GUS-abi1dNLS*-Linien zeigten für die betreffenden Gene eine nur schwache, ABA-bedingte Hemmung der Expression. Aufgrund der mit den verschiedenen Linien erhaltenen Ergebnisse

konnte für alle drei ausgewählten ABA-reprimierten Gene bezüglich der Transkriptionsregulation keine Aussage getroffen werden.

3.2. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer in Arabidopsis-Zellsuspensionskultur: Etablierung eines transienten Expressionssystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion

Wie alle Pflanzenhormone steuert Abscisinsäure in Pflanzen eine Vielzahl an Vorgängen, die ein komplexes Netzwerk an regulatorischen Prozessen bilden. Neben den direkt durch Abscisinsäure beeinflussten, physiologischen Prozessen (s. 3.1.9.) wird auch die ABA-abhängige Genregulation zur näheren Untersuchung der ABA-Signalkaskade verwendet (Sheen, 1998; Himmelbach et al., 2002). Da hierbei die Anwendung transienter Expressionssysteme im Vergleich zu stabilen Transformanten den Vorteil des deutlich geringeren Zeitaufwandes bietet, wurden bereits verschiedene transiente Systeme zur Untersuchung der ABA-Signaltransduktionswege adaptiert. Dazu gehört die, auch im Rahmen dieser Arbeit verwendete, Polyethylenglykol-vermittelte Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten, die unter anderem zur Untersuchung verschiedener ABA-induzierbarer Promotoren herangezogen wurde. So erfolgte der Nachweis der ABA-abhängigen Aktivierung des *ATHB6*-Promotors durch das eigene Genprodukt, den HD-Zip-Transkriptionsfaktor *ATHB6*, mit Hilfe dieses Systems (Himmelbach et al., 2002). Auch der Einfluss verschiedener, an der ABA-Signalkaskade beteiligter Effektoren auf die Aktivität ABA-abhängiger Promotoren wie *RD29B* und *RAB18* wurde in *Arabidopsis* Protoplasten untersucht (siehe 3.1.1.-3.1.8. und Hoffmann, 2002; unveröffentlichte Ergebnisse).

Neben den Promotoren der Gene *RD29B* und *RAB18* wurde auch der in transgenen Reporterlinien durch Abscisinsäure stark induzierbare *ATHB6*-Promotor (Himmelbach et al., 2002) in transient transformierten *Arabidopsis*-Protoplasten getestet. Überraschenderweise konnte jedoch die in stabilen Transformanten beobachtbare ABA-Induktion dieses Promotors im Protoplastensystem nicht hervorgerufen werden. Im Vergleich zu den parallel getesteten *RAB18*- und *RD29B*-Promotoren zeigte der *ATHB6*-Promotor eine konstitutive, aber niedrige Aktivität, welche durch die Zugabe von Abscisinsäure nicht zu beeinflussen war (Hoffmann, 2002).

Diese Daten deuten entweder auf eine unterschiedliche Regulation des *ATHB6*-Promotors im Vergleich zu den *RAB18*- und *RD29B*-Promotoren oder aber auf

eine Störung der *ATHB6*-Induktion im Protoplastensystem hin. So könnte beispielsweise die bei der Protoplastierung ablaufende, enzymatische Auflösung der Zellwand gleichzeitig zum Verlust eines für die ABA-abhängige *ATHB6*-Promotorinduktion benötigten zellwandständigen Rezeptors führen. Eine weitere Erklärung für die Deregulation des Promotors könnte der in den zellwandlosen Protoplasten fehlende Turgordruck sein, welcher eventuell als Signal bei der ABA-Signaltransduktion über *ATHB6* fungieren könnte.

Aufgrund der in Protoplasten erzielten Ergebnisse erwies es sich als notwendig, ein geeignetes transientes Expressionssystem für die nähere Charakterisierung des *ATHB6*-Promotors zu finden. Als alternatives System wurde die Methode des Agrobakterien-vermittelten Transfers von DNA in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur gewählt (Ferrando et al., 2000), da sie die Möglichkeit bietet, transiente Transformationsereignisse an Zellen mit Zellwand und ohne die Stress verursachende Protoplastierung durchzuführen.

3.2.1. Optimierung der Agrobakterien-vermittelten Transfektion von *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen

Bei pflanzlichen Zellsuspensionskulturen handelt es sich um schnell wachsende, homogene Suspensionen von Pflanzenzellen, die in einem flüssigen Kulturmedium unter sterilen Bedingungen wachsen. Zur Etablierung des transienten Expressionssystems wurden Zellkulturen verwendet, die *Arabidopsis*-Wurzelgewebe entstammten und eine Teilungsrate von 2-3 Teilungen pro Woche aufwiesen (Mathur and Koncz, 1998).

Für die Analyse ABA-aktivierbarer Promotoren sollten in binäre Vektoren klonierte *ATHB6*-, *RAB18*- und *RD29B*-Reporterkonstrukte (Hoffmann, 2002; Anhang 5.3.) über Agrobakterien in die Zellsuspensionskulturen übertragen und anschließend der Einfluss von Abscisinsäure auf die transient exprimierten, ABA-regulierbaren Reporter gemessen werden.

Zur Einstellung der System-Parameter wurden zunächst zwei unterschiedliche Agrobakterienlinien des Stammes C58 pGV3101 (Larebeke et al., 1974) eingesetzt, welche als binären Vektor pPCV812MESH1-35S::*LUC* (Groß, 2003) bzw. pB1121*RD29B*::*LUC* (Hoffmann, 2002) enthielten. Dabei wurde die

35S::*LUC*-Kassette als konstitutive, ABA-unabhängige Kontrolle und das *RD29B*::*LUC*-Konstrukt als ABA-induzierbares und in Protoplasten aktivierbares Reportersystem ausgewählt (s. Anhang 5.3.).

Für die Ausgangsbedingungen der Agrobakterien-vermittelten Transformation (s. Abbildung 3.26.) wurden zunächst alle Parameter entsprechend den früheren, zu dieser Methode verfassten Arbeiten eingestellt (Ferrando et al., 2000). So wurde als Ausgangskonzentration für die 1-tägige Co-Kultivierung von 30 ml Zellkultur und Agrobakterien 10^8 Bakterien/ml gewählt und die direkt im Anschluss folgende ABA-Induktionsphase erstreckte sich über zwei Tage.

Die Agrobakterien-Konzentration gehört zu den kritischen Parametern der Agrobakterien-vermittelten Transformation. Sie sollte hoch genug sein, um innerhalb einer möglichst kurzen Co-Inkubationszeit eine relativ hohe Transfektionsrate zu erzielen, gleichzeitig sollte sie jedoch nicht zu hoch gewählt werden, um eine, möglicherweise mit der Anwesenheit von Agrobakterien verbundene Schädigung der Pflanzenzellen zu vermeiden.

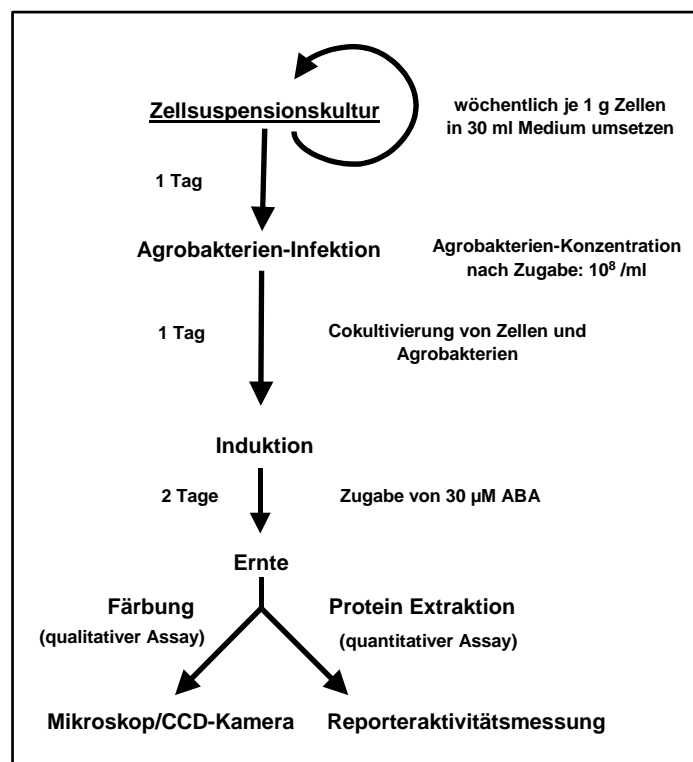


Abb. 3.26.: Ablauf einer Zellsuspensionskultur-Transformation durch Agrobakterien. Als Ausgangsbedingungen für die Etablierung dieses transienten Expressionssystems wurden die in der Diplomarbeit von Olaf Groß (2003) und durch Ferrando et al. (2000) angegebenen Bedingungen übernommen.

Auch die Auswahl der Co-Kultivierungsdauer von Agrobakterien und Pflanzenzellen erfolgte unter höchster Berücksichtigung der pflanzlichen Vitalität.

Für die Einstellung der Agrobakterien-Konzentration wurden die entsprechenden Bakterienkulturen bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 1,0 angezogen. Dies entspricht einer Zelldichte von $1 \cdot 10^9$ Bakterien/ml (Ferrando et al., 2000). Die Bakterien wurden nach einem Waschschrift mit Zellkulturmedium zu Suspensionen von $1 \cdot 10^{10}$ Bakterien/ml aufkonzentriert und bei der Infektion der pflanzlichen Zellsuspension eingesetzt.

Bei ersten Vorversuchen mit $35S::LUC$ -transferierenden Agrobakterien erwiesen sich die gewählte Konzentration von 10^8 Bakterien/ml sowie die insgesamt 3 Tage dauernde Co-Kultivierungs- und Induktionsphase als ungeeignet (s. Abb. 3.27.). Die Reporteraktivität von Pflanzenzellen, welche mit $35S::LUC$ -Plasmid transformiert und nach 72 Stunden geerntet wurden, zeigten relativ zu Zellen, die nach 16 h geerntet wurden, nur 20% LUC-Aktivität (s. Abb. 3.27.a).

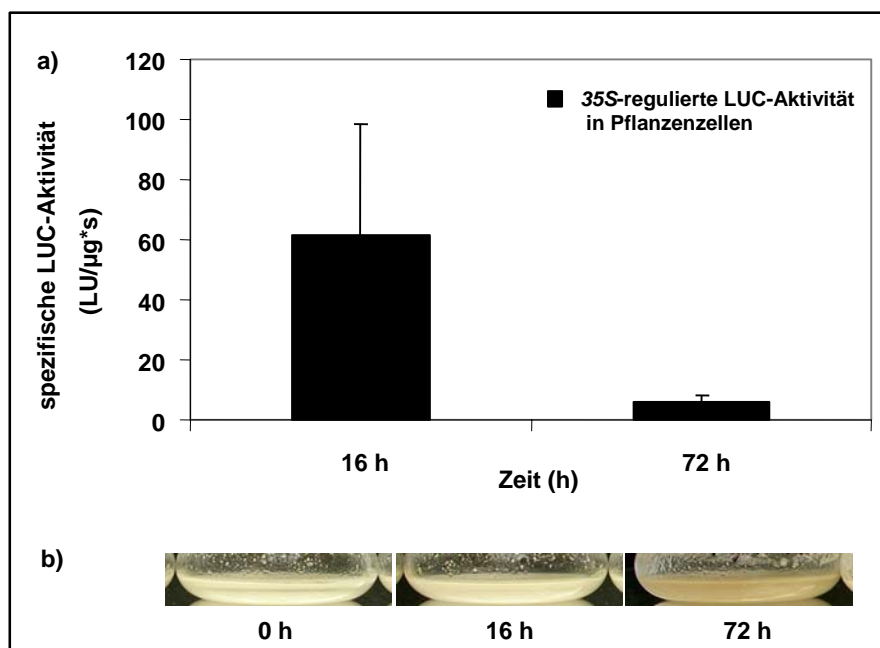


Abb. 3.27.: Einfluss von Agrobakterien auf die Reporteraktivität in transient transformierten Zellsuspensionen. Die mit 10^8 Bakterien/ml infizierten Pflanzenzellen wurden nach 16 h bzw. 72 h zwecks Reporteraktivitätsmessung geerntet. Die Färbung der Zellkulturen nach 16-stündiger bzw. 72-stündiger Agrobakterien-Infektion wurde mit Hilfe von Fotos dokumentiert.

Während die nach einer 16-stündigen Agrobakterien-Infektion geernteten Pflanzenzellen sich von nicht infizierten Kontrollzellen äußerlich nicht unterschieden, konnte bei den nach 72 h dokumentierten Zellsuspensionen eine braune Verfärbung beobachtet werden (s. Abb. 3.27.b). Diese deutet auf eine Verschlechterung der Kulturbedingungen hin. Die bräunliche Verfärbung von Zellkulturen ist auf die Bildung von Polyphenolverbindungen durch die Pflanzen zurückzuführen, welche im Zuge der Pathogenabwehr erfolgt. Eine Verstärkung der bräunlichen Verfärbung wird außerdem durch die nach dem Tod von Pflanzenzellen ablaufende Oxidation von Zellbestandteilen verstärkt. Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Verschlechterung der Zellkultur-Bedingungen und der längeren Dauer der Agrobakterien-Infektion wurde mit Hilfe einer Sauerstoff-Elektrode der Sauerstoffgehalt im Überstand von Zellkulturen analysiert, die mit $35S::GUS$ -übertragenden Agrobakterien infiziert worden waren (s. Abb. 3.28.).

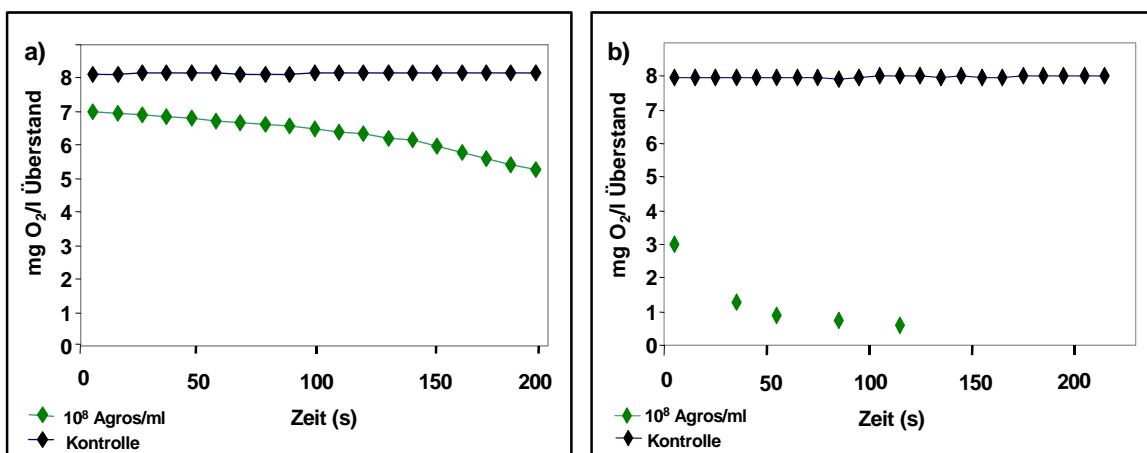


Abb. 3.28.: Messung der Sauerstoff-Konzentration bei verminderter Agrobakterien-Konzentration im Zellmedium von transgenen $35S::LUC$ -Zellkulturen. Mit Hilfe einer Sauerstoff-Elektrode wurde über 3 min die Veränderung des Sauerstoffgehaltes im Überstand von $35S::LUC$ -Zellsuspensionen gemessen, welche nach der Infektion mit 10^8 $35S::GUS$ -transferierenden Agrobakterien/ml für 18 h (a, grüne Symbole) bzw. 40 h (b, grüne Symbole) inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden nicht infizierte $35S::LUC$ -Zellkulturen verwendet (a und b, schwarze Symbole).

Hierfür wurden transgene $35S::LUC$ -Zellsuspensionen mit 10^8 Agrobakterien/ml versetzt und bis zu 48 h unter Schütteln inkubiert. Nach 18 h bzw. 40 h Co-Kultivation (Abb. 3.28.a bzw. b) wurde über einen Zeitraum von bis zu 3 min die Veränderung der Sauerstoff (O₂)-Konzentration im Überstand der

Zellsuspensionen gemessen. Dabei konnte für die infizierten Kulturen bereits nach 18 h Co-Inkubation eine deutliche Abnahme des O₂-Gehaltes von 7 auf 5,5 mg O₂/l Überstand festgestellt werden (3.28.a, grüne Symbole). Die als nicht infizierte Kontrolle verwendeten 35S::*LUC*-Zellen hingegen blieben in ihrer O₂-Verfügbarkeit über den gemessenen Zeitraum unbeeinträchtigt (3.28.a, schwarze Symbole). Nach 40 h Co-Kultivation ergab sich für die mit Agrobakterien belasteten Zellen ein drastischer Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle: gleich zu Beginn der Messung war der O₂-Gehalt im Agrobakterien-infizierten Kulturüberstand mit 3 mg O₂/l Überstand deutlich niedriger als im Überstand der unbehandelten Kontrolle, für den konstant 8 mg O₂/l gemessen wurden (3.28.b, grüne Symbole bzw. schwarze Symbole). Somit sorgte die verwendete Anfangskonzentration von 10⁸ Agrobakterien/ml bereits nach 40 h Co-Inkubation für einen akuten Sauerstoffmangel im Zellkultur-Überstand. Um die Bedingungen während der Co-Kultivierung von Pflanzenzellen und Bakterien zu verbessern, musste demnach die agrobakterielle Ausgangskonzentration im Zellkultur-Überstand deutlich niedriger als die bis dahin eingesetzte Konzentration von 10⁸ Agrobakterien/ml gewählt werden.

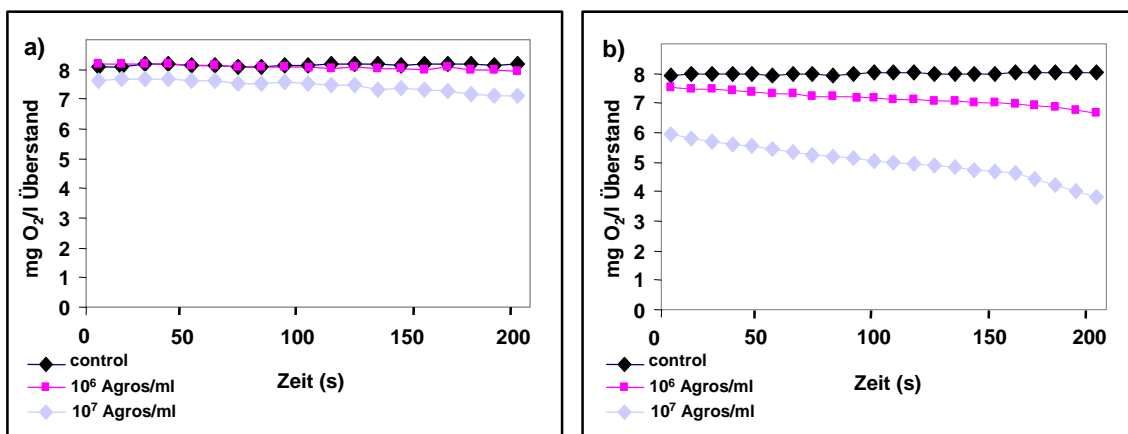


Abb. 3.29.: Messung der Sauerstoff-Konzentration bei Agrobakterien-infizierten transgenen 35S::*LUC*-Zellkulturen. Mit Hilfe einer Sauerstoff-Elektrode wurde über 3 min die Veränderung des Sauerstoffgehaltes im Überstand von 35S::*LUC*-Zellsuspensionen gemessen, welche nach der Infektion mit 10⁷ (blau) bzw. 10⁶ 35S::*GUS*-Agrobakterien/ml (magenta) für 18 h (a) bzw. 40 h (b) inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden nicht infizierte 35S::*LUC*-Zellkulturen verwendet (a und b, schwarze Symbole).

Zur Ermittlung der optimalen Ausgangskonzentration wurde der Einfluss von 10^7 bzw. 10^6 $35S::GUS$ -transferierenden Agrobakterien/ml auf den O_2 -Gehalt im Zellkultur-Überstand untersucht (s. Abb. 3.29.). Dabei konnten nach 18 h Co-Inkubation von Pflanzenzellen mit den ausgewählten Agrobakterien-Konzentrationen kaum Unterschiede zwischen den O_2 -Konzentrationen der nicht infizierten Kontrolle und den mit Agrobakterien belasteten Kulturüberständen festgestellt werden (Abb. 3.29.a). Die 40-stündige Inkubation mit Agrobakterien führte, neben einer schwachen Beeinträchtigung der O_2 -Verfügbarkeit in dem mit 10^6 Bakterien/l infizierten Kulturmedium (3.29.b, Symbole in magenta), zu einer sehr deutlichen Abnahme des Sauerstoffgehaltes in der mit 10^7 Bakterien/ml belasteten Zellsuspensionskultur (Abb. 3.29.b, Symbole in blau).

Die Schädigungen, welche der Agrobakterien-bedingte Sauerstoffmangel in den $35S::LUC$ -exprimierenden Pflanzenzellen hervorruft, wurden mit Hilfe von Reporteraktivitätsmessungen dokumentiert. Hierfür wurden nach der O_2 -Messung aus den 40 h mit Agrobakterien belasteten Zellsuspensionen Rohextrakte hergestellt und die Aktivität der extrahierten Luciferase im Luminometer quantifiziert (Abb. 3.30.).

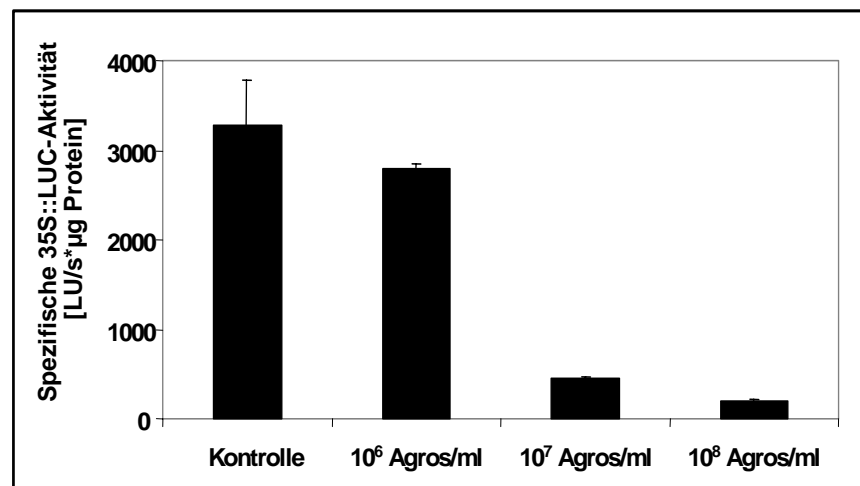


Abb. 3.30.: Spezifische LUC-Aktivität in mit verschiedenen Agrobakterien-Konzentrationen infizierten transgenen $35S::LUC$ -Zellsuspensionen. Nach 40-stündiger Co-Inkubation mit 10^6 , 10^7 bzw. 10^8 /ml Agrobakterien wurde die im Rohextrakt der Pflanzenzellen vorhandene LUC-Aktivität gemessen. Der Abgleich der gemessenen Reporter-Aktivitäten erfolgte quantitativ über Proteingehalt.

Dabei konnte mit zunehmender Agrobakterien-Konzentration eine starke Abnahme der LUC-Aktivität festgestellt werden, womit die in den einzelnen Zellsuspensionen gemessene Reporteraktivität exakt mit den vorher ermittelten Sauerstoff-Konzentrationen korrelierte. So wurde die höchste LUC-Aktivität in nicht infizierten Kontrollen gemessen, welche gleichzeitig den meisten Sauerstoff zur Verfügung hatten. Am niedrigsten fiel die Reporter-Aktivität in den, mit der höchsten Agrobakterien-Konzentration belasteten, und demzufolge bezüglich des Sauerstoffgehaltes stark eingeschränkten Zellsuspensionen aus (Abb. 3.30.).

Da bei den mit 10^6 Bakterien/ml infizierten Zellkulturen sowohl die nach 40 h Co-Inkubation ermittelte O_2 -Konzentration (Abb. 3.29.) als auch die zum gleichen Zeitpunkt gemessene Reporteraktivität nur schwach abnahm (Abb. 3.30.), wurde diese Agrobakterien-Konzentration als Ausgangswert bei anschließenden Experimenten eingesetzt.

Aufgrund des in Abb. 3.28. und 3.29. für alle getesteten Bakterien-Konzentrationen gezeigten, starken Unterschiedes zwischen dem O_2 -Gehalt im Zellkultur-Medium nach 18- und 40-stündiger Agrobakterien-Infektion sollte - zusätzlich zur Verwendung niedriger Agrobakterien-Konzentrationen - die Dauer der Co-Inkubation von Zellkulturen und Agrobakterien unter oder im Bereich von 40 h gehalten werden.

Zur Ermittlung des optimalen Zeitrahmens für die Agrobakterien-Transfektion mit anschließender ABA-Induktion wurden *Arabidopsis* Zellkulturen für 0 h bzw. 8 h oder 16 h mit unterschiedlichen Agrobakterienlinien und möglichst niedriger bakterieller Ausgangskonzentration (10^6 /ml) transfiziert (s. Abb. 3.31.). Diese übertrugen die binären Reporter-Plasmide pPCV812MESH1-35S::*c-myc-LUC* bzw. pPCV812MESH1-35S::*HA-GUS* deren jeweiliges Genprodukt enzymatisch über Luciferin- bzw. Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG)-Zugabe nachgewiesen und durch Nutzung der CCD-Kamera bzw. des Lichtmikroskops dokumentiert werden konnte (Abb. 3.31. a-c, bzw. d-f).

Zur Veranschaulichung der zeitabhängigen Verbesserung der Transformationseffizienz wurden in Abb. 3.31. repräsentativ einige der transformierten Zellen dargestellt.

Die beiden unabhängigen Reporternachweise ergaben nach 8-stündiger Co-Kultivierung eine Transformationsrate von etwa 5%, während die Verlängerung

der agrobakteriellen Inkubationszeit um weitere 8 h auf insgesamt 16 h zur Transformation von 25-40% der untersuchten Zellen führte.

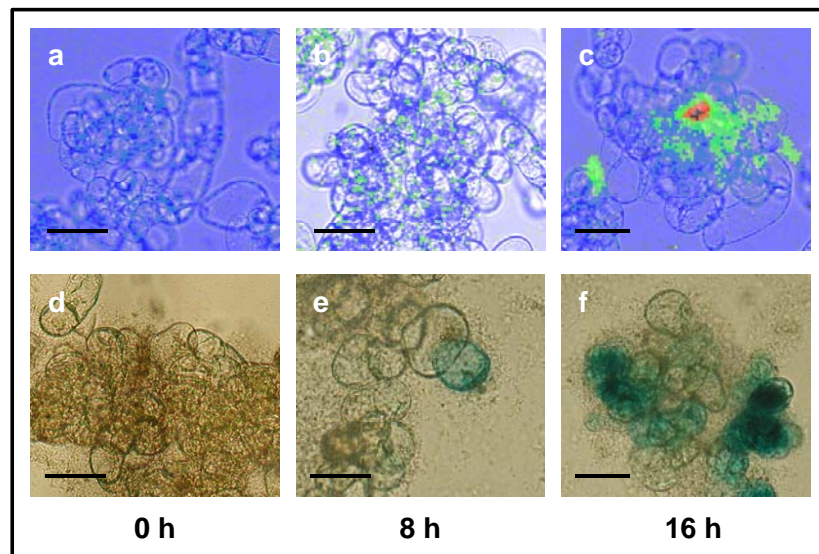


Abb. 3.31.: Reporternachweis in über Agrobakterien transformierten Zellsuspensionskulturen zur Ermittlung der zeitabhängigen Transformationseffizienz. Pflanzenzellen, die über Agrobakterien die Plasmide pPCV812-MESHI-35S::*c-myc-LUC* (a-c) bzw. pPCV812-MESHI-35S::*HA-GUS* (d-f) erhielten, wurden 0h (a, d), bzw. 8 h (b, e) oder 16 h (c, f) mit den transformierenden Agrobakterien (10^6 /ml) inkubiert. Nach der Ernte erfolgte der jeweilige Nachweis der erworbenen Reporteraktivität mit Hilfe der CCD-Kamera (a-c) bzw. unter dem Lichtmikroskop (d-f).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine 16 h andauernde Infektion von pflanzlichen Zellsuspensionen mit den jeweiligen, DNA-übertragenden Agrobakterien als ausreichend angesehen.

Um die Bedingungen der Zellsuspensionskulturen auch während der im Anschluss an die Transfektion erfolgenden ABA-Inkubationsphase möglichst optimal zu halten, wurde - zusätzlich zur Verkürzung der Co-Infektionszeit und zur Minimierung der Agrobakterien-Konzentration - nach einer Möglichkeit zur Eindämmung der agrobakteriellen Vermehrung gesucht. Eine Hemmung der Agrobakterien-Vermehrung nach erfolgtem DNA-Transfer würde zusätzlich zur Entlastung der Pflanzenzellen beitragen.

Eine Möglichkeit zur Einschränkung der Bakterien-Vermehrung besteht in der Verwendung von Antibiotika. In einem Vorversuch mit transgenen *RD29B::LUC*-Keimlingen wurde das von Ferrando *et al.* (2000) in Zellkulturen angewendete Cephalosporin-Derivat Cefotaxim getestet. Dabei sollten dessen antibakterielle

Wirkung sowie mögliche negative Einflüsse dieses Antibiotikums auf die Pflanzen untersucht werden. Als Indikator für die Vitalität der Keimlinge wurde die ABA-induzierbare *RD29B*-gesteuerte LUC-Aktivität genutzt.

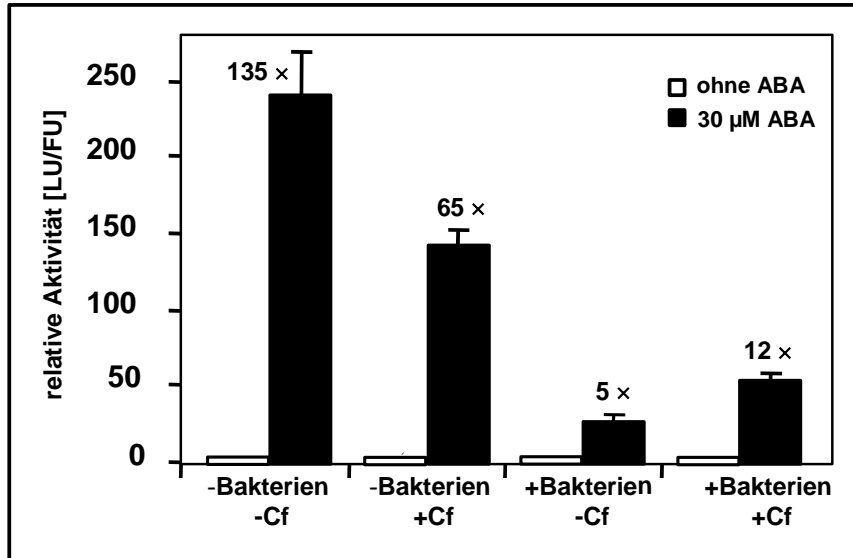


Abb. 3.32.: Einfluss des Antibiotikums Cefotaxim (Cf) auf die Reporteraktivität in transgenen *RD29B::LUC*-Keimlingen. Das Antibiotikum wurde sowohl im Beisein (+Bakterien) als auch in Abwesenheit von pPCV812-MESHI-35S::*GUS*-Agrobakterien (-Bakterien) zu den Keimlingskulturen gegeben, so dass gleichzeitig zur Untersuchung der Agrobakterien-Hemmung auch der Einfluss von Cefotaxim auf die *RD29B::LUC*-Aktivität geprüft werden kann (-Cf, +Cf). Zur ABA-Induktion des *RD29B*-Promotors wurden die Keimlinge 24 h lang mit 30 µM ABA inkubiert. Die angegebenen Messwerte beruhen auf Doppelbestimmungen von unabhängig angesetzten Keimlingskulturen.

Hierfür wurde die *RD29B*-regulierte Reporteraktivität sowie deren ABA-Induzierbarkeit unter dem Einfluss von Agrobakterien und bzw. oder Cefotaxim getestet und mit den entsprechenden Kontrollen verglichen (s. Abb. 3.32.). Um die Keimlinge zusätzlich zu schonen wurde gleichzeitig die ABA-Induktionsphase von ursprünglich 48 h auf 24 h verkürzt. Da alle Ansätze - unabhängig von Agrobakterien- und Antibiotikumbehandlung - eine deutliche ABA-Induktion zeigten, konnte die Dauer der ABA-Einwirkung als ausreichend betrachtet werden (Abb. 3.32.).

Bei den mit Agrobakterien belasteten Keimlingen konnte infolge einer Cefotaxim-Behandlung eine doppelt so hohe ABA-Induktion als bei nur mit Agrobakterien infizierten Keimlingen festgestellt werden (12-fache bzw. 5-fache ABA-Induktion). Allerdings zeigten ausschließlich mit Cefotaxim behandelte

Pflanzen im Vergleich eine deutlich schlechtere, 65-fache Reporter-Induktion als gänzlich unbehandelte Keimlinge, deren *RD29B*-regulierte Aktivität bis zu 135-fach durch ABA induziert wurde. Dieses Ergebnis ließ auf eine durch das Antibiotikum herbeigeführte Verschlechterung der pflanzlichen Vitalität schließen. Aufgrund dieser für Cefotaxim beobachteten negativen Wirkung auf die Fitness transgener Keimlinge wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Eindämmung des Agrobakterienwachstums gesucht.

So wurde außerdem die Effektivität eines im Anschluss an die Co-Kultivierung von Agrobakterien und Pflanzen folgenden Waschschrilles getestet. Bei diesem Schritt wurden die Zellen über einen Büchner-Trichter aufgefangen und - nach Spülung mit 2%-iger Saccharose-Lösung - in die mit frischem Medium versetzten Kolben zurückgegeben. In Abbildung 3.33. ist am Beispiel transgener Keimlinge der Effekt eines solchen Waschschrilles auf das Wachstum der Agrobakterien in pflanzlichen Flüssigkulturen dargestellt. Nach einer ÜN-Inkubation von *35S::LUC*-Keimlingen mit 10^8 Agrobakterien/ml wurde vor einer weiteren, 24-stündigen ABA-Induktionsphase, der mit Agrobakterien-belastete Kulturüberstand verworfen und durch neues Medium ersetzt.

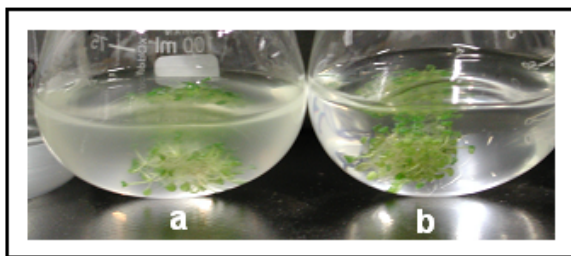


Abb. 3.33.: Einfluss eines Waschschrilles auf das Agrobakterien-Wachstum in Keimlingskulturen. Nach einer ÜN-Inkubation mit Agrobakterien wurden *35S::LUC*-Keimlinge direkt für 24 h mit ABA induziert (a) bzw. vor dem 24-stündigen ABA-Induktionsschritt gewaschen und mit neuem Medium versorgt (b).

Die Aufnahme in Abbildung 3.33. zeigt den Unterschied zwischen Keimlingen, die mit neuem Medium versehen wurden und Flüssigkulturen, bei denen die Vermehrung der Agrobakterien vor der 24-stündigen Inkubation mit ABA nicht durch einen Mediaustausch eingedämmt wurde. Letztere zeigen demnach eine deutlich stärkere agrobakterielle Kontamination des Überstandes (3.33.a) als die gewaschenen Keimlingskulturen (3.33.b).

Aufgrund der mit einem Waschschrill verbundenen, wirkungsvollen Hemmung des agrobakteriellen Wachstums in Keimlingskulturen, wurde diese Vorgehensweise auch für die Zellsuspensionskulturen übernommen, so dass

nach der Co-Inkubationsphase das Medium gewechselt wurde und somit die Agrobakterien für die anschließende ABA-Induktion zumindest größtenteils entfernt wurden.

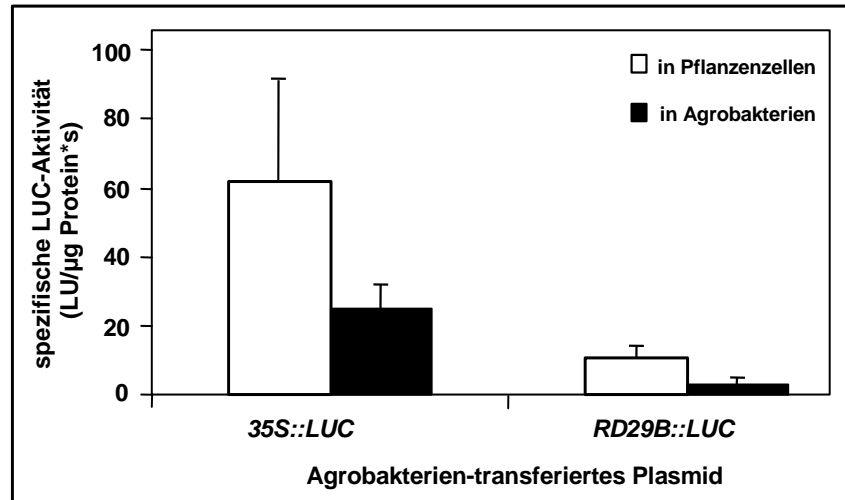


Abb. 3.34.: Nachweis der LUC-Aktivität in transient transformierten Zellkulturen und in der für die jeweilige Transformation verwendeten Agrobakterien-Suspension. Die LUC-Aktivität in mit 35S::LUC- bzw. RD29B::LUC-Plasmid transformierten Pflanzenzellen wurde gemessen und mit der Aktivität im Agrobakterien-Pellet des zugehörigen Zellkulturüberstandes verglichen.

Ein weiterer Vorteil des zwischen Co-Kultivierung und ABA-Induktion eingeführten Waschschrilles könnte in der Entfernung der aus bakterieller Genexpression stammenden Reporterproteine bestehen (Wood and DeLuca, 1987). Wie Testreihen mit 35S::LUC- bzw. RD29B::LUC-exprimierenden *Arabidopsis*-Zellen zeigten, kann im Zellkultur-Überstand gemessene Aktivität der agrobakteriellen Luciferase bis zu 30% der im entsprechenden pflanzlichen Rohextrakt gemessenen Reporteraktivität erreichen (Abb. 3.34.). Bei der Herstellung von Rohextrakten aus mit Agrobakterien kultivierten Zellsuspensionen kann es daher zur Vermischung von Reporterproteinen bakteriellen und pflanzlichen Ursprungs kommen, die in den anschließenden luminometrischen (LUC) bzw. fluorimetrischen Nachweisen (GUS) nicht unterschieden werden konnten.

Um die Wirksamkeit des Waschschrilles bei der Behebung dieses Problems zu überprüfen, wurde die Luciferase-Aktivität im Rohextrakt von Pflanzenzellen, die 16 h mit 35S::LUC-Agrobakterien inkubiert wurden, verglichen mit der Aktivität von Zellkulturen, die nur 10 min in Kontakt mit den transformierenden

Agrobakterien waren. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die für die 10-minütige Co-Kultivierung eingestellte agrobakterielle Dichte dem Wert entsprach, der in der 16 h lang co-inkubierten Zellsuspensionskultur gemessen wurde. Gleichzeitig wurde mit 10 min jedoch eine Zeitspanne gewählt, die zu kurz ist, um eine effiziente Transformation der Pflanzenzellen mit dem 35S::LUC-Konstrukt zu erreichen.

Die Zellkulturen wurden anschließend wie oben beschrieben gewaschen und zwecks Proteinextraktion sofort geerntet. Da für die nur 10 min mit Agrobakterien infizierten Pflanzenzellen nur Hintergrundaktivität im Luminometer gemessen werden konnte, wurde demzufolge das agrobakterielle Reporterprotein durch den Waschschrift effektiv entfernt. Die 16 h mit Agrobakterien inkubierte und demnach transformierte Zellkultur zeigte hingegen eine erwartungsgemäß hohe Luciferase-Aktivität (vgl. 0 h und 16 h in Abb. 3.35.).

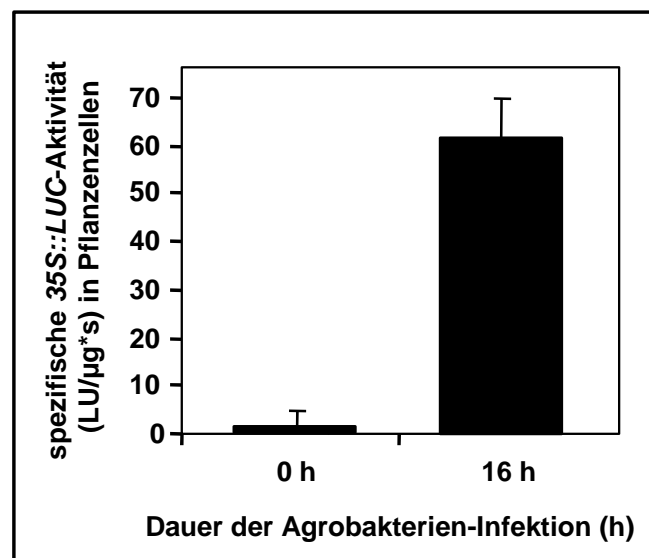


Abb. 3.35.: Messung der verbleibenden 35S::LUC-Aktivität in Pflanzenzellen nach Entfernung der Agrobakterien. Die Luciferase-Aktivität von Zellen, die 16 h mit Agrobakterien in Kontakt waren, wurde mit der entsprechenden Aktivität in Pflanzenzellen verglichen, die nur 10 min (entspricht 0 h in der Abbildung) mit Agrobakterien inkubiert wurden und demnach als untransformiert galten. Beide Zellkulturen wurden zum Entfernen der Agrobakterien vor der Proteinextraktion mit Hilfe eines Büchner-Trichters gewaschen und anschließend zur Proteinextraktion aufgeschlossen.

Somit wurde mit dem eingeführten Waschschrift nicht nur die Vitalität der Zellen verbessert, sondern gleichzeitig auch die durch bakterielle Reporterproteine

verursachte Hintergrundaktivität im Rohextrakt von Zellsuspensionen stark vermindert.

Alle bis hierher aufgeführten Veränderungen und Ergänzungen des in Abbildung 3.26. vorgestellten Transformationsschemas, die sich für einen effizienten Agrobakterien-vermittelten Gentransfer mit geringstmöglicher Schädigung der Pflanzenzellen und anschließendem spezifischem Nachweis pflanzlicher Reporteraktivität als notwendig erwiesen, sind in Abb. 3.36. mit roter Farbe dargestellt.

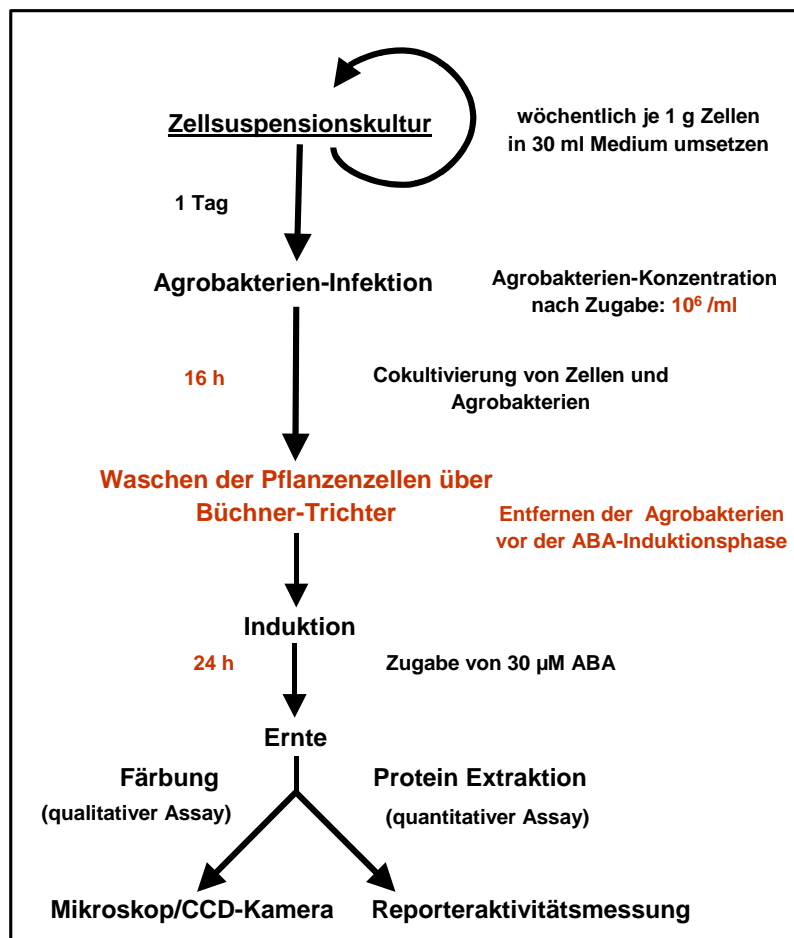


Abb. 3.36.: Zeitlicher Ablauf der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Zellsuspensionskulturen. Die als Ausgangsbedingungen bei der Etablierung dieses transienten Expressionssystems von Olaf Groß (unveröffentlichte Ergebnisse, 2003) und Ferrando et al. (2000) übernommenen Bedingungen wurden optimiert. Alle eingeführten Veränderungen sind in roter Schrift aufgeführt.

Um die Belastung der Pflanzenzellen während der agrobakteriell vermittelten Transformation so gering wie möglich zu halten, wurde die Ausgangskonzentration der Agrobakterien mit 10^6 /ml so niedrig gewählt, dass

gemäß den in Abbildung 3.28. aufgeführten Ergebnissen auch nach 40 h Gesamtinkubation kein Sauerstoffmangel auftreten sollte. Da gezeigt werden konnte, dass eine auf 16 h beschränkte Co-Kultivierung von Pflanzenzellen und Agrobakterien bereits zu ausreichenden Transformationsraten von 25-40% führt (s. Abb. 3.31.) wurden die Agrobakterien bereits nach 16 h durch den - ebenfalls neu eingeführten - Waschschrift mit Hilfe eines Büchner-Trichters entfernt (Abb. 3.33.-3.35.). Der in Abbildung 3.33. dargestellte, bezüglich der Wirksamkeit des Antibiotikums Cefotaxim durchgeführte Versuch zeigte außerdem, dass - zumindest bei *RD29B::LUC*-Keimlingen - eine nur 24-stündige ABA-Induktion ausreicht um eine starke Aktivierung des Reporters zu erhalten.

Mit diesem optimierten Protokoll sollte nun der Versuch gestartet werden, die ABA-abhängige Reporter-kassette *ATHB6::LUC* über Agrobakterien in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur einzubringen und anhand dieses transienten Systems die ABA-Regulation des in Protoplasten nicht induzierbaren *ATHB6*-Promotors näher zu untersuchen. Für den ersten Agrobakterien-vermittelten Transferversuch wurde jedoch neben dem Kontrollkonstrukt *pBI12135S::LUC* zuerst der binäre Vektor *pBI121RD29B::LUC* verwendet, da der *RD29B*-Promotor – im Gegensatz zum *ATHB6*-Promotor - auch im transienten Protoplasten-System reguliert ist (Hoffmann, 2002).

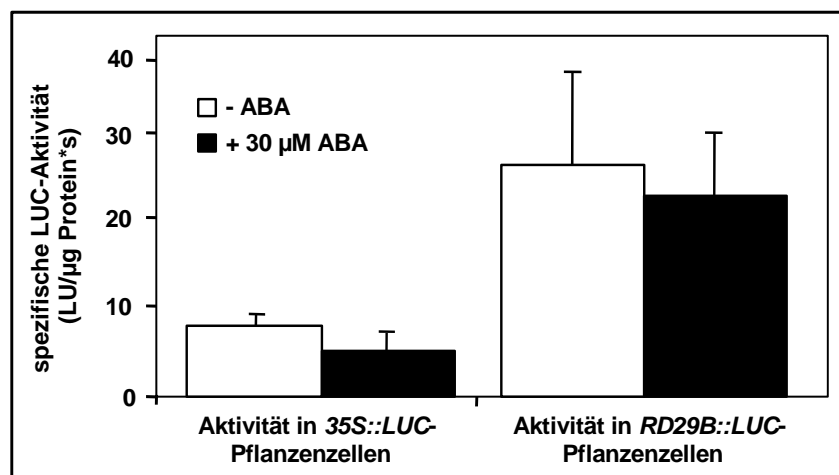


Abb. 3.37.: Luciferase-Aktivität in transient über Agrobakterien transformierten *35S::LUC*- und *RD29B::LUC*-Zellkulturen. Nach 16 h Agrobakterien-Transformation (10^7 /ml), anschließendem Waschschrift und 24 h Inkubation mit 0 µM (weiß) bzw. 30 µM (schwarz) ABA wurde die über Proteingehalt standardisierte Reporteraktivität in den Zellextrakten gemessen.

Transformiert wurde mit einer Anfangskonzentration von 10^6 Agrobakterien/ml für 16 h, anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 24 h mit $30 \mu\text{M}$ ABA induziert. Die nach der Ernte der Zellen für *35S::LUC* bzw. *RD29B::LUC* gemessene und über Proteingehalt abgegliche LUC-Aktivität ist in Abbildung 3.37. dargestellt.

Sowohl im uninduzierten als auch im induzierten Zustand war die *RD29B*-regulierte Reporteraktivität stärker als die *35S*-gesteuerte LUC-Aktivität. Somit konnte in den transformierten Zellkulturen keine ABA-Induktion des *RD29B*-Promotors, sondern vielmehr eine bereits vor ABA-Zugabe induzierte Luciferase-Aktivität beobachtet werden.

Obwohl die Transformation der Pflanzenzellen – den hohen Reporter-Aktivitäten nach - sehr effizient ablief und die Bakterien-Konzentration mit $10^6/\text{ml}$ bereits äußerst niedrig gewählt schien, führten diese Bedingungen zu einer ABA-unabhängigen Aktivierung des *RD29B*-Promotors. Auch ein weiteres Absenken der agrobakteriellen Anfangskonzentration im Zellkultur-Überstand brachte, wie in Abbildung 3.38. gezeigt, keinen Erfolg: der durch osmotischen Stress und exogenes ABA induzierbare *RD29B*-Promotor verhielt sich konstitutiv aktiv wie der *35S*-Promotor und somit komplett unabhängig von exogenem ABA.

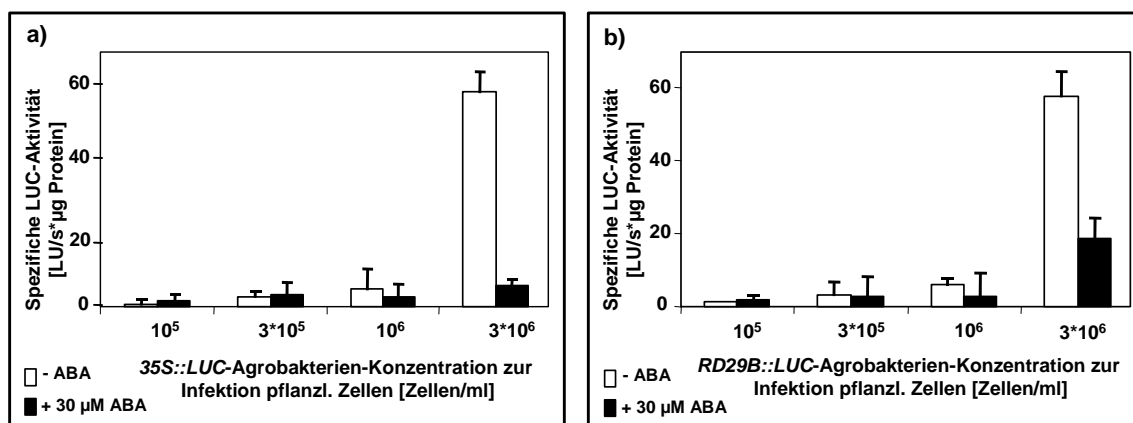


Abb. 3.38.: Vergleich des ABA-Einflusses in *35S::LUC*- und *RD29B::LUC*-transformierten Zellkulturen bei ansteigender Agrobakterien-Konzentration. Es wurde die ABA-Induzierbarkeit des *RD29B*-Promotors nach 16 h Agrobakterien-Infektion und 24 h Induktion mit 0 bzw. $30 \mu\text{M}$ ABA getestet (a). Parallel dazu wurde das *35S::LUC*-Plasmid als konstitutiv aktive Kontrolle in *Arabidopsis* Zellkultur eingebracht und die hier erhaltene LUC-Aktivität mit der in *RD29B::LUC*-Zellen verglichen (b).

Um ausschließen zu können, dass die *Arabidopsis*-Zellen - als Abwehrreaktion auf die Agrobakterien - selbst Abscisinsäure produzieren und somit für die Prä-Induktion des *RD29B*-Promotors sorgen, wurden für das anschließende Transformationsexperiment *aba2*-Zellkulturen verwendet, welche eine defiziente ABA-Biosynthese aufweisen (Cheng et al., 2002).

Diese Zellen zeigten ebenfalls nach der Transformation mit *RD29B::LUC* keine ABA-Induktion für den Promotor (s. Abb. 3.39.). Auch eine hier nicht gezeigte Behandlung der Zellsuspensionen mit Fluridon, einem generellen Hemmstoff der Carotenoid- und somit der ABA-Biosynthese, ergab keine Veränderung zur Promotor-Regulation in unbehandelten Wildtyp-Zellen. Eine pflanzeigene ABA-Produktion als Grund für die prä-induzierenden Bedingungen wurde somit ausgeschlossen.

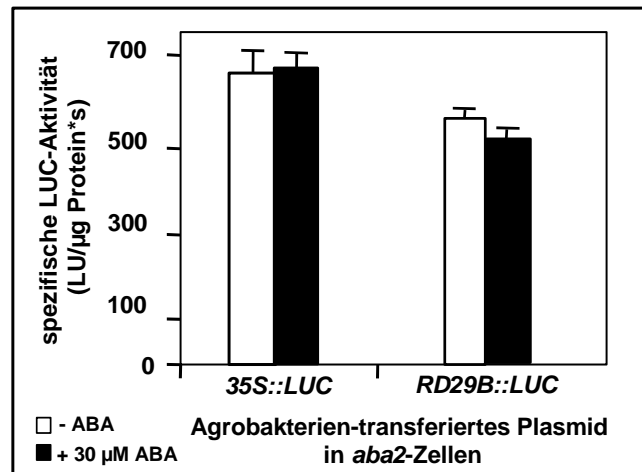


Abb. 3.39.: Test der *35S::LUC*- bzw. *RD29B::LUC*-Aktivität in Agrobakterien-transformierten *aba2*-Zellsuspensionen. Die *aba2*-Suspensionskulturen wurden 16 h mit den jeweiligen Agrobakterien inkubiert (10^6 /ml), gewaschen und 20 h mit 0 bzw. 30 µM ABA inkubiert. Die in den Rohextrakten gemessene LUC-Aktivität wurde über Proteingehalt abgeglichen.

Aufgrund des deregulierten Verhaltens des ABA-induzierbaren *RD29B*-Promotors wurde auch im mit Agrobakterien infizierten Zellkultur-Überstand nach hierfür verantwortlichen Faktoren gesucht. So wurde ein Test an *Arabidopsis*-Protoplasten durchgeführt, welche transient über PEG mit *RD29B::LUC* transformiert und mit 10^6 bzw. 10^8 *35S::GUS*-Agrobakterien/ml inkubiert wurden. Nach ÜN-Inkubation wurde die LUC-Aktivität in den jeweiligen Protoplasten-Ansätzen gemessen (s. Abb. 3.40.).

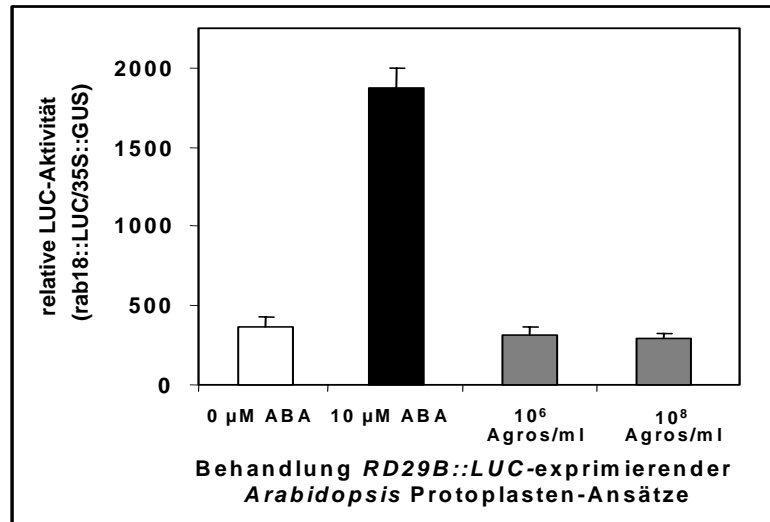


Abb. 3.40.: Einfluss des Agrobakterien-infizierten Zellkultur-Überstandes auf die *RAB18*-gesteuerte LUC-Aktivität in transient transformierten *Arabidopsis*-Protoplasten

Demnach konnten die in der *Arabidopsis*-Zellkultur herrschenden, *RD29B*-induzierenden Bedingungen auch keinem, in der Suspension von *35S::GUS*-übertragenden Agrobakterien vorhandenen Faktor zugeordnet werden.

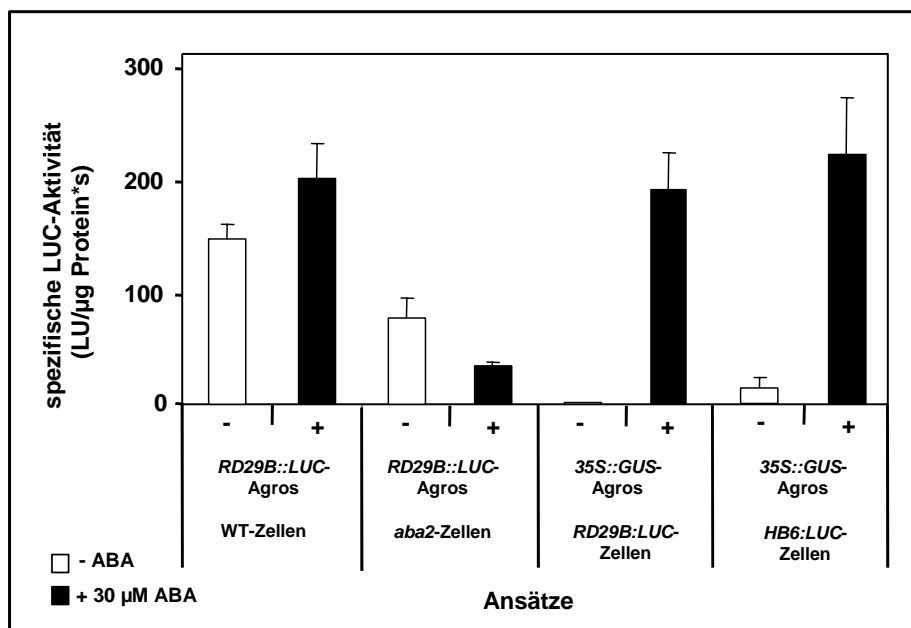


Abb. 3.41.: Vergleich der ABA-Induzierbarkeit von *RD29B::LUC*- und *ATHB6::LUC*-Konstrukten zwischen transient über Agrobakterien transformierten und stabil transgenen *Arabidopsis*-Zellkulturen. Wildtyp- und *aba2*-Zellkulturen wurden mit *RD29B::LUC*-übertragenden Agrobakterien infiziert, während die bereits transgenen *RD29B::LUC*- und *HB6::LUC*-Zellsuspensionen mit den *35S::GUS*-transferierenden Agrobakterien belastet wurden. Als Ausgangskonzentration wurde jeweils 10⁶ Bakterien/ml gewählt. Der Abgleich der jeweils gemessenen LUC-Aktivität erfolgte über die Proteinmenge.

Im Gegensatz zur verlorengegangenen ABA-Induzierbarkeit des *RD29B*-Promotors in transient transformierten *RD29B::LUC*-Zellsuspensionen zeigten Experimente mit stabil transgenen *RD29B::LUC*- und *HB6::LUC*-Zellkulturen eine deutliche ABA-Induktion für ihre stabil eingebauten Konstrukte (Abb. 3.41.). Diese ABA-Regulierbarkeit blieb sowohl in Gegenwart von *35S::GUS*-transferierenden Agrobakterien als auch unter dem Einfluss von Agrobakterien erhalten, die keine T-DNA auf Pflanzen übertragen konnten.

Demnach schien die Präsenz der Agrobakterien in Zellkulturen auf die ABA-Regulation bereits stabil integrierter Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte keinen negativen Einfluss zu nehmen, so dass die Deregulation des transient in Zellkulturen exprimierten *RD29B*-Promotors mit den beim Agrobakterien-vermittelten DNA-Transfer ablaufenden Mechanismen verknüpft sein muss.

Da der Transfer ABA-induzierbarer Reportersysteme in Pflanzenzellen mittels Agrobakterien den Verlust der ursprünglichen ABA-Induzierbarkeit dieser Konstrukte mit sich brachte, schien diese Methode der transienten Übertragung von DNA in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen für die anschließende Untersuchung der eingebrachten, ABA-regulierten Konstrukte nicht geeignet zu sein.

3.3. Funktionelle Analyse des Abscisinsäure-regulierten *ATHB6*-Promotors: Deletionsstudie in transgenen Pflanzen

Aufgrund der für den *ATHB6*-Promotor beobachteten, bis zu 2000-fachen ABA-Induktion in transgenen Reporterlinien (Himmelbach et al., 2002), sollte die ABA-abhängige Regulation dieses Promotors im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Da der *ATHB6*-Promotor in durch Thomas Hoffmann transformierten *Arabidopsis*- und Mais-Protoplasten keine ABA-Induktion mehr zeigt, sollte seine Regulation in alternativen Systemen untersucht werden (Hoffmann, 2002; unveröffentlichte Ergebnisse). Hierzu gehört neben dem, unter 3.2. vorgestellten System der Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Arabidopsis*-Zellkulturen, die Generierung stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen, welche im Folgenden besprochen wird.

3.3.1. Klonierung von 5'-deletierten *ATHB6::LUC*-Fragmenten in den binären Vektor pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* und Generierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Mit Hilfe transgener *Arabidopsis*-Pflanzen sollte innerhalb des *HB6*-Promotors nach den *cis*-Elementen gesucht werden, die für die ABA-abhängige Aktivierung dieses Promotors verantwortlich sind. Dafür wurden *ATHB6*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte mit zunehmender 5'-Deletion des Promotors angefertigt und zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen in einen binären Vektor kloniert. Die Untersuchung der ABA-Regulation dieser Konstrukte in den stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen sollte anschließend Aufschluss über bisher noch unbekanntes, an der ABA-induzierten Aktivierung des *ATHB6*-Promotors beteiligte Elemente geben.

Die Herstellung von 5'-deletierten *ATHB6*-Promotor-Fragmenten erfolgte über *proof reading* PCR mit Oligonukleotiden, die anhand der vorliegenden *ATHB6*-Promotorsequenz aus *Arabidopsis* (Ökotyp Columbia; <http://www.arabidopsis.org>) ausgewählt wurden. Die Sequenzen und exakten *annealing* Positionen der für die sieben *ATHB6*-Promotor-Deletionen (*ATHB6*($\Delta 1$ - $\Delta 7$)) verwendeten Primer sind dem Anhang zu entnehmen (siehe 5.2. bzw. 5.1.). Zur Übersicht ist in Abbildung

3.37. ein Schema des *ATHB6*-Promotors gezeigt (3.41.a). Auch die Längen der aus der PCR hervorgehenden 5'-Promotor-Deletionen sowie ihre jeweiligen Positionen relativ zur *ATHB6*-Bindestelle und zu einigen putativen regulatorischen Elementen sind dargestellt (Abb. 3.42.a bzw. b). Die mit *Xho*I- und *Bgl*III-Überhang generierten PCR-Produkte der *ATHB6*-Promotor-Deletionen wurden über *Xho*I und *Bgl*III in den ebenso geschnittenen Vektor pSKAscl (Hoffmann, 2002) ligiert. Von hier aus wurden die Promotor-Fragmente über die selben Schnittstellen in den binären Vektor pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* (Groß, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse) eingebracht, der eine *LUC*-Kassette mit vorgeschaltetem *c-myc*-Epitop enthält (Ferrando et al., 2000). Alle Konstrukte sind dem Anhang 5.3. zu entnehmen.

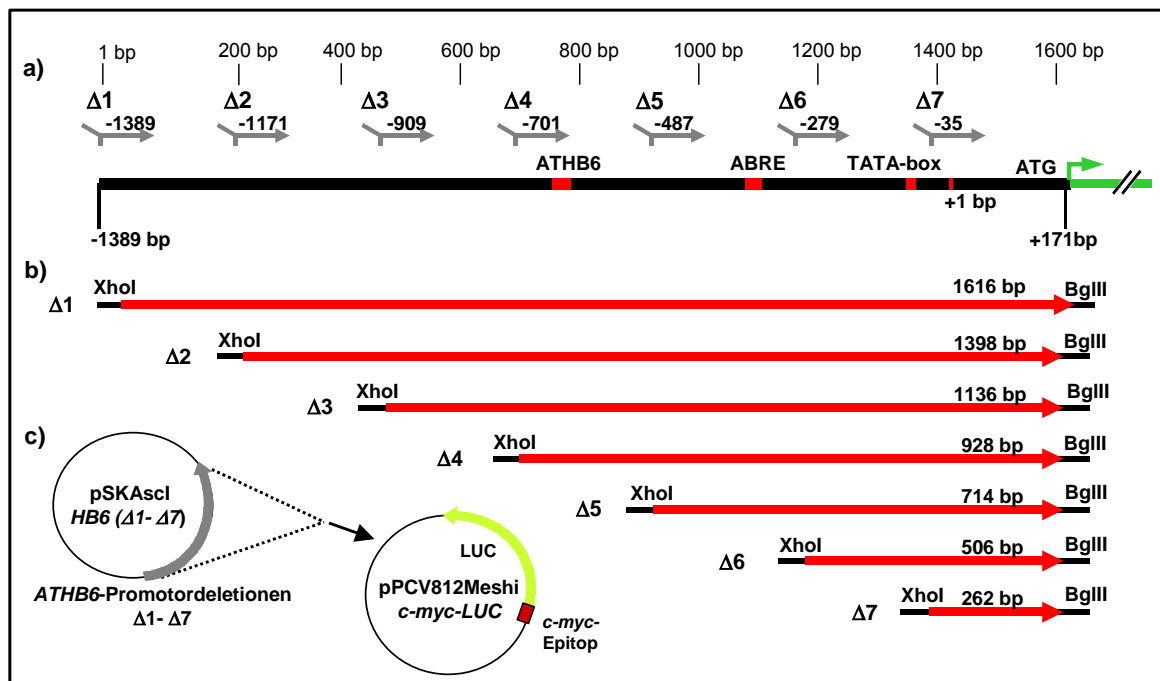


Abb. 3.42.: Schematische Darstellung der *ATHB6* 5'-Promotor-Deletionen und ihrer jeweiligen Länge relativ zur Ausgangspromotor-Sequenz. a) Die *ATHB6*-Bindestelle im Promotor des gleichnamigen Gens ist rot gekennzeichnet. Des Weiteren sind neben dem Transkriptionsstart (+1) mit ABRE und TATA-Box zwei potenzielle regulatorische Elemente rot hervorgehoben. Um die für die ABA-Regulation verantwortlichen Regionen des *HB6*-Promotors lokalisieren zu können, wurden über PCR mit Hilfe der angegebenen Primer (-1389, -1171...-35) sieben 5'-Promotor Deletionen ($\Delta 1$ - $\Delta 7$) konstruiert, deren jeweilige Länge in (b) dargestellt ist. Diese Fragmente wurden über *Xho*I-*Bgl*III-Überhänge erst in pSKAscl kloniert und dann zur Klonierung von *HB6*-Promotor-*c-myc-LUC*-Kassetten in den für *Arabidopsis* Transformation verwendbaren, binären Vektor pPCV812MESH1-*c-myc-LUC* übertragen (c).

Auf diese Weise wurden sieben *HB6*-Promotor-*c-myc-LUC*-Kassetten ($\Delta 1$ - $\Delta 7$) generiert, die zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen genutzt wurden. Dabei bezeichnet *ATHB6* $\Delta 1$ das von Thomas Hoffmann (2002) als Volllängen-Promotor verwendete, 1589 bp lange *ATHB6*-Fragment, welches am 3'-Ende die letzte Base der 5'-UTR vor dem Start-Codon einschließt (bezügl. *ATHB6*-Gensequenz s. Anhang 5.2.). Das kürzeste Promotor-Fragment, *ATHB6* $\Delta 7$, beginnt 35 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) und ist insgesamt 228 bp lang. Die zwischen dem längsten ($\Delta 1$) und dem kürzesten Promotor-Fragment ($\Delta 7$) liegenden 5'-Deletionen $\Delta 2$ - $\Delta 6$ verkürzen den Promotor jeweils um etwa 200 bp. Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Ökotyp RLD) erfolgte über die Methode des „floral dip“ (Clough and Bent, 1998). Für jedes *ATHB6*-Promotor-Konstrukt wurden je vier Töpfe mit je 15-20 Pflanzen zur Transformation verwendet. Parallel zu den *ATHB6*($\Delta 1$ - $\Delta 7$)::*c-myc-LUC*-Konstrukten wurden die Kontrollplasmide pPCV812Meshi35S::*c-myc-LUC* sowie pPCV812Meshi35S:*HA-GUS* (s. Groß 2003) in *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp RLD) eingebracht. Die von den transformierten Pflanzen geernteten, sterilisierten Samen wurden zur Selektion auf MS Agar-Platten mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin ausgebracht. Nach 2-3 Wochen wurden die Antibiotikum-resistenten Keimlinge (T_1 -Generation) in Töpfe mit Perlit-Erde-Mischung überführt und die Anwesenheit des jeweiligen *ATHB6*::*c-myc-LUC*-Konstrukts über PCR mit *LUC*- und *HB6*-Promotor-Primern bestätigt (Primer siehe Anhang 5.1.).

Konstrukt #	gescreente Samen	Anzahl an Transformanden	Transformationsrate [%]
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 1$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	18	0,06%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 2$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	15	0,05%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 3$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	10	0,03%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 4$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	13	0,04%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 5$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	19	0,06%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 6$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	16	0,05%
pPCV812 <i>HB6</i> $\Delta 7$:: <i>c-myc-LUC</i>	32500	13	0,04%
pPCV81235S:: <i>c-myc-LUC</i>	10000	4	0,04%
pPCV81235S: <i>HA-GUS</i>	10000	5	0,05%

Abb. 3.43.: Dokumentation des Hygromycin-Resistenz *screenings* von pPCV812Meshi*HB6*($\Delta 1$ - $\Delta 7$)::*c-myc-LUC*-Transformanden mit Ermittlung der jeweils erzielten Transformationsrate.

Die Anzahl der Pflanzen, welche in diesen Tests positiv getestet wurden, sind in Abbildung 3.43. dargestellt. Für alle transformierten Konstrukte wurde eine durchschnittliche Transformationsrate von 0,05% erreicht.

3.3.2. Untersuchung transgener pPCV812MeshiATHB6(Δ 1- Δ 7)::*c-myc-LUC*-Pflanzen

Im Anschluss an das PCR *screening* der Hygromycin-resistenten Pflanzen wurden die positiv getesteten Pflanzen hochgezogen und ihre T₂-Samen geerntet. Um die Luciferase-Aktivität in den transgenen Reporterlinien zu bestimmen, wurden aus den Samen der T₂-Generation Schüttelkulturen angezogen. Diese Keimlingskulturen wurden nach 10 d mit 0 μ M bzw. 30 μ M ABA behandelt. Nach 24-stündiger Hormonbehandlung wurde die in den Pflanzenextrakten der transgenen *ATHB6* (Δ 1- Δ 7)::*c-myc-LUC*-Linien vorhandene LUC-Aktivität bestimmt, wobei die Enzym-Aktivität auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen wurde.

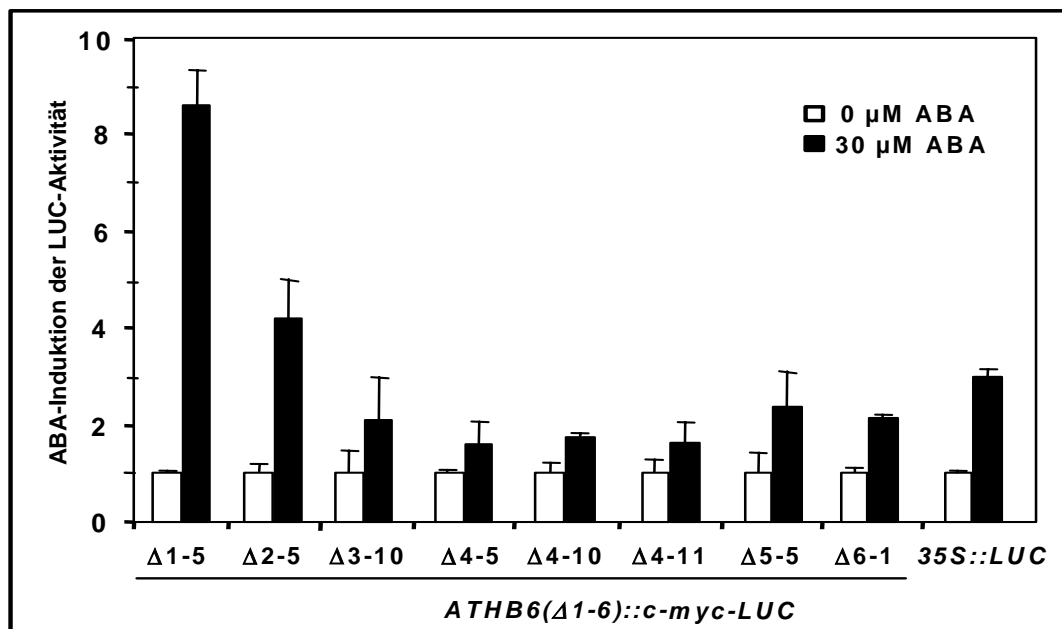


Abb. 3.44.: ABA-induzierter Anstieg der Reporter-Aktivität in transgenen pPCV812MeshiATHB6(Δ 1- Δ 6)::*c-myc-LUC*-Linien. Der ABA-Induktionsfaktor beschreibt das Verhältnis der für 0 μ M und 30 μ M ABA gemessenen LUC-Aktivitäten. Als ABA-unabhängige, konstitutive Kontrolle wurden zusätzlich transgene pPCV812Meshi35S::*c-myc-LUC*-Pflanzen untersucht.

Neben den als Vektor-Kontrollpflanzen verwendeten pPCV81235S::*c-myc-LUC*- und pPCV81235S::*HA-GUS*-Pflanzen wurden alle in Abb. 3.43. angegebenen Transformanten auf die ABA-Regulation ihres jeweiligen *ATHB6* Δ 1-7::*LUC*-Konstruktes getestet. Dabei konnten insgesamt jedoch nur wenige ABA-induzierbare Reporterlinien ermittelt werden: von den insgesamt 104 Hygromycin-resistenten Linien zeigten nur 8 unabhängige Transgene einen Anstieg der *ATHB6*-regulierten Reporter-Aktivität im Anschluss an die ABA-Behandlung. Diese Linien sind in Abb. 3.44. dargestellt.

Für das bereits in pBI121 getestete Vollängen-Promotor-Konstrukt Δ 1 (Hoffmann, 2002) wurde unter den 18 getesteten Linien nur eine ABA-induzierbare Pflanze gefunden, die jedoch mit der gemessenen 8-fachen ABA-Induktion eine nur schwache ABA-abhängige Aktivitätssteigerung im Vergleich zu den bereits beschriebenen *HB6*-Promotor::*LUC*-Linien zeigt (Himmelbach et al., 2002). Auch für die kürzeren Promotorfragmente wurden nur je 1 (*HB6* Δ 2::*c-myc-LUC*, *HB6* Δ 3::*c-myc-LUC*, *HB6* Δ 5::*c-myc-LUC* und *HB6* Δ 6::*c-myc-LUC*) bzw. 3 (*HB6* Δ 4::*c-myc-LUC*) ABA-aktivierbare Linien identifiziert, aber auch diese wiesen für die *LUC*-Aktivität nur geringe ABA-Induktionsfaktoren auf, die zwischen 4 (*ATHB6* Δ 2) und 1,6 (*ATHB6* Δ 4) lagen.

Als ABA-unabhängige, konstitutiv Luciferase exprimierende Kontrolle wurden zudem transgene 35S::*c-myc-LUC*-Pflanzen verwendet, welche mit dem gleichen binären Vektor, pPCV812Meshi, transformiert worden waren. Auch diese Pflanzen zeigten eine leichte, bis zu 3-fache Induktion der *LUC*-Aktivität im Anschluss an die ABA-Zugabe. Für das kürzeste Promotor-Fragment, *ATHB6* Δ 7, konnte ebenfalls keine ABA-Hochregulation festgestellt werden. Da diese Sequenz jedoch nur 35 bp des Promotors sowie die 5'-UTR enthält, wurde davon ausgegangen, dass die über diesen massiv deletierten Promotor regulierte Luciferase nur noch sehr schwach und unbeeinflusst von äußeren Faktoren exprimiert wird.

Während alle mit dem pPCV812Meshi-Vektor neu generierten *ATHB6*(Δ 1-7)::*c-myc-LUC*-Pflanzen keine oder nur eine schwache ABA-Induktion des *ATHB6*-Promotors zeigten, wurde bei parallel unter identischen Bedingungen angezogenen, von Thomas Hoffmann generierten, [RLD-*HB6*::*LUC* \times La-er]-

Reporterlinien (Himmelbach et al., 2002) mit *ATHB6Δ1:LUC-Expression* eine ca. 150-fache durch Abscisinsäure induzierte LUC-Aktivität festgestellt (s. Abb. 3.45.).

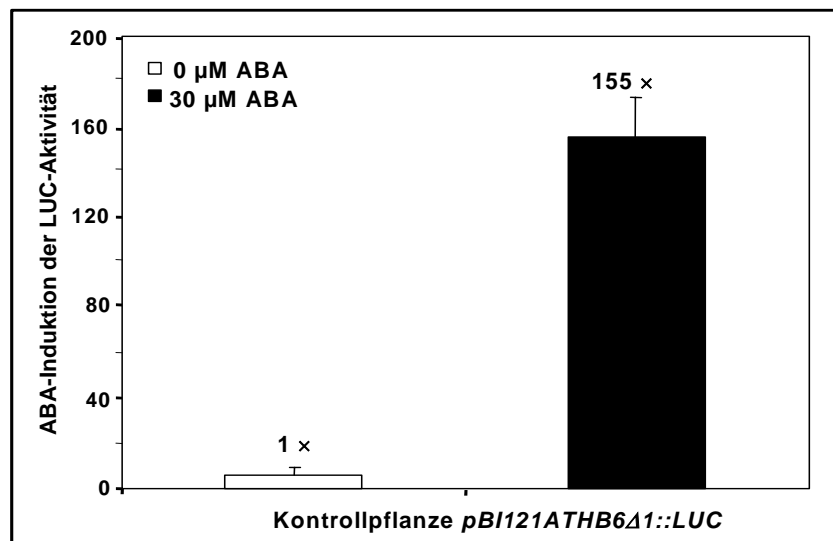


Abb. 3.45.: Abscisinsäure-abhängige Hochregulierung der *ATHB6*-regulierten LUC-Aktivität in von T. Hoffmann (2002) generierten transgenen *pBI121ATHB6Δ1::LUC*-Pflanzen im [RLD × La-er]-Hintergrund.

Somit konnte ein sich generell negativ auf die ABA-abhängige *ATHB6*-Promotorregulation auswirkender und eventuell auf die in den Schüttelkulturen herrschenden Bedingungen zurückzuführender Faktor ausgeschlossen werden.

Aufgrund der deregulierten *ATHB6*-Promotor-Aktivität in den generierten Reporterlinien wurden die klonierten 5'-Deletionen des Promotors - trotz Amplifikation der Promotor-Fragmente über *proof reading* PCR - durch Sequenzierung überprüft und mit der Sequenz des *ATHB6*-Promotors in den bereits vorhandenen, ABA-induzierbaren *pBI121ATHB6::LUC*-Linien verglichen. Der Vergleich zwischen der in *pBI121* und der in *pPCV812Meshi* klonierten *ATHB6*-Promotor-Sequenz ist im Anhang beschrieben (s. 5.2.). Hierbei konnte jedoch nur ein einzelner Basenaustausch festgestellt werden, welcher sich, relativ zum Transkriptionsstartpunkt an Position -981 bp und somit relativ nahe am 5'-Ende des benutzten Promotor-Fragmentes befand. Dieser Basenaustausch betraf weder die bereits bekannte *ATHB6*-Bindestelle (Position -632 bp) noch ein potenzielles, ABA-regulierbares Element.

Ein weiterer, weitaus größerer Unterschied zwischen den *ATHB6(Δ1-7)::c-myc-LUC*-Konstrukten in pPCV812Meshi und der *ATHB6::LUC*-Kassette in pBI121 bestand in dem der Luciferase in pPCV812Meshi vorgeschalteten c-myc-Epitop (s. Abb.3.46.).

a) pBI121HB6(Δ1)::LUC

CTTAACCATGGTTACTTTCTAACCCAACCTTTGAGTTT**TATTTAA**ACTGAGAGAAAGTGTGAAACCAAGCTTGTTCATATGGAA
+1 Transkriptionsstart und 5'-UTR HB6-Promotor
 AACGCTCATCAAC**C**TCAACAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTATATAGAAGAATCTCCATTGTCTTTAATTTCTCTCCATTT
 CTCTTTCTCTCTCTCTCAAGTTTTCTCTTTTCTTGATGGGTTAAGAGAGTAAAGATCATCAAGTACTATGCATTAATTTG
BamHI
 AGAAGTTATTAATAATTTTCGAAAGTAATTAAGATTGTTG**GGATCC**GAGCTTGAATTCCCTTTGTGTACATTCTGAATGTC
Start LUC
 GCTCGCAGTGACATTAGCATTCGGTACTGTTGGTAAA**ATG**GAAGACGCCAAAAA

b) pCV812Meshi35S::c-myc-LUC

←35S-Promotor **Start c-myc-Epitop** **BglII** **c-myc-Epitope (N-term)** **intron PIV2**
 GAGGACAGCCCAAGCTTccacc**atg**gcgcccgggtctagag**agatct**gagcaaaagtgtattgtaagtttctgcttctacctttg
 atatatataataaattatcattaattagtagtaataataatattttaaatatttttttcaaaataaaagaatgtagtatatagc
 aattgcttttctgtagtttataagtgtgtatatttcaatttataacttttctaataatgatgacccaaaatttgttgatgtgca
c-myc-Epitop (C-term) **Start LUC**
 G**ctctgaggaggatctt**gtcgacggatcgatccAA**ATG**GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCT

c) pPCV812MeshiHB6(Δ1)::c-myc-LUC

←HB6-Promotor **TATA-Box**
 ACTTTCTAACCCAACCTTTGAGTTT**TATTTAA**ACTGAGAGAAAGTGTGAAACCAAGCTTGTTCATATGGAAAACGCTCATCAAC
+1 Transkriptionsstart und 5'-UTR HB6-Promotor
CTCAACAATCTCTCTCTCTCTCTCTGTATATAGAAGAATCTCCATTGTCTTTAATTTCTCTCCATTTCTCTTTCTCTCT
 CCTTCAAAGTTTTCTCTTTTCTTGATGGGTTAAGAGAGTAAAGATCATCAAGTACTATGCATTAATTTGAGAAGTTATTA
BglII **c-myc-Epitop (N-term)** **intron PIV2**
 AATTTCCGAAAGTAATTAAGATTGTTG**agatct**gagcaaaagtgtattgtaagtttctgcttctacctttgatatatata
 ataattatcattaattagtagtaataataatattttaaatatttttttcaaaataaaagaatgtagtatatagcaattgctt
c-myc Epitop (C-term)
 ttctgtagtttataagtgtgtatatttcaatttataacttttctaataatgatgacccaaaatttgttgatgtgca**ctctgaggag**
Start LUC
 gatctt**gtcgacggatcgatccAA****ATG**GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCCA

Abb. 3.46.: Vergleich der *ATHB6Δ1::LUC*-Kassette in den Vektoren pBI121 und pPCV812Meshi. Die in pBI121*ATHB6Δ1::LUC* vorhandene Promotor-Reporter-Sequenz (a) ist durch Unterstreichen gekennzeichnet, die 5'-UTR ist rot hervorgehoben. In (b) und (c) ist der Übergang zwischen *HB6*-Promotor und *c-myc*-Epitop nach Ersetzen des 35S-Promotors in pPCV812Meshi35S::*c-myc-LUC* durch die *HB6*-5'-Promotordeletionen gezeigt. Der 35S-Promotor (b) und der *HB6*-Promotor (c) sind durch Unterstreichen gekennzeichnet, wobei die 5'-UTR des *HB6*-Promotors zusätzlich rot markiert ist. Das *c-myc*-Epitop und das PIV2-Intron aus Kartoffel sind grün hinterlegt bzw. in grüner Schrift markiert. Die Sequenz des *LUC*-Gens ist orange gekennzeichnet (a, b und c).

Während in pBI121 ein mit 325 bp vergleichsweise kurzer Übergang zwischen der TATA-Box des *ATHB6*-Promotors und dem Start-Codon des *LUC*-Reportergens besteht (s. Abb. 3.46.a), ist beim Vektor pPCV812Meshi zusätzlich zwischen Promotor-5'-UTR und Luciferase eine für das *c-myc*-Epitop codierende, 30 bp lange Sequenz zwischengeschaltet (s. Abb. 3.46.b und c).

Um eine Expression der *c-myc*-Sequenz durch prokaryotische Organismen zu unterbinden, wurde diese außerdem durch ein 189 bp langes Intron unterbrochen. Somit liegen im Vektor pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* zwischen dem 3'-Ende des jeweilig einklonierten Promotors und dem Start-Codon der Luciferase nicht nur die 30 bp des *c-myc*-Epitops, sondern, einschließlich der 189 bp langen Intron-Sequenz, insgesamt bereits 219 bp (s. Abb. 3.46.b). Aus diesem Grund fiel für die über eine BglII-Schnittstelle in diesen Vektor eingefügten *ATHB6*-Promotor-Deletionen der Abstand zwischen der TATA-Box des *ATHB6*-Promotors und dem *LUC*-Start-Codon mit 490 bp viel größer aus als der in den *c-myc*-freien Vektor pBI121 klonierte, nur 325 bp lange Abschnitt (Abb. 3.46.c).

Durch das Einklonieren der *HB6*-Promotor-Deletionen in den Vektor pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* über die BglII-Schnittstelle wurde außerdem das Start-Codon des *c-myc*-Epitops entfernt, so dass dieses nicht exprimiert werden konnte (s. Abb. 3.46.c).

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass in den neu klonierten, hinsichtlich der ABA-Regulation gestörten, pPCV812Meshi Δ 1-7::*c-myc-LUC*-Konstrukten die 5'-UTR mit 490 bp um 165 bp länger war als die 325 bp lange 5'-UTR in dem bereits vorhandenen, ABA-induzierbaren, pBI121 Δ 1-7::*LUC*-Konstrukt, sollten alle *ATHB6*-Promotor-Deletionen in den von Thomas Hoffmann verwendeten pBI121-*LUC*-Vektor kloniert werden. Auf diese Weise sollten die gleichen Ausgangsbedingungen geschaffen werden wie im bereits vorliegenden, funktionsfähigen, pBI121 Δ 1-7::*LUC*-Konstrukt.

Die Klonierung der *HB6*(Δ 1-7)-Promotor-5'-Deletionen in pBI121 sowie die Generierung neuer transgener *ATHB6*(Δ 1-7)::*LUC*-Pflanzen ist im Folgenden beschrieben.

3.3.3. Klonierung neu konstruierter *ATHB6*-Promotor($\Delta 1-7$)-*LUC*-Fragmente in den binären Vektor pBI121*LUC* und Generierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Da die mit Hilfe des binären Vektors pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* generierten *ATHB6*($\Delta 1-7$)-Reporter-Linien nicht die erwartete ABA-abhängige Reporter-Induktion zeigten, sollten die sieben *HB6*-Promotorfragmente in den Vektor pBI121 kloniert werden, welcher sich in Pflanzen bereits in Form des pBI121*HB6* $\Delta 1$::*LUC*-Plasmids als funktionsfähig erwiesen hatte (Hoffmann, 2002). Somit wurden erneut über *proof reading* PCR die oben beschriebenen 5'-deletierten *ATHB6*-Promotor-Fragmente *ATHB6*($\Delta 1-\Delta 7$) angefertigt. Als Matrize diente hierbei der von Thomas Hoffmann angefertigte Vektor pSKA*scI*p*HB6* $\Delta 1$. Während die *ATHB6*-spezifische *annealing* Sequenzen der Primer gegenüber den pPCV812Meshi-Fragmenten unverändert blieben (s. Anhang 5.1. und 5.2.), wurden die Restriktionsschnittstellen in den Überhängen der Primer modifiziert: die *forward* Primer wurden mit *Sac*II-, der *reverse* Primer mit *Bam*HI-Überhang versehen (siehe 5.1.).

Als Zielvektor der zwischen 1589 und 228 bp langen Promotor-Deletionen wurde das von Thomas Hoffmann (2002) generierte Plasmid pBI121*AscI**HB6*::*LUC* verwendet, aus dem zuvor über *Sac*II und *Bam*HI der vor das Luciferase-Gen geschaltete, 1,6 kb lange *HB6*-Vollängen-Promotor herausgeschnitten worden war. Die auf diese Weise neu klonierten Promotor-5'-Deletionen mit ihren jeweiligen Längen und den veränderten Restriktionsschnittstellen sind zusammen mit dem pBI121*LUC*-Zielvektor in Abbildung 3.47. (a bzw. b und c) dargestellt. Alle sieben pBI121*HB6*($\Delta 1-7$)::*LUC*-Kassetten wurden nach der exemplarischen Sequenzierung der Konstrukte pBI121*HB6*($\Delta 1$)::*LUC* und pBI121*HB6*($\Delta 2$)::*LUC*, wie in 3.3.1. beschrieben, über Agrobakterien in *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp RLD) eingebracht.

Als ABA-induzierbare Positivkontrolle wurde, parallel zu den p*ATHB6*($\Delta 1-\Delta 7$)::*LUC*-Konstrukten, das ursprüngliche pBI121*HB6* $\Delta 1$::*LUC*-Plasmid von Thomas Hoffmann stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp RLD) eingebracht. Die von den transformierten Pflanzen geernteten und sterilisierten Samen wurden zur Selektion auf MS Agar-Platten mit 50 μ M Kanamycin ausgebracht.

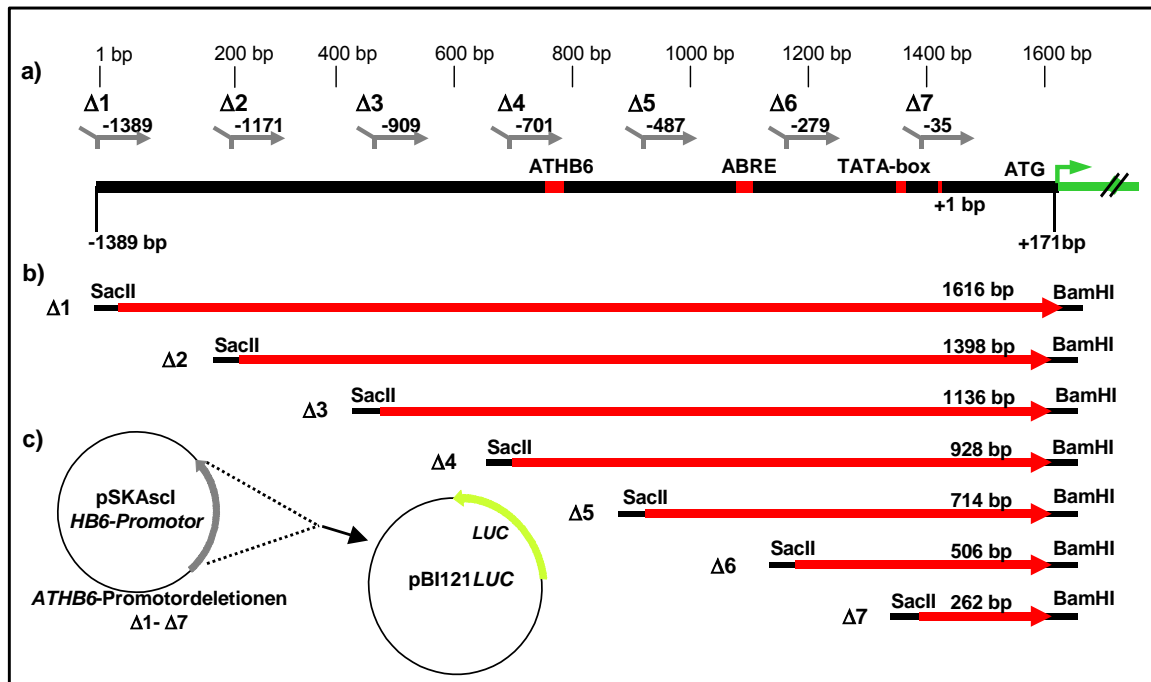


Abb. 3.47.: Schematische Darstellung der neu generierten und in *pBI121LUC* klonierten *ATHB6* 5'-Promotor-Deletionen und ihrer jeweiligen Länge relativ zur Ausgangspromotor-Sequenz. a) *ATHB6*-Bindestelle sowie Transkriptionsstart (+1), putatives *ABRE* und *TATA*-Box sind im *ATHB6*-Promotor rot gekennzeichnet. Um die ABA-regulierbaren Regionen des *HB6*-Promotors zu ermitteln, wurden über PCR mit Hilfe der angegebenen Primer (-1389, -1171...-35) sieben 5'-Promoter Deletionen ($\Delta 1$ - $\Delta 7$) konstruiert, deren jeweilige Länge in b) dargestellt ist. Diese Fragmente wurden über *Sac*II-*Bam*HI-Überhänge aus *pSKAsclHB6* $\Delta 1$ amplifiziert und anschließend zur Klonierung von *HB6*($\Delta 1$ - $\Delta 7$)::*LUC*-Kassetten in den für *Arabidopsis* Transformation verwendbaren, binären Vektor *pBI121LUC* übertragen (c), aus dem zuvor der *HB6*-Volllängenpromotor ($\Delta 1$) über *Bam*HI-*Sac*II-Verdau entfernt wurde.

Nach 2-3 Wochen wurden die Antibiotikum-resistenten Keimlinge (T_1 -Generation) in Töpfe mit Perlit-Erde-Mischung überführt und die Anwesenheit des jeweiligen *HB6*($\Delta 1$ - $\Delta 7$)::*LUC*-Konstrukts über PCR mit *LUC*- und *HB6*-Promotor-Primern bestätigt (Primer siehe Anhang 5.1.). Die Anzahl der *LUC*-Pflanzen, welche in diesen Tests positiv getestet wurden, sind in Abbildung 3.48. dargestellt. Im Gegensatz zu den die *pPCV812Meshi*-Konstrukte betreffenden Transformationsansätzen konnten für die *pBI121HB6:LUC*-Konstrukte $\Delta 4$, $\Delta 5$ und $\Delta 7$ trotz der vergleichsweise hohen Anzahl gescreenter Samen keine Kanamycin-resistenten Pflanzen und demnach keine stabilen Transformanten isoliert werden. Für die restlichen Konstrukte (*pBI121HB6:LUC* $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und $\Delta 6$) fiel zudem die Transformationsrate mit <0,01%-0,03% wesentlich niedriger aus als bei der vorangegangenen Transformation mit *pPCV812Meshi*-Konstrukten (s. Abb. 3.48.).

Konstrukt #	gescreente Samen	Anzahl an Transformanden	Transformationsrate [%]
pBI121HB6 Δ 1::LUC*	65000	18	0,03%
pBI121HB6 Δ 2::LUC	65000	14	0,02%
pBI121HB6 Δ 3::LUC	65000	4	<0,01%
pBI121HB6 Δ 4::LUC	98000	0	0%
pBI121HB6 Δ 5::LUC	98000	0	0%
pBI121HB6 Δ 6::LUC	65000	2	<0,01%
pBI121HB6 Δ 7::LUC	98000	0	0%

Abb. 3.48.: Dokumentation des Kanamycin-Resistenz *screenings* von pBI121HB6(Δ 1- Δ 7)::LUC-Transformanden mit Ermittlung der jeweils erzielten Transformationsrate. Das mit * gekennzeichnete Konstrukt ist identisch zu dem von Thomas Hoffmann (2002) bei der Generierung transgener pBI121HB6::LUC-Reporterlinien verwendeten Plasmid.

Durch die Analyse der ABA-Regulation in den generierten, stabil transformierten *ATHB6::LUC*-Pflanzen sollten anschließend Informationen über die an der ABA-induzierten Aktivierung des *ATHB6*-Promotors beteiligten Elemente erhalten werden.

3.3.4. Untersuchung transgener pBI121ATHB6(Δ 1- Δ 7)::LUC-Pflanzen

Nach dem *screening* der Kanamycin-resistenten Pflanzen über PCR wurden die positiv getesteten Pflanzen hochgezogen und ihre T₂-Samen geerntet. Aus diesen Samen wurden, wie unter 3.3.2. bereits für die pPCV812Meshi-Pflanzen beschrieben, zur Untersuchung der ABA-regulierten Reporter-Aktivität Schüttelkulturen angezogen, welche nach 10 d mit 0 μ M bzw. 30 μ M ABA behandelt wurden. Nach 24 h Hormonbehandlung wurde die in den Pflanzenextrakten der transgenen pBI121ATHB6::LUC-Linien vorhandene LUC-Aktivität bestimmt, wobei die Enzym-Aktivität auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen wurde.

Im Vergleich zu den über das *screening* der pPCV812MeshiHB6(Δ 1- Δ 7)::LUC-Pflanzen identifizierten 104 Transgenen wurden für die pBI121HB6(Δ 1- Δ 7)::LUC-Konstrukte – trotz der höheren Anzahl geprüfter Samen - insgesamt nur 38 unabhängige transgene Linien identifiziert.

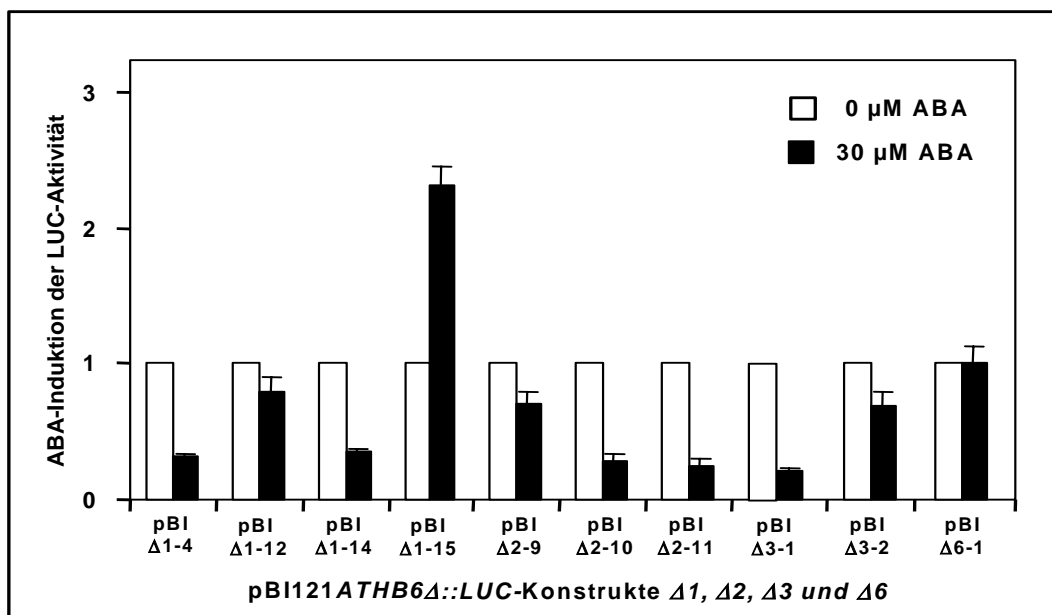


Abb. 3.49.: Messung der ABA-abhängigen Reporter-Aktivität in transgenen $pBI121ATHB6\Delta::LUC$ -Linien ($HB6$ -Promotor-Deletionen $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 6$) nach Behandlung mit 0 μM bzw. 30 μM ABA. Der ABA-Induktionsfaktor beschreibt das Verhältnis der für 0 μM und 30 μM ABA gemessenen LUC-Aktivitäten. Die parallel als ABA-induzierbare Kontrollpflanzen verwendeten $pBI121ATHB6\Delta 1::LUC$ -Linien sind in Abb. 3.50. dargestellt.

Davon entfielen 18 Transformanten auf das von Thomas Hoffmann verwendete Konstrukt $pBI121HB6\Delta 1::LUC$. Alle in Abb. 3.48. angegebenen Reporterlinien wurden bezüglich der ABA-Regulation ihres jeweiligen $ATHB6$ -regulierten LUC -Gens getestet, wobei in Abb. 3.49. und 3.50. nur die Reporter-Aktivität einiger Linien exemplarisch dargestellt ist.

Nur 2 der 38 untersuchten Linien zeigten eine Induktion der LUC-Aktivität infolge der ABA-Behandlung: so wurde für die $ATHB6\Delta 2::LUC$ -Linie #2 eine bis zu 214-fache ABA-abhängige Induktion ihres Reporters gemessen, während die $HB6\Delta 1::LUC$ -Linie #15 eine relativ schwache, 2-fache Induktion der Luciferase-Aktivität zeigte (s. Abb. 3.50. bzw. 3.49.). Bei den restlichen getesteten Linien war – trotz oftmals hoher LUC-Aktivität – keine Induktion des $HB6$ -regulierten Reporters festzustellen.

Zur besseren Dokumentierung der schwach bzw. nicht ABA-induzierbaren Linien in Abb. 3.49. wurde die stark Abscisinsäure-regulierte Linie $ATHB6\Delta 2::LUC$ #2 in Abb. 3.50. zusammen mit den als ABA-induzierbaren Kontrollen verwendeten Kreuzungen [RLD- $HB6::LUC \times La$ -er] #23 und #25 dargestellt.

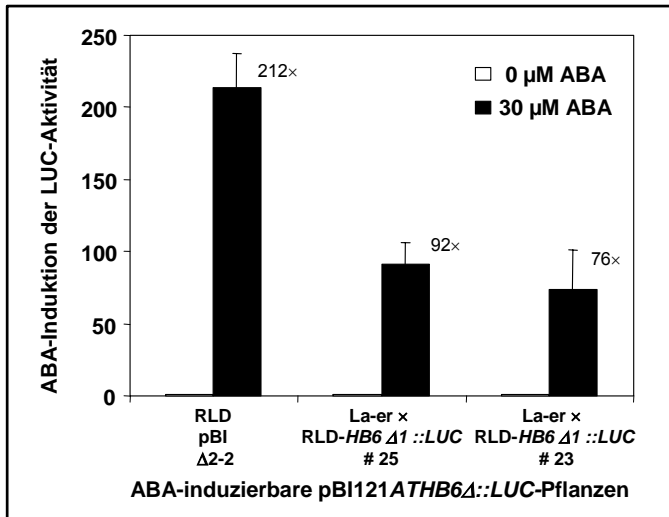


Abb. 3.50.: Abscisinsäure-abhängige Hochregulierung bei stark induzierbaren pBI121ATHB6Δ::LUC-Linien. Die ABA-abhängige Regulation der mit 214-facher Induktion am stärksten aktivierbaren pBI121ATHB6Δ2::LUC-Linie #2 ist im Vergleich zur Reporter-Aktivität in den als Positivkontrollen verwendeten [RLD-ATHB6Δ1::LUC × La-er] Kreuzungen gezeigt (Himmelbach et al., 2002).

Da neben der *ATHB6Δ2::LUC* #2-Linie die unter denselben Bedingungen angezogenen Positivkontrollen [*RLD-HB6::LUC* × *La-er*] eine bis zu 100-fache ABA-Induktion des *LUC*-Reporters zeigten, konnten auch hier – wie bei der Analyse der pPCV812Meshi-Pflanzen - in den Schüttelkulturen herrschende, sich hemmend auf die ABA-Regulation der Keimlinge auswirkende Bedingungen als Grund für die ABA-deregulierten pBI121HB6::LUC-Pflanzen ausgeschlossen werden.

Auch eine Sequenzierung der bis dahin noch nicht überprüften, stabil in die RLD-Pflanzen integrierten pBI121-Konstrukte *ATHB6(Δ1-Δ3)::LUC* ergab keine Unterschiede zu den bereits vorhandenen, als ABA-induzierbar getesteten pBI121ATHB6Δ1::LUC-Linien von Thomas Hoffmann (2002).

Um eventuell vorliegende, bis dahin unerkannte, Ökotyp-spezifische Probleme aufzudecken, wurde das pBI121HB6Δ1::LUC-Konstrukt im genetischen Hintergrund von Columbia- und RLD-Pflanzen auf seine jeweilige ABA-Induktion geprüft. Hierfür wurden homozygote pBI121HB6Δ1::LUC-Keimlinge vom Ökotyp Columbia verwendet, welche von Thomas Hoffmann parallel zu den für die [*RLD-HB6::LUC* × *La-er*]-Kreuzungen eingesetzten pBI121HB6Δ1::LUC-Pflanzen in RLD-Hintergrund generiert worden waren. Parallel zu den Columbia-Reporterlinien wurden bis dahin noch nicht verwendete, homozygote pBI121HB6Δ1::LUC-Keimlinge von Thomas Hoffmann verwendet. Die Keimlinge beider Linien wurden 10 d auf MS-Agarplatten angezogen und dann jeweils eine Platte mit 30 μM ABA bzw. mit 10 mM MES (pH 7,0) besprüht. Nach 24 h

Inkubation wurde die in den Proteinextrakten der Keimlinge vorhandene Luciferase-Aktivität luminometrisch gemessen.

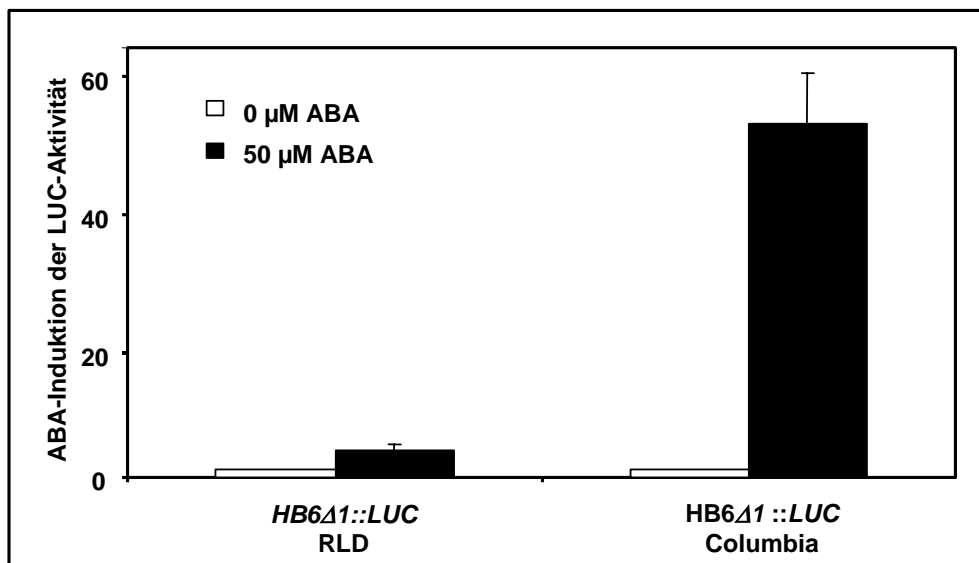


Abb. 3.51.: Quantitativer Vergleich zwischen der ABA-abhängigen Induktion von pBI121*ATHB6Δ1::LUC* in RLD- und Columbia-Pflanzen. Es wurde die ABA-induzierte Hochregulierung der *ATHB6*-regulierten Luciferase-Aktivität in RLD- und Columbia-Keimlingen dargestellt. Zur internen Standardisierung diente die jeweils über Bradford ermittelte Proteinmenge.

Die in beiden Ökotypen für *HB6Δ1::LUC* erhaltene, ABA-abhängige Induktion der Reporter-Aktivität ist in Abbildung 3.51. dargestellt. In Columbia-Pflanzen konnte die Aktivität der Luciferase durch die Behandlung mit ABA bis zu 50-fach hochreguliert werden, während die ABA-Induktion in der getesteten RLD-Reporterlinie nur den Faktor 4 erreichte.

Um aufzuklären, warum die oben beschriebenen [*RLD-HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen, im Gegensatz zu den in Abb. 3.51. gezeigten, homozygoten RLD-Reporterlinien eine starke, über 100-fache ABA-Induktion zeigten, wurde, um ökotypische Verwechslungen auszuschließen, der ökotypische Hintergrund der [*RLD-HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen überprüft. Hierfür wurde DNA aus drei verschiedenen Kreuzungen isoliert und über PCR mit CAPS-Marker-spezifischen Primern (s. Anhang 5.1.) und anschließendem XhoI-Restriktionsverdau getestet. Der verwendete CAPS-Marker RPS4-NT (*At5g45250*) ermöglicht die Unterscheidung zwischen RLD- und Columbia-Hintergrund, indem das in RLD-Pflanzen erhaltene, 420 bp lange PCR-Fragment durch XhoI in zwei 210 bp lange

Fragmente unterteilt wird, während das entsprechende, aus Columbia-DNA hervorgehende PCR-Produkt ungeschnitten bleibt (s. 5.1.). Eine Unterscheidung zwischen La-er- und RLD-DNA ist gleichzeitig allerdings nicht möglich, da der hier verwendete CAPS-Marker nicht zwischen Columbia und LA-er-DNA unterscheidet.

Wie die CAPS-Marker-spezifische PCR in Abb. 3.52. zeigt, zeigten die RLD- bzw. Columbia- Wildtyp-Kontrollen das erwartete Muster: das PCR-Produkt aus RLD konnte durch XhoI geschnitten werden, während das aus Columbia stammende Amplifikat unverdaut blieb. Da alle von Thomas Hoffmann verwendeten [*HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen unverdaut blieben handelt es sich bei diesen Reporterlinien nicht - wie ursprünglich angenommen - um [RLD-*HB6::LUC* × La-er]-, sondern um [Columbia-*HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen. Auch die Rückkreuzungen in *abi1*-Hintergrund erfolgten mit Columbia-*HB6::LUC*-Reporterlinien.

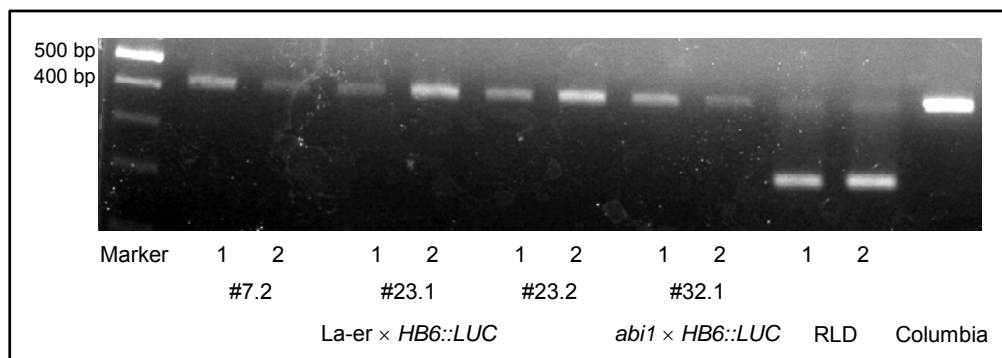


Abb. 3.52.: Überprüfung der ökotypischen Hintergründe verwendeter [*HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen über CAPS-Marker-spezifische PCR und anschließenden Restriktionsverdau. Es wurden drei verschiedene [RLD-*HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen (#7.2, #23.1, #23.2) und zusätzlich eine [RLD-*HB6::LUC* × *abi1*]-Kreuzung getestet. Als Wildtyp-Kontrollen wurden Matrizen von RLD und Columbia eingesetzt. Alle PCR-Amplifikationen (bis auf Columbia) wurden doppelt angesetzt (1, 2). Als Marker wurde die 100 bp-Ladder von MBI verwendet.

Die Tatsache, dass - mit Ausnahme der in Abb. 3.51. beschriebenen, nur schwach induzierbaren RLD-*HB6::LUC*-Reporterlinie - alle als ABA-induzierbare Positivkontrollen verwendeten [*HB6::LUC* × La-er]-Kreuzungen einen Columbia-Hintergrund aufwiesen, unterstreicht die Beobachtung, dass eine hohe ABA-Induzierbarkeit des *ATHB6::LUC*-Konstruktes vom *Arabidopsis*-Ökotyp abhängig ist. Dies erklärt somit auch die zwischen den vermeintlichen [RLD-*HB6::LUC* × La-

er]-Kreuzungen (s. Abb. 3.45. und 3.50.) und der homozygoten RLD-*HB6::LUC*-Reporterlinie (vgl. Abb. 3.51.) festgestellten Unterschiede bezüglich der ABA-abhängigen Induktion.

3.4. Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors ATHB6 über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation

Die Durchführung und Regulation der zahlreichen ABA-abhängigen Prozesse, welche während der pflanzlichen Entwicklung oder bei der Adaptation an äußere Einflüsse innerhalb der Zelle ablaufen, beruhen zu einem wesentlichen Teil auf den spezifischen Wechselwirkungen, die zwischen den einzelnen Komponenten des komplexen Signaltransduktionsnetzwerks stattfinden.

So konnten für die PP2C Phosphatasen ABI1 und ABI2, die eine zentrale Rolle bei der ABA-Signalübertragung einnehmen, über *yeast two-hybrid screening* bereits unterschiedliche Interaktionspartner identifiziert werden. Zu ihnen zählen neben dem bereits erwähnten HD-Zip-Transkriptionsfaktor ATHB6 (*At2g22430*), ein in den Plastiden an der Photoprotektion beteiligtes Fibrillin-Protein (*At4g04020*) (Yang et al., 2006) sowie eine im Cytosol lokalisierte Glutamyl-tRNA-Synthetase (*At5g26720*, Tang, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse), welche zudem noch mit ATHB6 in Wechselwirkung tritt.

Mit Ausnahme der ABI1-AtGluRS-Interaktion, deren Nachweis über Co-Immunopräzipitation der aus Pflanzenextrakten isolierten Proteine erfolgte, konnten all diese Wechselwirkungen *in vivo* bisher nur im heterologen Hefe-System und durch *in vitro* Bindungsassays nachgewiesen werden (Himmelbach et al., 2002; Yang et al., 2006).

Zur Bestätigung der hier erwähnten Interaktionen im homologen pflanzlichen System, sowie zur Identifizierung weiterer, bis dahin unbekannter Kontakte zwischen Proteinen der ABA-Signaltransduktion sollte daher die Methode der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation in Kombination mit dem transienten Protoplasten-Expressionssystem genutzt werden (Hu and Kerppola, 2003; Walter et al., 2004).

3.4.1. Klonierung potenzieller Interaktionspartner in pflanzenkompatible YFP-Fusionsvektoren

Das Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation beruht auf der Bildung eines fluoreszierenden Komplexes, der sich aus zwei Fragmenten des aufgespaltenen *yellow fluorescent protein* (YFP) zusammensetzt. Da die beiden YFP-Fragmente mit den codierenden Sequenzen potenzieller Interaktionspartner fusioniert werden, kommt es nur dann zur Emission des fluoreszierenden Signals, wenn die beiden, an die YFP-Fragmente gekoppelten Proteine tatsächlich miteinander in Wechselwirkung treten. Dieses System wurde ursprünglich für Säugetier-Zellen etabliert (Hu and Kerppola, 2003), doch mit Hilfe von entsprechenden, Pflanzen-kompatiblen YFP-Fusionsvektoren kann diese Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Pflanzenzellen verwendet werden (Walter et al., 2004). Alle für dieses System verwendeten YFP-Fusionsvektoren wurden von Herrn Professor Dr. Jörg Kudla (Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

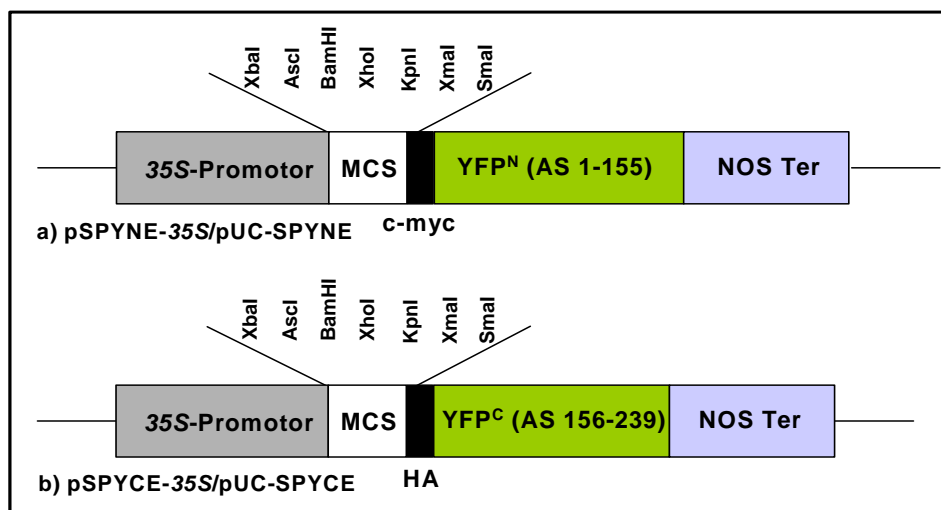


Abb. 3.53.: Schematische Darstellung der YFP-Fusionskassetten in den für die Transformation von Protoplasten eingesetzten Vektoren pSPYNE-35S/pUC-SPYNE (a) und pSPYCE-35S/pUC-SPYCE (b). Der in (a) dargestellte Vektor trägt die 465 bp lange, für den N-Terminus des YFP-Proteins codierende Sequenz, das in (b) gezeigte Plasmid die 249 bp lange, C-terminale YFP-Sequenz. In der *multiple cloning site* (MCS) sind 7 der insgesamt 14 Restriktionsschnittstellen angezeigt (siehe auch (Walter et al., 2004)) Die Konstrukte verfügen über ein c-myc- bzw. HA-Epitop, welches Antikörper-spezifische Immunodetektion ermöglicht.

Da die Untersuchung von Interaktionen zwischen den Proteinen ATHB6, ABI1, *abi1* und GluRS zunächst im transienten *Arabidopsis*-Protoplastensystem stattfinden sollte, wurden als YFP-Fusionsplasmide die in Abbildung 3.53. dargestellten pUC-Derivate pSPYNE-35S/pUC-SPYNE (a) und pSPYCE-35S/pUC-SPYCE (b) gewählt (Walter et al., 2004). Der pSPYNE-Vektor enthält die für die ersten 155 Aminosäuren codierende YFP cDNA-Sequenz, der pSPYCE-Vektor das entsprechende cDNA-Fragment für die 83 letzten Aminosäuren von YFP. Neben potenziellen Wechselwirkungen zwischen den oben genannten Proteinen sollte ausserdem die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren der Klasse I untersucht werden. Aus diesem Grund wurden auch die cDNA-Sequenzen von *ATHB5* und *ATHB7*, die als *in vitro* (Johannesson et al., 2001) bzw. *in vivo* Heterodimerisierungspartner (Tang, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse) von *ATHB6* gelten und *in vitro* auch untereinander Heterodimere bilden (Johannesson et al., 2001), mit den YFP-Fragmenten fusioniert.

Die Klonierung der codierenden Sequenzen von *AtGluRS*, *ATHB5*, *ATHB6*, *ATHB7*, *ABI1* und *abi1* in die Vektoren pSPYNE-35S/pUC-SPYNE (pSPYNE) und pSPYCE-35S/pUC-SPYCE (pSPYCE) erfolgte durch Amplifikation der entsprechenden Fragmente mittels *proof reading* PCR. Die *forward* Primer wurden so gewählt, dass sie das Start-Codon (ATG) des jeweiligen Leserasters enthielten, die Sequenzen der *reverse* Primer wurden so gewählt, dass das STOP-Codon aufgehoben wurde. Als Restriktionsschnittstellen-Überhänge wurden bei allen eingesetzten *forward* Primern, einschliesslich des *GluRS*-Primers BamHI gewählt, während sich die Überhänge der *reverse* Primer je nach Gen unterschieden. Für die Amplifikation der codierenden Sequenzen von *ABI1* und *abi1*, sowie *HB5* und *HB6* wurden *reverse* Primer mit XhoI-Überhang verwendet, für den *reverse* Primer von *HB7* wurde ein XmaI (SmaI)-Überhang gewählt (Primer s. Anhang 5.1.). Der *reverse GluRS*-Primer wurde beide mit einem SmaI-Überhang versehen.

Die verdauten PCR-Produkte wurden anschließend in die entsprechend verdauten, untereinander identischen, *multiple cloning sites* der Vektoren pSPYNE und pSPYCE einligiert. Die erhaltenen Klone konnten nach Überprüfung durch Restriktionsverdaus für die transiente Transformation von *Arabidopsis*-Protoplasten verwendet werden.

3.4.2. Visualisierung von *in vivo* Interaktionen im transienten Protoplasten-System

Das Prinzip der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC; *bimolecular fluorescence complementation*) in Protoplasten wurde zuerst an den pSPYNE- und pSPYCE-Konstrukten von ATHB6 und ATHB7 getestet. Hierfür wurden die Protoplasten mit je 10 µg des pSPYCE-35S::*ATHB6*- bzw. des pSPYCE-35S::*ATHB7*-Plasmids und je 10 µg des pSPYNE-35S::*ATHB6* bzw. des pSPYNE-35S::*ATHB7*-Plasmids transfiziert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurde pro Ansatz zusätzlich 5 µg pSK35S.Ω::*GUS* eingesetzt. Nach 14-20 h Inkubation im Dunkeln (50 rpm, 23-26 °C) wurden die Protoplasten mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops bzw. eines konfokalen Mikroskops untersucht. Zur Kontrolle der Kernlokalisierung wurden die Zellen optional vor dem Mikroskopieren 5 min mit DAPI bzw. mit dem Bisbenzimid H33342 behandelt.

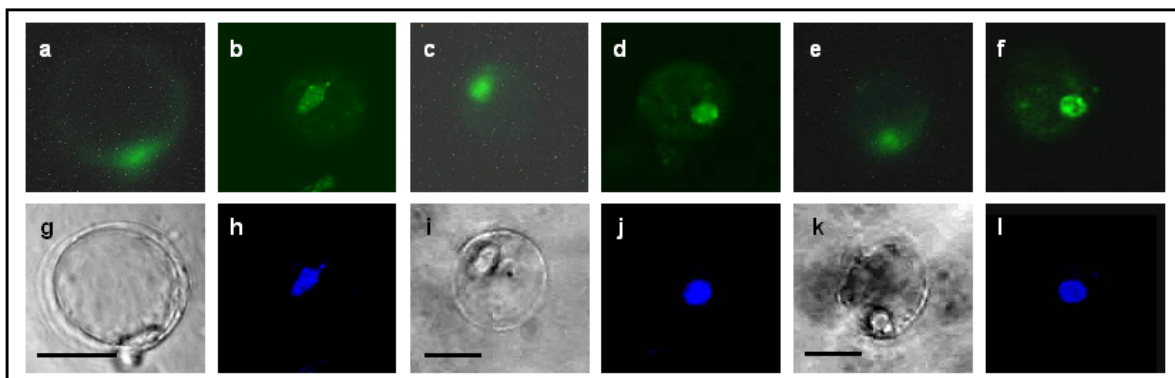


Abb. 3.54.: Visualisierung der bei verschiedenen ATHB6- und ATHB7-Kombinationen in *Arabidopsis*-Protoplasten auftretenden bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation in Form von emittierter YFP-Fluoreszenz. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fluoreszenz in nur mit *ATHB6*-YFP-Fusionen (a, b, h), nur mit *ATHB7*-YFP-Fusionen (c, d, j) oder mit einer Mischung aus *ATHB7*- und *ATHB6*-YFP-Fusionen (e, f, l) transfizierten Protoplasten erfolgte mit Hilfe des Epifluoreszenz- (a, g, c, i, e, k) und des Konfokalmikroskops (b, h, d, j, f, l). Unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop wurden zusätzlich Durchlicht-Aufnahmen der Protoplasten gemacht (g, i, k). Zur Markierung der Zellkerne wurde H33342 (h, j, l) verwendet. Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 µm.

Obwohl die Transformationseffizienz insgesamt niedrig ausfiel (2-3 Protoplasten unter 10^5), konnte in einigen Fällen ein sich deutlich vom Hintergrund

abzeichnendes Signal ausgemacht werden, welches sich nach eingehender Überprüfung des Emissionsspektrums am Konfokalmikroskop als YFP-Fluoreszenz identifizieren ließ. Außerdem wurde das bei Transformationen mit den YFP-Fusionsvektoren erhaltene Signal mit der Fluoreszenz in mit pSKAscl35S::YFP transformierten Protoplasten verglichen (s. Abb. 3.55.b und e). In Abbildung 3.54. sind jeweils YFP- (b, d, f) und DAPI-Fluoreszenzaufnahmen (h, j, l) bzw. YFP- (b, d, f) und Durchlichtaufnahmen (g, i, k) einander gegenübergestellt.

Für alle bis hierher getesteten Kombinationen, also pSPYNE-ATHB6/pSPYCE-ATHB6 (a, b), pSPYNE-ATHB6/pSPYCE-ATHB7 (c, d), pSPYNE-ATHB7/pSPYCE-ATHB6 (hier nicht gezeigt) sowie pSPYNE-ATHB7/pSPYCE-ATHB7 (e, f) konnte YFP-Fluoreszenz im Epifluoreszenz- (a, c, e) und im Konfokalmikroskop (b, d, f) nachgewiesen werden. Das Signal konzentrierte sich für alle drei Kombinationen fast ausschließlich im nukleären Bereich. Somit scheinen ATHB6- und ATHB7-Moleküle im Kern sich nicht nur jeweils zu Homodimeren zu assoziieren (Abb. 3.52.a und b bzw. c und d), sondern sie lagern sich offenbar auch zu ATHB6-ATHB7-Heterodimeren zusammen (Abb. 3.54.e und f). Dieses Ergebnis bestätigt die im *yeast two-hybrid* System sowie *in vitro* bereits beobachtete Interaktion für die Transkriptionsfaktoren ATHB6 und ATHB7 (Tang, 2003; unveröffentlichte Ergebnisse). Protoplasten, welche mit leeren YFP-Fusionsvektoren co-transfiziert wurden, zeigten keine YFP-spezifische Fluoreszenz und wurden hier nicht abgebildet (s. Abb. 3.55.d und h). Auch das in kaputten oder untransformierten Protoplasten beobachtete Hintergrundsignal wurde hier nicht dokumentiert.

Nachdem das BiFC-System für die HD-Zip-Transkriptionsfaktoren ATHB6 und ATHB7 erfolgreich angewendet worden war, sollten auch andere Proteine, wie ABI1, abi1 oder GluRS auf mögliche Interaktionen überprüft werden. Somit wurde auch der HD-Zip-Transkriptionsfaktor ATHB5, der als *in vitro* Interaktionspartner von ATHB6 und ATHB7 gilt (Johannesson et al., 2001), in Kombination mit ATHB6 getestet. Allerdings konnte bei der Co-Transfektion von ATHB5 und ATHB6 kein YFP-Signal ermittelt werden.

Auch bei den restlichen bisher getesteten Kombinationen verschiedener YFP-Fusionsplasmide ergab nur die Co-Transfektion von pSPYNE-ABI1 und pSPYCE-ATHB6 ein fluoreszierendes YFP-Signal, wobei hier die Anzahl an analysierten Protoplasten und somit auch die Ausbeute an co-exprimierenden Protoplasten mit 3 fluoreszierenden Protoplasten unter 10^6 Zellen im Vergleich zu den mit ATHB6 und ATHB7 durchgeführten Dimerisierungstests sehr gering war.

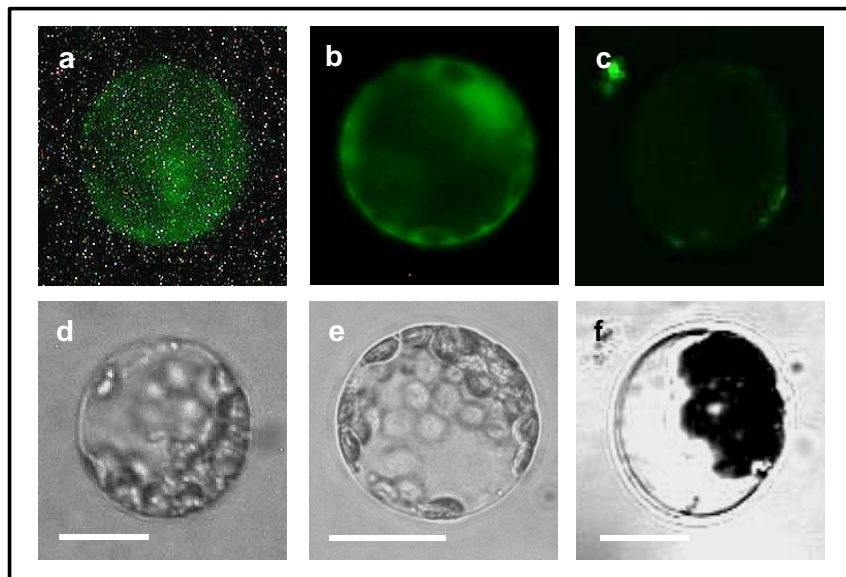


Abb. 3.55.: Visualisierung der bei Co-Expression von ATHB6- und ABI1-YFP-Fusionen in *Arabidopsis*-Protoplasten auftretenden bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation in Form von YFP-Signalemission. Die subzelluläre Lokalisation der YFP-Fluoreszenz (a) erfolgte mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops. Unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop wurden zusätzlich Durchlicht-Aufnahmen (d) der Protoplasten gemacht. Zum Vergleich wurden parallel Protoplasten mit pSK35S::YFP transformiert, welche unter Fluoreszenz- und Durchlicht dargestellt sind (b bzw. e). Als Negativkontrolle ist in c bzw. f ein mit den leeren YFP-Vektoren pSPYCE und pSPYNE transformierter Vektor dargestellt. Die angegebene Maßeinheit entspricht 20 μ m.

Im Gegensatz zu der für die HD-Zip-Transkriptionsfaktoren beobachteten, auf den Nukleus beschränkten Fluoreszenz verteilte sich das von den ABI1- und HB6-co-exprimierenden Protoplasten emittierte YFP-Signal jeweils innerhalb des ganzen Protoplasten (s. Abb. 3.55.a). Dies könnte auf eine neben dem Kern auch im Cytosol stattfindende Interaktion zwischen der Phosphatase ABI1 und dem HD-Zip-Protein ATHB6 hindeuten. Protoplasten, die mit pSKAscl35S::YFP transformiert worden waren, zeigten eine cytosolische Verteilung des Fluoreszenz-Signals (Abb. 3.55. b und e); die mit den

entsprechenden, während für die mit leeren pSPYNE- und pSPYCE-Vektoren transformierten Zellen nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu detektieren war (s. Abb. 3.55. c und f).

Die Co-Transfektion von pSPYNE-*abi1* und pSPYCE-*ATHB6* führte bisher zu keiner YFP-Reaktion. Eine endgültige Schlussfolgerung bezüglich der Interaktion von *abi1* mit HB6 kann jedoch, wie bei der Wechselwirkung zwischen ABI1 und HB6, noch keinesfalls getroffen werden, da die Anzahl der unabhängigen Transformationsansätze bisher zu gering war. Auch für die getestete Kombination aus pSPYNE-*ABI1* und pSPYCE-*ATHB7* konnte bisher keine YFP-Fluoreszenz dokumentiert werden, was mit früheren, in Hefe erzielten Ergebnissen übereinstimmt. Auch hier bedarf es jedoch bis zu einem endgültigen Fazit noch einiger Versuchswiederholungen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion der PP2C Proteinphosphatase ABI1 innerhalb des Netzwerks der ABA-Signaltransduktion untersucht. Besonderes Augenmerk lag mit der Analyse eines potenziellen ABI1-Kernlokalisationsignals vor allem auf der Rolle von ABI1 bei der Verbindung der ABA-Signalkaskade mit den durch Abscisinsäure hervorgerufenen Veränderungen der Genexpression. Während in einem ersten Teil der Arbeit die Ergebnisse aus transienten Expressionsexperimenten in *Arabidopsis*-Protoplasten gewonnen und mit Hilfe stabil transformierter Pflanzen auf ihre Bestätigung *in planta* überprüft wurden, sollte im Rahmen eines zweiten Projekts mit dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen ein alternatives transientes System zur Analyse der ABA-regulierten Genexpression etabliert werden. Dieses System sollte zur Untersuchung von solchen ABA-abhängigen Reporter-gen-Konstrukten eingesetzt werden, für die Experimente im transienten Protoplasten-System nicht durchgeführt werden können und welche aus diesem Grund bisher ausschließlich nach dem langwierigen Prozess der stabilen *Arabidopsis*-Transformation untersucht werden konnten. Ein Beispiel für derartige Konstrukte sind durch den *ATHB6*-Promotor regulierte Reportergene, deren ABA-abhängige Induktion Thema des dritten Ergebnisteils dieser Arbeit ist. Ein vierter Abschnitt illustriert die Verwendung der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation in *Arabidopsis*-Protoplasten als einfach zu handhabendes, transientes System zur Untersuchung von *in vivo* stattfindenden Interaktionen pflanzlicher Proteine im homologen System.

4.1. Die Funktion von ABI1 und abi1 bei der Modulation der ABA-Signaltransduktion

ABA-Signaltransduktion bezeichnet die Gesamtheit der Vorgänge, die an der Weiterleitung des Abscisinsäure-Signals in der Pflanze beteiligt sind. Ein häufig an der Regulation zellulärer Prozesse und an der Signalübermittlung in der

Zelle beteiligter Mechanismus ist die Proteinphosphorylierung durch MAPKinase-Kaskaden oder Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen (Mizoguchi et al., 1996; Mizoguchi et al., 1997; Urao et al., 2000). Proteinphosphatasen wirken bei diesen Prozessen als Modulatoren, welche die Reversibilität der Kinase-Reaktionen ermöglichen.

Die Beteiligung der PP2C-Phosphatasen an der ABA-Signalübermittlung zeigte sich durch die Klonierung der Gene *ABI1* (Meyer et al., 1994) und *ABI2* (Leung et al., 1997) aus *Arabidopsis thaliana*. Trotz zahlreicher Untersuchungen in verschiedenen experimentellen Systemen konnte die jeweilige Rolle der beiden Phosphatasen jedoch bisher nicht hinreichend erklärt werden. So erwiesen sich beide Gene infolge einer Analyse von genetischen Revertanten als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion mit teilweise überlappenden Funktionen (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Auch die für *ABI1*-T-DNA-Insertionslinien beobachtete Hypersensitivität bezüglich ABA-abhängiger, vegetativer Prozesse unterstreicht die für *ABI1* postulierte Rolle als negativer Regulator der ABA-Signalübertragung (Saez et al., 2006; Yoshida et al., 2006). Diese Befunde stehen außerdem im Einklang mit der im Rahmen ektopischer Expressionsexperimente in Mais-Protoplasten für *ABI1* beschriebenen Rolle des ABA-Insensitivität vermittelnden, negativen Regulators der ABA-abhängigen Genexpression (Sheen, 1998; Sheen, 2001).

Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist eine nukleäre Lokalisation von *ABI1* bzw. *abi1* Voraussetzung für die ABA-desensibilisierende bzw. ABA-insensitive Wirkung dieser Proteine.

Eine Kernlokalisierung von *ABI1* und *abi1* wurde in verschiedenen, transienten und stabilen Systemen gezeigt. So konnte für GFP-*ABI1*- und GFP-*abi1*-Fusionen in transient transformierten Zwiebelepidermis-Zellen neben einer im Cytosol verteilten Fluoreszenz ein deutliches GFP-Signal im Nukleus ausgemacht werden (Hoth et al., 2002). Die Verteilung von *ABI1*- und *abi1*-Fusionsproteinen in Cytosol und Zellkern wurde auch in stabil transgenen *Arabidopsis* 35S::*GUS-ABI1/abi1*-Linien beobachtet und in transienten Lokalisationsstudien mit 35S::*GFP-ABI1*- und 35S::*GFP-abi1*-Konstrukten in *Arabidopsis*- und Mais-Protoplasten bestätigt (Himmelbach, unveröffentlichte Ergebnisse, 2003). Ein direkter Einfluss von *ABI1* auf die beteiligten nukleären Prozesse könnte über Wechselwirkungen wie die in Hefe bereits gezeigte

Interaktion der PP2C Phosphatase mit dem HD-Zip-Transkriptionsfaktor ATHB6 erfolgen, bei der ABI1 in Abhängigkeit seiner Phosphatase-Aktivität mit ATHB6 interagiert und die ABA-abhängige Expression dieses Transkriptionsfaktors moduliert (Himmelbach et al., 2002).

Da die passive Diffusion von Proteinen in den Zellkern ab einem Molekulargewicht von mehr als 30 kD nur noch sehr ineffizient abläuft (Gorlich and Kutay, 1999), benötigen selbst relativ kleine Proteine wie das 28 kD große HMG1-Protein oder der 47 kD große Transkriptionsaktivator Opaque-2 (Tsuneoka et al., 1986; Varagona et al., 1992) ein oder mehrere Kernlokalisierungssignale (NLS). Um entsprechende Motive innerhalb des 47 kD großen ABI1-Proteins zu lokalisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein potenzielles NLS-Element am C-Terminus von ABI1 auf seine Bedeutung bezüglich der ABI1-Kernlokalisation überprüft (s. Abb. 3.2.).

Die dabei gezeigte, mit der Deletion dieses Motivs verbundene Aufhebung der ABI1-/abi1-Effektorwirkung im transienten *Arabidopsis*-Protoplastensystem ermöglicht schließlich die Herstellung einer direkten Verbindung zwischen der Rolle von ABI1 als negativer Regulator der ABA-abhängigen Genexpression und der ABI1-Kernlokalisation (s. Abb. 3.4. und 3.8.-3.11.). Da auch das durch Mutation deaktivierte NLS-Motiv die negative Effektor-Wirkung von ABI1/abi1 aufhob, kann eine durch die C-terminale Proteindeletion hervorgerufene, unspezifische Deaktivierung von ABI1/abi1 als Ursache für die ausgeschaltete Effektor-Wirkung ausgeschlossen werden.

Die direkte Verbindung zwischen funktionalem NLS-Motiv und negativer Regulator-Funktion von ABI1/abi1 wird durch die Befunde bei ABI1- bzw. abi1-überexprimierenden Pflanzen bekräftigt: nur in Anwesenheit des funktionsfähigen NLS-Elements von ABI1/abi1 kann ein ABA-insensitives Verhalten bezüglich Keimung, Wurzelwachstum und Stomataregulation beobachtet werden (s. 3.1.8. mit Abb. 3.12., 3.13. und 3.15.).

Die unmittelbare Abhängigkeit der durch ABI1 vermittelten ABA-Insensitivität vom Kernlokalisierungsmotiv lässt sich durch die nukleäre Lokalisation von ABI1-Substraten erklären. Diese könnten unter dem Einfluss von ABI1 die ABA-abhängige Genexpression modulieren und sich auf diese Weise an der ABA-desensibilisierenden Rückkopplung beteiligen.

Da in Protoplasten und transgenen Pflanzen trotz Deletion der NLS weiterhin eine abgeschwächte Kernlokalisierung für ABI1 bzw. *abi1* zu beobachten war (s. Abb. 3.7. bzw. 3.18.), wurden innerhalb der ABI1-Sequenz neben dem hier charakterisierten NLS-Element zusätzliche Kernlokalisierungsmotive vermutet. Zahlreiche pflanzliche Proteine verfügen über 2-3 NLS-Sequenzen (Varagona et al., 1992; Shieh et al., 1993; Meisel and Lam, 1996), die kombinatorisch für die nukleäre Akkumulation des jeweiligen Proteins sorgen und sich dabei in ihrer Effizienz deutlich voneinander unterscheiden können. Als Elemente, die potenziell neben dem hier charakterisierten Motiv zur Kernlokalisierung von ABI1 beitragen können, gelten zwei Motive an Position 255 bzw. 278 der ABI1-Sequenz, die einem Kernlokalisierungssignal des Opaque-2-Proteins entsprechen (Varagona et al., 1992).

Neben der wichtigen Rolle des NLS-Motivs beim Ausführen der ABI1-Funktionen, könnte die Kernlokalisierung von ABI1 zusätzlich Aufschluss über den dominant negativen Effekt von *abi1* auf die ABA-Signaltransduktion geben. So wurden in Schließzellen und Wurzelzellen transgener Pflanzen Unterschiede zwischen der subzellulären Verteilung von GFP-ABI1 und GFP-*abi1* festgestellt: Während GFP-ABI1 gleichmäßig in Kern und Cytosol verteilt ist und auch der Plasmamembran zugeordnet werden kann, ist GFP-*abi1* hauptsächlich im Kern zu finden (s. Abb. 3.16. und 3.20.). Zusätzlich deutet der in Schließzellen für GFP-ABI1 ermittelte, dreimal höher als für GFP-*abi1* ausfallende Quotient von cytosolischer zu nukleärer GFP-Signalintensität (s. Abb. 3.21.), auf eine im Vergleich zum ABI1-Protein deregulierte Kernlokalisierung des *abi1*-Proteins hin. Da die *abi1*-Mutation zum Austausch eines Glycin-Restes durch einen Asparaginsäure-Rest führt und somit dem *abi1*-Protein im Vergleich zum nativen ABI1-Protein möglicherweise den Status eines phosphorylierten Proteins verleiht (Littlepage and Ruderman, 2002), könnte die unterschiedliche Lokalisierung von ABI1 und *abi1* auf eine, der nukleären Translokation von ABI1 vorgeschaltete und im Zuge der ABA-Signalübertragung ausgelöste Phosphorylierung des nativen ABI1-Proteins zurückzuführen sein. Demnach wäre der Phänotyp der *abi1*-Mutanten durch eine fehlende, möglicherweise ABA-abhängige Regulation der nukleären Translokation von *abi1* bedingt.

Mehrere, an Schließzellen von *35S::GFP-ABI1*-Pflanzen durchgeführte Zeitreihen zur Untersuchung einer möglichen, ABA-abhängigen Akkumulation des ABI1-Proteins ergaben keine ABA-abhängige Translokation des GFP-ABI1-Proteins in den Zellkern (s. 3.1.9.). Aufgrund eines zusätzlich innerhalb der ABI1-Sequenz vorhandenen, potenziellen Kernexport-Signals (NES; *nuclear export signal*) (s. Abb. 4.1.), könnte anstatt einer rein nukleären Akkumulation des ABI1-Proteins auch ein, durch die NLS- und NES-Motive bedingtes, dynamisches Gleichgewicht zwischen cytoplasmatischer und nukleärer ABI1-Lokalisation herrschen. Dieses würde den Nachweis einer ABA-abhängigen ABI1-Translokation sichtlich erschweren. Ein potenzielles NES-Motiv befindet sich am C-Terminus von ABI1, in unmittelbarer Nähe der experimentell bestätigten NLS-Sequenz (s. Abb. 4.1.).

Da der Austausch von Glycin durch Asparaginsäure jedoch nicht nur einen phosphorylierten Aminosäure-Rest vortäuschen, sondern auch zu allgemeinen strukturellen Veränderungen, bspw. innerhalb von Dimerisierungs- oder Ligandenbindungsdomänen führen kann (Lease et al., 2001), könnte auch ein durch *abi1*-bedingte Konformationsänderungen dereguliertes NES-Element für die verstärkte nukleäre Akkumulation des *abi1*-Proteins verantwortlich sein.

ABI1	398	AAEYLSKLAIQ	408
AtRanBP1a	172	TAGLLEKLTVE	182
Rev	74	QLPPLERLTLD	84
mPKIα	38	AL-KLAGLDIN	47

Abb. 4.1.: Mögliches Kernexportsignal (NES) von ABI1 im Vergleich mit bekannten NES-Motiven. Der Vergleich zeigt die Sequenz der potenziellen NES von ABI1, sowie des pflanzlichen NES-Motivs von AtRanBP1a (Haizel et al., 1997). Außerdem sind noch die NES des HIV-Proteins Rev (Pollard and Malim, 1998) sowie die für Export verantwortliche Sequenz des mPKI α -Proteins gezeigt (Wen et al., 1995). Die für den Export kritischen hydrophoben Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Eine weitere Erklärung für die ausschließlich in Schließ- und Wurzelzellen beobachteten Kompartimentierungsunterschiede zwischen ABI1 und *abi1* könnten ABI1-Interaktionspartner darstellen, die in den Kernen dieser Zellen in vergleichsweise hoher Kopienzahl auftreten und aufgrund mutationsbedingter

Veränderungen von *abi1* eine äußerst stabile Wechselwirkung mit dem GFP-*abi1*-Fusionsprotein eingehen. Als potenzielle, nukleäre Interaktionspartner von ABI1 würden bspw. in Schließzellen verstärkt exprimierte Transkriptionsfaktoren wie ZAP1 oder Mitglieder der MYB-Transkriptionsfaktor-Familie in Frage kommen (Leonhardt et al., 2004).

Allerdings könnten die im Vergleich zu GFP-ABI1 verstärkte Kernlokalisierung von GFP-*abi1* auch auf eine verschlechterte Wechselwirkung des mutierten *abi1*-Proteins mit membranständigen oder cytosolischen Interaktionspartnern von ABI1 zurückzuführen sein. Eine im Fall des mutierten *abi1*-Proteins auftretende Inhibierung der Wechselwirkung zwischen ABI1 und der als Regulator der intrazellulären ABI1-Verteilung postulierten Phosphatidsäure, (Zhang et al., 2004; Mishra et al., 2006) hätte bspw. eine ungehinderte Kerntranslokation des *abi1*-Proteins zur Folge, während ABI1 durch die Wechselwirkung mit der membranlokalisierten Phosphatidsäure im Cytosol zurückgehalten würde.

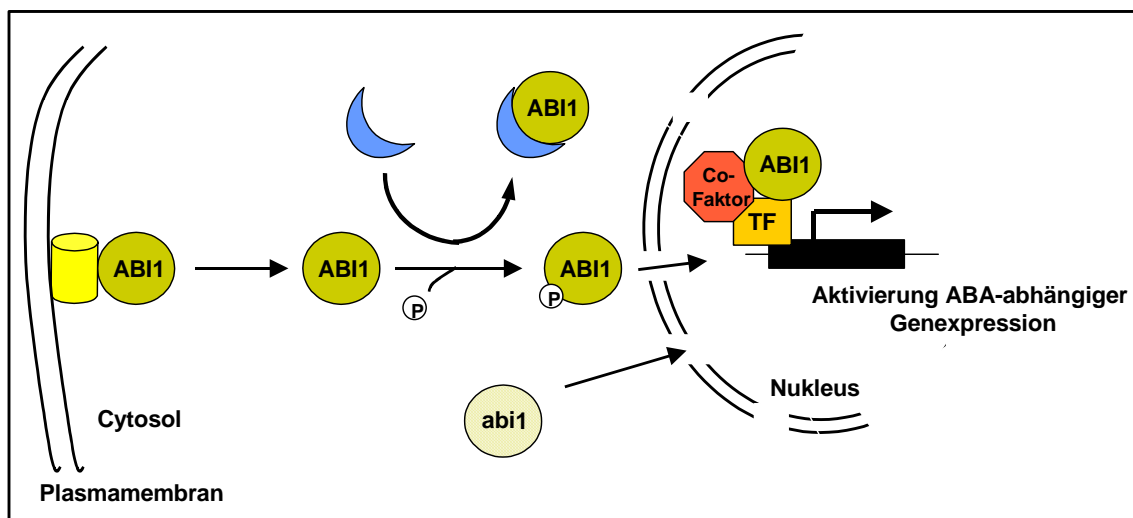


Abb. 4.2.: Vereinfachtes Modell zur Regulation der Kompartimentierung von ABI1. Während *abi1* auf deregulierte Weise im Kern akkumuliert wird die subzelluläre Lokalisation von ABI1 und somit die Weiterleitung des ABA-Signals in den Zellkern durch Phosphorylierung oder durch Wechselwirkungen von ABI1 mit membranständigen bzw. cytosolischen Interaktionspartnern kontrolliert.

Auch die im *yeast two-hybrid* System detektierte Interaktion zwischen ABI1 und der cytosolischen Glutamyl-tRNA-Synthetase AtGluRS (*At5g26707*) könnte als Regulationsmechanismus für die ABI1-Translokation vom Cytosol in den

Nukleus dienen (Tang, 2003; Yang, 2003), wobei das AtGluRS-Protein als cytosolischer Anker des ABI1-Proteins und somit als positiver Regulator der ABA-Signaltransduktion fungieren würde.

Ein in Abbildung 4.2. dargestelltes Modell fasst die hier aufgeführten Möglichkeiten zur Regulation der ABI1-Kompartimentierung zusammen: während *abi1* aufgrund seiner mutationsbedingten Eigenschaften unkontrolliert im Kern akkumuliert, wird die nukleäre Translokation von ABI1 und damit die ABA-abhängige Genregulation durch cytosolische oder membranständige Interaktionspartner von ABI1 bzw. durch phosphorylierungsabhängige Mechanismen reguliert.

Neben den für GFP-ABI1 und GFP-*abi1* festgestellten Unterschieden bezüglich der subzellulären Lokalisation zeigen die entsprechenden transgenen Linien eine für ABI1 bzw. *abi1* spezifische Verteilung in den Geweben der Wurzel (s. Abb. 3.16. und 3.17.), welche sich auf die Kalyptra-Stammzellen und die unmittelbar anschließende, dritte Kalyptra-Zellschicht sowie auf die meristematischen Zellen der Epidermis und der lateralen Wurzelhaube beschränkt (Sabatini et al., 1999).

Diese Proteindistribution stimmt in großen Teilen mit der bei *Arabidopsis* in Wurzelmeristemen beobachteten Lokalisation der PIN2-, PIN3- und PIN7-Proteine überein, welche an der Regulation der Auxin-Verteilung und somit an der Steuerung der Zellteilung und Zellexpansion in den Primärwurzeln beteiligt sind (Blilou et al., 2005). Da das unfusionierte, ebenfalls durch den 35S-Promotor gesteuerte GFP-Kontrollkonstrukt eine gleichmäßig innerhalb der Wurzel verteilte Fluoreszenz emittiert, deutet die für GFP-ABI1 und GFP-*abi1* beobachtete Verteilung auf eine erhöhte Stabilität dieser Reporterfusionen hin, welche durch den Ablauf ABA-regulierter Prozesse in diesen Zellen bedingt sein könnte. Demnach könnte ABA als Gegenspieler von Auxin bei der Steuerung des Wurzelwachstums sowie der Ausbildung von Seitenwurzelpremordien wirken. Die Beeinflussung der Wurzelentwicklung durch ABA wird bei der Untersuchung des Wurzelwachstums in ungestressten, mit exogen applizierter ABA behandelten Keimlingen deutlich: während die Elongation der Wurzel in derart behandelten Wildtyp-Keimlingen stark inhibiert

wird, ist bei ABA-insensitiven *abi1*-Keimlingen keine Hemmung der Wurzelverlängerung festzustellen (Meyer et al., 1994). Auch die Entwicklung von Seitenwurzeln wird durch ABA-abhängige Regulationsmechanismen gesteuert (Deak and Malamy, 2005): so wird beispielsweise die bei hohen Nitratkonzentrationen aufkommende Inhibierung der Seitenwurzelbildung durch ABA vermittelt (Signora et al., 2001). Die Tatsache, dass bei *abi1*-Mutanten eine verminderte Sensitivität für die ABA-induzierte Hemmung der Seitenwurzelformation festgestellt wurde, deutet außerdem auf eine Beteiligung von ABI1 an der ABA-abhängigen Inhibierung der Seitenwurzelbildung hin (De Smet et al., 2003)

In Wurzelzellen lokalisiertes ABI1-Protein könnte zudem die fördernde Wirkung von ABA auf das Wurzelwachstum bei Trockenstress vermitteln. Da diese ABA-Wirkung auf eine Hemmung der Ethylen-Produktion zurückgeht (Spollen et al., 2000), könnte das ABI1-Protein in derartige Mechanismen eingreifen.

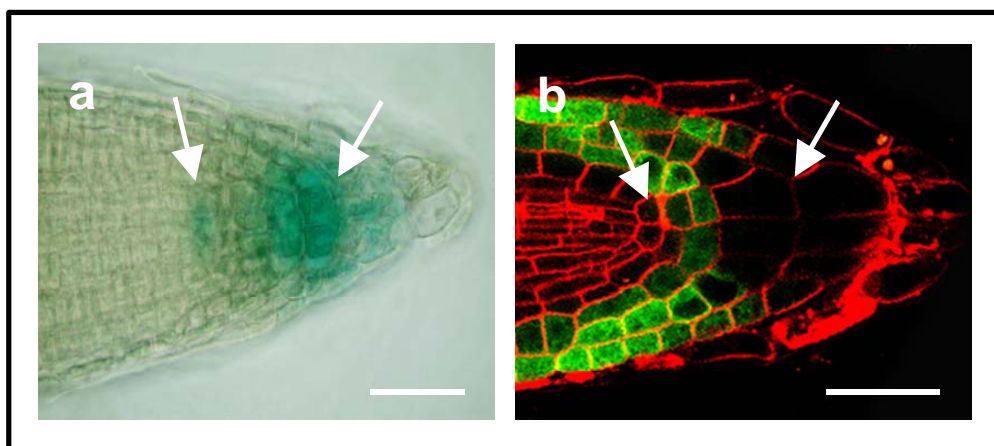


Abb. 4.3.: Lokalisation der ABA-Signaltransduktion in *RD29B::GUS*-Wurzeln sowie der GFP-ABI1-Expression in *35SS1::GFP-ABI1*-Wurzeln. In An- und Abwesenheit von Wasserstress beschränkt sich die ABA-abhängige Reporteraktivierung auf die durch Pfeile markierten Zellen der Kalyptra und des ruhenden Zentrums (a). Diese Verteilung entspricht nicht der für ektopisch exprimiertes GFP-ABI1 beobachteten Akkumulation (b), welche in der Kalyptra sowie in der Wurzelepidermis stattfindet. Die angegebene Maßeinheit entspricht 50 μm .

Eine intensive ABA-Signaltransduktion findet jedoch sowohl unter stressfreien Bedingungen als auch unter Trockenstress-Einfluss nicht in den hier durch GFP-ABI1 und GFP-*abi1* gekennzeichneten Zellen des Wurzelmeristems und der Kalyptra statt (s. Abb. 4.3.), sondern in der oberhalb dieser Zellen

lokalisierten Kalyptra sowie im weiter unten folgenden ruhenden Zentrum (Christmann et al., 2005).

Wie die oben erwähnten genetischen *abi1*-Revertanten mit ihrer bis zu 1000-fach verringerten Phosphatase-Aktivität zeigen, ist die negativ regulatorische Wirkung von ABI1 nicht nur eng mit der Kernlokalisierung des Proteins, sondern auch mit der katalytischen Aktivität seiner PP2C-Domäne verknüpft (Gosti et al., 1999). Dies bestätigt auch der für ABI1-Versionen mit reduzierter PP2C-Aktivität beobachtete fehlende Einfluss auf die ABA-abhängige Genexpression (Sheen, 1998).

Überraschenderweise gilt diese Feststellung jedoch nicht im Falle des nur 5% der ursprünglichen Phosphatase-Aktivität aufweisenden *abi1*-Proteins (Leube et al., 1998; Rodriguez et al., 1998; Gosti et al., 1999), welches sowohl in Mais (Sheen, 1998) als auch in *Arabidopsis*-Protoplasten (Hoffmann, 2002) eine stärkere Wirkung auf die ABA-regulierte Genexpression ausübt als das katalytisch aktivere ABI1-Protein. Demnach sind offenbar auch andere Regionen von ABI1 für dessen negativ regulatorische Funktion innerhalb der ABA-Signalkaskade wichtig.

So könnte der dominant negative Effekt von *abi1* auch durch mit der Mutation verbundene Konformationsänderungen innerhalb der PP2C-Domäne bedingt sein, welche das katalytische Verhalten des Proteins deutlich verändern und somit auch die Funktionalität von Substraten und Interaktionspartnern des ABI1-Proteins entscheidend beeinflussen würden (Gosti et al., 1999).

Mutationsbedingte Unterschiede zwischen ABI1 und *abi1* könnten auch die zwischen GFP-/GUS-ABI1- und GFP-/GUS-*abi1*-überexprimierenden Pflanzen hervorgerufenen, voneinander abweichenden Effekte auf physiologische Prozesse wie Keimung oder Stomataregulation erklären (s. 3.8.1. sowie Abb. 3.12., 3.13., und 3.15.). Während überexprimierte *abi1*-Reporterfusionen das für *abi1*-Mutanten typische, ABA-insensitive Verhalten hervorrufen, ist infolge der ektopischen Expression von GFP- bzw. GUS-ABI1 keine Abweichung vom Wildtyp-Verhalten festzustellen. Die Merkmale der hier untersuchten, ABI1-überexprimierenden Pflanzen entsprechen damit dem für *35S::ABI1*-Pflanzen beschriebenen Wildtyp-Phänotyp (Wu et al., 2003).

Da jedoch die im Rahmen dieses Projektes parallel getesteten, 35S::*c-myc-ABI1*-Pflanzen im Gegensatz zu den 35S::*GUS*- und 35S::*GFP-ABI1*-Linien ein ABA-insensitives Keimungsverhalten zeigten, (vgl. Abb. 3.15.), könnte die Aufhebung der ABI1-Wirkung in den GUS- und GFP-ABI1-Linien auch auf ein mit der Größe des GFP- bzw. GUS-Reporters verbundenes Problem zurückzuführen sein.

Während der nur 10 Aminosäuren lange *c-myc*-Anhang die Effektivität von ABI1 bei der Keimungsregulation kaum beeinträchtigt, könnten unter dem Einfluss des 27 kD großen, zur Dimerisierung neigenden GFP-Tags (Yokoe and Meyer, 1996; Palm et al., 1997) bzw. in Anwesenheit des zur Ausbildung von Tetrameren tendierenden, 68 kD schweren GUS-Anhangs (Jefferson et al., 1986) Tertiärstrukturen ausgebildet werden, die zu einer räumlichen Blockierung funktionaler Domänen führen könnten. Die auf diese Weise verschlechterte Zugänglichkeit zu essentiellen Sequenzbereichen würde die Wirkungsweise von ABI1, bspw. aufgrund eines veränderten Interaktionsverhaltens gegenüber Substraten oder sonstigen Regulatoren der ABA-Signalkaskade, erheblich einschränken oder sogar komplett abschalten.

Eine Beeinträchtigung funktionaler Protein-Domänen durch angeheftete Reporterproteine konnte für C-terminalen GUS-Fusionen des Opaque-2-Proteins bereits beobachtet werden. So galten Tertiärstrukturen, welche sich innerhalb dieses Proteins durch die tetramere Struktur des GUS-Enzyms und die Assoziation der O2-Leucin-Zipper-Domänen ausbildeten, als Ursache für die eingeschränkte Effizienz der zwischen GUS-Sequenz und Leucin-Zipper-Domäne liegenden O2-NLS (Varagona et al., 1992).

Da die von *abi1* vermittelte ABA-Insensitivität - unabhängig von den jeweils eingesetzten Reporter-Anhängen - in allen hier analysierten Ereignissen erhalten blieb, könnte es sich bei der in GFP-ABI1- bzw. GUS-ABI1-Fusionen sterisch behinderten Domäne um die katalytische PP2C-Domäne handeln. Eine räumliche Blockierung dieser enzymatisch aktiven Domäne durch den Reporter-Anhang würde die Funktion von ABI1 erheblich abschwächen, wäre aber gleichzeitig ohne besondere Konsequenz für das Wirkungsspektrum des *abi1*-Proteins, da dieses seinen dominant negativen Effekt innerhalb der Pflanze vermutlich unabhängig von seiner bis zu 30-fach reduzierten katalytischen Phosphatase-Aktivität ausübt (Sheen, 1998; Gosti et al., 1999). Wie *in vitro*

PP2C Aktivitätstests jedoch zeigen, haben N-terminale Anhänge wie die 26 kD große Glutathion-S-Transferase keinen negativen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von ABI1 (Smith and Johnson, 1988; Gosti et al., 1999), so dass auch bei den hier verwendeten GFP-ABI1- bzw. GUS-ABI1-Fusionen eine Reporterbedingte Beeinträchtigung der PP2C Aktivität unwahrscheinlich sein dürfte.

Da infolge des ABA-Signals die ABI1-Phosphatase-Aktivität erhöht und die Transkription des *ABI1*-Gens induziert wird (Leung et al., 1997; Hoth et al., 2002; Merlot et al., 2002), wurde für ABI1 die Beteiligung an einer negativen Rückkopplung des ABA-Signaltransfers postuliert (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). In diesem Fall könnte ABI1 an der Signaltransduktion beteiligte Proteine dephosphorylieren und auf diese Weise die Signalkaskade negativ regulieren. Eine derartige, ABI1-abhängige Desensibilisierung im Zuge der ABA-Signalkette würde es der Pflanze ermöglichen, die Anwesenheit des signalgebenden Hormons kontinuierlich zu überprüfen.

Ein in seinem katalytischen Verhalten verändertes *abi1*-Protein könnte innerhalb dieser negativen Rückkopplungsschleife Substrate von ABI1 irreversibel binden und sie der Signalkaskade gänzlich entziehen. Die auf diese Weise herbeigeführte Verstärkung der ursprünglichen ABA-desensibilisierenden Wirkung von ABI1 würde somit den durch *abi1* verursachten, ABA-insensitiven Effekt (Merlot et al., 2001) und gleichzeitig den Unterschied zwischen den ABA-desensibilisierten *abi1*-Pflanzen und dem ABA-hypersensitiven Verhalten von ABI1-T-DNA-Insertionslinien (Yoshida et al., 2006) erklären.

Neben der bis hierher diskutierten Rolle von ABI1 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion eröffnen im Rahmen der ABI1/*abi1*-Charakterisierung durchgeführte Mikroinjektionsexperimente in Tomate zusätzliche Aspekte der ABI1- und *abi1*-Funktion (Wu et al., 2003). So führt im Widerspruch zu bis dahin mit ektopisch exprimierten ABI1-Effektoren erhaltenen Ergebnissen ein Überschuss an injiziertem ABI1-Protein zur Aufhebung des *abi1*-vermittelten, ABA-insensitiven Effekts und deutete somit auf eine zusätzliche Rolle von ABI1 als positiver Regulator der ABA-Signalkaskade hin.

Modelle, welche die zweiseitige Funktion von ABI1 berücksichtigen, können demnach bezüglich der ABA-Signaltransduktion in eine frühe und eine späte

Phase unterteilt werden (s. Abb. 4.4.). So sorgt ABI1 in einem ersten Schritt der ABA-Signalkette für die Weiterleitung des ABA-Signals innerhalb der Zelle. Dieser positive Effekt besteht vermutlich in der inaktivierenden Dephosphorylierung eines Repressors (blaue Symbole, Abb. 4.4.) und ist somit direkt mit der PP2C-Aktivität des Proteins verbunden. Hierzu passt auch der innerhalb von 3 h nach ABA-Zugabe beobachtete Anstieg der ABI1 PP2C-Aktivität (Merlot et al., 2001).

Das im Zellkern ankommende Signal schaltet die Expression ABA-abhängiger Gene ein, zu denen auch das *ABI1*-Gen gehört. Das im Zuge der ABA-induzierten Genexpression akkumulierende ABI1-Protein übernimmt nun eine zweite, negativ regulatorische Funktion, welche zur ABA-Desensibilisierung der Pflanze führen soll.

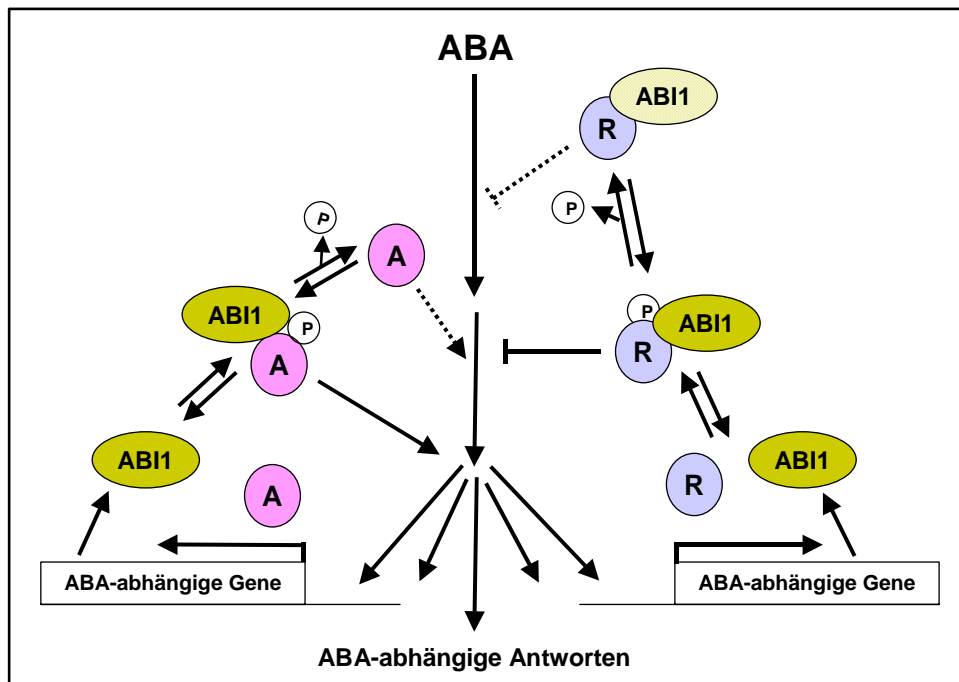


Abb. 4.4.: Erweitertes Modell für die Rolle von ABI1 in der ABA-Signaltransduktion (Christmann et al., 2003). In einer frühen Phase der ABA-Signaltransduktion schaltet ABI1 in einem dephosphorylierungsabhängigen Schritt den Repressor R (blau dargestellt) aus. Infolge der ABA-induzierten Genexpression von ABI1 sorgt akkumulierendes ABI1-Protein für die Stabilisierung und Aktivierung des ABA Repressors R (blau dargestellt) bzw. für die dephosphorylierungsabhängige Inaktivierung von ursprünglichen positiven Regulatoren (A, rot dargestellt) des ABA-Signaltransfers.

Diese inhibierende Wirkungsweise erfolgt über Protein-Protein-Interaktionen, welche zumindest teilweise im Nukleus stattfinden.

Die hier postulierten Protein-Wechselwirkungen sorgen möglicherweise für die Stabilisierung des in der frühen Phase durch ABI1 deaktivierten Repressors (Abb. 4.4., blau Symbole). Eine andere Möglichkeit besteht in dieser Phase außerdem in der bereits oben postulierten Dephosphorylierung positiver Regulatoren (Abb. 4.4., rote Symbole) der Signaltransduktionskette, die dadurch deaktiviert werden.

Eine parallele Verteilung der Interaktionspartner des sowohl positiv als auch negativ regulatorisch wirkenden ABI1-Proteins in Cytosol und Nukleus würde auch die in dieser Arbeit beobachtete, subzelluläre Lokalisation von GFP-ABI1- bzw. GUS-ABI1-Fusionen in beiden Kompartimenten erklären (s. Abb. 3.18. und 3.19.).

Die oben erwähnte Aufdeckung der beiden gegensätzlichen Funktionen von ABI1 lässt sich unter Umständen durch die Anwendung verschiedener experimenteller Systeme erklären, welche der Pflanze jeweils unterschiedliche Situationen vorgeben. So könnten die in ABI1-überexprimierenden Pflanzen durchgehend hohen Expressionslevel des ABI1-Proteins die negativ regulatorische Funktion des ABI1-Proteins im Zuge der ABA-Desensibilisierung unterstützen, während die in Mikroinjektionsexperimenten transient vorhandene, hohe Anzahl an ABI1-Molekülen eher die positive Wirkungsweise der PP2C Phosphatase hervorruft, welche in einer frühen Phase der ABA-Signalübertragung vermutet wird.

Auch die Wirkungsweise des mutierten *abi1*-Proteins lässt sich mit Blick auf die doppelte Funktion von ABI1 möglicherweise neu erklären. Während *abi1* aufgrund seines nativen Expressionslevels in *abi1*-Mutanten die ABA-Signalkaskade bereits früh beeinflusst und aufgrund seiner mutationsbedingten Eigenschaften beispielsweise die Dephosphorylierung des ersten ABI1-regulierten Repressors negativ beeinträchtigt, greift das in *35S::abi1*-Pflanzen kontinuierlich akkumulierende *abi1*-Protein erst in der zweiten Phase der ABA-Signalkette ein und verstärkt - entweder durch zusätzliche Stabilisierung des postulierten Repressors oder durch eine verstärkte Inhibierung von positiven Regulatoren der ABA-Signalkette - den von ABI1 ausgehenden, ABA-desensibilisierenden Effekt.

Für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Funktion von ABI1 im ABA-Signaltransduktionsnetzwerk sind zahlreiche Strategien denkbar. Ein

interessanter Ansatz wäre die Verwendung des nativen *ABI1*-Promotors zur Expression von *ABI1*- bzw. *abi1*-Reporterfusionen im transienten Protoplastensystem und in stabil transformierten Pflanzen. Mit Hilfe dieser neu generierten, endogene Expressionslevel der *ABI1*-/*abi1*-Reporterproteine aufweisenden Linien könnten durch äußere Einflüsse wie Schwerkraft oder osmotischen Stress hervorgerufene Translokationen der Reporterfusionen auf zellulärer Ebene, zum Beispiel in Schließ- oder Wurzelzellen, aber auch Veränderungen von Expressionsmustern, bspw. im Wurzelspitzenmeristem, analysiert werden.

4.2. Agrobakterien-vermittelter Gentransfer in pflanzliche Zellkultur: Ein Modellsystem für transiente Expressionsstudien?

Zur Untersuchung von Effekten auf die pflanzliche Genregulation werden neben stabil transgenen Linien oftmals transiente Expressionssysteme verwendet. Zahlreiche Methoden wurden entwickelt um den Gentransfer in Pflanzenzellen und die darauffolgende, vorübergehende Expression der eingebrachten Gene möglichst effizient zu machen. So ergaben zum Beispiel Mikroinjektionsexperimente mit Reporter-gen-Konstrukten, *second messengers* und Effektorproteinen neue Aufschlüsse über die Funktion und Position von ABI1 innerhalb der ABA-Signalkaskade (Wu et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit der transienten Transformation stellt die ballistische Transformation mittels Partikelkanone dar. Hierbei werden mit Hilfe von Mikropartikeln aus Gold oder Wolfram DNA-Moleküle in pflanzliche Gewebe oder Zellen geschossen (Klein et al., 1987; Seki et al., 1999; Kikkert et al., 2005). Aufgrund der freien Zugänglichkeit ihres Plasmalemmas eignen sich auch die zellwandlosen Protoplasten für den direkten Gentransfer. Die DNA-Transformation kann hier durch verschiedene Verfahren wie Elektroporation oder Behandlung mit Polyethylenglykol durchgeführt werden (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984; Guerche et al., 1987; Sheen, 2001). Auch der Agrobakterien-vermittelte DNA-Transfer wird für die transiente Transformation von Zellsuspensionskulturen oder pflanzlichen Geweben genutzt (Ferrando et al., 2000; Fuentes et al., 2004) und kann sogar über die Methode der Agro-Injektion für den transienten Gen-Transfer bei ganzen Früchten eingesetzt werden (Orzaez et al., 2006).

Im Unterschied zur Analyse in transgenen Pflanzen ist der Zeitaufwand zur Untersuchung genregulatorischer Prozesse in transienten Systemen relativ gering: während für die Konstruktion stabil transformierter Linien sowie die anschließende Untersuchung der Pflanzen mehrere Monate benötigt werden, nimmt z.B. der transiente Gentransfer durch PEG in *Arabidopsis*-Protoplasten sowie die im Anschluss durchgeführte Analyse der Genregulation nur wenige Tage in Anspruch.

Verschiedene transiente Systeme wurden bereits zur Untersuchung des ABA-Signaltransduktionsweges eingesetzt. So wurde durch Partikelbeschuss-

Experimente die durch ABA-Respons-Komplexe (ABRC, siehe 1.2.5.) vermittelte ABA-Induktion in Gerste charakterisiert (Shen et al., 2004). Auch in *Arabidopsis*-Protoplasten wurde die Regulation verschiedener ABA-induzierbarer Promotoren getestet: so wurde unter anderem die ABA-abhängige Aktivierung des *ATHB6*-Promotors durch das eigene Genprodukt, den coexprimierten HD-Zip-Transkriptionsfaktor *ATHB6*, nachgewiesen (Himmelbach et al., 2002). In Mais- (Sheen, 1998) und *Arabidopsis*-Protoplasten (Hoffmann, 2002) konnte über die Coexpression verschiedener Effektor- sowie ABA-regulierter Reportergenkonstrukte zudem die negativ regulatorische Rolle von PP2C Phosphatasen im ABA-Signaltransduktionsnetzwerk nachgewiesen werden.

Die Anwendung der DNA-Transformation von *Arabidopsis*-Protoplasten (Hoffmann, 2002) bietet im Vergleich zu anderen transienten Expressionsmethoden neben der einfachen Durchführung den Vorteil, dass zur Transfektion eine homogene Zellsuspension verwendet wird, die eine freie Zugänglichkeit der Gene für jede Zelle in definierter Konzentration ermöglicht (Potrykus, 1991). Zu den Nachteilen des Systems gehören die bei unabhängigen Transformationsansätzen auftretenden Schwankungen von Reporteraktivitätsmessungen, welche Variationen um den Faktor 50 erreichen können (Luehrsen et al., 1992) und selbst durch möglichst konstante Bedingungen hinsichtlich der Protoplastierung sowie durch Verwendung von in Phytokammern angezogenem Pflanzenmaterial nicht zu vermeiden sind (Doelling and Pikaard, 1993). Auch die Regenerierung stabil transgener Pflanzen aus transformierten Protoplasten gestaltet sich schwierig: obwohl anhand optimierter Protokolle die Effizienz hierbei inzwischen von 15% auf bis zu 30% gesteigert werden konnte (Dovzhenko et al., 2003), fällt sie immer noch deutlich niedriger aus, als die für das Anziehen stabiler Transformanden aus Agrobakterien-transformierten Zellsuspensionskulturen beschriebene Erfolgsrate von über 90% (Mathur et al., 1998).

Die Notwendigkeit eines als Alternative zur Protoplasten-Transformation nutzbaren transienten Systems wurde jedoch vor allem im Rahmen von Untersuchungen der ABA-abhängigen Genexpression durch den Verlust der ABA-Induzierbarkeit des *ATHB6*-Promotors im Protoplastensystem deutlich

(Hoffmann, 2002). Während die bereits vorgestellten Promotoren der Gene *RAB18* und *RD29B* ihre ABA-Induzierbarkeit in Protoplasten behalten, ist der *ATHB6*-Promotor nur noch konstitutiv auf niedriger Expressionsebene aktiv (s. Abb. 4.5. und Hoffmann, 2002).

Gründe für diese unterschiedliche Regulation könnten mit dem Prozess der Protoplastierung verbunden sein, welcher innerhalb der betroffenen Zellen zu erheblichen Veränderungen, unter anderem bei der Genexpression, führen kann (Grosset et al., 1990; Ferrando et al., 2000).

Verschiedene, mit der Protoplastierung verbundene und den *ATHB6*-Promotor negativ beeinflussende Konsequenzen sind denkbar. Zum einen könnte die Protoplastierung zum Verlust eines zellwandständigen Rezeptors führen, dessen Anwesenheit für die ABA-abhängige *ATHB6*-Promotorinduktion benötigt wird. Gegen diese Theorie spricht jedoch die Tatsache, dass die ABA-regulierten *RAB18*- und *RD29B*-Promotoren im Protoplastensystem weiterhin ABA-induzierbar sind (s. Abb. 4.5., Hoffmann, 2002).

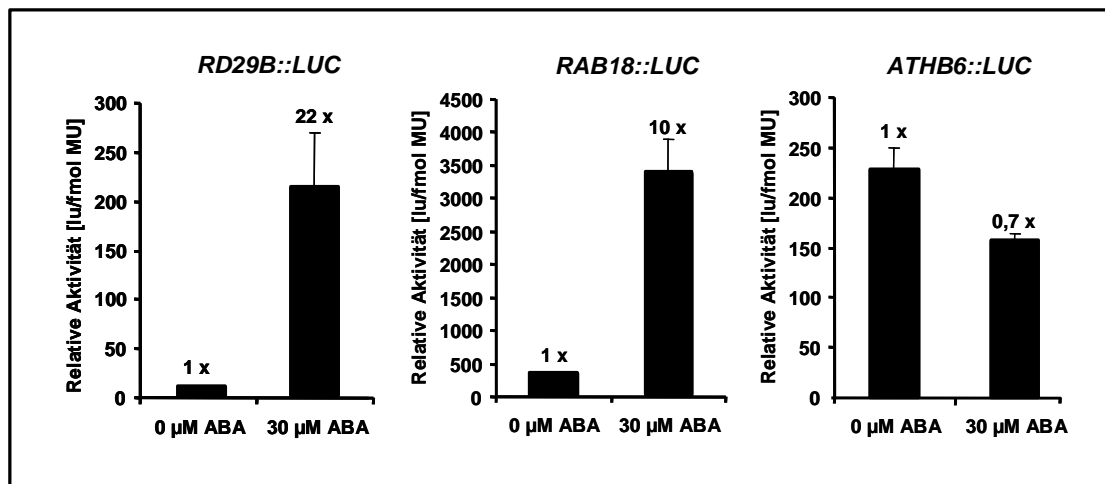


Abb. 4.5.: Transiente *LUC*-Expression in mit *RAB18::LUC* bzw. *RD29B::LUC* oder *ATHB6::LUC*-Plasmid transformiert wurden. Nach 18 h Inkubation mit 0 bzw. 30 µM ABA wurde die jeweilige Induktion durch ABA bestimmt. Zur internen Standardisierung wurde die GUS-Aktivität des co-transformierten *35S Ω ::GUS*-Plasmids gemessen (verändert nach Hoffmann, 2002).

Eine weitere Erklärung für die Störung der *ATHB6*-Promotorregulation könnte mit dem Abbau der Zellwände und dem dadurch herbeigeführten Verlust des Turgordrucks zusammenhängen, dessen Veränderungen die Induktion des Wasser- und Salzstress-regulierten *ATHB6*-Promotors regulieren könnte

(Söderman et al., 1999). Im Gegensatz zu Pflanzen, bei denen bisher noch keine Sensoren für Turgorveränderungen nachgewiesen wurden, konnte in *Caenorhabditis elegans* bereits die Verknüpfung von turgorsensiblen Proteinen mit dem Cytoskelett und der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (Tavernarakis and Driscoll, 1997).

Unter dem Aspekt einer eventuellen Turgorabhängigkeit der *ATHB6*-Regulation muß auch die Verwendung von Polyethylenglykol bei der Fällung von DNA auf *Arabidopsis*-Protoplasten als kritisch angesehen werden, da diese Substanz unter anderem zur Untersuchung von Enzymaktivitätsveränderungen in Abhängigkeit des osmotischen Drucks eingesetzt wird (Reid and Rand, 1997).

Aufgrund eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der Deregulation des *ATHB6*-Promotors und dem Vorgang der Protoplastierung sollte daher die Untersuchung der *ATHB6*-Promotorregulation in einem alternativen transienten System erfolgen. Um - ähnlich wie beim Protoplastensystem - eine freie Zugänglichkeit der übertragenen Gene für die einzelnen Pflanzenzellen in definierter Konzentration zu ermöglichen, wurde als System der Agrobakterienvermittelte DNA-Transfer in *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen gewählt (Ferrando et al., 2000). Weitere Vorteile dieses Systems im Gegensatz zur transienten Transformation von Protoplasten bestehen in der Intaktheit der Zellwände sowie in der über mehrere Tage stabilen, transienten Expression der eingebrachten Gene (Mathur et al., 1998; Ferrando et al., 2000). Auch die im Protoplastensystem als äußerst kritisch angesehene DNA-Qualität (Sheen, 2001) spielt beim Gen-Transfer über Agrobakterien keine Rolle mehr.

Vor der eigentlichen Anwendung dieses transienten Systems musste jedoch erst geklärt werden, ob die Methode alle Voraussetzungen erfüllt, die zur Aufklärung der gegebenen Fragestellungen benötigt werden.

Die aus früheren Publikationen übernommenen Parameter wie bakterielle Ausgangskonzentration, Co-Inkubationszeit zwischen Agrobakterien und Pflanzenzellen sowie Dauer der ABA-Induktion wurden an die Bedürfnisse der Zellsuspensionskulturen angepasst (Ferrando et al., 2000). Mit der Herabsenkung der agrobakteriellen Ausgangskonzentration sowie der Verkürzung der Co-Inkubationszeit von Agrobakterien und Pflanzenzellen konnte z.B. der mit der agrobakteriellen Vermehrung zunehmende

Sauerstoffmangel im Zellkulturüberstand (vgl. Abb. 3.29.), und der damit verbundene, massive Abfall der in den Pflanzenzellen gemessenen Reporteraktivität eingeschränkt werden (s. Abb. 3.30. bzw. 3.31.). Mit der Einführung eines im Anschluss an die Transfektion durchgeführten Waschschrilles erfolgte gleichzeitig zur Eindämmung der agrobakteriellen Vermehrung die Entfernung der aus agrobakterieller Genexpression hervorgehenden Reporterproteine (s. Abb. 3.34. und 3.35.).

Im Anschluss an die Optimierung des Systems (s. Abb. 3.36.) erfolgte der Agrobakterien-vermittelte Transfer ABA-regulierter Reporter-kassetten wie *RD29B::LUC* oder *ATHB6::LUC* in *Arabidopsis*-Zellsuspensionen und die Untersuchung der ABA-abhängigen Promotorregulation.

Dabei konnte jedoch für alle über Agrobakterien eingebrachten Promotoren eine Aktivität festgestellt werden, welche unabhängig von exogenem ABA war und auf prä-induzierende Bedingungen für die ursprünglich durch osmotischen Stress oder exogenes ABA regulierten Promotoren hindeutete (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Söderman et al., 1999; Himmelbach et al., 2002). Da die Aktivierung des *RD29B*-Promotors sich auch in den, nur zu einer dezimierten ABA-Produktion befähigten *aba2*-Zellen (Cheng et al., 2002) zeigte, und nicht durch Fluridon, einen Hemmstoff der der ABA-Synthese vorgeschalteten Carotenoid-Biosynthese (Kikuchi et al., 2006), auszuschalten war, konnte eine pflanzeigene ABA-Produktion als Grund für die Promotoraktivierung ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 3.39.). Auch eine durch agrobakterielle Faktoren ausgelöste Promotorinduktion bestätigte sich nicht, da bei PEG-transformierten *RD29B::LUC*-Protoplasten nach Co-Inkubation mit T-DNA-übertragenden Agrobakterien keine Aktivierung des ABA-abhängigen Reporterkonstruktes festzustellen war. Die in Zellkulturen trotz Agrobakterien-Infektion und T-DNA-Transfer weiterhin beobachtbare Regulierbarkeit von stabil exprimierten, ABA-induzierbaren Promotoren (s. Abb. 3.41.) sprach ebenfalls gegen eine, von Agrobakterien freigesetzte, und für die ABA-unabhängige Aktivierung der übertragenen Konstrukte verantwortliche Substanz.

Während demnach in pflanzlichen Zellen die Regulierbarkeit bereits eingebrachter Konstrukte durch die Präsenz von Agrobakterien nicht beeinflusst wird, ist für die über agrobakteriellen T-DNA-Transfer in Pflanzenzellen eingeschleusten Promotor-Reporter-Kassetten anschließend eine deregulierte

Genexpression zu beobachten. Demnach scheint weniger die Präsenz der Agrobakterien, sondern vielmehr der Mechanismus des agrobakteriellen T-DNA-Transfers Einfluss auf die Regulation der in die Pflanzenzellen eingeschleusten Konstrukte zu nehmen.

Faktoren agrobakteriellen Ursprungs wurden bereits mehrfach als Modulatoren der pflanzlichen Genexpression beschrieben. So wurden in *Ageratum conyzoides*-Zellsuspensionen bereits nach 24-stündiger Co-Kultivierung mit Bakterien Veränderungen der Genexpression festgestellt (Ditt et al., 2001). Bei *Arabidopsis*-Zellkulturen wurde sogar die durch *Pseudomonas syringae* ausgelöste Aktivierung von Genen der ABA-Biosynthese bzw. ABA-Signaltransduktion beschrieben, zu denen Gene wie *NCED3* bzw. *ABI1*, *ABI2* oder *RD26* gehörten (Truman et al., 2006). Diese, auch für ABA-abhängige Gene beobachtete, differentielle Genexpression erfolgt in den meisten Fällen als allgemeine Abwehrreaktion auf Bakterien, so dass auch die Anwesenheit der für Pflanzen nicht pathogenen *E. coli*-Zellen zu genregulatorischen Modifikationen führen kann. Allerdings konnten auch schon spezifisch als Reaktion auf Agrobakterien erfolgende Gen-Induktionen beobachtet werden, wie das für ein Nodulin-ähnliches Protein codierende Gen in *Ageratum conyzoides* zeigt (Ditt et al., 2001).

Auch die bei *Arabidopsis* bereits beobachtete Aktivierung der ABA-Signalkaskade durch bakterielle Elicitoren (Zipfel et al., 2004; Dong et al., 2005) eröffnet die Möglichkeit der Aktivierung von ABA-induzierbaren Genen durch agrobakterielle Faktoren. So könnte eine von den Agrobakterien freigesetzte Substanz die ABA-Signaltransduktion einschalten und auf diesem Weg die Expression ABA-regulierter Gene initiieren. Ein entsprechender Einfluss von Elicitoren auf ABA-abhängige Prozesse wurde in *Arabidopsis* für das pflanzenpathogene Bakterium *Erwinia amylovora* produzierten Harpin-Elicitoren beobachtet, welche neben den zum Stomataschluss und somit zur Trockenheitstoleranz führenden, ABA-abhängigen Prozessen, auch die Expression des hier getesteten, ABA-regulierten *RD29B*-Gens aktivieren (Dong et al., 2005). Die Tatsache, dass weder das *ATHB6*- noch das *RD29B*-Gen eine Flagellin-abhängige Induktion zeigen, unterstützt jedoch das Ausschließen von Flagellin als Ursache für die Prä-Induktion der gewählten Promotor-Reporterkonstrukte (Zipfel et al., 2004).

Eine Co-Inkubation von *RD29B::LUC*-Protoplasten mit T-DNA übertragenden Agrobakterienkulturen führte nicht zu einer Induktion des transient exprimierten *RD29B::LUC*-Konstruktes (s. Abb. 3.37. und 3.38.). Somit schienen die Agrobakterien keine induzierenden Faktoren zu enthalten. Gegen die Vermutung einer Agrobakterien-bedingten Promotor-Regulation spricht außerdem die unter dem Einfluss von Agrobakterien komplett erhaltene ABA-Aktivierbarkeit stabil eingebauter *RD29B::LUC*- bzw. *ATHB6::LUC*-Konstrukte in Zellkulturen (s. Abb. 3.41.). Eine mögliche Reaktion der Pflanzenzellen auf bakterielle Elicitoren wie Harpin, Flagellin oder Lipopolysaccharide wurde daraufhin als Ursache für die deregulierte Aktivierung der *RD29B*- und *ATHB6*-Promotoren in Zellsuspensionskulturen ausgeschlossen.

Somit liegt die Ursache für die in *Arabidopsis*-Zellkulturen herrschenden, ABA-induzierenden Bedingungen weder in der pflanzeigenen ABA-Produktion, noch in durch die Freisetzung agrobakterieller Substanzen in den Pflanzenzellen ausgelösten Mechanismen.

Die Präsenz der Agrobakterien verschlechtert zwar die Vitalität der Zellkulturen, hat aber keinen Einfluss auf die ABA-Induktion von bereits vorher integrierten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten. Der Verlust der Induzierbarkeit ABA-regulierter Konstrukte scheint vielmehr direkt mit dem Agrobakterien-vermittelten Gen-Transfer verbunden zu sein.

Als Ursache für die Deregulation von transient in Zellkulturen eingebrachten, ABA-regulierten Promotor-Reporter-Konstrukten kann die Intervention pflanzlicher Mechanismen vermutet werden, welche an der Regulation des Agrobakterien-vermittelten DNA-Transfers beteiligt sind. Zu diesen im Rahmen einer agrobakteriellen Infektion innerhalb der Pflanzenzelle ablaufenden Prozessen zählt unter anderem die Aktivierung jener pflanzlichen Gene, deren Produkte für den Transfer der agrobakteriellen T-DNA in den Kern der Pflanzenzellen benötigt werden (Veena et al., 2003).

Die durch Harpin-Proteine von *Erwinia amylovora* sowie durch Typ III-Effektorproteine (TTEs) von *Pseudomonas syringae* hervorgerufene Induktion der *ABI1*- und *ABI2*-Transkription deutet demnach auf eine Rolle der beiden, als zentrale Regulatoren der ABA-Signalübertragung geltenden PP2C Phosphatasen *ABI1* und *ABI2*, an den Prozessen der agrobakteriellen Infektion hin (Dong et al., 2005; Truman et al., 2006). Auch die im Vergleich zu Wildtyp-

Pflanzen erhöhte Anfälligkeit von *abi1*-Pflanzen bezüglich der Agrobakterien-vermittelten Transformation (Tao, 1999) könnte auf die Beteiligung von ABI1 an den, im Zuge einer Agrobakterien-Infektion eingeleiteten, pflanzlichen Prozessen hindeuten.

Da ABI1 die ABA-Induktion des *RD29B*-Promotors in Protoplasten (s. 3.1.3.) und transgenen Pflanzen (s. 3.1.11.) beeinflussen kann und auch eine Rolle bei der ABA-abhängigen Aktivierung des *ATHB6*-Promotors einnimmt (Himmelbach et al., 2002), könnte dieses, an der Regulation der Genexpression beteiligte Protein (Sheen, 1998) die Expression von Genen beeinträchtigen, die im Zuge einer Agrobakterien-Infektion in die Pflanzenzelle eingebracht werden. Da die im Rahmen dieser Systemetablierung ausgewählten, ABA-regulierten Reporter-Konstrukte außerdem Promotoren enthalten, die von ursprünglichen Zielgenen des ABI1-Effektors herrühren (*RD29B*, *ATHB6*), könnte es im Laufe eines, für die Übertragung der agrobakteriellen T-DNA in die Pflanzenzelle benötigten, ABI1-abhängigen Schrittes gleichzeitig zu einer ABI1-induzierten Aktivierung der aus Agrobakterien eingeschleusten Konstrukte kommen.

Die Beteiligung von PP2C Phosphatasen an den Prozessen des Agrobakterien-vermittelten T-DNA-Transfers in die Pflanzenzelle konnte bereits anhand der aus Tomate isolierten PP2C Phosphatase DIG3 gezeigt werden, welche als negativer Regulator auf den Kernimport des agrobakteriellen Komplexes aus VirD2-Protein und T-DNA einwirkt und deren Aminosäuresequenz zu 36% identisch ist mit der Aminosäuresequenz des ABI1-Proteins (Tao et al., 2004).

Neben der hier erwähnten, möglichen Beteiligung ABA-regulierter Faktoren könnten jedoch auch andere, von der ABA-Signaltransduktion gänzlich unabhängige, pflanzliche Prozesse am Vorgang der agrobakteriellen Infektion pflanzlicher Zellkulturen beteiligt sein. Die während der agrobakteriellen Übertragung regulierter Konstrukte auftretenden Probleme könnten demnach bspw. mit dem Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle, mit dem anschliessenden nukleären Import oder mit dem Einbau ins pflanzliche Genom verbunden sein.

Auf die Präsenz von, beim Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in Zellkulturen auftretenden Mechanismen, die mit der Regulation eingebrachter Gene negativ interferieren, deutet auch der in diesem System zu beobachtende

Verlust der Volicitin-abhängigen Induktion des transient eingebrachten *Igl*-Gens aus Mais hin (Kortes, 2003). Im Gegensatz dazu blieb jedoch die Induzierbarkeit von Salicylsäure-abhängigen Promotoren aus Tabak auch nach dem Agrobakterien-vermittelten DNA-Transfer erhalten; was eine Kartierung der für die Induktion verantwortlichen *cis*-Elemente ohne weiteres ermöglichte (Yang et al., 2000).

Aufgrund dieser für regulierte Promotoren erhaltenen, unterschiedlichen Ergebnisse infolge des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers muss vor der Anwendung dieses Systems dessen Eignung zur Untersuchung des jeweils ausgewählten Promotors spezifisch überprüft werden.

4.3. Funktionelle Analyse des Abscisinsäure-regulierten *ATHB6*-Promotors über Deletionsstudien in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Produktion von Abscisinsäure spielt eine wichtige Rolle bei der Adaptation von Pflanzen an äußere Umwelteinflüsse, wie Trocken- und Salzstress. Als Reaktion auf ABA werden Gene eingeschaltet, deren Produkte eine Toleranz gegen den abiotischen Stress etablieren (Zhu, 2002; Shinozaki et al., 2003). Modifikationen der Expression finden für diese regulierten Gene zum großen Teil auf der Ebene der Transkription statt (Calkhoven and Ab, 1996) und beruhen auf der Kombination verschiedener *cis*-Elemente sowie der Verfügbarkeit und Aktivität von den an sie bindenden Transkriptionsfaktoren (*trans*-Faktoren). Die Analyse der, an der Regulation der ABA-abhängigen Genexpression in *Arabidopsis* beteiligten *cis*- und *trans*-Faktoren leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Stresswirkung (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit der Charakterisierung des *ATHB6*-Promotors die ABA-abhängige Expressionsregulation des HD-Zip-Transkriptionsfaktors *ATHB6*, einem Interaktionspartner von *ABI1*, näher untersucht werden. Stabile *ATHB6::LUC*-Reporterlinien zeigten eine bis zu 2000-fache ABA-Induktion des Promotors, welche in *abi1*-Pflanzen bis auf 10% Restinduktion reduziert war und damit die Position von *ATHB6* unterhalb von *ABI1* innerhalb der ABA-Signaltransduktion festlegte (Himmelbach et al., 2002). Innerhalb des *ATHB6*-Promotors ist ein *cis*-Element kartiert worden, das für die Aktivierung der *ATHB6*-Expression durch das eigene Genprodukt verantwortlich ist (Himmelbach et al., 2002). Es sollten die für die in transgenen Pflanzen auftretende, starke ABA-Induktion verantwortlichen *ATHB6*-Promotorelemente identifiziert werden.

Der klassischen Vorstellung von Genexpression zufolge befinden sich die regulierenden *cis*-Elemente stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Guarente, 1988). Basale Promotorelemente sind meist innerhalb des direkt an den Transkriptionsstart anschließenden, etwa 300 bp langen Bereichs lokalisiert (Ohtsubo et al., 1993; Ellerstrom et al., 1996; Hong et al., 2000; Morikami et al., 2005), weitere *cis*-Elemente finden sich jedoch in größeren Entfernungen von

1 kb und mehr (Sarah et al., 1996; De Bellis et al., 1997). Um die ABA-regulierten *cis*-Elemente des bereits beschriebenen, 1,6 kb langen *ATHB6*-Promotors zu kartieren (Himmelbach et al., 2002), sollten vom 5'-Ende des Promotors fortschreitende Deletionen konstruiert und deren jeweils verbleibende ABA-Induzierbarkeit dokumentiert werden, vergleichbar der Identifizierung zweier INA-induzierbarer *cis*-Elemente (INA; 2,6-dichloroisonicotinic acid) im *PR1*-Promotor von *Arabidopsis* (Lebel et al., 1998). Da die ABA-induzierte Aktivierung des *ATHB6*-Promotors in *Arabidopsis*- und Mais-Protoplasten (Hoffmann, 2002) sowie infolge des Agrobakterienvermittelten Gentransfers in *Arabidopsis*-Zellkulturen (s. 3.2. und 4.2.) gestört ist, erfolgte die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte *ATHB6*-Promotorstudie in stabil transformierten Pflanzen.

Um innerhalb der Promotorsequenz vorhandene, potenziell ABA-regulierte *cis*-Elemente lokalisieren und die Positionen der Deletionsfragmente dementsprechend anpassen zu können, wurde der Promotor unter Nutzung der Transfac- und PLACE-Datenbanken nach bereits bekannten und für die beobachtete ABA-Induktion eventuell relevanten Elementen abgesucht (s. Abb. 4.4. bzw. <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/info.html> und <http://www.gene-regulation.com/>).

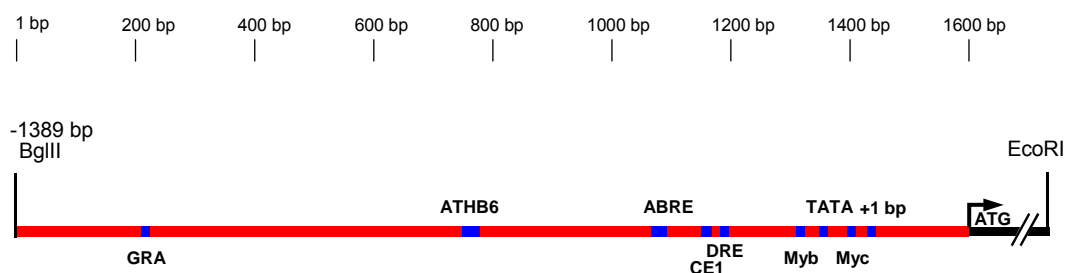


Abb. 4.4.: Putative Bindestellen für an der ABA-Signaltransduktion beteiligte Transkriptionsfaktoren innerhalb der *ATHB6*-Promotorsequenz. Die Analyse wurde mit Hilfe der PLACE- und der Transfac-Datenbank erstellt (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/info.html> bzw. <http://www.gene-regulation.com/>).

Verschiedene, innerhalb der Trockenstress-Signaltransduktion bereits beschriebene Motive, deren Sequenzen starke Ähnlichkeit mit innerhalb des *ATHB6*-Promotors gefundenen, putativen *cis*-regulatorischen Elementen haben, sind in Abb. 4.6. näher beschrieben. Ein Sequenzvergleich zwischen den im

Folgenden näher beschriebenen *cis*-Elementen und den entsprechenden Bereichen des *ATHB6*-Promotors ist dem Anhang 5.2. zu entnehmen.

Zu den potenziell innerhalb der *ATHB6*-Promotorsequenz vorhandenen Motiven gehört unter anderem das *GRA*-Element (*GRA*, *GC-rich rab activator*) des *Rab17*-Promotors aus Mais, welches die ABA-abhängige Transkriptionsaktivierung des *Rab17*-Gens in Blättern reguliert (Busk et al., 1997). Das innerhalb der *ATHB6*-Sequenz gefundene, dem *GRA*-Motiv ähnelnde Element, befindet sich 1200 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (s. Anhang 5.2.) und überlappt mit einer Sequenz, welche Übereinstimmungen mit dem als *motif II* bezeichneten, innerhalb der ABA-regulierten *RAB16*-Familie aus Reis hoch konservierten Motiv zeigt (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1990).

NAME	BINDEMOTIV	BESCHREIBUNG/ERKENNUNGSSEQUENZ
GRA:	CACTGGCCGCC	Motiv aus dem ABA-responsiven Promotor des <i>RAB17</i> -Gens in Mais (Busk et al., 1997)
MOTIF II:	CGCCGCGCTG	konserviertes Motiv in den ABA-regulierten Promotoren der <i>RAB16</i> -Genfamilie (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1990)
ABRE	ACGT	Promotor-Motiv zur ABA-abhängigen Transkriptionsinduktion (Hattori et al., 2002)
CE1:	TGCCACCGG	Motiv aus dem ABA-regulierten Promotor des <i>HVA22</i> -Gens in Gerste (Niu et al., 2002)
MYB/MYC:	YAACKG/CANNTG	Transkriptionsfaktoren, die als Antwort auf abiotischen Stress hin aktiviert werden (Abe et al., 2003)

Abb. 4.5.: Auflistung von potenziell im *ATHB6*-Promotor vorhandenen *cis*-Elementen stressabhängiger Transkriptionsfaktoren mit jeweiliger Sequenz und entsprechender Referenz. Die Positionen und Sequenzen der diesen Motiven entsprechenden, putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb des *ATHB6*-Promotors sind im Anhang 5.2. angezeigt.

Zusätzlich konnte 200 bp stromaufwärts des *ATHB6*-Transkriptionsstarts ein dem *CE1*-Element aus Mais entsprechender Bereich ausgemacht werden, welches als Bindestelle für einen als *ABI4*-Homolog beschriebenen Transkriptionsfaktor fungiert (Niu et al., 2002). Zusammen mit der 100 bp stromaufwärts lokalisierten *ABRE*-Kernsequenz könnte dieses *CE*-Element als ABA-responsiver Komplex (Shen et al., 1996) die ABA-Regulation des *ATHB6*-Promotors steuern.

Als weitere potenzielle Erkennungsmotive für an der ABA-abhängigen Genexpression beteiligte Transkriptionsfaktoren könnten die 20 bp bzw. 60 bp stromaufwärts der *ATHB6-TATA*-Box als mögliche MYB- bzw. MYC-Bindestellen identifizierten Sequenzen dienen (Abe et al., 2003).

Zur Bestätigung bzw. Identifizierung der für die ABA-abhängige *ATHB6*-Promotorregulation verantwortlichen Elemente wurden sieben Promotorfragmente erzeugt, die gleichmäßig vom 5'-Ende aus um jeweils ca. 250 bp verkürzt und als *ATHB6*-Promotor-*LUC*-Konstrukt jeweils in *Arabidopsis*-Pflanzen vom Ökotyp RLD eingebracht wurden. Alle aus einem ersten Transformationsansatz hervorgegangenen, unabhängigen Transformanten zeigten jedoch eine, selbst im Falle der ursprünglichen, 1,6 kb langen Promotorversion beobachtbare Aufhebung der ursprünglich beschriebenen, starken ABA-Induktion des *ATHB6*-Promotors.

Als Ursache für die Deregulation des Promotors wurde die Anwesenheit einer in dem verwendeten Vektor pPCV812Meshi zwischen *LUC*-Gen und *ATHB6-TATA*-Box geschalteten Sequenz für die Störung der *ATHB6*-Promotorregulation in den generierten transgenen Pflanzen vermutet, welche die dem Luciferase-Gen vorgeschaltete 5'-UTR gegenüber dem ABA-induzierbaren *ATHB6::LUC*-Ausgangskonstrukt um 165 bp verlängerte.

Da die 5'-UTR oftmals essentielle Elemente enthält, welche unter anderem für die Bildung von Protein-RNA-Komplexen benötigt werden und somit - wie unter anderem in Spinat Chloroplasten gezeigt - eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und Translation von mRNA übernehmen (Merhige et al., 2005), könnte eine Veränderung dieser Sequenz die ABA-abhängige Expression des *ATHB6*-regulierten Reportergens entscheidend beeinflussen. Die Verlängerung einer 5'-UTR-Sequenz über ihre ursprüngliche, endogene Länge hinaus kann sogar, wie im Fall der Expression des plastidären *accD*-Gens aus Tabak, die Transkriptionseffizienz des nachgeschalteten Gens deutlich herabsenken (Hirata et al., 2004).

Aufgrund der für die ABA-Regulation des *ATHB6*-Promotors als inhibierend betrachteten Verlängerung der 5'-UTR, erfolgte die Klonierung der *ATHB6*-Promotordeletionen in einem zweiten Anlauf in den für die Untersuchung ABA-regulierter Promotoren geeigneten Vektor pBI121-*LUC*. Somit wurden die

gleichen Bedingungen geschaffen wie für das ursprünglich als ABA-induzierbar beschriebene, *ATHB6*-Promotor-Volllängenfragment (Himmelbach et al., 2002).

Die Tatsache, dass sowohl diese neu generierten *ATHB6::LUC*-Kassetten als auch das ursprünglich ABA-induzierbare *ATHB6::LUC*-Ausgangsplasmid in transgenen Pflanzen keine ABA-Induktion des *ATHB6*-Promotors zeigten, führte zum Ausschluss eines Vektor-abhängigen Problems als Ursache für die *ATHB6*-Deregulation. Vielmehr deuteten anschließende Untersuchungen der *ATHB6*-Promotorinduktion im homozygoten, genetischen Hintergrund von RLD-Pflanzen, die eine auf 10% der für Columbia-Keimlinge beobachteten ABA-abhängigen *ATHB6*-Promotoraktivierung ergaben, auf eine ökotypische Abhängigkeit der *ATHB6*-Promotorregulation hin.

Diese Vermutung wurde durch den Befund bestätigt, dass keine der bis dahin im Rahmen dieses Projektes als ABA-induzierbare Kontrollen verwendeten Linien über den genetischen Hintergrund von RLD-Pflanzen verfügte: alle als Positivkontrollen verwendeten *HB6::LUC*-Pflanzen bzw. Kreuzungen wiesen Columbia bzw. La-er-Hintergrund auf.

Demnach scheint die beobachtete, hohe ABA-Induzierbarkeit des *ATHB6::LUC*-Konstruktes (Himmelbach et al., 2002) vom *Arabidopsis*-Ökotyp abhängig sein: während im Columbia-Hintergrund eine starke ABA-abhängige Regulation des *ATHB6*-Promotors erreicht werden kann, zeigt sich für entsprechende Konstrukte im RLD-Hintergrund nur eine schwache bzw. keine ABA-abhängige Aktivierung.

Ökotypische Unterschiede bezüglich der Genregulation in *Arabidopsis* konnten zumindest für La-er- und Columbia-Pflanzen bereits mehrfach beobachtet werden. So wurden bei *Arabidopsis* für 1316 von 4876 ausgewählten Genen signifikante Differenzen bezüglich der Transkription in La-er- bzw. Columbia-Pflanzen nachgewiesen (Vuylsteke et al., 2005). Ein Beispiel für die unterschiedliche Gen-Regulation im La-er- bzw. Columbia-Hintergrund ist die unter 4.1. bereits erwähnte ABA-abhängige Reprimierung der *ABI8*-Transkription, welche im Columbia-Hintergrund stattfindet, in La-er-Pflanzen jedoch nicht zu beobachten ist (Brocard-Gifford et al., 2004).

Um bei einer erneuten Studie der ABA-abhängigen *ATHB6*-Promotorregulation die mit einer ökotypisch differenzierten Regulation des *ATHB6*-Gens

verbundenen Komplikationen zu umgehen, sollte die funktionelle Analyse des Promotors demnach in den, sich bezüglich der ABA-Induzierbarkeit des *ATHB6*-Promotors als unproblematisch erwiesenen Columbia-Pflanzen durchgeführt werden.

4.4. Untersuchung von *in vivo* stattfindenden Interaktionen zwischen Komponenten des ABA-Signalnetzwerkes über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation

Die bisher ausschließlich in Pflanzen gefundenen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine DNA-bindende Homöodomäne und ein direkt an diese Homöodomäne folgendes Leucin-Zipper-Motiv aus. Durch hydrophobe Wechselwirkungen, häufig durch eine hohe Anzahl an Leucin-Resten sind diese Proteine in Form einer Doppelwendel zu reiverschlussartigen Dimeren verbunden (Siberil et al., 2001).

Die Ausbildung von Hetero- und Homodimeren zwischen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren wurde bereits mehrfach belegt. Allein in der im Rahmen dieser Arbeit näher betrachteten HD-Zip Klasse I kommt es zur Ausbildung von Heterodimeren zwischen dem Transkriptionsfaktor ATHB5 und den zur gleichen Klasse gehörenden Proteinen ATHB6, ATHB7, ATHB12 und ATHB16 (Johannesson et al., 2001), sowie zwischen ATHB7 und ATHB6 bzw. ATHB16. ATHB5 ist außerdem zur Bildung von Homodimeren befähigt (Wang, 2001; Tang, 2003). Daneben können auch HD-Zip-Transkriptionsfaktoren der Klasse II, wie zum Beispiel ATHB1 und ATHB2 Homodimere ausbilden (Sessa et al., 1993, 1997) und sogar mit HD-Zip-Proteinen anderer Spezies interagieren, wie es für das ATHB2-Protein aus *Arabidopsis* und das OsHox1-Protein aus Reis bereits gezeigt wurde (Meijer et al., 1997).

Alle hier erwähnten Dimerisierungen wurden jedoch bisher nur *in vitro* gezeigt. Als einzige Ausnahme gilt die von Y. Tang (2003) *in vivo* ber *yeast two-hybrid* Assay nachgewiesene, vom Leucin-Zipper-Motiv abhängige Interaktion zwischen ATHB6 und ATHB7. Die aufgrund von *in vitro* Bindungsassays postulierte Interaktion zwischen ATHB5 und ATHB6 (Johannesson et al., 2001) konnte hingegen im Hefe-System nicht bestätigt werden (Tang, 2003).

Verschiedene Methoden zur *in vivo* Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden bereits entwickelt. Hierzu zählt das oben erwähnte *yeast two-hybrid* System, welches neben den häufig auftretenden, falsch-positiven bzw. falsch-negativen Interaktionen auch den Nachteil der heterologen Bedingungen besitzt (Fields and Song, 1989; Stephens and Banting, 2000). Auch die weit verbreitete Methode zur

Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) birgt Komplikationen: so gelten hohe Expressionslevel der Interaktionspartner und eine enge, räumliche Nähe der GFP-Fluorophore als Voraussetzung für die erfolgreiche, quantitative Detektion von Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Chen et al., 2003). Weitere Ursachen für die bisher relativ schwach verbreitete Anwendung von FRET zum Nachweis pflanzlicher Protein-Interaktionen (Aker et al., 2006; Huang et al., 2006) sind das im Rahmen von Untersuchungen auftretende Ausbleichen der Proben sowie die komplizierte Handhabung des Systems.

Als bisher einziger, kernlokalisierter Interaktionspartner von ABI1 unterstreicht der HD-Zip-Transkriptionsfaktor ATHB6 die im ABA-Signaltransduktionsnetzwerk für ABI1 postulierte Notwendigkeit einer Kernlokalisierung. Mit dem Nachweis zusätzlicher, im Nukleus stattfindender Interaktionen zwischen der PP2C Phosphatase und Transkriptionsfaktoren, oder anderen Modulatoren der Genexpression könnten Komponenten der ABA-Signaltransduktion identifiziert werden, die für die direkte Übertragung des ABA-Signals auf die Genexpression verantwortlich sind. Nachdem derartige Protein-Protein-Interaktionen bisher, wie die Wechselwirkung zwischen ABI1 und ATHB6, nur über *yeast two-hybrid screening* und *in vitro* Bindungsassays nachgewiesen wurden, besteht nun durch die Methode der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) die Möglichkeit, bereits detektierte Interaktionen durch ein einfach zu handhabendes, transientes System *in planta* zu bestätigen. Auch bis dahin unbekannte Wechselwirkungen zwischen Proteinen können auf diese Weise direkt unter physiologischen Bedingungen detektiert und subzellulär lokalisiert werden, wie die Charakterisierung von G-Protein-Komplexen in Säugetierzellen zeigt (Tsuchisaka and Theologis, 2004).

Wie der Nachweis der Homodimerisierung für das Leucin-Zipper-Protein bZIP63 aus *Arabidopsis* zeigt (Walter et al., 2004), kann die Methode der BiFC auch zur Detektion nukleärer Interaktionen im transienten Protoplasten-System verwendet werden, weshalb es im Rahmen dieser Arbeit für die *in planta* Bestätigung der oben beschriebenen Homo- und Heterodimer-Bildungen zwischen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren, aber auch zur Verifizierung der in

Hefe gezeigten ABI1-ATHB6-Interaktion (Himmelbach et al., 2002) herangezogen wurde.

Neben der Bestätigung der in Hefe bereits beobachteten Heterodimerisierung zwischen ATHB6-ATHB7 konnte dabei sowohl für ATHB6 als auch für ATHB7 eine bis dahin nie diskutierte Ausbildung von Homodimeren beschrieben werden (s. Abb. 3.50.). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund der autoaktivierenden Wirkung von ATHB6 im *yeast two-hybrid* System stets C-terminal deletierte Versionen dieses Proteins eingesetzt werden (Tang, 2003). Das durch die Homo- bzw. Heterodimer-Bildung der ATHB6- und ATHB7-Proteine emittierte YFP-Signal war in jedem Fall ausschliesslich auf den Kern beschränkt, welcher für die drei Transkriptionsfaktoren auch als Hauptwirkungsort postuliert wird.

Zusammen mit den bereits erwähnten HD-Zip-Dimerisierungen deuten die durch bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation neu gewonnen Erkenntnisse auf eine hohe Komplexität bezüglich der Interaktionen zwischen HD-Zip-Transkriptionsfaktoren und bezüglich der durch diese Proteine gesteuerten Transkriptionsregulation hin. So wird für die zahlreichen HD-Zip-Homo- und Heterodimere der Zusammenschluss zu einem komplexen Netzwerk von Transkriptionsfaktoren postuliert, dessen kombinatorische Transkriptionskontrolle der Pflanze die Feinabstimmung ihres vegetativen Wachstums mit den durch Wasserverfügbarkeit und Lichtverhältnisse bestimmten, äußeren Bedingungen ermöglichen und sie somit, auch im Rahmen der ABA-Signalübertragung, äußerst differenziert auf wechselnde Einflüsse reagieren lassen (Henriksson et al., 2005).

Neben den Wechselwirkungen innerhalb der HD-Zip Klasse I wurde auch die Interaktion zwischen ABI1 und ATHB6 bzw. zwischen *abi1* und ATHB6 über bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation überprüft. Dabei konnte in wenigen unabhängig transformierten Protoplasten ein in Kern und Cytoplasma gleichermaßen verteiltes YFP-Signal beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass zumindest ein Teil der durch die Interaktion der Phosphatase ABI1 mit dem Transkriptionsfaktor ATHB6 gesteuerten Prozesse im Cytoplasma abläuft.

Ähnlich wie die bereits beschriebene Regulation der Genexpression durch die Retention von Transkriptionsfaktoren in intrazellulären Membranen oder im Cytosol (Kaffman and O'Shea, 1999; Brown et al., 2000), könnte die cytosolische Interaktion von ABI1 und ATHB6 auch Teil eines Regulationsmechanismus für die *ATHB6*-abhängige Genexpression sein.

Eine im Cytosol stattfindende Interaktion wird bereits aufgrund von histochemischen Untersuchungen und *yeast two-hybrid* Studien für ATHB6 und die als cytosolisches Anker-Protein des Transkriptionsfaktors postulierte GlutamyI-tRNA-Synthetase (GluRS) vermutet (Tang, 2003). Da die im Cytosol lokalisierte GluRS im *yeast two-hybrid* außerdem mit ABI1 interagiert und die *trans*-Faktor-Wirkung von ATHB6 inhibiert (Tang, 2003), könnte die im BIFC-System beobachtete, cytosolische Interaktion zwischen den negativen Regulatoren der ABA-Signalübertragung, ATHB6 und ABI1, auf die Bildung eines Komplexes zwischen ABI1, ATHB6 und GluRS zurückzuführen sein, welcher die ABI1-gesteuerte Translokation von ATHB6 in den Nukleus in Abhängigkeit von ABA regulieren würde.

Um dieses Modell zu bestätigen bedarf es jedoch weitererführender Untersuchungen bezüglich der in *planta* Interaktionen zwischen ABI1 und ATHB6, ATHB6 und GluRS, sowie zwischen ABI1 und GluRS, welche auch unter Nutzung des BIFC-Systems durchgeführt werden könnten.

5. Anhang

5.1. Oligonukleotide

In der folgenden Aufzählung sind die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide (*primer*) aufgeführt. *Sense-Primer* (*forward Primer*) sind durch die Abkürzung „fwd“, *antisense-Primer* (*reverse Primer*) durch „rev“ gekennzeichnet. In den Oligonukleotiden enthaltene Restriktionsschnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben und im Namen des jeweiligen Primers enthalten.

Amplifikation und Klonierung der ABI1/abi1 Sequenz in pBI221/pSK:

ABI1BamHI-fwd: 5'-CTA GGA TCC ATG GAG GAA GTA TCT CCG GC-3'

ABI1Eco147I-rev: 5'-TAG GCC TAG TAC TAG TTC AAG GGT TTG CTC TTG-3'

Amplifikation und Klonierung der ABI1/abi1Sequenzen in pBI221GFP-fusion bzw. pBI121GUSnoSTOP:

ABI1XhoI-fwd: 5'-AAT TCC **TCG AGG** GAA GTA TCT CCG GC-3'

ABI1XhoI-rev: 5'-GTA **CTC GAG** TCA GTT CAA GGG TTT GC-3'

abi1dnlsstopXhoI-rev: 5'-GTA **CTC GAG CTC** TCA CAC ACT TAT GTT GTC
TTT GC-3'

ABI1nlsXhoI-rev: 5'-CCC **CTC GAG** TCA GTT CAA GGG TTT GCT CTG
CAG ATT ATT CTG AGG CTT C-3'

Amplifikation von GFPnoSTOP aus pBI221GFP-fusion:

GFPnoSTOPXhoI-rev: 5'-CGA GCT **CGA GTT** GTA TAG TTC ATC CAT GC-3'

GFPnoSTOPXhoISmaI-rev: 5'-GGG GCT **CGA GTT** GTA TAG TTC ATC CAT GC-3'

GFPBamHI-fwd: 5'-GGC GGG ATC CAT GAG TAA AGG AGA AGA AC-3'

Modifikation der GUS-Sequenz für GUS-ABI1/abi1 Fusionen in pBI221/121:

GUSG1-fwd: 5'-CGT GCT GAT GGT GCA CGA CC-3'

GUSG2-rev: 5'-ACT GCT **CGA GCA** TTG TTT GCC TCC CTG-3'

Amplifikation von 35SS1-GFP-Fusion-Nos-Kassetten aus pBIGFP-fusion zur anschließenden Ligation in pBI121Ascl:

35SS1Ascl-fwd: 5'-TTG **GCG CGC** CTC TAG ATT CAT TAA TGC AG-3'
 NOSterAscl-rev: 5'-TTG **GCG CGC** CCC CGA TCT AGT AAC ATA GAT G-3'

RT-PCR-Analyse von ABA-regulierten Genen:

Actin-fwd: 5'-TGG GAT GAC ATG GAG AAG AT-3'
 Actin-rev: 5'-ATA CCA ATC ATA GAT GGC TGG-3'.
 RAB18-fwd: 5'-GCG TCT TAC CAG AAC CGT-3'
 RAB18-rev: 5'-GAA GCA TTC CTC CCA AGC-3'
 RD29B-fwd: 5'-CCC TGT AAA AGA TGA AAC TCC GAG-3'
 RD29B-rev: 5'-CCC AAT CTC TTT TTC ACA CAA AG-3'
 At3g61890-fwd: 5'-CAG CGA GAT TAG TAG TGG CA-3'
 At3g61890-rev: 5'-GTA ATT GCT GCT AGA TTG GTC-3'
 At4g18160-fwd: 5'-CAA TAC ATG ATT AGC CCG AG-3'
 At4g18160-rev: 5'-ACT GTT TGG AGT GAT GAC TCC-3'
 At5g57520-fwd: 5'-CCA AAC ACA TCC CTA CGT CT-3'
 At5g57520-rev: 5'-GCC GTG TGC CGG AGA GTG GT-3'
 HB6BamHI-fwd: 5'-**CGG GAT CCT** AAT GAT GAA GAG ATT AAG TAG-3'
 HB6BamHI-rev: 5'-**CGG GAT CCT** GCA GTC AAT TCC AAT GAT CAA CG-3'
 At2g22770-fwd: 5'-TGG ATT TGA TGA TCG ACA CTG-3'
 At2g22770-rev: 5'-CTG CTC TTC TTC CTG GCC TCA-3'
 At4g43600-fwd: 5'-CTA TCT CAA CCC CAT TCT GG-3'
 At4g43600-rev: 5'-CAG GAT CGA ACT TGG AGA GAA-3'
 At3g09340-fwd: 5'-TTC TTC ACT TGA AAG GAG AC-3'
 At3g09340-rev: 5'-CACTGA CGA CAT GAT TCT GA-3'

Amplifikation von 5'-Deletionen des ATHB6-Promotors zur Klonierung in pPCV812Meshi-LUC:

Δ1-1389 5'-CAG AGC **TCG AGA** TCT CTC GCG ACC CAA TAT C-3'
 Δ2-1171 5'-CAG AGC **TCG AGG** AAT GCT CTT TGC AGG CC-3'
 Δ3-909 5'-CAG AGC **TCG AGT** TAT CAA TGG ATG ATA CCG G-3'
 Δ4-701 5'-CAG AGC **TCG AGG** AAA GTC ATC ACC CTA TAA C-3'
 Δ5-487 5'-CAG AGC **TCG AGT** AAC CAA TTT TGT TAC ACA C-3'
 Δ6-279 5'-CAG AGC **TCG AGC** CAT ATT ATA TCC GTT TGA G-3'
 Δ7-35 5'-CAG AGC **TCG AGA** CCA AGC TTG TTC ATA TGG-3'

rev+171 5'-GTC GAA **GAT CTA GAC** AAC AAT CTT TAA TTA CTT TCG-3'

Die Restriktionsschnittstellen für XhoI (Primer $\Delta 1-\Delta 7$) bzw. BglII (Primer rev +171), welche zur Klonierung der Fragmente in pPCV812Meshi-*c-myc-LUC* verwendet wurden, sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Für die Klonierung dieser Promotorfragmente in pBI121 wurden dieselben genspezifischen Abschnitte der Primer verwendet, die Restriktionsschnittstellen-Überhänge wurden jedoch gegen SacI- (*forward* Primer $\Delta 1-\Delta 7$) bzw. BamHI-Schnittstellen (*reverse* Primer rev+171) ausgetauscht.

Unterscheidung zwischen den Arabidopsis-Ökotypen Columbia bzw. Landsberg erecta und RLD durch den CAPS-Marker RPS4-NT:

RPS4-NT-primer1: 5'-TCA TCA ATT TTC CGT GGG GCA-3'

RPS4-NT-primer2: 5'-GGT ACC TTT TCT TGT CAA TG-3'

Das erhaltene, 420 bp lange PCR-Produkt kann bei der Verwendung von RLD-DNA durch XhoI in zwei 210 bp lange Fragmente gespalten werden. Das entsprechende, aus genomischer DNA von *Landsberg erecta* bzw. Columbia hervorgehende PCR-Produkt bleibt dagegen unverdaut.

Amplifikation codierender Sequenzen zur Klonierung in die YFP-Fusionsvektoren pSPYNE-35S/pUC-SPYNE und pSPYCE-35S/pUC-SPYCE:

ABI1-BamHIY-fwd: 5'-CTA **GGA TCC** ATG GAG GAA GTA TCT CCG GC-3'

ABI1-XhoIYnoSTOP-rev: 5'-AAT TCG **CTC GAG** GTT CAA GGG TTT GCT CTT G-3'

HB6-BamHIY-fwd: 5'-CGG **GAT CCT** ATG ATG AAG AGA TTA AGT AGT-3'

HB6-XhoIYnoSTOP-rev: 5'-ATT **CTC GAG** ATT CCA ATG ATC AAC GGT GG-3'

GluRS-BamHI-fwd (Y. Tang) 5'-CGA ATT CCC **GGA TCC** TAT GGA TGG GAT GAA
GCT TTC-3'

GluRS-SmaIYnoSTOP-rev: 5'-ATT **CCC GGG** CTT AGC GGC TCT TCC ATC TGG-3'

HB5-BamHI-fwd: 5'-CGC **GGA TCC** ATG AAG AGA TCA CGT GGA AG-3'

HB5-XhoI-YnoSTOP-rev: 5'-CCG **CTC GAG** CGA ATT CCA CTG ATC GGA G-3'

HB7-BamHIY-fwd: 5'-CGC **GGA TTC** ATG ACA GAA GGT GGA GA-3'

HB7-XmaIYnoSTOP-rev: 5'-TCC **CCC CGG** GTG ACC AAA AAT CCC GCC AA
G-3'

5.2. Sequenz des *ATHB6*-Gens aus *Arabidopsis* (Ökotyp Columbia) mit Positionen der *ATHB6*-Promotor-Primer ($\Delta 1$ - $\Delta 7$) zur Erzeugung von *ATHB6*-Promotor-Deletionsfragmenten

Die Primer $\Delta 1$ - $\Delta 7$ sind mitsamt ihren XhoI- bzw. BglII-Überhängen durch Unterstreichen und Fettdruck hervorgehoben, wobei der fettgedruckte Bereich die *annealing* Sequenz kennzeichnet. Die Primer-Bezeichnungen sind blau hervorgehoben. Der schwarze Bereich kennzeichnet den *ATHB6*-Promotor, von dem die 5'-UTR durch rote Markierung abgegrenzt ist. Innerhalb des offenen Leserasters von *ATHB6* sind die Exons orange und die Introns violett markiert (die Farben wurden entsprechend den Kennzeichnungen in <http://arabidopsis.org> gewählt). Aus Platzgründen wurde das *ATHB6*-Gen am 3'-Ende um 300 bp verkürzt. Der grau hinterlegte Thymin-Rest an Position 408 (entspricht Position -981 relativ zum Transkriptionsstart), welcher in Thomas Hoffmanns *HB6*-Promotor (2002) entsprechend der in den Datenbanken vorgegebenen Promotorsequenz vorhanden ist, wird in dem von Olav Groß (2003) klonierten *HB6*-Promotorfragment durch einen Guanin-Rest ersetzt.

Die in Abb. 4.6. aufgeführten, putativen Bindemotive stressabhängiger Transkriptionsfaktoren innerhalb der *ATHB6*-Promotorsequenz sind hier gelb hinterlegt. Zum Sequenzvergleich mit bereits bekannten Elementen sind deren Sequenzen und Bezeichnungen unmittelbar über den potenziellen *ATHB6*-Elementen aufgeführt: Abweichungen sind in Großbuchstaben, Übereinstimmungen klein geschrieben.

```

bp           XhoI
cagagCTCGAG  $\Delta 1$  -1389
1      atctctcgcg acccaatatc ctgacttaac agtataatta ccggatttag tgtgagacca
61     gctaaagcca tcaactcaagt aggtacgact tgggcgaatc cctaaaatga gtggaatatac
121    aacgggatcg atcagtgctt ggagacggtc caatttcac  aaatttgtgt tttggtcaat
                                           Motif II gccgcgcT
                                           cagagCTCGAG  $\Delta 2$  -1171
                                           GRA CAcTggccgcCc
181    taaatcattg acatagagta gagaatctct tatgttaaga atgctctttg caaggccgcgc
241    gaggatagtg ggaatccatg gatctttcca tacgcgagtc agcattccag aacctatggt
301    cctccgaaat ccaaagacaa gaagaggttt ggcgcatttt cacctctaaa ataaacacaa
361    tttcatgttg atattaaggt tgttagtttc gatccaaaag aattattttg actatagtta
421    agatgatggt atacctaaaa aatataatth acattttata aagaaaacaa actaattata

cagagCTCGAG  $\Delta 3$  -909
481    ttatcaatgg atgataccgg atataggaac ttataaggtg aaaaaaatca aagaaccaa
541    aacccaaaaa ctttccaaat atataagaga atataaatat gttttggaga atcaaaagaa
601    cctaacccaa ataaaaagaa agcaaaaaac tcaactctgt tgctgtcatc gaggcccaa

```

cagagCTCGAG Δ4 -701

661 agctcttgtc tcatttttgc attgccacga **aagtcacac cctataactt** taattataa
 HB6 Bindemotiv

721 attttttaat gggttagaga aaataaaaaa cgcataaat **ccaattatta** caactttaac
 781 aaattaaaga agacatgatg attagattac catgcgaata agacaaacat attttgtaaa
 841 atggtgtcaa aaaaatatct ctaaagcatt catgatttta gcatthaaca aaataattct

cagagCTCGAG Δ5 -487

901 **gataaccaat tttgttacac act**tactataa aacttctaaa cacaatattg tgatgttata
 961 ataactttta catggtgaat agacaatttc aaaagattaa taaaagaaa actcgattat
 ABRE-Core-Sequenz acgt

1021 tcaattttta aaaatagatt attaatttaa cacagagatt cctttcc**acg** t atagcttga

cagagCTCGAG Δ6 -279

1081 gtggagctga gccgattagt ataagccgag **ccatattata tccgtttgag** attaatttta
 CE1 tgCCaccgg

1141 ttttaattga ttttttaatc ttctcttaca cgagttccag **tgataccgga** agaaacctgg
 1201 aggtaactgg gtatagccgg tggacccct caaatttatt ttaacaaaa aaaaaaatc
 1261 atttacaanaa gaaaacacc aagacaatat ctacttaacc atggttactt tctaaccnaa
 Myb YAACK G

cagagCTCGAG Δ7 -35 Myc CAN NTG

1321 cctttgagtt **TATTTAAact** gagagaaagt gtga**aacnaa gcttgttcat atgg**aaaacg
 1381 ctcatcaac+1
 c tcaacaatct ctctctctc tctctctgta tatagaagaa tctccattgt

1441 **ctttaatttc tctccatttc tctttctctc ttcttcaaa gttttctctt ttcttgatgg**
 1501 **gtttaagaga gtaaagatca tcaagtacta tgcattaaat tgagaagtta ttaaaaattt**

+192 BglII XbaI

gctttcatta atttctaaca acAGATCTAGAagctg

1561 cgaaagtaat taaagattgt tg

atgatgaa gagattaagt agttcagatt cagtgggtgg

1621 tctcatctct ttatgtccta caacttcac aggtacttag ctaattttct aaacaagtcc
 1681 ttttaattaat ctcacttttg tttgctaatt gttcttctta tgggaattaca gatgagcaga
 1741 gtccgaggag atacgggtgg agagagtttc agtcgatgct tgaaggatac gaggaagaag
 1801 aagaagctat agtagaagaa agaggacacg tgggcttgct ggagaagaag agaaggttaa
 1861 gcattaacca agttaaagct ttggagaaga attttgagtt agagaataag cttgagcctg
 1921 agaggaaagt taagttagct caagaacttg gtcttcaacc tctcaagtt gctgtttggt
 1981 ttcaaaaccg tctgtctcgg tggagacaa aacagcttga gaaagattac ggtgttctta
 2041 aaaccagta cgattctctc cgtcataact ttgattccct cgccttgac aatgaatctc
 2101 tccttcaaga ggtataaaaa ttcaacttt ttgataaaa attgaaactt ttgttgatc
 2161 aaagttaaaa aaattgaaac tttttacca tcttgagatt tacaagagaa ttgaaactta
 2221 tggttttggt ttgatgcaga ttagttaact gaaaacgaag cttaatggag gaggaggaga
 2281 agaagaagaa gaagagaaca acgcgccggt gacaacggag agtgatatt cggccaagga
 2341 ggaagaagtt tctgtcccg agaagattac agaggcaccg tctctctctc cacagtttct
 ...

2641 ctccaccggt gatcattgga at**tga**

5.3. Plasmide und ihre Registrierung in der Stammsammlung

In der folgenden Tabelle sind die für Klonierungen, Transformation und Transfektion genutzten Vektoren, sowie die Nummer der entsprechenden Agrobakterien (AT)- und *E. coli*. (EC)-Stämme dargestellt. Zweitausführungen der Stämme sind in Klammern angegeben. Die Stämme werden als Glycerolstocks bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Konstrukt	Organismus	Nummer in Stammsammlung
-	DH5 α , EC	62
pBI121	DH5 α , EC	812
pBI221	DH5 α , EC	813
pBI121	C58 pGV3850, AT	814 (393)
pPCV812Meshi-35S:: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	885
pMP90RK, pPCV812 (HiAGUS)	C58 pGV3101, AT	825 (834)
pMP90RK	C58 pGV3101, AT	844
pMP90	C58 pGV3101, AT	845
pSKAscl <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7)	DH5 α , EC	897-903
pPCV812Meshi- <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	967-990
pPCV812Meshi- <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i>	C58 pGV3101, AT	991-1008
pSKAscl <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	1138-1149
pBI121 <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	1150-1165
pBI121 <i>ATHB6</i> (Δ 1- Δ 7):: <i>LUC</i>	C58 pGV3101, AT	Box TH -80 °C Agros
pBI22135S:: <i>ABI1</i>	DH5 α , EC	1102 (1103)
pBI22135S:: <i>abi1</i>	DH5 α , EC	1104 (1105)
pBI22135S:: <i>ABI1NAP</i>	DH5 α , EC	1106 (1107)
pSK35S:: <i>ABI1mtNLS</i>	DH5 α , EC	860 (861)
pSK35S:: <i>abi1mtNLS</i>	DH5 α , EC	862
pSKAscl <i>RAB18</i> :: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	878 (879)
pSKAscl <i>RD29B</i> :: <i>LUC</i>	DH5 α , EC	880 (881)
pBI121Ascl <i>RD29B</i> :: <i>LUC</i>	C58 pGV3101, AT	398 (+ Box TH Agros)
pBI121Ascl <i>HB6</i> :: <i>LUC</i>	C58 pGV3101, AT	396 (+ Box TH Agros)
pSK35S Ω :: <i>GUS</i>	DH5 α , EC	883 (882)
pBI22135SS1:: <i>GFPnoSTOP</i>	DH5 α , EC	940 (941)
pBI22135SS1:: <i>GFP-ABI1</i>	DH5 α , EC	943
pBI22135SS1:: <i>GFP-abi1</i>	DH5 α , EC	944

pBI22135SS1::GFP-GUS	DH5 α , EC	945
pBI22135SS1::GFP-ABI1dNLS	DH5 α , EC	947
pBI22135SS1::GFP-abi1dNLS	DH5 α , EC	1179 (1180)
pBI22135SS1::GFP-ABI1mtNLS	DH5 α , EC	1188 (1189)
pBI22135SS1::GFP-abi1mtNLS	DH5 α , EC	1012 (1013)
pBI22135SS1::GFP-HB6	DH5 α , EC	951 (950)
pBI121Ascl35SS1::GFP-ABI1	DH5 α , EC	1216
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1	DH5 α , EC	1217 (1218)
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1dNLS	DH5 α , EC	1219
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1mtNLS	DH5 α , EC	1220
pBI121Ascl35SS1::GFP-HB6	DH5 α , EC	1225 (1226)
pBI121Ascl35SS1::GFP-ABI1	C58 pGV3101, AT	1228 (1229)
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1	C58 pGV3101, AT	1230 (1231)
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1dNLS	C58 pGV3101, AT	1233 (1234)
pBI121Ascl35SS1::GFP-abi1mtNLS	C58 pGV3101, AT	1235
pBI121Ascl35SS1::GFP-HB6	C58 pGV3101, AT	1236
pBI22135S::GUS-ABI1	DH5 α , EC	1009
pBI22135S::GUS-abi1	DH5 α , EC	1011
pBI12135S::GUS-ABI1dNLS	DH5 α , EC	1208 (1209)
pBI12135S::GUS-abi1dNLS	DH5 α , EC	1210 (1211)
pSK35SS1eYFP	DH5 α , EC	1330 (720)
pSPYCE-35S/pUC-SPYCE	DH5 α , EC	1238 (1239)
pSPYNE-35S/pUC-SPYNE	DH5 α , EC	1240 (1241)
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -ABI1	DH5 α , EC	1254 (1255)
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -abi1	DH5 α , EC	1256
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -ABI1	DH5 α , EC	1257 (1258)
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -abi1	DH5 α , EC	1259 (1260)
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -HB6	DH5 α , EC	1264 (1265)
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -HB6	DH5 α , EC	1266 (1267)
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -HB5	DH5 α , EC	1271 (1272)
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -HB5	DH5 α , EC	1273
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -HB7	DH5 α , EC	1274 (1275)
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -HB7	DH5 α , EC	1276 (1277)
pSPYNE-35S/pUC-35S::YFP ^N -GluRS	DH5 α , EC	1278
pSPYCE-35S/pUC-35S::YFP ^C -GluRS	DH5 α , EC	1279

6. Literaturverzeichnis

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78
- Abel S, Theologis A** (1998) Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol* **82**: 209-217
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B** (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120
- Aker J, Borst JW, Karlova R, de Vries S** (2006) The *Arabidopsis thaliana* protein CDC48A interacts *in vivo* with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *J Struct Biol*
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053-1057
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI** (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* **289**: 2338-2342
- Allen GJ, Kuchitsu K, Chu SP, Murata Y, Schroeder JI** (1999) *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* Phosphatase Mutations Reduce Abscisic Acid-Induced Cytoplasmic Calcium Rises in Guard Cells. *Plant Cell* **11**: 1785-1798
- Allen GJ, Murata Y, Chu SP, Nafisi M, Schroeder JI** (2002) Hypersensitivity of Abscisic Acid-Induced Cytosolic Calcium Increases in the *Arabidopsis* Farnesyltransferase Mutant *era1-2*. *Plant Cell* **14**: 1649-1662
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH** (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10600-10605
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J, Blatt MR** (1995) Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9520-9524
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL** (2005) A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.* **418**: 2071-2083
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. **433**: 39-44
- Brault M, Amiar Z, Pennarun AM, Monestiez M, Zhang Z, Cornel D, Dellis O, Knight H, Bouteau F, Rona JP** (2004) Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiol* **135**: 231-243
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* **45**: 113-122
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2002) Regulation and Role of the *Arabidopsis* Abscisic Acid-Insensitive 5 Gene in Abscisic Acid, Sugar, and Stress Response. *Plant Physiol.* **129**: 1533-1543

- Brocard-Gifford I, Lynch TJ, Garcia ME, Malhotra B, Finkelstein RR** (2004) The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* **16**: 406-421
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL** (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391-398
- Busk PK, Jensen AB, Pages M** (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *RAB17* from maize. *Plant J* **11**: 1285-1295
- Calkhoven CF, Ab G** (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* **317 (Pt 2)**: 329-342
- Callis J, Fromm M, Walbot V** (1987) Expression of mRNA electroporated into plant and animal cells. *Nucleic Acids Res* **15**: 5823-5831
- Chen Y, Mills JD, Periasamy A** (2003) Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* **71**: 528-541
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J** (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**: 2723-2743
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- Christmann A, Grill E, Meinhard M** (2003) Abscisic acid signalling. *In* Topics in Current Genetics, Vol 4. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 39-71
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A** (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**: 209-219
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E** (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 314-325
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Crawford NM** (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 471-478
- Davis SJ, Vierstra RD** (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**: 521-528
- De Bellis L, Ismail I, Reynolds SJ, Barrett MD, Smith SM** (1997) Distinct *cis*-acting sequences are required for the germination and sugar responses of the cucumber isocitrate lyase gene. *Gene* **197**: 375-378
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH, Zhang H** (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J* **33**: 543-555
- Deak KI, Malamy J** (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J* **43**: 17-28
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ** (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* **55**: 205-212
- Ditt RF, Nester EW, Comai L** (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* **98**: 10954-10959
- Doelling JH, Pikaard CS** (1993) Transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts derived from rapidly established cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* **12**: 241-244
- Dong H-P, Yu H, Bao Z, Guo X, Peng J, Yao Z, Chen G, Qu S, Dong H** (2005) The *ABI2*-dependent abscisic acid signalling controls HrpN-induced drought tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* **221**: 313-327

- Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop HU** (2003) Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **222**: 107-111
- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L** (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol* **32**: 1019-1027
- Farras R, Ferrando A, Jasik J, Kleinow T, Okresz L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C** (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *Embo J* **20**: 2742-2756
- Fedoroff NV** (2002) Cross-Talk in Abscisic Acid Signaling. *Sci. STKE* **2002**: re10-
- Ferrando A, Farras R, Jasik J, Schell J, Koncz C** (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *The Plant Journal* **22**: 553-560
- Fields S, Song O-K** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **340**: 245-246
- Finkelstein RR** (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* **5**: 765-771
- Finkelstein RR** (2006) Studies of Abscisic Acid Perception Finally Flower. *Plant Cell* **18**: 786-791
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Finkelstein RR, Lynch TJ** (2000) The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *Plant Cell* **12**: 599-610
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM** (1998) The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Locus *ABI4* Encodes an APETALA 2 Domain Protein. *Plant Cell* **10**: 1043-1054
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V** (1985) Expression of Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation. *PNAS* **82**: 5824-5828
- Fuentes A, Ramos PL, Ayra C, Rodriguez M, Ramirez N, Pujol M** (2004) Development of a highly efficient system for assessing recombinant gene expression in plant cell suspensions via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. *Biotechnol Appl Biochem* **39**: 355-361
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *PNAS* **103**: 1988-1993
- Futterer J, Gordon K, Sanfacon H, Bonneville JM, Hohn T** (1990) Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA. *Embo J* **9**: 1697-1707
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158
- Gonzalez-Guzman M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodriguez PL** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**: 1833-1846
- Gorlich D, Kutay U** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**: 607-660
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**: 1897-1910
- Grosset J, Marty I, Chartier Y, Meyer Y** (1990) mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound-inducible. *Plant Molecular Biology* **15**: 485-496

- Guarente L** (1988) UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* **52**: 303-305
- Guerche P, Bellini C, Le Moullec JM, Caboche M** (1987) Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. *Biochimie* **69**: 621-628
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-103
- Haizel T, Merkle T, Pay A, Fejes E, Nagy F** (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **11**: 93-103
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *PNAS* **94**: 2122-2127
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A** (2002) Experimentally Determined Sequence Requirement of ACGT-Containing Abscisic Acid Response Element. *Plant Cell Physiol.* **43**: 136-140
- Henriksson E, Olsson ASB, Johannesson H, Johansson H, Hanson J, Engstrom P, Soderman E** (2005) Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in *Arabidopsis*. Expression Patterns and Phylogenetic Relationships. *Plant Physiol.* **139**: 509-518
- Hey SJ, Bacon A, Burnett E, Neill SJ** (1997) Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. *Argenteum*: both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta* **202**: 85-92
- Hicks GR, Raikhel NV** (1993) Specific Binding of Nuclear Localization Sequences to Plant Nuclei. *Plant Cell* **5**: 983-994
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**: 3029-3038
- Himmelbach A, Iten M, Grill E** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **353**: 1439-1444
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 470-479
- Hirai N, Yoshida R, Todoroki Y, Ohigashi H** (2000) Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**: 1448-1458
- Hirata N, Yonekura D, Yanagisawa S, Iba K** (2004) Possible Involvement of the 5'-Flanking Region and the 5'UTR of Plastid *accD* Gene in NEP-Dependent Transcription. *Plant Cell Physiol.* **45**: 176-186
- Hoffmann T** (2002) Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Technische Universität, München
- Hong SB, Sexton R, Tucker ML** (2000) Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol* **123**: 869-881
- Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci* **115**: 4891-4900
- Hu CD, Kerppola TK** (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**: 539-545
- Huang J, Taylor JP, Chen J-G, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth KL, Jones AM** (2006) The Plastid Protein THYLAKOID FORMATION1 and the

- Plasma Membrane G-Protein GPA1 interact in a Novel Sugar-Signaling Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1226-1238
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI** (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* **106**: 477-487
- Hwang I, Sheen J** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Plant Cell* **13**: 383-389
- Iten M, Hoffmann T, Grill E** (1999) Receptors and signalling components of plant hormones. *J Recept Signal Transduct Res* **19**: 41-58
- Jackson MB, Osborne DJ** (1972) Abscisic Acid, Auxin, and Ethylene in Explant Abscission. *J. Exp. Bot.* **23**: 849-862
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D** (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a Gene-Fusion Marker. *PNAS* **83**: 8447-8451
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**: 3901-3907
- Jiang M, Zhang J** (2002) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**: 1022-1030
- Johannesson H, Wang Y, Engstrom P** (2001) DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Mol Biol* **45**: 63-73
- Johannesson H, Wang Y, Hanson J, Engstrom P** (2003) The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol Biol* **51**: 719-729
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**: 837-846
- Kaffman A, O'Shea EK** (1999) Regulation of nuclear localisation: A Key to a Door. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**: 291-339
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509
- Kikkert JR, Vidal JR, Reisch BI** (2005) Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol Biol* **286**: 61-78
- Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshiba T, Kamada H** (2006) Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* **223**: 637-645
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC** (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Methods Mol Biol* **327**: 70-73
- Kohler B, Blatt MR** (2002) Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *The Plant Journal* **32**: 185-194
- Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsunashi W, Toyomasu T, Koshiba T** (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 1697-1707
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* **204**: 383-396
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karssen CM** (1982) The isolation of abscisic acid deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **61**: 385-393

- Koornneef M, Reuling G, Karszen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383
- Kortes O** (2003) Untersuchung zur Bestimmung regulatorischer Elemente des Indolglycerinphosphatlyasegens *Igl* von Mais (*Zea mays*). Technische Universität, München
- Koscianska E, Wypijewski K** (2001) Electroporated intact BY-2 tobacco culture cells as a model of transient expression study. *Acta Biochim Pol* **48**: 657-661
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA** (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. **296**: 72-74
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI** (2006) The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*, and Effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* **140**: 127-139
- Lanford RE, Butel JS** (1984) Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**: 801-813
- Lang V, Palva ET** (1992) The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* **20**: 951-962
- Larebeke NV, Engler G, Holsters M, Den Elsacker SV, I. Z, Schilperoort RA, Schell J** (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. **252**: 169-170
- Lease KA, Lau NY, Schuster RA, Torii KU, Walker JC** (2001) Receptor serine/threonine protein kinases in signalling: analysis of the erecta receptor-like kinase of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **151**: 133-143
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E** (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* **16**: 223-233
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**: 596-615
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M** (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**: 655-661
- Leube MP, Grill E, Amrhein N** (1998) ABI1 of *Arabidopsis* is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* **424**: 100-104
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222
- Leung J, Merlot S, Giraudat J** (1997) The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *Plant Cell* **9**: 759-771
- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4203-4208
- Li J, Julie Lee Y-R, Assmann SM** (1998) Guard Cells Possess a Calcium-Dependent Protein Kinase That Phosphorylates the KAT1 Potassium Channel. *Plant Physiol* **116**: 785-795
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng CK, Gygi SP, Shimazaki K, Assmann SM** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**: 793-797

- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM** (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300-303
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-274
- Littlepage LE, Ruderman JV** (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**: 2274-2285
- Lopez-Molina L, Chua NH** (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**: 541-547
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH** (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J* **32**: 317-328
- Lu C, Fedoroff N** (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* **12**: 2351-2366
- Luehrsen KR, De Wet JR, Walbot V** (1992) Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol* **216**: 397-414
- MacRobbie EAC** (2000) Inaugural Article: ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. *PNAS* **97**: 12361-12368
- Marcotte Jr WR, Russell SH, Quatrano RS** (1989) Abscisic Acid-Responsive Sequences from the Em Gene of Wheat. *Plant Cell* **1**: 969-976
- Mäser P, Leonhardt N, Schroeder J** (2003) The Clickable Guard Cell: Electronically Linked Model of Guard Cell Signal Transduction Pathways. *In The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists
- Mathur J, Koncz C** (1998) Establishment and maintenance of cell suspension cultures. *Methods Mol Biol* **82**: 27-30
- Mathur J, Szabados L, Schaefer S, Grunenberg B, Lossow A, Jonas-Straube E, Schell J, Koncz C, Koncz-Kalman Z** (1998) Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant J* **13**: 707-716
- Meijer AH, Scarpella E, Dijk EL, Qin L, Taal AJC, Rueb S, Harrington SE, McCouch SR, Schilperoort RA, Hoge JHC** (1997) Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *The Plant Journal* **11**: 263-276
- Meisel L, Lam E** (1996) The conserved ELK-homeodomain of KNOTTED-1 contains two regions that signal nuclear localization. *Plant Molecular Biology* **30**: 1-14
- Merhige P, Both-Kim D, Robida M, Hollingsworth M** (2005) RNA-protein complexes that form in the spinach chloroplast atpl 5'- untranslated region can be divided into two subcomplexes, each comprised of unique *cis*-elements and *trans*-factors. *Current Genetics* **48**: 256-264
- Merkle T, Leclerc D, Marshallsay C, Nagy F** (1996) A plant *in vitro* system for the nuclear import of proteins. *Plant J* **10**: 1177-1186
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J** (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* **25**: 295-303
- Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J** (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* **30**: 601-609
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455
- Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA** (1995) Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. *Science* **267**: 1161-1163

- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X** (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**: 264-266
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K** (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* **15**: 15-19
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 765-769
- Morikami A, Matsunaga R, Tanaka Y, Suzuki S, Mano S, Nakamura K** (2005) Two *cis*-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Mol Genet Genomics* **272**: 690-699
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH** (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1406-1410
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Transcriptional Regulation of ABI3- and ABA-responsive Genes Including *RD29B* and *RD29A* in Seeds, Germinating Embryos, and Seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **60**: 51-68
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185
- Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596-599
- Niu X, Helentjaris T, Bate NJ** (2002) Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell* **14**: 2565-2575
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592-1593
- Ohtsubo N, Nakayama T, Terada R, Shimamoto K, Iwabuchi M** (1993) Proximal promoter region of the wheat histone H3 gene confers S phase-specific gene expression in transformed rice cells. *Plant Mol Biol* **23**: 553-565
- Olsson A, Engström P, Söderman E** (2004) The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**: 663-677
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A** (2006) Agroinjection of Tomato Fruits. A Tool for Rapid Functional Analysis of Transgenes Directly in Fruit. *Plant Physiol.* **140**: 3-11
- Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 1105-1119

- Palm GJ, Zdanov A, Gaitanaris GA, Stauber R, Pavlakis GN, Wlodawer A** (1997) The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *4*: 361-365
- Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandak V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I** (1984) Direct gene transfer to plants. *Embo J* **3**: 2717-2722
- Pei ZM, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI** (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* **282**: 287-290
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI** (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* **9**: 409-423
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Pollard VW, Malim MH** (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annual Review of Microbiology* **52**: 491-532
- Potrykus I** (1991) Gene Transfer to Plants: Assessment of Published Approaches and Results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 205-225
- Ramagli L, Rodriguez, L. V.**, (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Reid C, Rand RP** (1997) Probing protein hydration and conformational states in solution. *Biophys J* **72**: 1022-1030
- Rodrigues-Pousada RA, De Rycke R, Dedonder A, Van Caeneghem W, Engler G, Van Montagu M, Van Der Straeten D** (1993) The *Arabidopsis* 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene 1 Is Expressed during Early Development. *Plant Cell* **5**: 897-911
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E** (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **421**: 185-190
- Rodriguez PL, Leube MP, Grill E** (1998) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* **38**: 879-883
- Rogers S, Bendich A** (1994) Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. *In* *Plant Molecular Biology Manual*, Ed 3rd. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands
- Rohde A, De Rycke R, Beeckman T, Engler G, Van Montagu M, Boerjan W** (2000) ABI3 Affects Plastid Differentiation in Dark-Grown *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Cell* **12**: 35-52
- Rohde A, Van Montagu M, Boerjan W** (1999) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **22**: 261-270
- Ruberti I, Sessa G, Lucchetti S, Morelli G** (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *Embo J* **10**: 1787-1791
- Ryan CA, Pearce G** (2003) Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**: 14577-14580
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463-472

- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL** (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**: 354-369
- Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL** (2006) Enhancement of Abscisic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in *Arabidopsis* by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol.* **141**: 1389-1399
- Sambrook J, Russell DW** (2001) Molecular cloning : a laboratory manual, Ed 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarah CJ, Graham IA, Reynolds SJ, Leaver CJ, Smith SM** (1996) Distinct *cis*-acting elements direct the germination and sugar responses of the cucumber malate synthase gene. *Mol Gen Genet* **250**: 153-161
- Schena M, Davis RW** (1992) HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3894-3898
- Schnorf M, Neuhaus-Url G, Galli A, Iida S, Potrykus I, Neuhaus G** (1991) An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis. *Transgenic Res* **1**: 23-30
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627-658
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ** (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* **410**: 327-330
- Seki M, Iida A, Morikawa H** (1999) Transient expression of the beta-glucuronidase gene in tissues of *Arabidopsis thaliana* by bombardment-mediated transformation. *Mol Biotechnol* **11**: 251-255
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282-291
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T** (2000) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12908-12913
- Sessa G, Morelli G, Ruberti I** (1993) The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *Embo J* **12**: 3507-3517
- Sessa G, Morelli G, Ruberti I** (1997) DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J Mol Biol* **274**: 303-309
- Sharp RE** (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 211-222
- Sharp RE, LeNoble ME** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot* **53**: 33-37
- Sheen J** (1996) Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. *Science* **274**: 1900-1902
- Sheen J** (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 975-980
- Sheen J** (2001) Signal Transduction in Maize and *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiol.* **127**: 1466-1475

- Shen Q, Casaretto J, Zhang P, Ho T-H** (2004) Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* **54**: 111-124
- Shen Q, Zhang P, Ho T** (1996) Modular Nature of Abscisic Acid (ABA) Response Complexes: Composite Promoter Units That Are Necessary and Sufficient for ABA Induction of Gene Expression in Barley. *Plant Cell* **8**: 1107-1119
- Shieh MW, Wessler SR, Raikhel NV** (1993) Nuclear Targeting of the Maize R Protein Requires Two Nuclear Localization Sequences. *Plant Physiol.* **101**: 353-361
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 217-223
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 410-417
- Siberil Y, Doireau P, Gantet P** (2001) Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem* **268**: 5655-5666
- Siddiqui NU, Chung H-J, Thomas TL, Drew MC** (1998) Abscisic Acid-Dependent and -Independent Expression of the Carrot Late-Embryogenesis-Abundant-Class Gene *Dc3* in Transgenic Tobacco Seedlings. *Plant Physiol.* **118**: 1181-1190
- Signora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H** (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **28**: 655-662
- Smith DB, Johnson KS** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40
- Söderman E, Hjellstrom M, Fahleson J, Engstrom P** (1999) The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol Biol* **40**: 1073-1083
- Söderman E, Mattsson J, Engstrom P** (1996) The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J* **10**: 375-381
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2000) Regulation and Function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 Gene in Seed and Abscisic Acid Response Signaling Networks. *Plant Physiol.* **124**: 1752-1765
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR** (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* **43**: 520-529
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE** (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* **122**: 967-976
- Stephens DJ, Banting G** (2000) The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking. *Traffic* **1**: 763-768
- Suzuki M, Kao CY, McCarty DR** (1997) The Conserved B3 Domain of VIVIPAROUS1 Has a Cooperative DNA Binding Activity. *Plant Cell* **9**: 799-807
- Tang Y** (2003) Analysis of auxin and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. Technische Universität, München
- Tao Y** (1999) Purdue University, West Lafayette, IN.
- Tao Y, Rao PK, Bhattacharjee S, Gelvin SB** (2004) Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobacterium* T-complex protein VirD2. *PNAS* **101**: 5164-5169
- Tavernarakis N, Driscoll M** (1997) Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Physiology* **59**: 659-689
- Truman W, Zabala MT, Grant M** (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal* **46**: 14-33

- Tsuchisaka A, Theologis A** (2004) Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family. *PNAS* **101**: 2275-2280
- Tsuneoka M, Imamoto NS, Uchida T** (1986) Monoclonal antibody against non-histone chromosomal protein high mobility group 1 Co-migrates with high mobility group 1 into the nucleus. *J Biol Chem* **261**: 1829-1834
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) *Arabidopsis basic* leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11632-11637
- Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. *FEBS Lett* **478**: 227-232
- Varagona MJ, Schmidt RJ, Raikhel NV** (1992) Nuclear Localization Signal(s) Required for Nuclear Targeting of the Maize Regulatory Protein Opaque-2. *Plant Cell* **4**: 1213-1227
- Veena, Jiang H, Doerge RW, Gelvin SB** (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal* **35**: 219-236
- Vuylsteke M, van Eeuwijk F, Van Hummelen P, Kuiper M, Zabeau M** (2005) Genetic Analysis of Variation in Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **171**: 1267-1275
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**: 428-438
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM** (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**: 2070-2072
- Wang Y** (2001) The role of the homeobox gene *ATHB16* in developmental regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 618 Uppsala
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS** (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473
- Wood KV, DeLuca M** (1987) Photographic detection of luminescence in *Escherichia coli* containing the gene for firefly luciferase. *Anal Biochem* **161**: 501-507
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH** (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**: 2126-2130
- Wu Y, Sanchez JP, Lopez-Molina L, Himmelbach A, Grill E, Chua NH** (2003) The *abi1-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant J* **34**: 307-315
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu JK** (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev Cell* **1**: 771-781
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK** (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**: 2063-2083
- Yamaguchi-Shinozaki K, Mundy J, Chua NH** (1990) Four tightly linked rab genes are differentially expressed in rice. *Plant Mol Biol* **14**: 29-39
- 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**: 251-264
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* **10**: 88-94

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yang Y** (2003) Signal transduction of abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*: Identification and characterisation of protein interaction partners of ABI2. Technical University, Munich
- Yang Y, Li R, Qi M** (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* **22**: 543-551
- Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E** (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6061-6066
- Yokoe H, Meyer T** (1996) Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. **14**: 1252-1256
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K** (2006) The Regulatory Domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 Interacts with ABI1 and Integrates Abscisic Acid (ABA) and Osmotic Stress Signals Controlling Stomatal Closure in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **281**: 5310-5318
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2006) ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among *Arabidopsis* Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* **140**: 115-126
- Zalejski C, Zhang Z, Quettier A-L, Maldiney R, Bonnet M, Brault M, Demandre C, Miginiac E, Rona J-P, Sotta B, Jeannette E** (2005) Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *The Plant Journal* **42**: 145-152
- Zhang D-P, Chen S-W, Peng Y-B, Shen Y-Y** (2001) Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *J. Exp. Bot.* **52**: 2097-2103
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X** (2004) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9508-9513
- Zhu J-K** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **428**: 764-767

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Danièle Moes

Adresse: Landshuter Strasse 68 38, Chemin des Vignes
85356 Freising L-5576 Remich/Luxbg.

geboren am: 01.07.1978 in Frankfurt am Main

Nationalität: luxemburgisch

Familienstand: ledig

Ausbildungsdaten

1984 – 1989 Grundschule in Remich/Luxemburg

1989-1997 Lycée Robert-Schuman, Luxemburg-Stadt,
Luxemburg

1996/1997 „Diplôme de Fin d’Etudes Secondaires“ (Abitur)

1997 – 2002 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-
Universität Heidelberg

Oktober 2002 Abschluss des Studiums an der Ruprecht-Karls-
Universität Heidelberg als Diplom-Biologin

März 2003 –
Oktober 2006 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Botanik der
Technischen Universität München (Arbeitsgruppe
Prof. Dr. E. Grill)

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor Dr. Erwin Grill für die Überlassung eines vielseitigen und interessanten Themas sowie für den beeindruckenden Bruchteil seiner knapp bemessenen Zeit, den er immer wieder für mich und mein Projekt freischaufeln konnte.

Besonderen Dank schulde ich außerdem Dr. Alexander Christmann, Dr. Axel Himmelbach und Dr. Michael Meinhard für die wertvollen Tipps und hilfreichen Anregungen, aber auch für ihre große Geduld und die jeweils einzigartigen Motivationskünste.

Ganz herzlich danken möchte ich allen Kollegen am Lehrstuhl für Botanik der TU München, die mich während meiner Promotion hier in Freising unterstützt und ertragen haben, insbesondere

- Herrn PD Dr. Klaus Lenzian für die Hilfe bei der Handhabung der Sauerstoffelektrode (und natürlich auch für verschmutzte Gespräche an der Kaffeemaschine)
- meinem Bürokollegen Arthur Korte für den einzigartigen Austausch an beruflichen und privaten, realistischen und virtuellen, gruseligen und amüsanten Spinnereien, sowie für erwärmende Einblicke in die Naturwunder an fränkischen Felswänden
- Jana Wünschmann und Ralph Blum, die durch ihre Übersicht und Kompetenz, aber auch durch den unbezahlbaren (nicht immer schwarzen) Humor beim täglichen Pausensnack und beim wöchentlichen Freitagseminar für die Komplettierung eines tremendously denkwürdigen Doktorandenteams sorgten
- Christoph Heidersberger, Lisa Held, Caroline Klaus, Christian Kornbauer und Josef Reischenbeck für ungezählte zauberhafte Momente innerhalb und außerhalb des Labors
- den Jungs aus der „Waldläufer- und Messerfraktion“ für Espresso, Spanferkel und manches literarische Brotzeit-Häppchen

Außerdem danke ich Dr. Michael Helm und Beate Seeliger für die große Hilfsbereitschaft bei bürokratischen Problemen.

I am very grateful to Ram Yadav for excellent advises concerning the confocal microscope and to Martine Batoux pour les conversations amusantes.

Familie Prestele danke ich für die gemütlichen und entspannenden Stunden in und um Langenbach herum – es war schön, immer willkommen zu sein. Auch den Mädels aus meiner WG sowie Familie Meinhard(t) möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für ein tolles Zuhause ausdrücken.

Un deser Plaz och e Merci un den Jean-Paul Meyers (an säin formidablen Hausskla...) fir e Stéck Letzebuerg matzen an Freising matt Dame Blanche Inverse, Place Royale an Sauce Andalouse.

Neben meinen jetzigen Arbeitskollegen möchte ich auch den ehemaligen Heidelberger Laborkollegen Andreas, Jan, Jochen, Markus und Stina danken, die mich nicht vergessen haben und unglaublicherweise alle während meiner Promotion hier in Freising vorbeigeschaut bzw. mich mit einem Jahrhundertfrühstück auf der Urlaubsdurchreise völlig plattgemacht haben.

An dieser Stelle seien auch David und sein Räkelfsofa, Sushi-Queen Ivonne, der stets einnordende Dr. Jockel, die nach Früchtekörben lechzende Mel, das Schlüsselkind Nele, die allzeit tugendhafte Simone sowie Tim mit dem längsten Briefkasten der Welt, höchstlobend erwähnt: ohne Euch wäre es leider mal sowas von aus...

Villmols Merci och un deser Plaz un d'Anik Sibenaler: hatt huet mech emmer esou akzeptéiert wéi ech sin an séng Frenschchaft as fir méch en onbeschreiwlechen Cadeau.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Großmüttern, Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung in der letzten Zeit bedanken und dafür, dass ich mich jedes Mal darauf freue, nach Hause zu kommen. Mein größter Dank geht an Wolfgang - ich bin außer Dir gar nicht hier.

Dat lescht as fir d'Keule – an fir méch:

“...While the details here are unique to me, I hope that they will strike a chord with anyone who has ever found themselves drifting off, in the middle of a working day or a film or a conversation, towards a left-foot volley into a right-hand corner ten or fifteen or twenty-five years ago.”

Nick Hornby, Fever Pitch