

**Etablierung und Anwendung molekularer Methoden
zur Analyse des *Arabidopsis thaliana*
Transkriptionsfaktor-ORFeoms**

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Nora Wehner
aus Jena

Würzburg 2012

Eingereicht am: 19. 04.2012

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler, Lehrstuhl für
Verhaltensphysiologie und Soziobiologie

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser, Lehrstuhl für
Pharmazeutische Biologie

Zweitgutachter: PD Dr. Dirk Becker, Lehrstuhl für Botanik I

Tag des Promotionskolloquiums: 18.06.2012

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Summary	8
1 Einleitung	10
1.1 <i>Aufbau und Funktion transkriptioneller Regulatoren</i>	10
1.2 <i>Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung von Arabidopsis Transkriptionsfaktoren</i>	11
1.2.1 Hochdurchsatzverfahren zur Generierung von <i>Arabidopsis</i> Überexpressionssamen-Kollektionen.....	13
1.2.2 Methoden zur Identifizierung und Analyse von TF-Bindestellen.....	15
1.2.3 Analyse von <i>cis-trans</i> -Wechselwirkungen zwischen transkriptionellen Regulatoren und ihren Ziel-Promotorsequenzen	16
1.3 <i>Funktionen transkriptioneller Regulatoren in pflanzlichen Stessantworten</i> ...	18
1.3.1 Transkriptionskontrolle in der pflanzlichen Pathogenantwort.....	18
1.3.2 Transkriptionelle Regulatoren pflanzlicher Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress	26
1.4 <i>Zielsetzung</i>	28
2 Material	29
2.1 <i>Organismen</i>	29
2.1.1 Bakterien	29
2.1.2 Pflanzen.....	29
2.2 <i>Nukleinsäuren</i>	29
2.2.1 Plasmide	29
2.2.2 Oligonukleotide.....	30
2.3 <i>Größenstandards</i>	32
2.3.1 DNA-Größenstandard	32
2.3.2 Protein-Größenstandard	32
2.4 <i>Antikörper</i>	32
2.5 <i>Nährmedien und Zusätze</i>	32
2.5.1 Bakterienmedien	32
2.5.2 Pflanzenmedien	32
2.5.3 Medienzusätze.....	33
2.5.3.1 Antibiotika	33
2.5.3.2 Agar.....	33

2.5.3.3	Sonstige Zusätze.....	33
2.6	Lösungen und Puffer	33
2.7	Geräte.....	35
2.8	Verbrauchsmittel.....	36
2.9	Chemikalien.....	36
2.10	Enzyme	37
2.11	Kits	38
3	Methoden	39
3.1	Bakterienanzucht und Transformation.....	39
3.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	39
3.1.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.1.3	Lagerung der Bakterien.....	39
3.1.4	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	39
3.1.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	40
3.1.6	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.1.7	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.2	Pflanzenanzucht und Transformation	41
3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde.....	41
3.2.2	Sterile Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf MS-Platten.....	41
3.2.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Hilfe der <i>flower-dip</i> -Methode	41
3.2.4	Selektion auf Basta [®] -Resistenz.....	42
3.2.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-Transformation.....	43
3.2.5.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-Gewinnung.....	43
3.2.5.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-PEG-Transformation im Standard- Verfahren.....	44
3.2.5.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten-PEG-Transformation im Hochdurchsatz-Verfahren (PTA-System).....	44
3.2.5.4	Messung der Luciferase (LUC)-Aktivität	45
3.2.5.5	Messung der dualen Luciferase-Aktivität	45
3.3	Extraktion genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	46
3.4.1	Mutagenese-PCR	47
3.5	Restriktionsspaltung der DNA	48
3.6	Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen.....	48
3.7	DNA-Elution aus Agarosegelen.....	48
3.8	Ligation	48

3.9	<i>Gateway[®]-Rekombination</i>	49
3.9.1	BP-Reaktion	49
3.9.2	LR-Reaktion	50
3.10	<i>Kolonie-Screening mittels PCR</i>	50
3.11	<i>Plasmid-Präparation mit Hilfe von Kits</i>	51
3.12	<i>Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse</i>	51
3.13	<i>DNA-Sequenzierung</i>	52
3.14	<i>Herstellung von Proteinextrakten aus transformierten Arabidopsis Protoplasten</i>	52
3.15	<i>Western Blot Analyse</i>	52
3.15.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	52
3.15.2	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	53
3.15.3	Immunodetektion mit dem ECL+ System	54
3.16	<i>Verwendete Computerprogramme</i>	54
4	Ergebnisse	55
4.1	<i>Das PTA-System: Anwendung eines Hochdurchsatzverfahrens für Protoplasten-transformationen zur funktionellen Analyse des Arabidopsis thaliana Transkriptionsfaktor-ORFeoms</i>	55
4.1.1.1	Etablierung eines Protoplastentransformationssystems für Mikrotiterplatten	58
4.1.1.2	Vergleich möglicher Detektionsmethoden zur Lumineszenz-Messung	59
4.1.1.3	Evaluierung verschiedener Präparationsmethoden zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA zur Protoplastentransformation	61
4.1.1.4	Anpassung der erforderlichen DNA-Mengen an das Hochdurchsatzverfahren	62
4.1.1.5	Detektion der in Protoplasten exprimierten Fusionsproteine.....	63
4.1.1.6	Reproduzierbarkeit der im PTA-System erhaltenen Transaktivierungsdaten	64
4.1.1.7	Die Transaktivierbarkeit von Reporterkonstrukten mit hoher Grundaktivität	66
4.1.1.8	Überprüfung des PTA-Konzeptes anhand einer Transaktivierungsstudie der bereits bekannten Promotoren von <i>PDF1.2</i> und <i>RD29A</i> mit der AP2/ERF-TF-Familie.....	69
4.1.1.9	Generierung einer TF-Überexpressionsbank mit Hilfe der Gateway [®] - Technologie.....	71
4.1.2	Anwendungsmöglichkeiten des PTA-Systems zur funktionellen Charakterisierung von <i>Arabidopsis</i> Transkriptionsfaktoren	71
4.1.2.1	Detektion von Repressoreigenschaften	71

4.1.2.2	Induktion der Promotoraktivität durch verschiedene Stress-Stimuli ..	73
4.1.2.3	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des PTA-Systems	77
4.1.2.4	Analyse des Einflusses von Signal-Molekülen auf die Aktivität von TF	78
4.1.3	Anwendung des PTA-Systems in verschiedenen <i>Screening</i> -Ansätzen	80
4.1.3.1	Analyse zum Einfluss von bZIP Transkriptionsfaktoren auf die Auxin- vermittelte Induktion des <i>GH3.3</i> -Promotors.....	80
4.1.3.2	Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren des <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan- abgeleiteten Sekundärmetaboliten	84
4.1.3.2.1	<i>Screening</i> der TF-Expressionsvektor-Kollektion auf Transaktivierung von Promotoren ausgewählter Gene des Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten.....	86
4.1.3.2.2	Der Einfluss der EAR-Domäne von AtERF#079 auf die Aktivierung des <i>CYP71A12</i> -Promotors.....	95
4.1.3.2.3	Identifizierung repressiver Regulatoren der <i>CYP71A12</i> -Expression	97
4.2	<i>AtTORF-EX-Bank: Screening einer Arabidopsis thaliana</i> <i>Überexpressionssamenbank auf erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem</i> <i>Stress</i>	99
4.2.1	Identifizierung von Überexpressionspflanzen die eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress zeigen	100
4.2.2	Analyse von bZIP1 <i>gain of function</i> - und <i>loss of function</i> -Linien.....	102
5	Diskussion	105
5.1	<i>Das PTA-System ist eine geeignete Screening-Plattform zur Identifizierung</i> <i>aktivierender Arabidopsis Transkriptionsfaktoren</i>	105
5.2	<i>In der Anwendung bietet das PTA-System erhebliche Vorteile gegenüber</i> <i>anderen Methoden</i>	108
5.3	<i>Mit Hilfe des PTA-Systems lassen sich potentielle Regulatoren pflanzlicher</i> <i>Stressantworten identifizieren</i>	112
5.3.1	Die Auxin-vermittelte Expression des <i>GH3.3</i> -Gens kann durch viele Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie gesteigert werden.	113
5.3.2	Mit Hilfe des PTA-Systems konnten potentielle Regulatoren der Biosynthesewege von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin identifiziert werden	115
5.4	<i>Durchmusterung der AtTORF-EX-Bank: Überexpressionslinien für die</i> <i>Transkriptionsfaktoren bZIP1 und OBP1 zeigen eine erhöhte Toleranz</i> <i>gegenüber oxidativen Stress</i>	126

6	Literaturverzeichnis.....	129
7	Anhang	144
7.1	<i>Grundaktivitäten der Promotor:LUC-Konstrukte von ausgewählten Gene der Biosynthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin.....</i>	<i>144</i>
7.2	<i>Einfluss der EAR-ERF-TF auf die CYP71A13-Promotor-Aktivität.....</i>	<i>145</i>
7.3	<i>Weitere Ergebnisse des PTA-Screenings des CYP71A12-Promotors.....</i>	<i>146</i>
7.4	<i>Promotor-Bindestellen der Gene CYP71A12, CYP71A13, WRKY40, WRKY18 und WRKY10.....</i>	<i>151</i>
7.5	<i>PTA-Expressionsvektor-Kollektion.....</i>	<i>157</i>
7.6	<i>Kollektion AD- und BD-fusionierter Transkriptionsfaktoren</i>	<i>175</i>
7.7	<i>Weitere Ergebnisse aus dem Screening der AtTORF-EX-Bank</i>	<i>176</i>
8	Abkürzungsverzeichnis	177
8.1	<i>Allgemeine Abkürzungen.....</i>	<i>177</i>
8.2	<i>Einheiten</i>	<i>179</i>
8.3	<i>Präfixe.....</i>	<i>179</i>
8.4	<i>Aminosäuren</i>	<i>179</i>
8.5	<i>Nukleotide</i>	<i>179</i>
9	Danksagung	180

Zusammenfassung

Transkriptionsfaktoren (TF) sind wichtige Regulatoren der Genexpression. In *Arabidopsis* kodieren ca. 1500-2000 Gene für TF, von denen die Mehrheit bis heute nicht funktionell charakterisiert ist. Um die Aufklärung der TF-Funktionen weiter voranzutreiben, werden daher Analyse-Plattformen für Hochdurchsatzverfahren immer wichtiger. In den letzten Jahren sind umfangreiche Gateway[®]-kompatible ORF (*open-reading-frame*)-Kollektionen für *Arabidopsis* aufgebaut worden, die nun als nützliche Ressourcen für genetische Analysen zur Verfügung stehen. Auf Grundlage dieser Kollektionen wurde in dieser Arbeit eine neue *Screening*-Plattform etabliert, mit der *trans*-regulatorische Eigenschaften von TF in einem Hochdurchsatzverfahren untersucht werden können. Ein Mikrotiterplatten-System für Protoplastentransformationen erlaubt die transiente Koexpression von 96 verschiedenen TF-Expressionsvektoren mit einem Promotor:Luciferase-Reporter der Wahl. Das Transaktivierungspotential jedes einzelnen TF kann über die Luciferaseaktivität bestimmt werden, indem emittierte Lumineszenz in einem Luminometer detektiert wird. Die Funktionalität des PTA (*Protoplast Trans Activation*)-Systems wurde anhand einer Transaktivierungsstudie der bereits gut charakterisierten Promotoren von *RD29A* und *PDF1.2* und der ERF (*Ethylene Response Factor*)-TF-Familie überprüft, wobei bekannte Bindungsspezifitäten der TF bestätigt werden konnten. Für das System wurde eine umfassende *Arabidopsis* TF-Kollektion aufgebaut. Ca. 950 verschiedene Gateway[®]-kompatible TF-Expressionsvektoren stehen für *Screening*-Ansätze zur Verfügung.

Für das PTA-System wurden verschiedene Anwendungen etabliert. Neben transaktivierenden, konnten beispielsweise auch repressive Eigenschaften von TF bestimmt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es möglich ist, (I) die Expression von Promotoren gezielt durch verschiedene Stimuli, wie Salz oder Pflanzenhormone zu modulieren, (II) Protein-Protein-Interaktionen zu bestimmen, sowie (III) den Einfluss von Signalmolekülen (wie z. B. Kinasen) auf ihre Aktivierungseigenschaften zu untersuchen.

Das PTA-System wurde in verschiedenen *Screening*-Ansätzen zur Identifizierung transkriptioneller Regulatoren pflanzlicher Stressantworten eingesetzt. In einer Analyse des Auxin-induzierbaren *GH3.3*-Promotors wurde dabei gezeigt, dass weit mehr bZIP-TF Einfluss auf die Auxin-vermittelte *GH3.3*-Expression haben, als bisher angenommen. Beispielsweise zeigten bZIP16 und bZIP68 ein höheres Transaktivierungspotential, als die bisher beschriebenen bZIP-Regulatoren der *GH3.3*-Expression.

In einem zweiten Ansatz wurde die koordinierte Regulation der Biosynthese von Tryptophan-abgeleiteten antimikrobiellen Sekundärmetaboliten (Indol-Glukosinolate, Camalexin) untersucht. Dabei konnten ERF-TF der phylogenetischen Gruppen VIII und IX als potentielle Regulatoren mehrerer wichtiger Gene der Biosynthesewege identifiziert werden. Mit einem zusätzlichen *Screening*-Ansatz der gesamten TF-Expressionsvektor-Kollektion und einem Markerpromotor des Camalexin-Biosynthesewegs wurden weitere potentielle Regulatoren identifiziert, von denen einige bereits in der Pathogenantwort beschrieben sind.

In einem weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit wurde die von Weiste *et al.* (2007) etablierte *Arabidopsis thaliana* TF-ORF-Überexpressions-Kollektion (*AtTORF-EX*) erweitert. Mit Hilfe des dafür entwickelten Hochdurchsatzverfahrens zur Generierung stabil transformierter Pflanzenlinien wurden neue Überexpressionssamen-Kollektionen hergestellt und anschließend in einem *Screening*-Ansatz auf erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress getestet, wobei die Chemikalie Paraquat als oxidativer Stress-Geber eingesetzt wurde. Die TF bZIP1 und OBP1 konnten dabei als Resistenzvermittelnd identifiziert werden.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit mit Hilfe beider Systeme neue potentielle Regulatoren pflanzlicher Stressantworten identifiziert.

Summary

Transcription factors (TFs) are important cellular regulators of gene expression. In *Arabidopsis* approximately 1500-2000 genes encode for TFs. Until now, the majority of these genes has not been functionally characterized. To further promote the evaluation of TF function, high-throughput tools are required. In recent years, comprehensive *Arabidopsis* open reading frame (ORF) collections have been established, which are valuable resources for functional genomics. Based on these collections a high-throughput microtiter plate based *Protoplast Trans Activation* (PTA) system has been established to screen for TFs which regulate a given promoter:Luciferase construct *in planta*. 96 protoplast transfection experiments can be performed simultaneously in a standard microtiter plate. Transactivation of a promoter:Luciferase reporter is measured via luciferase imaging. A screening collection of roughly 950 TFs expression vectors has been assembled using Gateway[®] technology and can be tested in various screening approaches. In this respect, it is possible to analyze transactivating as well as repressive properties. Moreover (I) stimulus induced transcription, (II) studies of protein-protein interaction and (III) the impact of signaling molecules (e.g. kinases) on the promoter's activation potential can be measured.

To demonstrate the feasibility of the high-throughput system, the transactivating properties of the *Ethylene Response Factor* (ERF) TF family were studied in combination with the well-characterized *RD29A* and *PDF1.2* promoters. By this means, known binding specificities of the TF family were confirmed.

Furthermore, the PTA-System was applied to identify transcriptional regulators involved in plant stress responses. In one approach the influence of bZIP TFs on the auxin-inducibility of the *GH3.3*-promoter was studied. In particular, bZIP16 and bZIP68 showed a stronger transactivation potential than those bZIPs which were previously described to regulate this auxin-responsive promoter.

In an independent approach the transcriptional regulation of tryptophan-derived antifungal compounds (indol-glycosinolates, camalexin) biosynthesis has been studied. ERF TFs of the groups VIII and IX were identified as potential regulators of several

biosynthetic genes. A subsequent screening approach of a key promoter of the camalexin biosynthetic pathway disclosed further potential regulators. Among these TFs, many have been described previously in plant pathogen responses.

As a second approach to examine TF function the *Arabidopsis thaliana* TF ORF-EXpression-library (*At*TORF-EX) established by Weiste *et al.* (2007) was extended. The developed high-throughput transformation procedure was used to generate new TF overexpression seed collections. Afterwards the library was applied in a screening approach to identify regulators which mediate enhanced tolerance towards the oxidative stress inducing chemical Paraquat. Thus, the TFs bZIP1 and OBP1 were found to promote resistance against Paraquat when overexpressed in *Arabidopsis*.

In summary, using both approaches novel putative regulators of plant stress response signaling were identified.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion transkriptioneller Regulatoren

Pflanzen unterliegen dem ständigen Einfluss verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren. Um nicht schutzlos allen Umweltfaktoren ausgeliefert zu sein, sind sie in der Lage, Veränderungen ihrer Umwelt zu erkennen und in entsprechende Genexpressionsmuster zu übersetzen. Die Initiation Stress-induzierter Genexpression erfordert ein komplexes Netzwerk transkriptioneller Regulatoren (Singh *et al.*, 2002). Pflanzen investieren große Teile ihrer genomischen Kapazität in transkriptionelle Kontrolle. In *Arabidopsis thaliana* zum Beispiel kodieren weit mehr als 5 % aller Gene für Transkriptionsfaktoren (TF) (Riechmann *et al.*, 2000).

Generell unterscheidet man zwischen allgemeinen und spezifischen TF. Bei allgemeinen TF handelt es sich um ubiquitäre Proteine, die Teil des Präinitiationskomplexes sind. Der RNA-Polymerase II fehlt die Fähigkeit der spezifischen Identifizierung des Kern-Promotors mit der TATA-Box, daher gewährleisten allgemeine Transkriptionsfaktoren eine korrekte Promotorerkennung (zur Übersicht siehe Roeder, 1996).

Grundlage der differentiellen Transkription sind spezifische TF. Sie kontrollieren, ob ein Gen aktiviert oder reprimiert wird und definieren darüber hinaus die Expressionsstärke. Im Allgemeinen besitzen DNA-bindende TF eine modulare Struktur, d. h. sie sind aus verschiedenen Proteindomänen zusammengesetzt, die funktionelle Eigenschaften wie DNA-Bindung, Multimerisierung, transkriptionelle Aktivierung oder Repression vermitteln (Abb.1.1) (zur Übersicht siehe Latchman, 1997).

In *Arabidopsis* kodieren ca.1500-2000 Gene für TF (Guo *et al.*, 2005; Perez-Rodriguez *et al.*, 2010; Ramirez und Basu 2009; Riechmann *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.*, 2010). Die genaue Zahl variiert je nach bioinformatischer Studie. Aufgrund der Struktur des hochkonservierten DNA-Bindemotivs werden TF in verschiedene Familien unterteilt. Zu den größten zählen die MYB-TF, die MADS-TF, die bHLH-TF und die AP2/ERF-TF mit jeweils mehr als 100 Mitgliedern. Einige der Familien, wie zum Beispiel die AP2/ERF-, NAC-, Dof-, GARP- und WRKY-Familien, kommen ausschließlich in Pflanzen vor (Riechmann *et al.* 2000; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009).

Viele TF sind dafür bekannt Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen. Zum Beispiel formen einige bZIP-TF untereinander Homo- und Hetero-Dimere (Ehlert *et al.*, 2006), NAC- und MADS-TF können Hetero-Dimere und sogar Tetra-Komplexe ausbilden (Honma und Goto 2001; Ernst *et al.*, 2004; Heazlewood *et al.*, 2007;). Wieder andere TF interagieren mit Signal-übertragenden Proteinen, wie Kinasen und werden phosphoryliert (He *et al.*, 2002; Furihata *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2008). Kombinatorische Kontrolle ist ein wichtiger Mechanismus eukaryotischer transkriptioneller Regulation (Singh, 1998). Promotoren zeichnen sich häufig durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinbindestellen aus und können durch ein ganzes Set transkriptioneller Aktivatoren reguliert werden. Gebunden an entsprechende *cis*-Elemente bilden verschiedene TF höher geordnete Nukleo-Proteinkomplexe, sogenannte Enhanceosome (zur Übersicht siehe Carey, 1998), die synergistische Effekte auf die Aktivierung der Transkription ausüben können. Auf diese Weise können TF multiple regulatorische Aufgaben übernehmen und in unterschiedlichen Komplexen die Expression vieler Ziel-Gene steuern.

1.2 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung von *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren

Nur ein kleiner Teil der TF aus *Arabidopsis* konnte bisher funktionell charakterisiert werden (Riechmann *et al.*, 2000). Kombinatorische Kontrollmechanismen und transkriptionelle Netzwerke machen eine Aufklärung sehr schwer und aufwändig. Aus diesem Grund werden Analyse-Plattformen zur Aufklärung der TF-Funktionen auf genomweiter Ebene immer wichtiger (Abb.1.1).

In den vergangenen Jahren lieferten große Sequenzierungsprojekte zahlreiche Informationen über verschiedene pflanzliche Genome, mit denen die Proteinkodierenden Abschnitte genau definiert werden konnten. Das Wissen ermöglichte letztendlich den Aufbau von umfangreichen ORF (*open-reading-frame*)-Kollektionen, als nutzbarere Ressource für verschiedene genetische Analysen. ORF-Klone stehen als Rekombinase-kompatible (Gateway[®]) Eingangsvektoren zur Verfügung, weshalb die kodierenden Sequenzen schnell und einfach in beliebige Expressionsvektoren überführt werden können.

Es gibt spezielle ORF-Kollektionen ausschließlich mit cDNA-Sequenzen transkriptioneller Regulatoren. Für *Arabidopsis thaliana* gibt es mehrere solcher TF-

ORF-Kollektionen. Zu den Wichtigsten zählt die PKU-Yale-Kollektion mit rund 1300 ORFs (Gong *et al.*, 2004). Diese wurde von Ou *et al.* (2011) auf ca. 1600 TF-Klone erweitert (Ou *et al.*, 2011). Die TF-only-library, die rund 1500 verschiedenen TF-ORFs enthält (Mitsuda *et al.*, 2010) und die REGIA-Kollektion mit rund 800 TF-ORFs (Paz-Ares, 2002). Die Regia-Kollektion wurde von Castrillo *et al.* (2011) auf ca. 1200 ORFs beträchtlich erweitert. Obwohl diese Kollektionen zum Teil redundant sind, decken sie das *Arabidopsis* TF-ORFeom zu großen Teilen ab.

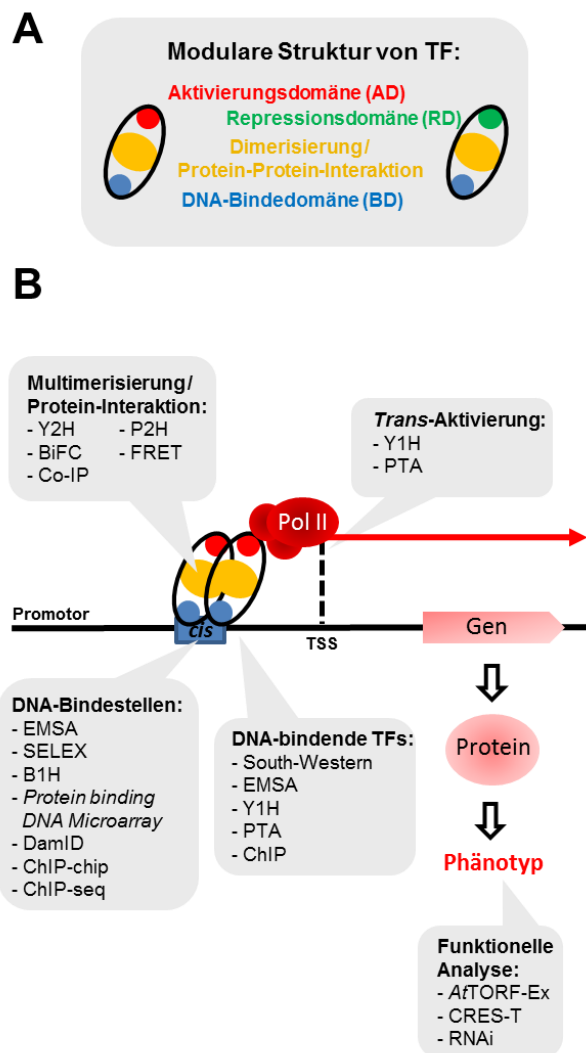


Abb.1.1: Zusammenfassung molekularbiologischer Methoden zur funktionellen Analyse von *Arabidopsis* TF

A: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von TF. Die verschiedenen Domänen eines TF bestimmen Funktionen wie DNA-Bindung (blau), Dimerisierung/Multimerisierung (gelb), transkriptionelle Aktivierung (rot) oder Repression (grün).

B: Übersicht der Methoden zur Aufklärung von TF-Funktionen. Für weitere Erklärungen zu einzelnen Methoden siehe folgender Text. Y2H: *yeast two-hybrid*; Y1H: *yeast one-hybrid*; B1H: *bacterial one-hybrid*; P2H: *protoplast two-hybrid*; BiFC: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation; FRET: Fluoreszenz-Resonance-Energie-Transfer; Co-IP: Co-Immunoprecipitation; PTA: *protoplast-transactivation-assay*; EMSA: *electrophoretic mobility shift assay*; SELEX: *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*; DamID: *DNA adenine methylation identification*; ChIP: Chromatin Immunoprecipitation; ChIP-chip: ChIP kombiniert mit der *Tilling-Array*-Technologie; ChIP-seq: ChIP kombiniert mit der Sequenzierung immunoprecipitierter DNA-Fragmente; CRES-T: *chimeric repressor gene silencing*-Technologie; RNAi: RNA-Interferenz; TSS: Transkriptionsstart. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.* (2011).

1.2.1 Hochdurchsatzverfahren zur Generierung von *Arabidopsis* Überexpressionssamen-Kollektionen

Der flexible Transfer von cDNA-Sequenzen in beliebige Zielvektoren ermöglichte die Etablierung von zahlreichen Hochdurchsatzverfahren zur Analyse von *Arabidopsis* TF. Basierend auf stabilen Pflanzentransformationen, konnte eine Reihe von *gain-of-function*-Ansätzen entwickelt werden (Kuromori *et al.*, 2009; Kondou *et al.*, 2010). Das FOX (Full-length cDNA Over-eXpressing)-gene-hunting-System ist einer der ersten Ansätze reverser Genetik in einem Hochdurchsatz-Maßstab. Das System bietet eine 10.000 cDNAs umfassende Kollektion transformierter *Arabidopsis*-Linien (Ichikawa *et al.*, 2006). Es folgte die Entwicklung einer *Arabidopsis* Überexpressionssamenbank speziell für die Analyse von TF (Weiste *et al.*, 2007). Die *AtTORF-EX* (Arabidopsis thaliana Transcription factor ORF Over-Expression)-Samenbank bietet kleinere, zum Teil den verschiedenen TF-Familien zugeordnete, Sammlungen transformierter Pflanzenlinien. In einem *batch*-Verfahren werden dafür Gateway[®]-kompatible „Entry“-Vektor-Kollektionen von 25-60 Vektoren, simultan in einer LR-Reaktion, in einen Pflanzen-Expressionsvektor überführt (Abb.1.2). Die TF-ORFs stehen anschließend unter der Kontrolle eines konstitutiven *CaMV35S*-Promotors. Der entstandene Vektor-Mix wird zur Amplifizierung und zur Selektionierung der Expressionsvektoren zunächst in *Escherichia coli* transformiert. Es folgt die Präparation der Expressionsvektor-Plasmid-DNA aus allen gewachsenen Kolonien. Nach der Transformation der Vektor-Kollektion in *Agrobacterium tumefaciens* kann die, zwischen T-DNA Grenz-Sequenzen kodierte, TF-DNA per *flower-dip*-Verfahren (Clough und Bent, 1998) in *Arabidopsis*

transferiert werden. Erfolgreich transformierte Pflanzen werden durch die Behandlung mit dem Herbizid BASTA[®] selektioniert und die Samen der Transkriptionsfaktor-Überexpressionskollektionen können nach der Reife gemeinsam abgeerntet. Die entstandenen Samenmische stehen dann für *Screening*-Ansätze zur Analyse von TF-Funktionen innerhalb verschiedener Stressantworten und Entwicklungsprozessen zur Verfügung. Es sollte aber beachtet werden, dass die T₂-Samenmische auch ein Viertel Wildtyp (WT)-Samen enthalten. In den einzelnen *Screening*-Anwendungen müssen daher mehr Samen ausgelegt werden. Bisher wurden Samen-Überexpressionskollektionen für die *Arabidopsis* TF-Familien AP2/ERF, NAC, Dof, bZIP und WRKY generiert. Weitere Kollektionen sollen im Rahmen dieser Arbeit entstehen. Die *At*-TORF-EX-Bank konnte bereits in *Screening*-Ansätzen zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder TF gegenüber oxidativen Stress (Weiste *et al.*, 2007) und dem Befall durch *Verticillium longisporum* (Iven, Dissertation 2009) erfolgreich eingesetzt werden.

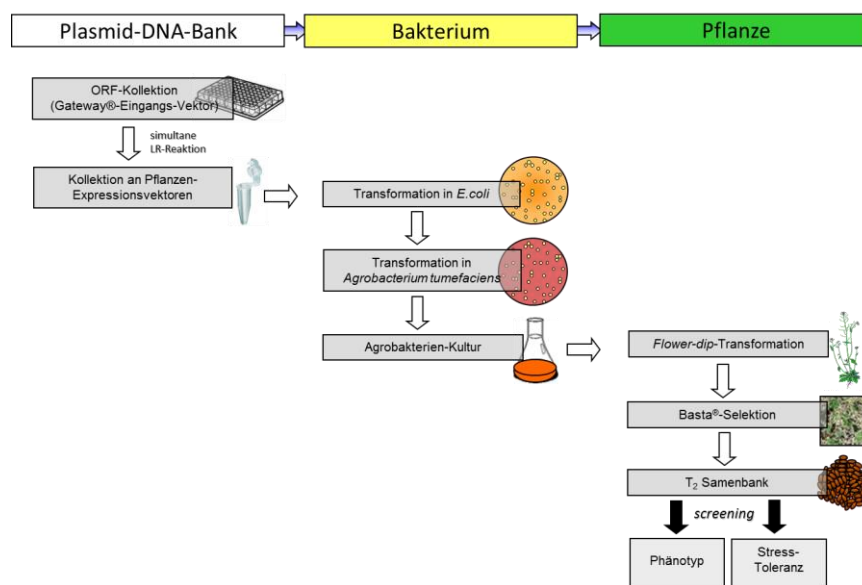


Abb.1.2: Schematische Darstellung der Transformationsroutine zum Aufbau der *At*TORF-EX-Bank
Gateway[®]-kompatible TF-ORF-Kollektionen werden simultan in einen Pflanzen-Expressionsvektor transferiert. Nach der Transformation in *E.coli* und *A.tumefaciens* erfolgt der *Agrobacterium*-vermittelte Transfer der T-DNA in *Arabidopsis*. Nicht transformierte Pflanzen werden über eine BASTA[®]-Selektion aussortiert. Die T₂-Samen-Generation kann anschließend in *Screening*-Ansätzen verwendet werden. Abb. modifiziert nach Weiste *et al.* (2007).

1.2.2 Methoden zur Identifizierung und Analyse von TF-Bindestellen

Zur Aufklärung der Funktion von TF gehört auch die Identifizierung der jeweiligen DNA-Zielsequenzen. Es gibt einige *in vitro* Ansätze zur Selektion von Bindestellen für rekombinante TF-Proteine. Auf SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)-basierende Methoden beruhen auf einem Verfahren zur „evolutionären Entwicklung“ von Oligonukleotid-Strängen, die spezifisch an ausgewählte TF binden können (Tuerk und Gold, 1990; Xue, 2005). Zu Anfang wird eine umfassende Oligonukleotid-Kollektion aufgebaut, aus der Moleküle mit entsprechenden Bindeeigenschaften durch gezielte Vermehrung herausisoliert werden. Durch gerichtete Mutationen der angereicherten Zielsequenzen können die Bindeeigenschaften gegenüber dem ausgewählten TF nach jeder Amplifikationsrunde verbessert werden. Nach mehreren Durchläufen werden letztendlich Sequenzen mit hoher Bindungsaffinität zum jeweiligen Zielprotein angereichert. Ein weiteres *in vitro*-Verfahren wurde erst kürzlich von Godoy *et al.* (2011) vorgestellt. Es handelt sich dabei um eine *Microarray*-Studie für Proteinbindung (*Protein-Binding Microarray 11* (PBM11)), basierend auf einer Kollektion aller möglichen doppelsträngigen 11-mers, die dem TF-Ligand zur Bindung angeboten werden. Denkbar wäre auch ein *in vivo bacterial one-hybrid Screening*-System mit einer Bank aus klonierten DNA-Bindemotiven (Meng *et al.*, 2005). Ein solcher Ansatz wurde bisher allerdings für den Bereich der Pflanzenforschung noch nicht etabliert. Es gibt eine Reihe weiterer *in vivo*-Methoden zur Analyse von DNA-Bindestellen. Der DamID (*DNA adenine methylation IDentification*)-Ansatz von Germann und Gaudin (2011) beruht auf der Methylierung von Bindestellen-angrenzenden DNA-Sequenzen, durch die Expression eines Fusionsproteins, zusammengesetzt aus dem bindenden TF und der prokaryotischen DNA-Adenin Methyltransferase (Dam). Die darüber gekennzeichneten Bereiche können anschließend durch spezifische, an methylierten Sequenzen schneidende, Restriktionsenzyme isoliert werden. Auch mit *Chromatin-Immunopräzipitation* (ChIP) lassen sich Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* nachweisen (Orlando 2000; Fode und Gatz 2009). Bestehende Interaktionen werden dafür in der Pflanzenzelle mit Formaldehyd fixiert. Das Chromatin wird anschließend mit Hilfe von Ultraschall in ca. 500 Basenpaar große Moleküle zertrümmert. Ein für das DNA-bindende Protein spezifischer Antikörper ermöglicht anschließend die Isolierung des DNA-Protein-

Komplexes. Nachdem die Interaktion wieder gelöst ist, kann die Identität des DNA-Fragments über verschiedenen Methoden geklärt werden. Eine quantitative *real-time* PCR-Analyse mit genspezifischen *Primern* ermöglicht die Aufklärung der Protein-Bindung an eine Promotor-Region. Wenn möglichst alle Bindestellen eines TF im Genom identifiziert werden sollen, eignet sich eine kombinatorische Analyse aus Chromatin-Immunopräzipitation und der *Microarray*-Technologie (ChIP-*on-chip*, Ren *et al.*, 2000; Horak *et al.*, 2002), oder mit Sequenzierungstechnologien der neuen Generation (ChIP-seq, Johnson *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007).

1.2.3 Analyse von *cis-trans*-Wechselwirkungen zwischen transkriptionellen Regulatoren und ihren Ziel-Promotorsequenzen

Bindungs- und Regulationsstudien von TF und ausgewählten Promotor-Elementen gehören zum Standard-Verfahren der Molekularbiologie. Es gibt zahlreiche Herangehensweisen zur Analyse von *cis-trans*-Interaktionen. Ein klassischer Ansatz zur Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen ist eine *South-Western*-Analyse (Bowen *et al.*, 1980; Siu *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um eine Kombination aus *Southern*- und *Western*-Analyse. Proteinextrakte werden dafür in einem SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es folgt eine Hybridisierung der Membran-gebundenen Proteine mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden spezifischer DNA-Sequenzen. Resultierende Protein-DNA-Interaktionen können autoradiographisch visualisiert werden. Singh *et al.*, (1988) erweiterte die *South-Western*-Analyse für den Aufbau einer *Screening*-Plattform zur Identifizierung DNA-bindender Proteine. In Phagen exprimierte cDNA-Banken werden dafür auf einen Filter übertragen. Die Identifizierung *trans*-regulatorischer Proteine erfolgt über die Hybridisierung mit der entsprechenden radioaktiv markierten DNA-*cis*-Sequenz. Allerdings handelt es sich um eine *in vitro* Analyse und diese reflektiert nicht immer die Gegebenheiten einer lebenden Zelle (Heinekamp *et al.*, 2002). Das *Yeast-one-Hybrid*-System bietet eine Möglichkeit *trans*-regulatorische Eigenschaften von Proteinen unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren (Fields und Song, 1989). Klassischerweise basieren *Yeast-one-Hybrid*-Ansätze auf der Interaktion vollständiger cDNA-Expressionsbanken mit einem Promotor:Reporter-Konstrukt der Wahl. Die Aktivierung des Promotors durch einen beliebigen TF kann über die Expression eines Reportergens detektiert werden. Für

gewöhnlich wird die cDNA-Bank in translationaler Fusion mit einer starken Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) exprimiert, um auch Proteine ohne eigene funktionelle Aktivierungsdomäne testen zu können. Gewonnen werden die cDNA-Banken durch reverse Transkription vollständiger mRNA-Präparationen. Für die Analyse transkriptioneller Regulatoren sind sie damit eigentlich nicht besonders geeignet. Die Transkriptionsrate von TF ist für gewöhnlich eher niedrig, wodurch TF-Transkripte in cDNA-Banken häufig unterrepräsentiert sind. In den letzten Jahren sind deshalb zahlreiche *Yeast-one-Hybrid*-Plattformen etabliert wurden, deren Expressionsvektor-Kollektionen auf normalisierten cDNA-Banken mit bis zu 1500 TF-Klonen beruhen (Mitsuda *et al.*, 2010; Castrillo *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2011). Der *Screening*-Ansatz von Castrillo *et al.* (2011) bietet noch einen weiteren Vorteil. Die TF-Kollektion ist in Mikrotiterplatten angeordnet und kann in einem Hochdurchsatz-Kreuzungs-Verfahren unabhängig mit dem Reporter-Konstrukt in Hefe koexprimiert werden. Aufwändige Re-Isolationsschritte sind nicht nötig, da die TF positiver Kolonien über die Plattenposition identifiziert werden können. Obwohl es sich bei den *Yeast-one-Hybrid*-Plattformen um sehr effiziente *Screening*-Systeme handelt, bleibt der Nachteil, dass nicht alle Aspekte transkriptioneller Initiation in *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Eukaryoten konserviert sind (Blackwood *et al.*, 1988; Guarente, 1988; Dobi und Winston, 2007). Vor allem die Distanz, über die die Transkription aktiviert werden kann, unterscheidet sich. In *Saccharomyces cerevisiae* erstreckt sich der Bereich der *upstream activation sequences* (UAS) nur über wenige Hundert Basenpaare, während *enhancer*-Elemente in Pflanzen oft mehrere Tausend Basenpaare vom Transkriptionsstart entfernt liegen können (Blackwood und Kadonaga, 1998; Guarente, 1988). Ist der Abstand zwischen wichtigen *cis*-regulatorischen Elementen und der TATA-Box eines Promotors zu weit, kann die Initiation der Transkription an alternativen, weiter proximal zum regulatorischen Element liegenden, Sequenzen stattfinden. Pflanzliche „Vollängen“-Promotoren werden im Hefesystem deshalb nicht immer korrekt aktiviert (Dobi und Winston, 2007). Es gibt aber auch die Möglichkeit Transaktivierung in Pflanzenzellen zu untersuchen. Mit dem von Yoo *et al.* (2007) entwickelten Transformationsverfahren für *Arabidopsis*-Protoplasten können TF, ähnlich wie im *Yeast-one-Hybrid*-Verfahren, über die Aktivierung eines Reportergens, auf ihre Transaktivierungseigenschaften getestet werden. Die Weiterentwicklung zum

Protoplast-two-Hybrid-System von Ehlert *et al.* (2006) ermöglicht darüber hinaus eine Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in der Pflanzenzelle. Eine Analyse-Plattform zur Anwendung der Methoden in einem Hochdurchsatzverfahren für *Arabidopsis* Protoplasten-Transformationen wurde bisher nicht etabliert.

1.3 Funktionen transkriptioneller Regulatoren in pflanzlichen Stressantworten

Die Regulation pflanzlicher Stressantworten ist sehr komplex. Zahlreiche Netzwerke transkriptioneller Regulatoren sorgen für effektive Antworten auf eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stresseinwirkungen. Die Etablierung der verschiedenen Methoden zur funktionellen Analyse von TF-Eigenschaften ermöglichte die Durchführung zahlreicher wissenschaftlicher Studien an transkriptionellen Regulatoren. In den letzten Jahren konnte deshalb die Funktion verschiedener TF in regulatorischen Prozessen pflanzlicher Stressantworten definiert werden.

1.3.1 Transkriptionskontrolle in der pflanzlichen Pathogenantwort

Obwohl Pflanzen in ständigem Kontakt zu verschiedenen potentiellen Pathogenen stehen, ist eine tatsächliche Infektion eher selten. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen eine Reihe komplexer Abwehrmechanismen entwickelt, um eine erfolgreiche Kolonisation durch verschiedene Pathogene zu verhindern (zur Übersicht siehe Lipka *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Tieren verfügen Pflanzen nicht über spezialisierte Zellen zur Pathogenabwehr, sondern jede Zelle ist in der Lage Befall zu erkennen und nötige Reaktionsmechanismen zu aktivieren (Dangl und Jones, 2001). Das Spektrum pflanzlicher Abwehrmechanismen ist in vielen Pflanze/Pathogen-Interaktionen sehr ähnlich (Heath, 2000; Jones und Dangl, 2006; de Wit, 2007; Dodds und Rathjen, 2010). Es wird allgemein angenommen, dass die pflanzliche Pathogenabwehr auf passiven Abwehrbarrieren und induzierbaren Abwehrmechanismen basiert. Als äußere Penetrationsbarriere dient die Epidermis mit aufgelagerter Wachsschicht (Cuticula); (Pollard *et al.*, 2008). In der Wurzel übernimmt die Endodermis eine ähnliche Funktion. Die Zelllagen des Casparischen Streifens, mit extrazellulär eingelagertem Suberin, bilden hier eine Schutzschicht (Franke und Schreiber 2007). Die induzierte Abwehr beruht zu einem Teil auf der transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene, die unter anderem für die Bildung antimikrobieller Substanzen, lytischer Enzyme (Chitinasen, Glukanasen, Proteasen) und der Synthese spezieller Abwehrproteine

(*Pathogenesis-Related-proteins*; PR-Proteine) verantwortlich sind (zur Übersicht siehe Sels *et al.*, 2008). Zum anderen führen Mechanismen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, sowie zur Verstärkung der Zellwand durch oxidative Quervernetzungen und lokale Ablagerungen von Kallose und Lignin am Infektionsherd (Bolwell *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; de Wit, 2007). Häufig werden Abwehrreaktionen auch begleitet von lokal begrenztem programmierten Zelltod, verursacht durch die *Hypersensitive Response* (HR); (Greenberg und Yao, 2004). Die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies an der Infektionsstelle zerstört pflanzliches Gewebe, wodurch biotrophen Organismen das Substrat entzogen wird. Zusätzlich verhindert die antimikrobielle Wirkung der reaktiven Moleküle eine weitere Ausbreitung des Pathogens (zur Übersicht siehe Alvarez, 2000).

Dass die meisten Pflanzenarten resistent gegen ein weites Spektrum verschiedener pathogener Mikroorganismen sind, beruht auf einer allgemeinen Grundresistenz, auch Basis-Inkompatibilität oder Nichtwirtsresistenz genannt. Diese Grundresistenz gilt als vorherrschende Form pflanzlicher Resistenz gegenüber Pathogenen und umfasst die bereits beschriebenen Abwehrmechanismen (zur Übersicht siehe Heath, 2000; Niks und Marcel, 2009). Einige angepasste Mikroorganismen sind allerdings in der Lage basale Abwehrmechanismen zu umgehen oder zu überwinden (Pedras und Ahiahonu 2005; Sun *et al.*, 2006). Man spricht in diesem Fall von der Basis-Kompatibilität oder Wirtssuszeptibilität. Eine erfolgreiche Infektion durch angepasste Mikroorganismen beruht häufig auf der Freisetzung spezieller Effektormoleküle. Diese Virulenz-Faktoren sind zum einen an der Suppression pflanzlicher Abwehrmaßnahmen beteiligt, zum anderen unterstützen sie die Etablierung der parasitären Interaktion (da Cunha *et al.*, 2007). Einige Pflanzenarten haben rassenspezifische Resistenzmechanismen zur Abwehr angepasster Pathogene entwickelt. Sie sind in der Lage die Pathogenspezifischen Effektormoleküle über entsprechende Rezeptoren (Resistenz-Proteine) zu erkennen und Abwehrmaßnahmen einzuleiten. Man bezeichnet die wirtsspezifische Resistenz auch als „Gen für Gen“-Abwehr, weil sie auf Grund komplementärer Paare bestimmter *Avr*-Gene (Avirulenz-Gene) im Pathogen und den *R*-Genen (Resistenz-Gene) in der Pflanze genetisch determiniert ist (Flor, 1971).

Pflanzen reagieren auf Pathogenbefall auch mit der Produktion spezifischer hormoneller Signalmoleküle. Jasmonsäure (JA), Salicylsäure (SA) und Ethylen (ET) zum Beispiel

regulieren verschiedene Abwehrreaktionen der Pflanze, die teilweise gegen spezifische Pathogen-Klassen gerichtet sind (zur Übersicht siehe Koornneef und Pieterse, 2008). Im Allgemeinen übernehmen ET und JA bei der Interaktion mit nekrotrophen Pilzen eine zentrale Signalfunktion, während SA eher eine Rolle in der Abwehr gegenüber biotrophen Organismen spielt (Glazebrook, 2005). SA hat auch einen antagonistischen Effekt auf die Signalwege, die durch JA und ET ausgelöst werden, indem es während der Interaktion mit nekrotrophen Pathogenen die Aktivierung von JA- und ET-responsiven Genen unterdrückt. Neben JA, SA und ET spielen auch weitere Pflanzenhormone, wie Abscisinsäure (ABA), Brassinosteroide (BR) und Auxin eine Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr (zur Übersicht siehe Spoel und Dong, 2008). Die Induktion der verschiedenen Abwehrmechanismen als Antwort auf pathogenen Befall erfordert massive Änderungen des Genexpressionsmusters. Die Regulation Stress-responsiver Gen-Aktivierung beinhaltet auch zahlreiche TF (Singh *et al.*, 2002; Eulgem, 2005). Mitgliedern vieler TF-Familien konnten bereits definierte Funktionen innerhalb verschiedener Abwehrreaktionen nachgewiesen werden. So sind zum Beispiel einige TF der ERF (*Ethylene Responsive Factor*)-Familie in der Pathogenantwort der Pflanze beschrieben (Libault *et al.*, 2007; Gutterson und Reuber, 2004). Die Expression vieler Mitglieder wird durch ET, Verwundung oder nach Befall durch *Pseudomonas syringae* induziert (Suzuki *et al.*, 1998; Onate-Sanchez und Singh, 2002). Phylogenetisch gehört die ERF-Familie zur AP2/ERF-Superfamilie (Nakano *et al.*, 2006). Neben ERF-TF umfasst diese auch die AP2-Familie und die RAV-Familie. Gekennzeichnet ist die AP2/ERF-Superfamilie durch die typische AP2-DNA-Bindedomäne, die erstmals in dem homeotischen Gen *APETALA2* (AP2) beschrieben wurde (Jofuku *et al.*, 1994) und daher ihren Namen hat. ERF-TF sind dafür bekannt an spezielle GCC-*cis*-Elemente der DNA zu binden (Fujimoto *et al.*, 2000). In Promotoren einiger PR-Gene befinden sich GCC-Elemente, wie zum Beispiel im Promotor des *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) Gens in *Arabidopsis* (Brown *et al.*, 2003). Viele ERF-TF zeigen Effekte auf die Expression des Gens, wenn sie überexprimiert oder ausgeschaltet werden. Die Überexpression von ERF1 (Solano *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2003), ORA59 (Pré *et al.*, 2008), AtERF1 (Pré *et al.*, 2008) und AtERF2 (Brown *et al.*, 2003) führt zu einer verstärkten Akkumulation der *PDF1.2*- mRNA. Für ERF1 und ORA59 konnte zusätzlich die Transaktivierung des *PDF1.2*-Promotors in Protoplasten

nachgewiesen werden (Pré *et al.*, 2008). Neben transkriptionellen Aktivatoren, gehören auch einige Repressoren zur ERF-Familie. ERF-TF mit einem c-terminalen EAR (ERF-associated amphiphilic repression) -Motiv sind dafür bekannt die Transkription von Zielgenen aktiv reprimieren zu können (Ohta *et al.*, 2001). In der pflanzlichen Pathogenantwort konnte zum Beispiel der EAR-ERF-TF NbCD1 als negativer Regulator der HR beschrieben werden (Nasir *et al.*, 2005).

Auch Mitglieder der bZIP-TF-Familie (basic leucine zipper) sind in Resistenzmechanismen gegenüber Pathogenen involviert (Singh *et al.*, 2002; Eulgem, 2005). bZIP-TF zeichnen sich durch ihre basische DNA-Bindedomäne und einen benachbarten Leucinzipper aus. Letzterer ermöglicht die Dimerisierung zweier bZIP-TF (Jakoby *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass TGA(TGACG-Motif Binding Factor)-bZIP-TF in die Pathogen-responsive und Salizylsäure-induzierte Expression von PR-Genen, wie zum Beispiel *PR1*, involviert sind (Fan und Dong, 2002). Einige der TGA-Faktoren interagieren mit dem NPR1 (NONEXPRESSER OF PR GENES)-Faktor (Zhou *et al.*, 2000), wobei diese Interaktion die Bindung der TGA-Faktoren an entsprechende TGA-*cis*-Elemente des *PR1*-Promotors, und vermutlich auch an weitere SA induzierbare Gene, unterstützt (zur Übersicht siehe Singh *et al.*, 2002).

Neben ERF- und bZIP-TF sind auch viele der WRKY-TF in die pflanzliche Pathogenantwort involviert (Singh *et al.*, 2002; Rushton *et al.*, 2010). Mitglieder der Familie sind durch ihre spezifische WRKY-DNA-Bindedomäne am N-Terminus und eine atypische Zinkfinger-Struktur am C-Terminus gekennzeichnet. Darüber hinaus ist bekannt, dass sie an konservierte W-Box-*cis*-Elemente binden, wie sie häufig auch in Promotoren verschiedener Gene der Pathogenantwort zu finden sind (Rushton *et al.*, 2010). Die Mehrheit der verschiedenen WRKY-Gene wird nach Pathogenbefall in der Pflanze transkriptionell hochreguliert und es konnte gezeigt werden, dass die TF in vielen verschiedenen Pathogenantworten der Pflanze eine Rolle spielen. Unter anderem sind sie auch bei der Aktivierung der *NPR1*-Genexpression beteiligt und sind daher ebenfalls in die Regulation der *PR1*-Expression involviert (Yu *et al.*, 2001).

Für eine Reihe weiterer TF konnte eine Rolle bei der Regulation der Synthese antimikrobieller Substanzen nachgewiesen werden. Die während der basalen Abwehrreaktion *de novo* synthetisierten antimikrobiellen Sekundärmetabolite (VanEtten *et al.*, 1994) weisen eine große chemische Vielfalt auf und sind jeweils für wenige Arten

spezifisch. Charakteristisch für *Arabidopsis* sind Indol-Alkaloide wie Indol-Glukosinolate und Camalexin (Böttcher *et al.*, 2009). Die Synthese der Verbindungen geht von der Aminosäure Tryptophan aus (Abb.1.3). Für die Bildung von Camalexin wird Tryptophan zunächst in Indol-3-Acetonitril (IAN) umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch die funktionell redundanten Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP71A13 und CYP71A12. In weiteren Schritten erfolgt die Synthese von IAN zur Dihydrocamalexinsäure. Die Cytochrom P450-Monooxygenase CYP71B15 (PAD3, PHYTOALEXIN DEFICIENT 3) katalysiert letztendlich den letzten Schritt der Synthese zu Camalexin (Böttcher *et al.*, 2009). Die Bildung verschiedener Indol-Glukosinolate, wie Indol-3-ylmethylglukosinolat (I3G) und 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat (4MI3G) erfolgt über die Zwischenprodukte S-Indolylmethylthiohydroximoyl-Cystein, Indolyl-Methylthiohydroximat und Indolyl-Methyl-Desulfo-Glukosinolat.

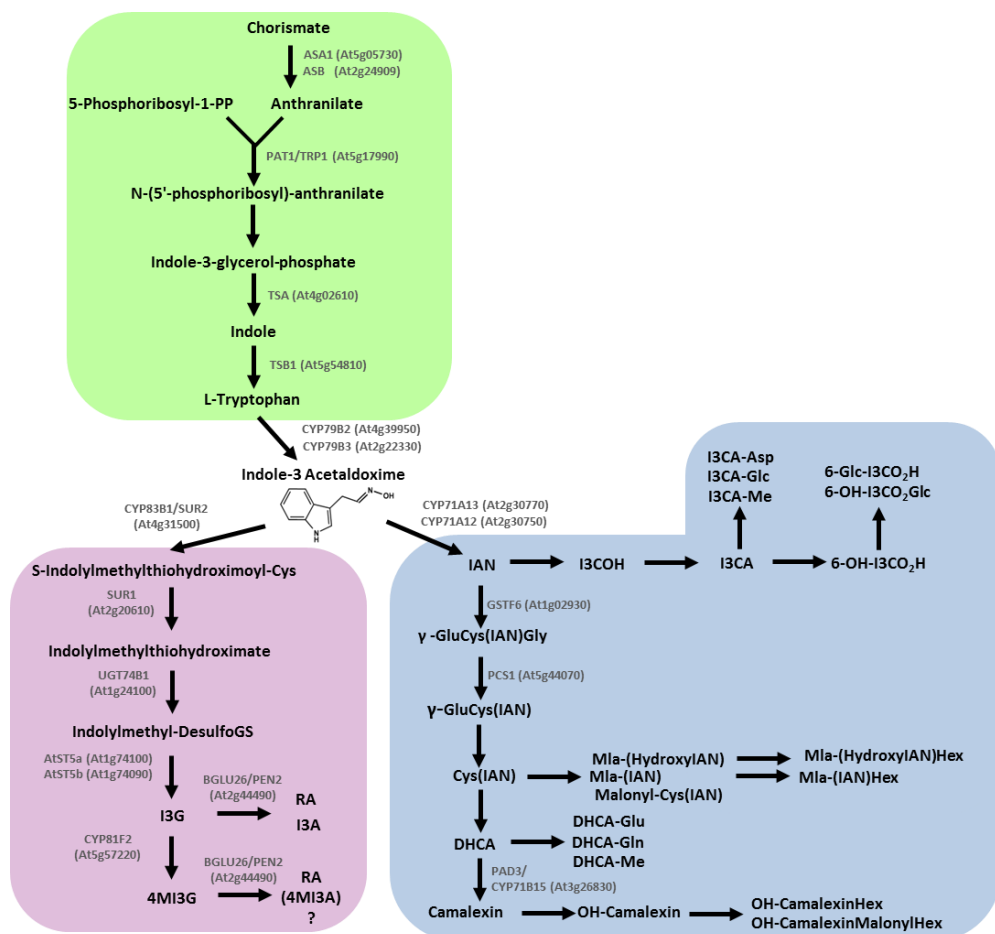


Abb.1.3: Flussdiagramm des Biosynthesewegs von Tryptophan und Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Dargestellt sind die wichtigsten Zwischenprodukte (schwarz) und die beteiligten Enzyme (grau) der Synthesewege von Tryptophan (grün hinterlegt) und abgeleiteten Metaboliten wie Camalexin (blau hinterlegt) oder verschiedener Indol-Glukosinolate (rot hinterlegt). Abkürzungen: IAN: Indol-3-Acetonitril, DHCH: Dihydrocamalexinsäure, I3COH: Indole-3-Carbinol, I3CA: Indol-3-Carboxyl-Säure, I3G: Indol-3-ylmethylglukosinolat, 4MI3G: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat, RA: *Raphanusamic Acid*, I3A: Indol-3-ylmethylamin, 4MI3A: 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin. Modifizierte Abbildung nach Iven *et al.* (in Druck).

Camalexin ist das wichtigste Phytoalexin in *Arabidopsis* und konnte bereits als antimikrobielle Substanz gegen nekrotrophe Pilze, wie *Botrytis cinerea*, beschrieben werden (Kliebenstein *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2007).

Indol-Glukosinolate sind bereits relativ gut beschrieben als Substanzen in der Insektenabwehr (Grubb und Abel, 2006). Gewebeerstörung, ausgelöst durch einen Insektenangriff, induziert die Spaltung der thioglucosidischen Bindung von Indol-Glukosinolaten durch Glykosyl-Hydrolasen (Myrosinasen) und führt zur Akkumulation einer Vielzahl toxischer Abbauprodukte (Bones und Rossiter, 2006). Neuere Ergebnisse zeigten, dass Indol-Glukosinolate und spezielle Abbauprodukte auch bei der Abwehr von pathogenen Pilzen von Bedeutung sind (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Allerdings unterscheidet sich der Indol-Glukosinolat-Metabolismus erheblich von dem der Insektenabwehr und führt zur Bildung anderer Endprodukte. Es konnte gezeigt werden, dass in *Arabidopsis*-Blättern die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP81F2 die Reaktion von I3G zu 4MI3G katalysiert. Sowohl I3G, als auch 4MI3G können anschließend durch die Glykosyl-Hydrolase PEN2 in verschiedene Metabolite, wie *Raphanusamic Acid* (RA), Indol-3-ylmethylamin (I3A) und 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin (4MI3A) konvertiert werden (Bednarek *et al.*, 2009; Pfalz *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur Insektenabwehr, wird die atypische PEN2-Myrosinase nicht in zerstörtem Gewebe aktiviert, sondern in der intakten Zelle, wobei das Peroxisomen-assoziierte Enzym nach Pathogenbefall zur Zell-Peripherie an die Stelle der Infektion transportiert wird (Lipka *et al.*, 2005). Welche der verschiedenen Indol-Glukosinolat-Derivate letztendlich eine Funktion in der pflanzlichen Resistenz gegenüber Pathogenen einnehmen, muss weiter untersucht werden. Dass die Aktivität von PEN2 in Bezug auf die Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber nekrotrophen Pilzen, wie *Botrytis cinerea* wichtig ist, konnte aber demonstriert werden (Bednarek *et al.*, 2009). Unklar ist auch,

ob die gebildeten Substanzen eine direkte antimikrobielle Wirkung haben oder als Signalmoleküle der pflanzlichen Pathogenantwort dienen (Clay *et al.*, 2009).

Zhao und Last (1996) konnten zeigen, dass die Regulation des Tryptophanbiosynthesewegs und die Akkumulation von Camalexin in *Arabidopsis* Blättern sehr koordiniert verlaufen. Ähnliche Ergebnisse lieferten Array-Daten von *Verticillium longisporum*-infizierten *Arabidopsis* Wurzel-Proben (Iven *et al.*, in Druck). Nach der Infektion werden zahlreiche Gene verschiedener Enzyme aus dem Syntheseweg von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin induziert. Zusätzlich reichert sich Camalexin auch in der Wurzel nachweisbar an.

Es sind bereits einige transkriptionelle Regulatoren des Biosynthesewegs von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten in *Arabidopsis* beschrieben (Abb.1.4). So ist bereits bekannt, dass der TF MYB51 aus der *Arabidopsis* MYB-Familie in die transkriptionelle Aktivierung der Indol-Glukosinolat-Biosynthesegene involviert ist (Gigolashvili *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist auch die Flg22-induzierte Expression des Tryptophanbiosynthesegens *ASA1* (Anthranilat-Synthase 1) abhängig von MYB51 (Clay *et al.*, 2009). Das Enzym *ASA1* katalysiert den ersten und limitierenden Schritt des Tryptophanbiosynthesewegs. Der TF MYB34/ATR1 ist ebenfalls an der Regulation der Synthese von Indol-Glukosinolaten in *Arabidopsis* beteiligt. Die Überexpression von *MYB34* führt zu einer verstärkten Akkumulation von Indol-Glukosinolaten in *Arabidopsis* (Bender und Fink, 1998; Celenza *et al.*, 2005). In *MYB34*-Überexpressionslinien ist die Transkriptmenge einiger Gene aus dem Tryptophanbiosyntheseweg (*ASA1* und *TSBI*), sowie aus dem abgeleiteten Biosyntheseweg zu Indol-3-Acetaldoxim (*CYP79B2*, *CYP79B3*) erhöht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Transkript-Menge von *CYP79B2*, *CYP79B3* in einer *MYB34-knock-out*-Linie stark reduziert ist, was dafür spricht, dass diese Gene das Hauptziel von MYB34 im Biosyntheseweg darstellen (Celenza *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde der TF ANAC042 aus der NAC-Familie (Olsen *et al.*, 2005) als Regulator der Camalexinbiosynthese beschrieben (Saga *et al.*, 2012). *Knock-out*-Linien des TF zeigen eine eingeschränkte Camalexin-Akkumulation und eine reduzierte Expression der Camalexin-Biosynthesegene *CYP71A12*, *CYP71A13* und *PAD3*. Dem TF WRKY33 wird ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Camalexinbiosynthese zugesprochen (Qiu *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2011). *WRKY33 knock-out*-Mutanten zeigen

eine signifikante Reduktion der Camalexin-Produktion (Mao *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass WRKY33 die Expression des *PAD3*-Gens, über die direkte Bindung an den *PAD3*-Promotor initiiert. Neben transkriptionellen Regulatoren mit aktivierenden Eigenschaften sind auch Repressoren in der Camalexin-Biosynthese bekannt. Die TF WRKY18 und WRKY40 sind zum Beispiel als negative Regulatoren der *CYP71A13*-Expression beschrieben.

Dass die Regulation der Biosynthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin so koordiniert verläuft lässt vermuten, dass es vielleicht TF gibt, die in der Lage sind, die Transkription mehrerer zentraler Gene der Biosynthesewege zu induzieren. Bisher ist ein solcher TF nicht beschrieben.

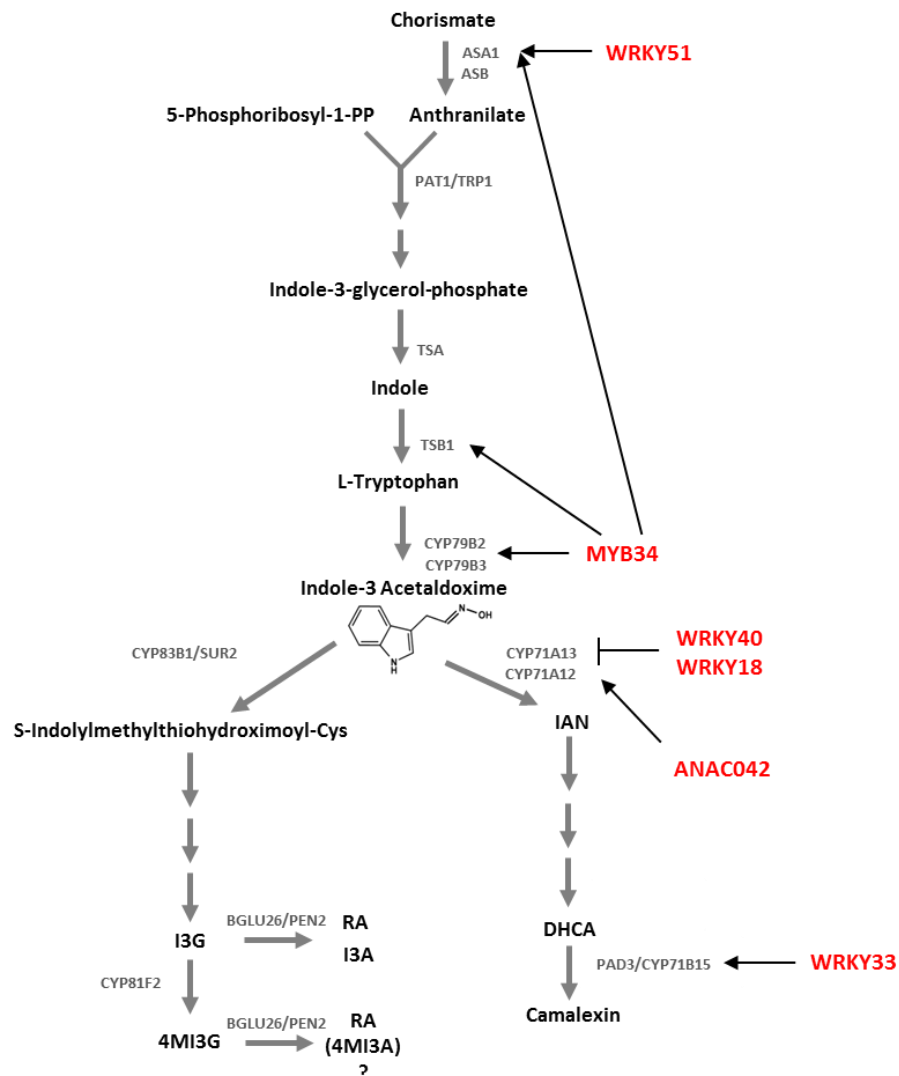


Abb.1.4: Transkriptionelle Regulatoren der Biosynthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Übersicht bekannter Regulatoren der Synthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin (in rot gekennzeichnet). Für weitere Erklärungen zu einzelnen TF siehe Text. Abkürzungen: IAN: Indol-3-Acetonitril, DHCH: Dihydrocamalexinsäure, I3G: Indol-3-ylmethylglukosinolat, 4MI3G: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat, RA: *Raphanusamic Acid*, I3A: Indol-3-ylmethylamin, 4MI3A: 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin. Modifizierte Abbildung nach Iven *et al.* (in Druck).

1.3.2 Transkriptionelle Regulatoren pflanzlicher Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress

Das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies wird während unterschiedlicher Stresssituationen in der Pflanze beobachtet. Sie entstehen zum einen als Folge der unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff, zum Beispiel auf Grund der Absorption überschüssiger Lichtenergie, während der Photosynthese (Takahashi *et al.*, 2008). Reaktiven Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidradikal (O_2^-), Hydroperoxylradikal (HO_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) sind hochgradig zellschädigend, weil sie biologische Moleküle, wie beispielsweise DNA, Proteine und Lipide oxidieren können (Dat *et al.*, 2000). Während der Photosynthese kann eine verstärkte Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies zur Zerstörung der Photosysteme und damit zur Photoinhibition führen (zu Übersicht siehe, Takahashi *et al.*, 2008). Trotz ihrer zerstörenden Eigenschaften, agieren reaktive Sauerstoffspezies in der Pflanzenzelle auch als Signalmoleküle und werden als Antwort auf unterschiedliche abiotische Stresseinflüssen, wie zum Beispiel Salzstress, Trockenheit oder Hitze gebildet (Desikan *et al.*, 2001; Mittler, 2002; Miller *et al.*, 2008). In der Pathogenantwort sind sie als Signalmoleküle an der Auslösung der *hypersensitive response* beteiligt (Greenberg und Yao, 2004).

Für Pflanzen ist oxidativer Stress also weder vermeidbar noch verzichtbar. Deshalb besitzt die Pflanze ein wirksames System zur Entgiftung auftretender reaktiver Sauerstoffspezies, basierend auf antioxidativen Verbindungen wie Ascorbat (Vitamin C), Glutathion, α -Tocopherol (Vitamin E) und Carotinoiden, sowie verschiedenen Enzymen, wie zum Beispiel die Katalase, die Superoxid-Dismutase und die Ascorbat-Peroxidase (zur Übersicht siehe Mittler, 2002).

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, inwiefern Abwehrmaßnahmen gegenüber oxidativem Stress reguliert werden und welche Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen. Im Zuge der Etablierung der *At*TORF-EX-Bank (Weiste *et al.*, 2007), wurde

eine Überexpressionssamenkollektion für ERF-TF auf erhöhte Resistenz gegenüber dem Kontaktherbizid Paraquat getestet. Paraquat nimmt vom Photosystem I kommende Elektronen auf und reagiert zum Paraquatradikal. Das Radikal überträgt wiederum sein überschüssiges Elektron auf ein Sauerstoffmolekül, wobei Superoxidradikale entstehen. Bei der Durchmusterung der Überexpressionssamenkollektion zeigten *Arabidopsis*-Pflanzen, die den ERF-TF AP2-20 überexprimierten eine erhöhte Toleranz gegenüber Paraquat. In einer Studie von Rizhsky *et al.* (2004) konnte demonstriert werden, dass die Expression der Zink-Finger-Faktoren *Zat12* und *Zat7*, sowie von *WRKY25* nach oxidativem Stress signifikant erhöht ist. Überexpressionslinien für *Zat12* und *Zat7* zeigen zudem eine erhöhte Toleranz gegenüber Paraquat und H_2O_2 . Weitere Experimente demonstrierten, dass *Zat12 knock-out*-Linien nicht mehr fähig sind die Expression der ASCORBATE-PEROXIDASE 1, sowie der beiden TF *Zat7* und *WRKY25* als Antwort auf oxidativen Stress zu erhöhen. Die Experimente sprechen alle dafür, dass *Zat12* eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Antwort gegenüber oxidativem Stress einnimmt. Allerdings müssen weitere TF an der Regulation des komplexen Systems pflanzlicher Detoxifizierung beteiligt sein.

1.4 Zielsetzung

Obwohl zahlreichen TF bereits eine definierte Rolle in pflanzlichen Regulationsmechanismen zugeordnet werden konnte, ist der größte Teil der *Arabidopsis* TF-Funktionen noch ungeklärt. Um die funktionelle Analyse von TF zu vereinfachen und weiter voran zu treiben, soll im Rahmen dieser Arbeit eine Plattform entstehen, mit der transaktivierende Eigenschaften regulatorischer Proteine in einem Hochdurchsatzverfahren getestet werden können. Geplant ist ein Mikrotiterplatten-System für Protoplastentransformationen, das die gleichzeitige Analyse von 96 *Arabidopsis*-TF auf einen Promotor der Wahl ermöglichen soll. Neben Transaktivierung, sollen mit dem System auch transkriptionelle Repression, Stimulus-induzierte Expression und Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden können.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Gateway[®]-kompatible TF-ORF-Kollektionen für *Arabidopsis* aufgebaut worden. Mit Hilfe dieser Kollektionen soll parallel zum Protoplasten-Transformationssystem eine umfassende *Arabidopsis* TF-Expressionsvektorbank aufgebaut werden, die für *Screening*-Ansätze zur Identifizierung transkriptioneller Regulatoren zur Verfügung stehen soll.

Im weiteren Verlauf der Arbeit soll das Protoplasten-Transaktivierungssystem eingesetzt werden, um transkriptionelle Regulatoren innerhalb verschiedener pflanzlicher Stressantworten zu identifizieren. Dafür soll in einem ersten Ansatz der Einfluss von bZIP-TF auf die Auxin-vermittelte Induktion des *GH3.3*-Promotors untersucht werden und in einem zweiten Ansatz sollen transkriptionelle Regulatoren, die der koordinierten Regulation der Biosynthese von Tryptophan-abgeleiteten antimikrobiellen Sekundärmetaboliten (Indol-Glukosinolate, Camalexin) identifiziert werden.

Des Weiteren ist geplant, die von Weiste *et al.* (2007) etablierte *AtTORF-EX*-Überexpressionssamenbank weiter auszubauen und anzuwenden. In einem *Screening*-Ansatz auf erhöhte Toleranz gegenüber der Chemikalie Paraquat, sollen TF der pflanzlichen Antwort auf oxidativem Stress identifiziert werden.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	recA1 relA1 thi-1 Δ lacU 169 80 (lacZ Δ M15) hsdR17 (r _k m _k +))	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 D(sr1- recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl-5 λ - leu mtl-1	Bernard <i>et al.</i> , 1993
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK, Rif ^r , Gm ^r	Koncz und Schell, 1986

2.1.2 Pflanzen

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-0 N1092	Wildtyp	Kultursorte
<i>atbzip1</i> (SALK_059343)	AtbZIP1 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip53</i> (SALK_069883)	AtbZIP53 Knock Down	NASC Stock Center
<i>atbzip1 atbzip53</i>	s.o.	Dietrich, 2006
Prom35S:AtbZIP1 L.C.2	AtbZIP1 Überexpression mit HA-Tag, pAlligator2, samenspezifisches GFP	Weltmeier,2005

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pRT-101-35S-LUC	pUC ori, 35S Promotor, LUC- Reporter gen, Amp ^R	R.Töpfer
pGL4.70-35S-hRluc	35S Promotor, <i>Renilla-Luciferase</i> - Reporter gen, nos, Amp ^R	Promega, modifiziert
pHBTL- Δ GFP	pHBTL-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht); Entfernung des <i>sGFP</i> Gens durch NcoI/NotI- Verdau, Klenow ‚fill in‘ und Religation, pUC ori, Amp ^R , 35S-Promotor	Heinekamp <i>et al.</i> (2002)
p35S-HA-GW	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, attR2	Ehlert <i>et al.</i> , 2006
p35S-HA-cGW	pUC ori, Amp ^R , attR1,attR2, 3x HA- tag	Christoph Weiste

p35S-GAD-GW	AD, pUC ori, Amp ^R , attR1,attR2	Ehlert <i>et al.</i> , 2006
p35S-GBD-GW	BD, pUC ori, Amp ^R , attR1, attR2	Ehlert <i>et al.</i> , 2006
pBT10-Gal4-Luc	pUC ori, Gal4UAS, LUC-Reporter, Amp ^R	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000 modifiziert
pUC-RD29A	pUC ori, Amp ^R	Kovtun <i>et al.</i> , 1998
pBT10-Asn1-LUC	Asn1-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-ProDH-LUC	ProDH-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-LEA76-LUC	LEA76-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Laura Hartmann
pBT10-PDF1.2-LUC	PDF1.2-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-TSA1-LUC	TSA1-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-PAT1-LUC	PAT1-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-CYP81F2-LUC	CYP81F2-Promotor, BamHI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-BGLU27-LUC	BGLU27-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-CYP71A12-LUC	CYP71A12-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pBT10-PAD3-LUC	PAD3-Promotor, EcoRI/NcoI Schnittstelle, LUC-Reporter, Amp ^R	Diese Arbeit
pDON201	pUC ori, Km ^R , attL1, Cm ^R , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pHBTL-HA-Kin10	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, KIN10, attR2	Laura Hartmann (unveröffentlicht)
pHBTL-HA-TFx (PTA-TF-Kollektion) Vollständige Liste siehe Anhang	3x HA- tag, pUC ori, Amp ^R , attR1, TFx, attR2	Diese Arbeit

2.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zweck
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese
Random nonamer	NNNNNNNNN	cDNA-Synthese
Uni24	ACGACGTTGTAACACGACGGCCAG	Sequenzierung
Rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
pE-HA LB	CGTCCCGGACTATGCAGATA	Sequenzierung
pE-HA RB	CGTATGGATAACCCCATCA	Sequenzierung
pBT2GW7HA rev	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	Sequenzierung
SeqL1	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Sequenzierung
SeqL2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Sequenzierung
pBT10-LUC for	AGTCAGTGAGCGAGGAAGC	Sequenzierung

pBT10-LUC rev	GTGATGTTACCTCGATATGTG	Sequenzierung
PDF1.2 EcoRI for	AAAAAGAATTCCTGATCTCTTATAATGT TCGG	Klonierung
PDF1.2 NcoI rev	AAAAACCATGGGTGAAGAAATAAGCCA AAGATC	Klonierung
LEA76 EcoRI for	AAAAAAAAAAGAATTCTTTTCATTGATT ACATTTACAAATTTTTGG	Klonierung
LEA 76 NcoI rev	AAAAAAAAAACAATGGTTCCTTTCTTCA AATGTGTATCAAACG	Klonierung
TSA1 EcoRI for	AAAAAGAATTCTAATCCTTTTATTGGAC TCGTCACA	Klonierung
TSA1 NcoI rev	AAAAACCATGGTTGAAAACTTTGTGG AATTTTTGG	Klonierung
PAT1 EcoRI for	AAAAAGAATTCTATTGTTTTTTTTTTTT GGAGGGG	Klonierung
PAT1 NcoI rev	AAAAACCATGGCACTCGATTGCTCAA CCAAC	Klonierung
CYP71A12 EcoRI for	AAAAAGAATTCAAAAACACGAGTTAG TTTTGGAACATA	Klonierung
CYP71A12 NcoI rev	AAAAACCATGGGTATGAAAGTGTTTG ATTTGTGATTTTTAA	Klonierung
CYP71A13 BamHI for	AAAAAAGGATCCATATTTTAAAAACAG ACATATATTACTCCG	Klonierung
CYP71A13 NcoI rev	AAAAACCATGGGTAAGAAAGTGTTTG ATTGGTGATTTT	Klonierung
PAD3 EcoRI for	AAAAAGAATTCCACTTCCGATTCTATG CAGTTTAAC	Klonierung
PAD3 NcoI rev	AAAAACCATGGTTTCCTTGCCCTGTTC TTGT	Klonierung
CYP81F2 BamHI for	AAAAAAGGATCCTGGTTGAAAATGATG TAGTTCACATC	Klonierung
CYP81F2 NcoI rev	AAAAACCATGGTTTTTTTTCCTTTGTG T TGATTTTT	Klonierung
BGLU27 EcoRI for	AAAAAGAATTCATCGCGTAACTTGTCT TTAACCA	Klonierung
BGLU27 NcoI rev	AAAAACCATGGTGTTGAAAATGGTTT ATAAGGGCT	Klonierung

Die Schmelztemperatur der gelisteten Primer wurde mit der Formel von Bolton und McCarthy (1962) berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 650/n$$

T_m = Schmelztemperatur, n = Anzahl der Basen, GC = Anteil an Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen

2.3 Größenstandards

2.3.1 DNA-Größenstandard

Als Fragmentlängenstandard bei der Gelelektrophorese wurde der Generuler DNA Ladder Mix von Fermentas verwendet.

2.3.2 Protein-Größenstandard

Als Größenstandard bei SDS-Gelen wurde der Page Ruler-Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

2.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller
α HA IgG	HA-Epitoptag (YPYDVPDYA)	polyklonal aus Kaninchen	1 : 600	Santa Cruz
anti rabbit IgG	Kaninchen-Immunoglobulin	polyklonal, Peroxidase gekoppelt	1 : 10000	GE Healthcare

2.5 Nährmedien und Zusätze

2.5.1 Bakterienmedien

DYT (Sambrook *et al.*, 1989)

16g/l Trypton
10g/l Hefeextrakt
5g/l NaCl
Autoklavieren

LB (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
pH 7,4 mit NaOH
autoklavieren

YEB (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Beefextrakt
2 g/l Hefeextrakt
5 g/l Pepton
5 g/l Saccharose
2 mM MgSO₄
pH 7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

2.5.2 Pflanzenmedien

MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)

4,4 g/l Murashige und Skoog Medium
pH 5,7 mit KOH
autoklavieren

2.5.3 Medienzusätze

2.5.3.1 Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicilin (Amp)	100 µg/ml	100 mg/ml in H ₂ O
Carbenicillin (Carb)	100 µg/ml	100 mg/ml in H ₂ O
Gentamicin (Gent)	10 – 25 µg/ml	25 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml	20 mg/ml in Methanol
Spectinomycin (Spec)	100 mg/ml	10 mg/ml in H ₂ O

2.5.3.2 Agar

Festmedien für Bakterien enthalten zusätzlich 12 g/l Kobe-Agar, Festmedien für Pflanzen 8 g/l Gel rite. Der Agar wird nach dem Einstellen des pH-Wertes aber vor dem Autoklavieren zugegeben.

2.5.3.3 Sonstige Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
Methylviologen (Paraquat)	3 µM	10 mM in H ₂ O

2.6 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben werden alle Lösungen und Puffer mit ultra pure H₂O angesetzt und anschließend autoklaviert (15min, 2bar, 121°C).

CTAB (DNA-Extraktion): 2 % CTAB
100 mM Tris HCl pH8,0
20 mM EDTA pH8,0
1,4 M NaCl
Vor Gebrauch 2 % β-Mercaptoethanol dazu

DEPC-H₂O (RNA-Extraktion): 1l H₂O
1ml DEPC
kräftig schütteln, ü.N. unterm Abzug ausdampfen lassen
autoklavieren

Enzymlösung (Protoplasten): 1,25 % Cellulase R-10 (0,625 g auf 50 ml)
0,3 % Macerozyme R-10 (0,15 g auf 50 ml)
0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml)
20 mM KCl (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
20 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
10 mM CaCl₂ (0,5 ml von 1 M auf 50 ml)
steril filtrieren und bei 4°C lagern

Fällungspuffer (RNA-Extraktion): 1,2 M NaCl
0,8 M tri-Natrium-Citrat

Färbelösung für Proteine

auf Nitrocellulosemembranen:	0,02 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Harnstoffextraktionspuffer:	4M Harnstoff 16,6 % Glycerin (100%) 5 % β -Mercaptoethanol 5 % SDS Ein paar Krümel Bromphenolblau
Laufpuffer 1x (SDS-PAGE):	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Ladepuffer für Agarosegele (OX):	10 ml TBE 10 ml Glycerin (87 %) 0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Orange G 0,2 % Xylencyanol
MMg (Protoplasten):	0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml) 15 mM $MgCl_2$ (1,5 ml von 0,5 M auf 50 ml) 4 mM MES (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml) steril filtrieren
PEG-Lösung (Protoplasten):	20 g PEG 4000 14,16 ml H_2O 13,3 ml 0,75M Mannitol 5 ml 1M $CaCl_2$ steril filtrieren
RNA-Probenpuffer (2,5x):	20 % MEN 8 % Glycerin 56,7 % Formamid 5 % Formaldehyd 0,001 % Bromphenolblau 0,1 % Ethidiumbromid 4 mM EDTA pH 7,5
Sammelgel (SDS-PAGE):	0,83 ml 30 % Acrylamid /BIS-Mix (19:1) 0,63 ml 1 M Tris/ HCL pH 6,8 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,005 ml TEMED 3,4 ml H_2O
TAE 20 x (Agarosegelelektrophorese):	0,8 M Tris 2,3 % (v/v) Essigsäure 20 mM EDTA
TBS (Western):	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,6 mit HCl

TBST (Western):	TBS 0,1 % Tween20
Trenngel 12% (SDS-PAGE):	8 ml 30 % Acrylamid/ BIS-Mix (19:1) 5 ml 1,5M Tris/ HCL pH 8,8 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED 6,6 ml H ₂ O
Transferpuffer (Western):	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol 0,01 % (w/v) SDS
Trizolpuffer (RNA-Extraktion):	380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt 0,8 M Guanidiniumthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 33,4 ml/l Na-Acetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure) 5 % Glycerin
W5 (Protoplasten):	154 mM NaCl (4,5 g/ 500 ml) 125 mM CaCl ₂ (2H ₂ O) (9,19 g/ 500 ml) 5 mM KCl (5 ml von 0,5 M auf 500 ml) 2 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 500 ml) autoklavieren
WI (Protoplasten):	0,5 M Mannitol (33,3 ml von 0,75 M auf 50 ml) 4 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 50 ml) 20 mM KCl (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml) steril filtrieren

2.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VE-100	Systec
Pipetten	2, 20, 200,1000	Gilson
Multikanal Pipetten	DV12-200C	Abimed,
CCD-Kamera	C4742-98	Hamamatsu
Digitalkamera	Coolpix	Nikon
Eismaschine	D-100	Icematic
Gefriertruhe -80°C	C66085	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage	GeliX Imager	INTAS
Gelelektrophoresekammer (Agarose)	-	Werkstatt der Universität Würzburg
Heizblock/-schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Heizrührer	-	IKA Labortechnik
Inkubationsschrank	-	WTC Binder, Memmert
Klimaschrank	-	Percival Scientific
Kühlschränke	-	Liebherr
Luminometer Plate Reader	Robion Solaris	STRATEC
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA

pH-Meter	HI 9321	InoLab
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Polyacrylamid-Gelkammer	-	AGS
RealTime PCR	Mini Opticon	BioRad
RNA-/ DNA-Calculator	Nano Drop	Pharmacia
Scanner	-	Epson
Schüttler	3005	GFL
Semi-Dry-Blot-Apparatur	-	Werkstatt der Universität Bielefeld
Sequenziergerät	ABI 3100	Perkin-Elmer Corporation
Sterilbank	Microflow	Nunc
Tischzentrifuge	5414	Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt	5403	Eppendorf
Rotoren f. Ultrazentrifuge	TFT 30.58; TFT 65.13	Kontron
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Waage, Feinwaage	SPO51, SAC62,	Scaltec Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA
Wasserbäder	1086	GFL
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16 A	Hettich

2.8 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Hartenstein
Fließpapier	Whatman
Gläser	Weck
Glasmaterialien	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Hartenstein
Immobilon-P, PVDF-Transfer-Membranen	Millipore
Kunststoff-Einwegmaterial (Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Spritzen, Petrischalen usw.)	Eppendorf, Greiner, Sarstedt, Abimed
Microtiterplatten	Nunc, Roth, HJ-Bioanalytik
Parafilm N	American National Can
Röntgenfilme	Kodak
Stahl-Netz 0,063 mm (für Protoplasten-Trafo)	Pressel

2.9 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agar (Bacteriological) Kobe I	Roth
Agar (für Pflanzen Anzucht) Select Agar	Invitrogen
Agarose (Gelelektrophorese)	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Ampicillin	Duchefa
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
dNTPs	MBI Fermentas
EDTA 25mM (für DNase Verdau)	Fermentas

EDTA	Roth
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Fluorescein (Fluorescein Calibration Dye)	BioRad
Formaldehyd	Roth
Formamid	Fluka
Glycerin (87 %)	Roth
Harnstoff	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Mannitol	Roth
Milchpulver	Glücksklee
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Natriumhypochlorid	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Organische Lösungsmittel (Alkohole etc.)	Merck, Roth
Pepton	Roth
Phenol	AppliChem
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth
Ponceau rot	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
Select Agar	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Silwet L77	Lehle Seeds
Syber Green	Lonza
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamidin)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Tween	Sigma
Verschiedene Salze	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Boehringer, Fluka oder Sigma bezogen.

2.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
Advantage-Polymerase-Mix	BD Clontech
Bio-Taq-DNA-Polymerase	BioLine
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva
DNaseI, RNase frei	Fermentas
H Minus M-MulV Reverse Transkriptase	Fermentas
Macerocym R-10	Sigma
Proteinase K	Roth
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase A (DNase-frei)	Sigma; Qiagen

T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	Bioline

2.11 Kits

Kit	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence Plus Kit (ECL ⁺)	Amersham
Beetle-Juice Kit	pjk
Lysis-Juice	pjk
NucleoBond [®] MaxiKit	Macherey-Nagel
Nucleospin [®] Extract	Macherey Nagel
Nucleospin [®] Plasmid	Macherey Nagel
Plasmid plus Midi Kit	Qiagen
<i>Renilla</i> -juice Kit	pjk

3 Methoden

3.1 Bakterienanzucht und Transformation

3.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgt entweder in LB-Medium oder im reichhaltigeren DYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) im Schüttler bei 37°C, mit geeigneten Antibiotika zur Selektion. Für die Anzucht auf Festmedium wird LB-Medium versetzt mit Agar verwendet.

3.1.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* in Flüssigkultur erfolgt in YEB-Medium über Nacht bei 30°C mit einem geeigneten Antibiotikum zur Selektion (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Anzucht auf Festmedium wird YEB-Medium versetzt mit Agar verwendet.

3.1.3 Lagerung der Bakterien

Auf Platten können Bakterien bei 4°C für 2-3 Monate gelagert werden. Für eine langfristige Lagerung müssen Gefrierkulturen angelegt werden.

Anfertigung einer Gefrierkultur:

- 750 µl einer frischen ü. N.-Kultur mit 750 µl 87 % Glycerin versetzen
- kräftig vortexen
- schockgefrieren in Flüssigstickstoff
- Lagerung bei -80°C

3.1.4 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Für die Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen werden Bakterien des Stammes DH5α verwendet. Die Methode erfolgt nach Inoue *et al.* (1990).

- 0,8 ml einer frischen ü. N.-Kultur in 40 ml LB-Medium überimpfen
- Anzucht der Kultur bis zur OD₆₀₀ von 0,5
- Je 10 ml der Kultur in 10 ml-Röhrchen überführen
- 5 Min., 6000g, 4°C abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml 50 mM CaCl₂ (4°C) resuspendieren
- 30 Minuten auf Eis inkubieren
- 5 Min., 6000g, 4°C abzentrifugieren
- Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂ (4°C) und 0,4 ml 87 % Glycerin aufnehmen
- Zu je 100 µl in 1,5 ml-Gefäßen aliquotieren
- schockgefrieren in Flüssigstickstoff
- Lagerung bei -80°C.

3.1.5 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E.coli*-Zellen können DNA aus dem Umgebungsmedium aufnehmen. Dafür werden *E.coli*-Zellen mit Hilfe der Methode von Hanahan (1983) mit Plasmid-DNA transformiert.

- Kompetente Zellen auf Eis auftauen
- Zugabe von 200–500 ng Plasmid-DNA
- Inkubation für 15 Minuten bis mehrere Stunden auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen)
- Hitzeschock der Zellen für 1 Minute bei 42°C (Aufnahme der DNA)
- Zugabe von 0,5 ml LB-Medium
- Regeneration der Zellen bei 37°C für 30 Minuten auf dem Schüttler (Ausbildung der Antibiotikaresistenz)
- Transformationsansatz auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren

3.1.6 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen erfolgt mit Bakterien des Stammes GV3101.

- 5 ml einer Agrobakterienflüssigkultur abzentrifugieren (5 min, 5000rpm, RT)
- Dreimaliges Waschen der Zellen in sterilem Wasser durch Resuspendieren und Abzentrifugieren
- Pellet in 500 µl sterilem Wasser resuspendieren und zu 100 µl Aliquots in Flüssigstickstoff einfrieren
- Lagerung bei -80°C

3.1.7 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Aufnahme freier DNA in *A. tumefaciens* wird durch kurze Spannungspulse ermöglicht.

- 2 mm Elektroporationsküvette mehrfach mit 70% EtOH und sterilem H₂O waschen
- Küvette unter der Sterilbank trocknen
- Kompetente *Agrobakterien* auf Eis auftauen
- Zugabe von 50-100 ng Plasmid-DNA (Transformationsansatz)
- Transformationsansatz in sterile Elektroporationsküvette überführen
- Pulsgebung am GenePulser mit 2,5 kV, 25 µF, 400 kΩ
- Zugabe von 2 ml YEB-Medium
- Überführung des Transformationsansatz in 2 ml-Gefäß
- Regeneration der *Agrobakterien* für 2 Stunden bei 28°C
- Transformationsansatz auf YEB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren

3.2 Pflanzenanzucht und Transformation

3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Um das Ausbreiten von Schädlingen in den Klimakammern zu vermeiden wird die Erden vor der Aussaat gedämpft.

- 4 l Pflanzenerde mit etwas Leitungswasser für 30 min bei 100°C autoklavieren
 - Samen auslegen
 - Stratifizierung der Samen für zwei Tage bei 4°C
 - Kultivierung in der Klimakammer unter definierten Lichtbedingungen
-
- Langtagbedingungen: 16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit
 - Kurztagbedingungen: 8 Stunden Licht, 16 Stunden Dunkelheit
 - 12/12-Bedingungen: 12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit

3.2.2 Sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf MS-Platten

Für die sterile Anzucht auf MS-Platten müssen *Arabidopsis* Samen oberflächensterilisiert werden (Clough und Bent, 1998).

- Samen in 2 ml-Gefäß überführen (Schichtdicke höchstens 0,5 cm)
- Becherglas mit 100 ml 12%iger Natriumhypochloritlösung in einen Exsikkator stellen
- Offene Samengefäße in einem Kunststoffständer auf das Becherglas stellen
- 5 ml 37% HCl zur Hypochloritlösung geben und den Exsikkator schnell verschließen, kein Vakuum anlegen
- Nach 4 den Exsikkator öffnen und Samengefäße schnell verschließen
- Samen unter der Sterilbank kurz ausdampfen lassen
- Sterile Samen auf MS-Platten auslegen
- Platten mit Parafilm oder Leukopor abdichten
- zwei Tage bei 4°C stratifizieren
- Kultivierung unter definierten Lichtbedingungen

3.2.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe der *flower-dip*-Methode

Der einfachste Weg zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* beruht auf dem Prinzip des *Agrobakterien*-vermittelte Gentransfers. Die durch Clough und Bent (1998) entwickelte *flower-dip*-Methode nutzt die Fähigkeit von *Agrobacterium tumefaciens* einen durch zwei Border-Sequenzen definierten Abschnitt (T-DNA) in die Pflanzenzelle zu transportieren und dort an einer zufälligen Stelle ins pflanzliche Erbgut einzufügen (Herrera-Estrella *et al.*, 1992). Die T-DNA ist auf dem Ti-Plasmid (Tumor-induzierendes Plasmid) kodiert. Für die gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom wurde das Ti-Plasmid entsprechend modifiziert. Die zwischen den Bordersequenzen kodierten Tumor-induzierenden Oncogene wurden entfernt und die für den Transfer notwendige Vir-Region wurde auf ein zweites Helferplasmid übertragen (binäres Vektorsystem). Fremde DNA-Sequenzen lassen sich jetzt mit

molekularbiologischen Methoden zwischen die Border-Sequenzen an Stelle der Oncogene inserieren.

Für die *flower-dip*-Methode werden Pflanzen in Medium mit entsprechend transformierten *Agrobakterien* und einem Benetzungsmittel getaucht. Die Bakterien können in den Fruchtknoten eindringen und den weiblichen Gametophyten transformieren. Es entstehen heterozygote Samen.

Die Transformationseffizienz ist am höchsten, wenn die gedippten *Arabidopsis*-Pflanzen ihre Blüte gerade erst öffnen. Durch das Abschneiden der ersten Blütenstände lässt sich die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anregen, was die Ausbeute an transgenen Samen erhöhen kann.

Transformationsablauf:

- *Arabidopsis* WT-Samen auf Erde auslegen (4 Samen pro Topf mit 6 cm Durchmesser)
- Anzucht bis zur gerade erst geöffneten Blüte
- 25 ml *Agrobakterien*-Vorkultur in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika ansetzen (10 µl Carbenicilin, 125 µl Rifampecin, 15 µl Gentamycin und 25 µl Kanamycin)
- bei 28°C schütteln über Nacht
- 400 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika (160 µl Carbenicilin, 2 ml Rifampecin, 240 µl Gentamycin und 400 µl Kanamycin) mit 1 ml der Vorkultur animpfen und bis zu einer OD600 von ~ 2,0 bei 28°C wachsen lassen
- Bakterien für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugieren
- Bakterien in einer 5 % igen Saccharoselösung mit 0,02 % Silwet resuspendieren
- Bakteriendichte auf eine OD600 von ~ 0,8 einstellen
- 500 ml Bakteriensuspension in ein hohes Becherglas geben und Pflanzen für einige Sekunden bis zur Rosette in die *Agrobakterien*-Lösung tauchen
- Pflanzen anschließend zurück in die Klimakammer stellen
- Pflanzen bis zur Samenreife weiter kultivieren

Für die Details zur Anwendung der Methode im *batch*-Verfahren siehe Weiste *et al.* (2007).

3.2.4 Selektion auf Basta®-Resistenz

Zur Selektion erfolgreich transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen wird mit der Integration der T-DNA ins Pflanzengenom auch eine BASTA®-Resistenz vermittelt. Basta® bzw. Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoanalin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) wirkt als Struktur analogon des L-Glutamat und inhibiert so die Glutaminsynthetase. Die Behandlung der Pflanze mit BASTA® führt zu Glutaminmangel und zur letalen Anhäufung von Ammonium. Pflanzen, die als Resistenzmarker das bar-Gen tragen, sind unempfindlich gegenüber Phosphinothricin (White *et al.*, 1990).

- Samen auf Erde aussähen
- Ca. 8 Tage in der Klimakammer anziehen
- Pflanzen mit 2-4 vegetativem Blättern mit 1 mM BASTA-Lösung[®] besprühen
- Nach 2-3 Tagen Behandlung wiederholen
- Überlebende Pflanzen umtopfen

3.2.5 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-Transformation

Arabidopsis Mesophyllprotoplasten werden als molekulares Werkzeug zur transienten Genexpression genutzt. Transaktivierungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren sowie Protein-Protein-Interaktionen können in diesem System schnell und einfach untersucht werden. Auch verschiedenste Stressbedingungen wie eine erhöhte Salzkonzentration sowie der Einfluss verschiedener Hormone (z.B. Auxin) auf die Genexpression unterschiedlicher Reportergene kann in Protoplasten getestet werden. Das Transformationsverfahren erfolgt nach Yoo *et al.* (2007), im 96-Probenverfahren nach Wehner *et al.* (2011a).

3.2.5.1 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-Gewinnung

- Blätter von 4 bis 5 Wochen alten Pflanzen (Erdanzucht) entnehmen und auf der Blattunterseite fein mit einem Skalpell in 1 mm Abstand einritzen
- Blätter mit der Blattunterseite nach unten auf 10 ml Enzymlösung in eine Petrischale mit 10 cm Ø legen bis diese voll bedeckt ist
- Der Zellwandverdau erfolgt über Nacht im Klimaschrank
- Vorsichtiges Schwenken bis zum Ausfall der Protoplasten in die Lösung
- Protoplastenlösung durch ein W5-Puffer benetztes Metallnetz (0,063 mm) vorsichtig in ein 50 ml-Gefäß gießen
- Für 2 Minuten bei 100g und RT zentrifugieren bei langsamer Beschleunigung und Bremse
- Überstand mit abgeschnittener Spitze vollständig entfernen
- Vorsichtig mit 4°C kalter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen und die Protoplasten durch leichtes Schwenken resuspendieren
- 1 Minute bei 100g und RT zentrifugieren, bei langsamer Beschleunigung und Bremse
- Überstand mit abgeschnittener Spitze entfernen
- Vorsichtig mit 4°C kalter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen und wieder vorsichtig resuspendieren
- Protoplasten für 5 Stunden auf Eis stellen

3.2.5.2 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-PEG-Transformation im Standard-Verfahren

- Überstand mit abgeschnittener Spitze entfernen
- Protoplasten mit gewünschter Menge MMg-Lösung versetzen und durch leichtes Schwenken resuspendieren
- In 2 ml-Gefäßen 20 µg DNA in 20 µl Volumen vorlegen
- 2 ml-Gefäße schräg halten und 200 µl Protoplasten-Lösung mit abgeschnittener Spitze hinzufügen
- Vorsichtig 3-4 mal invertieren
- 220 µl PEG-Lösung mit abgeschnittener Spitze hinzufügen
- 12-14 mal vorsichtig invertieren bis PEG- und Protoplastenlösung vollständig vermischt sind
- 25 min bei RT inkubieren
- 800 µl W5-Lösung vorsichtig hinzugeben und dabei den Rand des Gefäßes abspülen
- 1 Minute bei 100g und RT zentrifugieren (langsames Beschleunigen und Abbremsen)
- mit abgeschnittener Spitze 1 ml des Überstands entfernen, mit einer Insulin-Spritze den Rest vom Überstand abnehmen
- 250 µl WI-Lösung zugeben und Protoplasten vorsichtig durch leichtes Schwenken resuspendieren
- Inkubation über Nacht im Klimaschrank unter definierten Lichtbedingungen (12/12 h Bedingungen)
- Am Folgetag Überstand mit Insulin-Spritze entfernen
- Protoplasten im Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff schockgefrieren
- Die Ansätze können mehrere Tage bei -20°C gelagert werden

3.2.5.3 *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten-PEG-Transformation im Hochdurchsatz-Verfahren (PTA-System)

- Überstand mit abgeschnittener Spitze entfernen
- Protoplasten mit gewünschter Menge MMg-Lösung versetzen und durch leichtes Schwenken resuspendieren
- In weißer Mikrotiterplatte mit Rundboden (klare Mikrotiterplatte für duales System) je 1 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt und Reaktion in 4 µl Gesamtvolumen vorlegen
- Platte schräg halten und 30 µl Protoplasten-Lösung mit Multikanalpipette und weitlumigen Spitzen hinzufügen
- 33 µl PEG-Lösung mit Multikanalpipette und weitlumigen Spitzen hinzufügen
- 10 mal vorsichtig auf- und abpipettieren, bis PEG- und Protoplastenlösung vollständig vermischt sind
- 25 min bei RT inkubieren

- 120 µl W5-Lösung vorsichtig mit Multikanalpipette und weitleumigen Spitzen hinzufügen und 5 mal auf- und abpipettieren
- Mikrotiterplatte für 1 Minute bei 100g und RT zentrifugieren (langsames Beschleunigen und Abbremsen)
- mit weitleumigen Spitzen 175 µl des Überstands entfernen
- 100 µl WI-Lösung zugeben und durch 3 maliges Auf- und Abpipettieren Protoplasten resuspendieren
- Inkubation über Nacht im Klimaschrank unter definierten Lichtbedingungen (12/12 h Bedingungen)
- Am Folgetag 80 µl Überstand entfernen
- Es folgt die jeweilige Luciferase-Messung

3.2.5.4 Messung der Luciferase (LUC)-Aktivität

Die Messung der *Firefly*-Luciferaseaktivität für das PTA-Screening-System ohne Abgleich erfolgt mit lebenden Protoplastenzellen. Zuvor müssen die Zellen 8 Minuten dunkel stehen, um die Eigenphosphoreszenz abklingen zu lassen. Anschließend werden 40 µl WI-Puffer mit 1mM Luciferin-Kalium-Salz pro Reaktion über die Injektoren des Luminometers zugegeben. Die Lumineszenzmessung erfolgt nach jeweils 15 Sekunden Integrationszeit.

3.2.5.5 Messung der dualen Luciferase-Aktivität

Bei der dualen Luciferase-Messung wird sowohl die Aktivität der *Firefly*-Luciferase, als auch die der *Renilla*-Luciferase gemessen. Über Letztere wird die Transformationseffizienz ermittelt. Während das *Firefly*-Gen als Reporter durch verschiedene Promotoren angetrieben wird, steht das *Renilla*-Gen immer unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors. Bei der Transformation geht man davon aus, dass der Protoplast, wenn er transformiert wird, beide Luciferase-Konstrukte aufnimmt. Misst man also anschließend die Luciferase-Aktivitäten, kann man zur Einberechnung der Transformationseffizienz den Quotient aus *Firefly*- und entsprechendem *Renilla*-Wert berechnen.

Die Messung kann nicht an lebenden Zellen erfolgen, sondern erfordert eine Extraktion.

- Jeweils 40 µl 1:5 verdünnten *passive lysis buffer* (Promega) zu den Protoplasten geben
- Zur besseren Lyse 5 mal auf- und abpipettieren (Multikanalpipette mit normalen 200 µl-Spitzen)
- 15 Minuten auf Eis inkubieren
- für 10 Minuten bei 4000 rpm und RT zentrifugieren
- jeweils 10 µl klaren Überstand mit einer Multikanalpipette in zwei weiße Mikrotiterplatten überführen, so dass zwei identische Versuchsexemplare gemessen werden können
- jeweils eine Platte mit *Firefly*-Substrat messen, die andere mit *Renilla*-Substrat

Da keine lebenden Protoplasten gemessen werden, muss die Eigenphosphoreszenz nicht abgewartet werden. Die Messung erfolgt nach Protokoll des Substrat-Herstellers (pjk).

3.3 Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Phasentrennung. Durch Zugabe von Chloroform erreicht man, dass sich die DNA besser in der wässrigen Phase (hydrophile Phase) löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase verbleiben.

- Einige Blätter in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff wegfrieren
- Pflanzenmaterial mit Hilfe einer Stahlkugel auf einem Vortexer pulverisieren
- 200 µl CTAB dazugeben
- Inkubation für 15 Minuten bei 65°C
- Gleiches Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und gut vermischen
- 10 Minuten bei 13.000 rpm und RT abzentrifugieren
- Obere wässrige Phase in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Gleiches Volumen eiskaltes Isopropanol zugeben und mehrfach invertieren
- 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- 10 Minuten bei 13.000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand vorsichtig verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol waschen
- Überstand vorsichtig verwerfen
- Pellet für 30 Sekunden bei 65°C mit offenem Deckel trocknen
- Pellet in 50-100 µl Wasser resuspendieren

3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) dient der *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Zuerst beschrieben von Mullis und Faloona (1987) gehört sie zu den grundlegenden Methoden der Molekularbiologie. Sie beruht auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang zu vervollständigen. Als Startpunkt braucht die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, ab dem sie den Komplementärstrang aufpolymerisieren kann. Für die Vervielfältigung einer beliebigen DNA-Sequenz braucht man daher zwei, das Fragment abgrenzende, basenkomplementäre Oligonucleotide (*Primer*) als Startpunkt für die Synthese.

Die PCR-Reaktion erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten. 1. Denaturierung des DNA-Doppelstrangs zu Einzelsträngen durch Hitze (94–96 °C). 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* mit den Einzelsträngen bei ca. 55–65 °C (*Primer*-abhängig). 3. Kettenverlängerung (Elongation) zum Doppelstrang mit Hilfe freier Nucleotide bei 68–72 °C. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte wird das Zielfragment exponentiell angereichert. Die Taq-Polymerase wurde aus dem Hitze-resistenten Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und bleibt daher auch bei hohen Temperaturen aktiv. Die Temperaturen und die Länge der verschiedenen Schritte hängen von den jeweiligen *Primern*, von der verwendeten *template*-DNA ab und der Polymerase ab.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

- 2,5 µl 10x PCR-Puffer + MgCl₂
- 0,25 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl linker Primer (10 µM)
- 1 µl rechter Primer (10 µM)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase
- 1 µl DNA-Template
- 19 µl H₂O

3.4.1 Mutagenese-PCR

Mit einer Mutagenese-PCR lassen sich gezielt kleinere Veränderungen in einer Zielsequenz erzeugen, die zum Austausch, zur Deletion oder zur Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren führen können. Die verwendeten *Primer* (*sense* und *antisense Primer*) dienen in diesem Fall nicht zur Begrenzung eines DNA-Abschnitts, sondern als Matrize für die gewünschte Mutation. In diesen Bereichen sind sie nicht komplementär zur Basenabfolge. Wenn die flankierenden und komplementären Bereiche entsprechend groß sind, können die *Primer* trotzdem stabil mit der DNA hybridisieren. Mit Hilfe der Mutagenese-PCR lassen sich kleinere Veränderungen in der Basensequenz ganzer Vektoren erzielen. Mit der Synthese des komplementären Strangs wird das Plasmid vollständig abgelesen und amplifiziert. Die PCR erfolgt nach dem Protokoll des QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Für die Erstellung der Mutagenese-Primer steht ein frei zugängliches Programm zur Verfügung: <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 40 ng dsDNA (Template)
- 2 µl *sense*-Oligonukleotid-Primer (10 µM)
- 2 µl *antisense*-Oligonukleotid-Primer (10 µM)
- 1 µl dNTP-Mix
- mit H₂O auf 50 µl auffüllen
- 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2.5U)

PCR-Programm:

1. 95°C 30 Sekunden
 2. 95°C 30 Sekunden
 3. 55°C 1 Minute *Annealing*
 4. 68°C 1 Minuten pro kb des Plasmids
- Schritte 2-4 17 mal wiederholen

Die methylierte *template*-DNA kann durch das Enzym *DpnI* gezielt verdaut werden für mindestens 1 h bei 37°C. *DpnI* greift dabei die Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3' an.

3.5 Restriktionsspaltung der DNA

Als Restriktionsspaltung bezeichnet man die Trennung von Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. In der Molekularbiologie werden vor allem Typ II Enzyme eingesetzt. Diese schneiden die DNA an genau definierten Stellen (Smith und Wilcox, 1970) innerhalb einer meist palindromischen Erkennungssequenz, wobei entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen können. Es gibt eine große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen, die jeweils bestimmte Erkennungssequenzen haben (Roberts, 1985).

Ein Restriktionsverdau erfordert pro μg DNA mindestens 1 Unit Enzym. Für jedes Enzym müssen optimale Temperatur- und Pufferbedingungen eingestellt werden (siehe Herstelleranweisungen). Die Reaktionsdauer ist abhängig von DNA- und Enzymmenge, liegt aber ungefähr zwischen 1-16 Stunden. Nach der Spaltung können die meisten Enzyme bei 65°C inaktiviert werden. Die Kontrolle der Restriktion erfolgt über eine Gelelektrophorese.

3.6 Agarosegelelektrophorese von DNA-Molekülen

Die Agarosegelelektrophorese erlaubt es Nukleinsäure-Moleküle der Größe nach aufzutrennen (McDonell *et al.*, 1977; Southern, 1979). Dabei wird ein elektrisches Feld genutzt, um die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Agarosematrix zur Anode zu ziehen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße der DNA-Fragmente und von der Porengröße der Gelmatrix. Es gilt, je kleiner ein Molekül ist, desto schneller wandert es durch die Poren des Gels. Die verwendete Agarosekonzentration beeinflusst die Porengröße. Für sehr große Moleküle (1-30 kb) sollte daher ein 0,5-0,7 %-iges Gel verwendet werden. Für Moleküle mittlerer Größe (0,4-7 kb) ein 1 %-iges Gel und für sehr kleine Fragmente (0,1-2 kb) ein 2 %-iges Gel. Die Gelelektrophorese erfolgt in einem Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) bei einer Spannung von 90-140 Volt. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben mit Ladepuffer vermischt (1 μl pro 10 ml Probe) um die Dichte zu erhöhen und um die Proben auf dem Gel sichtbar zu machen. Mit Gelstain[®] wird die DNA angefärbt. Der Farbstoff wird direkt vor dem Gießen ins Gel gegeben. Er interkaliert mit der DNA und der Komplex fluoresziert unter UV-Licht auf dem Transilluminator.

3.7 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem Nucleospin[®] Extract Kit von Macherey-Nagel nach dem Protokoll des Herstellers.

3.8 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung des 3'-Hydroxy-Endes mit dem 5'-Phosphat-Ende zweier Nucleotid-Stränge unter Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung. Die Reaktion wird unter ATP-Verbrauch durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. In Anwesenheit von ATP wird das Enzym durch Adenylierung aktiviert und Pyrophosphat wird abgespalten. Das AMP wird auf das 5'-Ende eines der Stränge übertragen. Durch den nukleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-

Strangs wird die Bindung unter AMP-Freisetzung verschlossen. Durch die T4-Ligase lassen sich sowohl glatte als auch überhängende Enden verknüpfen.

Reaktionsbeispiel für die Insertion eines DNA-Fragments in einen Zielvektor:

- Vektor-DNA (ca. 50 ng)
- Fragment (>50 ng)
- 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer
- 2 µl 50% PEG 4000-Lösung (nur für glatte Enden)
- 1 µl T4-DNA Ligase
- Auf 20 µl auffüllen
- 1-2 Stunden bei RT ligieren
- Reaktion für 10 Minuten bei 60°C abstoppen

3.9 Gateway®-Rekombination

Die Gateway®-Technologie (Invitrogen) erlaubt den Transfer von DNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Plasmiden über eine ortsspezifische Rekombination. Die Methode basiert auf dem Rekombinationssystem des Phagen Lambda. Es dient der Integration der linearen Phagen-DNA in das Genom von *E. coli* und ermöglicht den Wechsel zwischen lytischem und lysogenen Zyklus (Ptashne, 1992). Die Rekombination erfordert spezifische Erkennungssequenzen auf der DNA, sogenannte *attachment (att)-sites*. Für die biotechnologische Nutzung des Systems müssen diese Sequenzen an den gewünschten DNA-Abschnitt angefügt werden. Realisiert werden kann das über die Amplifizierung des Fragments mit Primern, die an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen enthalten. Das Segment kann anschließend in einer BP-Reaktion in einen Gateway®-kompatiblen Eingangsvektor (*entry*-Vektor) transferiert werden. Vom Eingangsvektor kann der gewünschte DNA-Abschnitt dann in der LR-Reaktion in jeden beliebigen Gateway®-kompatiblen Zielvektor überführt werden.

3.9.1 BP-Reaktion

Die Reaktion ermöglicht den Transfer des DNA-Abschnitts zwischen den *attB*-sites in einen Donor-Vektor mit *attP*-sites. Es entsteht ein Eingangsplasmid mit *attL*-sites. Die Reaktion wird katalysiert durch den BP-Clonase-Enzymmix (λ -Integrase + *E. coli* Integration Host Factor). Das *ccdB*-Gen dient der negativen Selektion.



- 50-150 ng *attB*-PCR-Produkt (oder linearisierter Ziel-Vektor)
- 150 ng Eingangs-Vektor (z.B. pDONR201)
- 2 µl BP Clonase Enzym Mix (Puffer enthalten) zugeben
- Mit H₂O auf 10 µl auffüllen
- Über Nacht bei 25°C inkubieren

- 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5α-*E. coli* Zellen transformieren

3.9.2 LR-Reaktion

Die Reaktion ermöglicht den Transfer des DNA-Abschnitts zwischen den *attL*-sites eines Eingangsplasmids in einen Ziel-Vektor mit *attR*-sites. Die Reaktion wird katalysiert durch den LR-Clonase-Enzymmix (λ -Integrase + Excisionase + *E. coli* Integration Host Factor). Das *ccdB*-Gen dient der negativen Selektion.



- 200 ng Eingangs-Vektor
- 200 ng Ziel-Vektor
- 2 µl LR Clonase Enzym Mix (Puffer enthalten)
- Mit H₂O auf 10 µl auffüllen
- 2-4 Stunden (oder über Nacht) bei 25°C inkubieren
- 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5α-*E. coli* Zellen transformieren

Es besteht die Möglichkeit, das DNA-Segment aus dem Ziel-Vektor über eine BP-Reaktion wieder in einen anderen Eingangs-Vektor zu transferieren.

3.10 Kolonie-Screening mittels PCR

Um nach der Klonierung eines Vektors und der anschließenden Transformation in *E. coli* eventuell positive Klone schnell und einfach bestimmen zu können, kann eine PCR direkt mit einer Kolonie erfolgen. Die Zellen müssen dafür in einem zusätzlichen Schritt vor der eigentlichen PCR aufgeköcht werden, damit die Plasmid-DNA als Matrize zur Verfügung steht.

- PCR-Mastermix pipettieren (siehe Abschnitt 3.4)
- Kolonie mit steriler Pipetten-Spitze aufnehmen und einen Teil der Zellen in den PCR-Mastermix durch kurzes Rühren überführen
- Die restlichen Zellen an der Spitze in 5 ml-DYT-Kultur mit entsprechendem Antibiotikum überführen.
- PCR-Programm mit 10-minütigem Startschritt bei 95°C zur Lyse der Zellen wählen

3.11 Plasmid-Präparation mit Hilfe von Kits

Nucleospin [®] Plasmid-Kit (Macherey-Nagel):	Zur schnellen Isolierung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>
NucleoBond [®] MaxiKit (Macherey-Nagel):	Zur Gewinnung großer und hochreiner Plasmid-Mengen, z.B. für die Präparation der Reporter-Plasmid-DNA zur Protoplasten-Transformation
Plasmid plus [®] Midi Kit (Qiagen):	Zur schnellen Gewinnung mittlerer Mengen an hochreiner Plasmid-DNA, z.B. für die PTA-Expressionsvektor-Kollektion.

- Die Extraktion erfolgt jeweils nach dem Protokoll des Herstellers

3.12 Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse

Zur Isolierung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen kann auch eine klassische alkalische Lyse durchgeführt werden (Le Gouill *et al.*, 1994). Die Methode ist eine sehr günstige Alternative zum Nucleospin[®] Plasmid-Kit, vorallem da die Lösungsreste aus dem Kit für die alkalische Lyse verwendet werden können (Puffer A1-A3). Die gewonnene DNA ist allerdings sehr unsauber und kann nicht für alle Zwecke verwendet werden. Für einen Restriktionsverdau ist der Reinheitsgrad aber ausreichend. Die Methode kann z.B. nach der Transformation des LR-Reaktionsansatzes in *E.coli*, zur Überprüfung der gewachsenen Kolonien, angewandt werden.

- 2 ml einer *E. coli*-ü.N.-Kultur abzentrifugieren (1 Minute, 11000 rpm)
- Überstand verwerfen
- Die Zellen in 150 µl Puffer A1 resuspendieren
- Zugabe von 200 µl Puffer A2 (Lyse der Bakterien)
- Mehrfach invertieren
- Zugabe von 200 µl Chloroform
- Inkubation für 1 Minute bei RT
- 150 µl Puffer A3 zugeben (Neutralisation), mehrfach invertieren
- 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- 400 µl Überstand in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführen
- 800 µl eiskalten 96 %-igen Ethanol zugeben, mischen
- 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen

- Die pelletierte DNA mit 500 µl 70 % Ethanol waschen
- Überstand verwerfen und Pellet trocknen
- Pellet in 50 µl H₂O resuspendieren
- Plasmid-DNA kann so zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden

3.13 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz beruht auf der Methode von Sanger *et al.* (1977). Einzelsträngige DNA dient dabei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Die Sequenzierungsreaktion erfordert ebenfalls einen Primer als doppelsträngige Startsequenz für die DNA-Polymerase I. Zur Amplifizierung werden neben Desoxyribonukleotiden auch Fluoreszenz-markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz gegeben. Werden zufällig ddNTPs in den neuen DNA-Strang eingebaut, stoppt das Kettenwachstum. Didesoxyribonukleotiden fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers und deshalb kann keine Phosphodiesterbindung ausgebildet werden. Statistisch betrachtet wird an jeder Basen-Position einmal ein Didesoxyribonukleotid eingebaut. Über die unterschiedliche Länge der entstandenen DNA-Stränge lässt sich anschließend die Basenabfolge elektrophoretisch bestimmen. Die unterschiedlich Fluoreszenz-markierten Didesoxyribonukleotide der DNA-Stränge werden nach der Auftrennung in einer Kapillar-Gelelektrophoreseapparatur mit einem Laser detektiert. Längenunterschiede von einem Basenpaar können so aufgelöst werden.

Die Sequenzierung aller DNA-Proben erfolgt über einen Service der Firma LGC-Genomics: http://www.lgc.co.uk/divisions/lgc_genomics/services/dna_sequencing.aspx

3.14 Herstellung von Proteinextrakten aus transformierten *Arabidopsis* Protoplasten

Die Proteinextrakte werden mittels einer Extraktion mit Harnstoffextraktionspuffer gewonnen.

- Je 20 µl Harnstoffextraktionspuffer zu jeder Probe geben
- 10 Minuten bei 65°C inkubieren
- 1 Minute bei 12.000 rpm abzentrifugieren
- Die Proben können direkt auf das Gel aufgetragen werden

3.15 Western Blot Analyse

3.15.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) nach ihrer Molekularmasse elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Gelmatrix wird durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) erzeugt. Die Porengröße kann über Konzentration des Acrylamids und das Acrylamid/BIS-Verhältnis verändert werden. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisation durch Erzeugung freier Radikale

gestartet. N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient dabei als Katalysator. Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels werden Trenn- und Sammelgel nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zur Erzeugung von Probenaschen wird ein Spezialkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach der Polymerisation erfolgt das Einsetzen des Gels in die Elektrophoreseapparatur.

Reaktionsansatz für ein 12 %-iges Trenngel:

H ₂ O	6,6 ml
30 %-iger Acrylamidmix	8,0 ml
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml
10 % APS	0,2 ml
TEMED	0,008 ml

Reaktionsansatz für ein 5 %-iges Sammelgel:

H ₂ O	3,4 ml
30 %-iger Acrylamidmix	0,38 ml
1,5 M Tris-Puffer (pH 6,8)	0,63 ml
10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Alle Taschen werden mit Laufbuffer bedeckt. Anschließend werden die Taschen des Gels mit je 40 µl Proteinextrakt oder mit Harnstoffextraktionspuffer befüllt. Es sollten keine leeren Taschen mitlaufen. Der Gellauf erfolgt bei 140 V für etwa 2-4 Stunden.

3.15.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgt mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Anderson, 1984).

- PVDF-Membran und 6 Lagen Fließpapier auf die benötigte Größe zurecht schneiden
- Drei Lagen Fließpapier in Transferpuffer anfeuchten und auf die Blottingapparatur auflegen
- PVDF-Membran in Methanol aktivieren und anschließend mit Transferpuffer äquilibrieren
- PVDF-Membran luftblasenfrei auf die Schicht Fließpapier legen
- Das SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran positionieren
- Drei Lagen Fließpapier in Transferpuffer äquilibriertem und SDS-Polyacrylamidgel bedecken

Der Elektrotransfer läuft für eine Stunde bei 1 mA/cm² Filterfläche. Nach dem Transfer kann die Membran getrocknet und aufbewahrt werden. Vor der Weiterbehandlung ist

allerdings eine Aktivierung mit Methanol nötig. Die Proteinbanden auf der Membran können mit PonceauC gefärbt werden (Beladungskontrolle).

3.15.3 Immunodetektion mit dem ECL+ System

Die immobilisierten Proteine auf der PVDF-Membran werden immunologisch mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Der Primärantikörper richtet sich dafür spezifisch gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins (z.B. gegen ein HA-Epitop). Der sekundäre Antikörper hingegen ist an eine Peroxidase-gekoppelt und erkennt den Primärantikörper. Der Nachweis des sekundären Antikörpers erfolgt mit Hilfe des ECL⁺ Kits der Firma Amersham über die Peroxidase-katalysierte Oxidation des Substrates Luminol. Die resultierende Chemilumineszenz kann durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

- Absättigen freier Bindestellen mit 5 % Milchpulver in TBST für 1 Stunde (Blocken)
- 2 Stunden oder über Nacht mit dem Primärantikörper in TBST mit 1 % Milchpulver inkubieren
- Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit 1x TBST waschen
- 2 Stunden oder länger mit dem Sekundärantikörper in TBST mit 1 % Milchpulver inkubieren
- 5 x für jeweils 5 Minuten mit 1x TBST waschen
- ECL-Substratmix frisch aus Lösung A und Lösung B nach Angaben des Herstellers vorbereiten (3-4 ml, je nach Größe der Membran)
- Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Klarsichtfolie legen
- Substratmix gleichmäßig auftragen und für 5 Minuten inkubieren
- Überschüssiges Substratmix entfernen
- zweite Klarsichtfolie darauf legen

Für die Detektion der Chemilumineszenz wird ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt (unter Lichtausschluss). Die Exposition erfolgt je nach Signalstärke innerhalb weniger Sekunden oder bis zu einer Stunde. Der Film wird anschließend für 1-5 Minuten entwickelt und nach kurzer Wässerung für 3 Minuten fixiert.

3.16 Verwendete Computerprogramme

- MicrosoftOffice 2010 – Datenauswertung und -präsentation
- Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008) – vergleichende Expressionsanalyse von Genen in öffentlichen Transkriptomdatensätzen
- VectorNTI 10.1.1 (Invitrogen) – Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
- Chromas1.55 (Technelysium, 1998) – Analyse von Sequenzierdaten
- Blast (Altschul *et al.*, 1997; Schäffer *et al.*, 2001) – Programme zur Suche von ähnlichen DNA- oder Proteinsequenzen

4 Ergebnisse

4.1 Das PTA-System: Anwendung eines Hochdurchsatzverfahrens für Protoplasten-transformationen zur funktionellen Analyse des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor-ORFeoms

Transkriptionsfaktoren (TF) sind wichtige Regulatoren der Zelle und beteiligt an zahlreichen biologischen Prozessen. Es wird angenommen, dass weit mehr als 5 % aller Gene in *Arabidopsis* für TF kodieren (Guo *et al.*, 2005; Perez-Rodriguez *et al.*, 2010; Ramirez und Basu 2009; Riechmann *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.*, 2010), was die Bedeutung der regulatorischen Proteine für die Pflanze demonstriert. Bisher konnte aber nur ein kleiner Teil davon genetisch charakterisiert werden, da eine Eins-zu-Eins-Analyse jedes Faktors ein sehr aufwendiges Unterfangen darstellt. Um diesen Prozess voranzutreiben sollte ein Hochdurchsatzverfahren für Protoplasten-Transformationen zur funktionellen Analyse der Transaktivierungseigenschaften von TF entwickelt werden.

Für den Aufbau einer PTA (*Protoplast-Trans-Activation*)-*Screening*-Plattform (Abb. 4.1) zur Analyse der Transaktivierungseigenschaften von *Arabidopsis* TF wurde ein Konzept entwickelt, das zu wesentlichen Teilen auf der Verfügbarkeit von Gateway[®]-kompatiblen TF-ORF-Kollektionen (ORF: *Open Reading Frame*) beruht. In den letzten Jahren wurden zahlreiche solcher Kollektionen aufgebaut (Gong *et al.*, 2004, Mitsuda *et al.*, 2010; Riechmann *et al.*, 2000), die insgesamt rund 1500 der 2000 angenommenen TF für *Arabidopsis* enthalten. Das Gateway[®]-Verfahren erlaubt es schnell und präzise die TF-ORFs in einen Expressionsvektor zu transferieren, ohne aufwändige Restriktions- und Ligationsschritte. Damit ist es möglich in relativ kurzer Zeit eine große TF-Überexpressionskollektion für das Hochdurchsatzverfahren aufzubauen mit dem Ziel, die rund 1500 verfügbaren TF-ORFs für die *Screening*-Plattform nutzbar zu machen. Der Transfer in die Expressionsvektoren p35S-HA-GW (Ehlert *et al.*, 2006) und p35S-cHA-GW (Christoph Weiste unveröffentlicht) ermöglicht auch die basengenaue Fusion der ORFs mit einer Epitop-Sequenz (Abb. 4.1 B), wodurch die Expression der TF leicht in einem Immuno-Blot verfolgt werden kann. Die PTA-

Plattform selbst beruht auf dem Verfahren der Protoplastentransformation entwickelt von Yoo *et al.*, (2007). Zur Analyse der Transaktivierungseigenschaften großer TF-Kollektionen soll dieses zum Hochdurchsatzverfahren modifiziert werden und in Mikrotiterplatten durchführbar sein. Jeweils 96 TF können dann parallel mit einem gewünschten Promotor:LUC-Reporter in Protoplasten, in unabhängigen Reaktionen, transformiert werden, um zu bestimmen, ob sie den Promotor aktivieren können oder nicht. Die Detektion der Transaktivierung erfolgt über die Messung des Luciferasesignals.

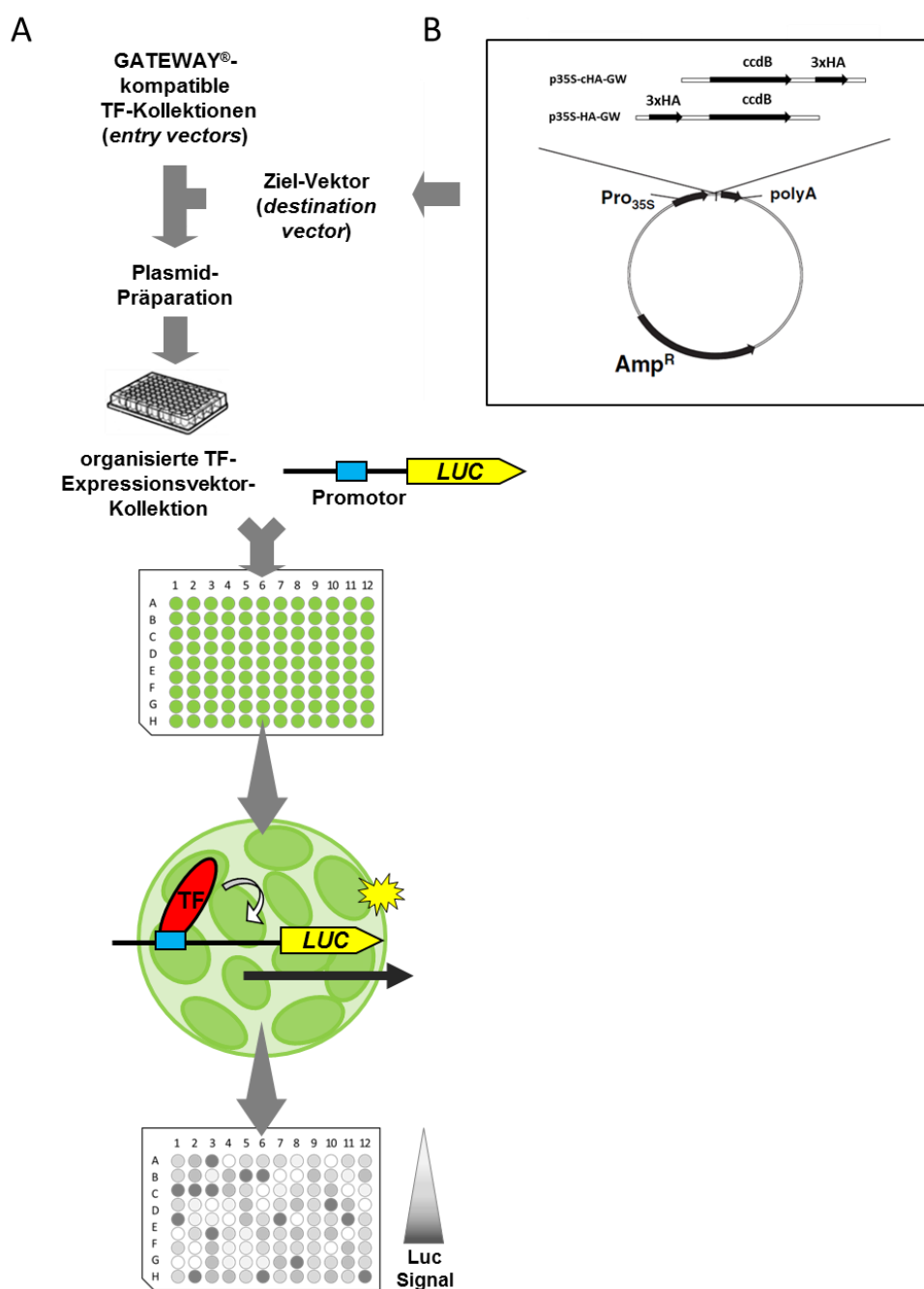


Abb.4.1: Schematische Darstellung des Arabidopsis Protoplasten-Trans-Aktivierungssystems (PTA).

A: Zur Analyse der Transaktivierungseigenschaften verschiedener Arabidopsis TF werden 96 Protoplastentransformationsansätze simultan in einer standard Mikrotiterplatte durchgeführt. Dafür werden Gateway®-kompatible TF-Kollektionen in einen Expressionsvektor überführt und anschließend mit einem Promotor:LUCIFERASE-Konstrukt kotransformiert. Eine mögliche Transaktivierung des Promotors kann über eine Lumineszenz-Messung detektiert werden. **B:** Der Transfer der Arabidopsis TF-ORFs in den Expressionsvektor p35S-HA-GW (Ehlert *et al.*, 2006) ermöglicht die Fusion an eine HA-Epitop kodierende Sequenz. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011b.

4.1.1.1 Etablierung eines Protoplastentransformationssystems für

Mikrotiterplatten

Für die Entwicklung des PTA-Systems musste zunächst ein Transformationsprotokoll entwickelt werden, das im Arbeits-Volumen (200-500 µl) einer Mikrotiterplatte verwirklicht werden kann. Das PTA-System sollte zudem automatisierbar, bzw. mit Multikanalpipetten durchführbar sein. Für die Realisierung wurde das von Yoo *et al.* (2007) entwickelte Transformationsprotokoll modifiziert und auf das maximale Probenvolumen von insgesamt 200 µl herunter skaliert. Dafür musste auch die benötigte Protoplastenmenge drastisch reduziert werden. 2×10^6 Protoplasten pro 96er-Mikrotiterplatte konnten maximal eingesetzt werden. Ein Transformationstest mit anschließender Lumineszenz Messung zeigte, dass diese Protoplastenmenge absolut ausreichend für messbare Signalstärken ist (Abb. 4.2).

Des Weiteren musste der Ablauf aller Transformationsschritte etabliert werden. In Mikrotiterplatten erfordern alle Schritte bei denen Lösungen zugegeben oder miteinander vermischt werden die Anwendung von Multikanalpipetten. Da Protoplasten aber sehr fragil sind und während des Pipettierens mit Standard-Spitzen zerstört werden würden, müssen alternativ spezielle weitlumige Spitzen verwendet werden (Abimed). Die Expression der Proteine erfolgt über Nacht (16 h). Bei der Entscheidung über einen geeigneten Reporter für das System fiel die Wahl auf die *Firefly*-Luciferase (Alam und Cook, 1990). Die Luciferase-Messung sehr sensitiv, was aufgrund des sehr kleinen Probenvolumens besonders wichtig ist. Zudem müssen die Protoplastenzellen vor der Messung nicht lysiert werden. Die Lumineszenz-Detektion aller 96 Ansätze findet ebenfalls in der Mikrotiterplatte statt und kann ohne weiteren Enzymtest direkt in der lebenden Zelle erfolgen.

Um auch die Vorbereitungen der 96-Proben-Transformation möglichst effizient zu gestalten erfolgte der Aufbau der TF-Plasmid Bank bereits als geordnetes Mikrotiterplattensystem (siehe Anhang, Tab. 7.6). Den einzelnen TF-Konstrukten wurde dafür, entsprechend der zugehörigen Familie, eine definierte Plattenposition zugewiesen. Für einen PTA-Test mit 96 verschiedenen TF muss die Plasmid-DNA aus der entsprechenden Platte nur noch mit einer Multikanalpipette auf eine neue Platte übertragen und mit einem Promoter-Konstrukt der Wahl kombiniert werden.

Für die Etablierung des PTA-Systems mussten eine Reihe von Evaluierungsschritten durchgeführt werden. Für die folgenden Experimente wurden dafür die bereits gut charakterisierten TF-Konstrukte TF1 (BD-AtbZIP2), TF2 (BD-AtbZIP11) und TF3 (BD-AtbZIP44) in Kombination mit dem Gal4-UAS₄:LUC-Reporter verwendet. Bei den TF-Konstrukten handelt es sich um BD-(Bindedomäne)-TF-Fusionskonstrukte, deren Aktivierungspotential bereits bekannt ist (Ehlert *et al.*, 2006). Der Gal4-UAS₄:LUC-Reporter enthält die für BD-fusionierte TF entsprechende Gal4-Bindestelle.

4.1.1.2 Vergleich möglicher Detektionsmethoden zur Lumineszenz-Messung

Die Expression des Promotor:Luciferase-Konstrukts in Protoplasten kann über eine Chemilumineszenz-Messung nachgewiesen werden. Die Zugabe von Luciferin, Magnesium und ATP bewirkt eine oxidative Decarboxylierung des Luciferin-Substrats durch das Luciferase-Enzym und die damit verbundene Emission von Lichtimpulsen. Über die Messung des emittierten Lichts kann letztendlich die Promotoraktivität bestimmt werden (Alam und Cook, 1990). Die Detektion der Luciferase-Reporteraktivität sollte direkt in der Mikrotiterplatte erfolgen. Zur Etablierung einer geeigneten Messmethode für das PTA-System wurden die Handhabung und die Effizienz eines Lumineszenz-Plattenlesegerätes mit der einer CCD-Kamera verglichen. Beide Systeme eignen sich prinzipiell für eine quantitative Lumineszenz-Messung von 96 Proben in einer Mikrotiterplatte (Abb. 4.2). Im Gegensatz zu einem Plattenlesegerät würde die Verwendung einer CCD-Kamera die gleichzeitige Detektion mehrerer Platten ermöglichen. Problematisch ist allerdings, dass die Kamera fest fixiert ist und deshalb nicht im gleichen Winkel zu jeder Probe steht. Die Proben-Oberfläche der äußeren Positionen wäre auf Grund der Dreidimensionalität der Platte für die Kamera nicht mehr vollständig sichtbar. In einem Plattenlesegerät kann jede Position einzeln vermessen werden. Die Intensität der Lumineszenz wird vom Gerät direkt in relativen Lumineszenz-Einheiten (*relative luminescence units*, RLU) angegeben. Zusätzlich ermöglichen automatische Injektoren die präzise und zeitlich genaue Zugabe der Luciferase-Substratlösung zu jeder Reaktion. Somit ist für jede der 96 Reaktionen eine gleichmäßige Integrationszeit gewährleistet. Ein zweites Injektionssystem erlaubt zudem die Verwendung einer zweiten Luciferase (*Renilla*-Luciferase) als internen Standard.

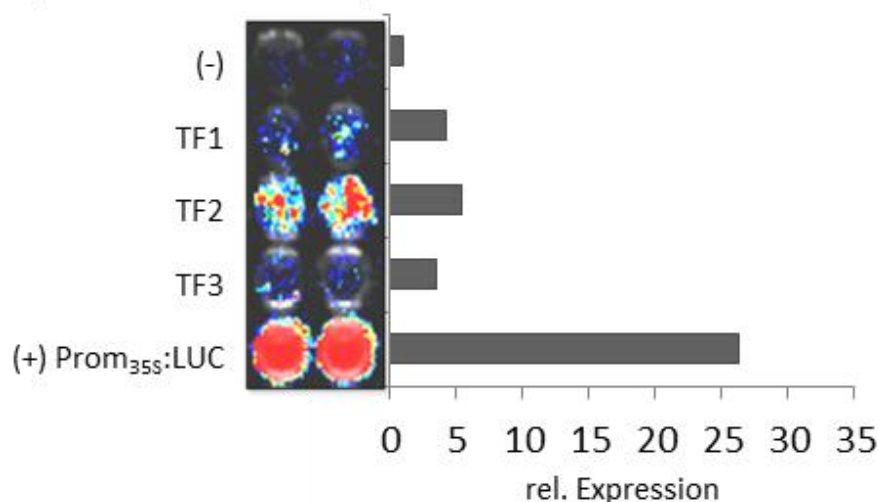


Abb.4.2: Methoden zur Detektion der Luciferaseaktivität im 96-Probenmaßstab

Die Lumineszenz-Messung in Mikrotiterplatten kann in einem automatisierten Plattenlesegerät (rechts) erfolgen oder mit Hilfe einer CCD-Kamera (links). Für beide Methoden wurde direkt vor der Messung Luciferin-Substrat zu den noch lebenden Protoplasten gegeben. Zur Etablierung geeigneter Messmethoden wurden die Transaktivierungseigenschaften drei verschiedener TF auf den Gal4-UAS₄:LUC-Reporter (Ehlert *et al.*, 2006) getestet: TF1 (BD-AtbZIP2), TF2 (BD-AtbZIP11), TF3 (BD-AtbZIP44). (-) zeigt die Aktivität des Gal4-UAS₄:LUC-Reporter ohne ko-exprimierten TF; (+) kennzeichnet die Luciferaseaktivität eines Prom_{35S}:LUC-Konstrukts (Positivkontrolle). Die Ergebnisse der Messung im Plattenlesegerät sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Das CCD-Kamera-Bild zeigt jeweils zwei Wiederholungen des gleichen Transformations-experiments. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

Das PTA-System sollte als schnelles und vor allem günstiges *Screening*-System aufgebaut werden. Ziel der Anwendung ist es, TF zu identifizieren, die einen bestimmten Promoter aktivieren können. Eine genaue Quantifizierung der jeweiligen Aktivierungsstärke sollte dabei noch zweitrangig sein, weshalb das PTA-*Screening*-System auch keine Normalisierung enthält. Die Verwendung eines dualen Luciferasesystems, mit einem zweiten Luciferase-Reporter als internen Abgleich, würde die Kosten des *Screening*-Systems erheblich erhöhen. Für die erste Suche nach positiven Kandidaten sind die Ergebnisse des PTA-Systems auch ohne Abgleich ausreichend signifikant (Abb. 4.3 A).

Um trotzdem quantifizierbare Luciferase-Messungen zu ermöglichen, wurde ein PTA-Test, basierend auf einem *Dual-Luciferase*[®]-Reporter-Gen-Assay (Promega), etabliert. Ein Prom_{35S}:*Renilla*-Luciferase-Konstrukt (pGL4.70-35S-hRluc, Promega) wird dafür zusätzlich in die Protoplasten kotransformiert. Mit der Zugabe von Coelenterazin, dem Substrat der *Renilla*-Luciferase, kann die resultierende Lumineszenz anschließend unabhängig von der *Firefly*-Luciferaseaktivität gemessen werden. Die Normalisierung der gewonnenen Daten erfolgt durch Dividieren des *Firefly*-Messwertes durch den

Renilla-Messwert (fLUC/rLUC). Im direkten Vergleich zum PTA-System ohne Normalisierung zeigt sich, dass sich die experimentelle Variabilität mit der Verwendung eines 35S:*Renilla*-LUC-Abgleichreporters minimieren lässt (Abb. 4.3). Unterschiede im Aktivierungspotential der verschiedenen TF sind präzise quantifizierbar.

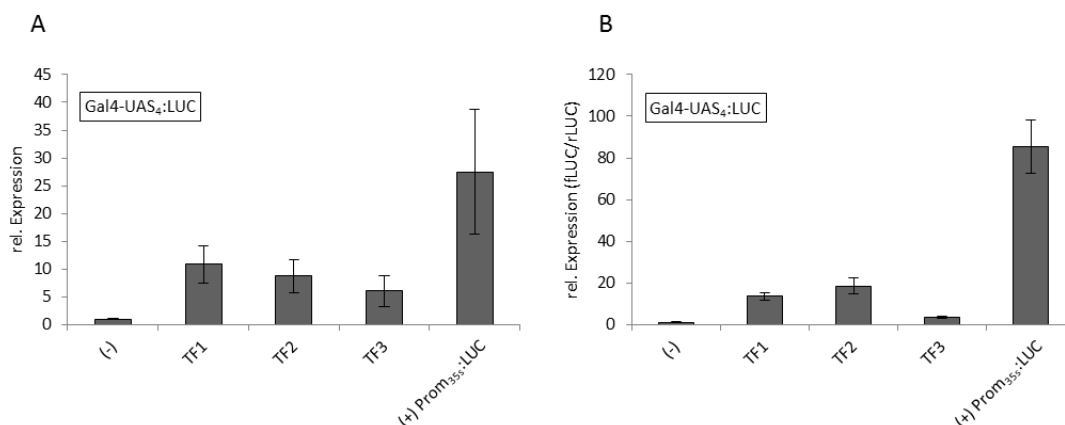


Abb.4.3: Vergleich der experimentellen Variabilität im PTA-System ohne Normalisierung und unter Verwendung eines 35S:*Renilla*-LUC-Abgleichreporters

In beiden Experimenten wurde die Transaktivierungseigenschaften drei verschiedener TF auf den Gal4-UAS₄:LUC-Reporter (Ehlert *et al.*, 2006) getestet: TF1 (BD-AtbZIP2), TF2 (BD-AtbZIP11), TF3 (BD-AtbZIP44). (-) zeigt die Aktivität des Gal4-UAS₄:LUC-Reporter ohne koexprimierten TF; (+) kennzeichnet die Luciferaseaktivität eines Prom_{35S}:LUC-Konstrukts (Positivkontrolle). **A** zeigt die Ergebnisse des PTA-Experiments ohne internen Abgleich, in **B** wurden die Transaktivierungsdaten, unter Verwendung eines Prom_{35S}:*Renilla*-LUC-Konstrukts, normalisiert. Dafür wurden die *Firefly*-Messwerte durch die *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

Die Ergebnisse der Messungen sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von sechs unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD).

4.1.1.3 Evaluierung verschiedener Präparationsmethoden zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA zur Protoplastentransformation

Die Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten erfordert große Mengen an hochreiner Plasmid-DNA. Für das System nach Yoo *et al.* (2007) werden kommerziell erwerbliche Maxipräparationskits verwendet (Macherey-Nagel). Diese liefern große Mengen reiner DNA (4000-5000 μ g/600 ml *E. coli*-Kultur), sind aber teuer und zeitaufwendig. Für den Aufbau einer TF-Plasmid Bank mit mehr als 1000 Faktoren wurden daher zahlreiche Alternativen getestet. Besonders schnell und günstig ist die Isolierung der DNA im Mini-Präparationsformat. Damit können vor allem sehr viele Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Ein Transformationstest zeigt allerdings, dass Plasmid-DNA, die mit Hilfe von Minipräparationskits gewonnen wird, für die Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten nicht geeignet ist. Das Ergebnis eines

Testversuchs mit der gewonnenen DNA zeigt, dass kein Transaktivierungssignal gemessen werden kann (Abb. 4.4). Als weitere Alternative wurde ein Midipräparationskit der Firma Qiagen getestet. Das Kit erfordert eine Vakuumpumpe, die den Transfer des Bakterienlysats durch die Chromatographie-Säule beschleunigt und Platz für 24 Reaktionen bietet. Durch dieses Prinzip lässt sich in sehr kurzer Zeit eine große Menge an unterschiedlicher Plasmid-DNA isolieren (~250 µg/25 ml *E. coli*-Kultur). Der Transformationstest zeigt zudem, dass die DNA sauber genug für die empfindlichen Protoplasten ist. Die Transaktivierungssignale mit der Midi-DNA sind genauso hoch, wie unter Verwendung der Maxi-DNA (Abb. 4.4).

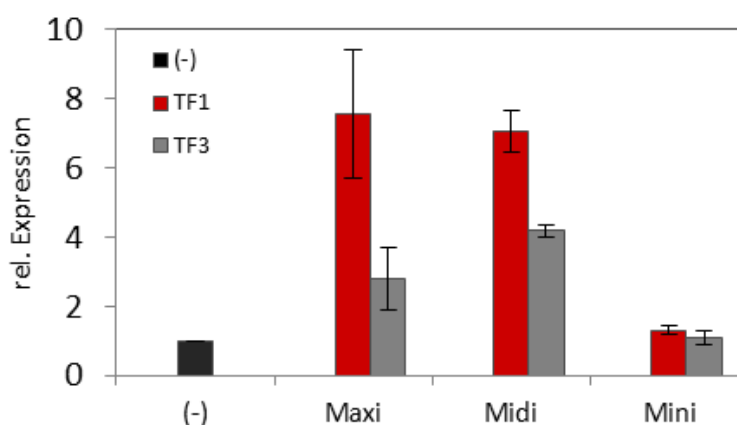


Abb.4.4: Erprobung verschiedener Präparationsmethoden zur Gewinnung geeigneter Plasmid-DNA für Protoplasten-Transformationen

Gezeigt ist der direkte Vergleich dreier Transformationsexperimente durchgeführt unter Verwendung verschieden präparierter Plasmid-DNA. Transformiert wurde jeweils Plasmid-DNA der TF-Konstrukte TF1 (BD-AtbZIP2) und TF3 (BD-AtbZIP44) in Kombination mit dem Gal4-UAS₄:LUC-Reporter. Die Transaktivierung ist dargestellt als rel. Expression, d. h. als vielfache Änderung zur Negativkontrolle (Gal4-UAS₄:LUC-Reporter ohne koexprimierten TF (-)). Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals (n=3) mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.1.4 Anpassung der erforderlichen DNA-Mengen an das Hochdurchsatzverfahren

Um die Kosten für das PTA-System möglichst gering zu halten sollte die erforderliche DNA-Menge pro Reaktion möglichst auf ein Minimum reduziert werden. Dafür wurde eine Plasmid-DNA-Konzentrationsreihe durchgeführt. Zu den Protoplasten wurde zwischen 0,5 µg DNA/Konstrukt und 5 µg DNA/Konstrukt gegeben. Die Lumineszenz Daten ergeben, dass die maximale Signalstärke bereits mit 2 µg DNA/Konstrukt erreicht ist (Abb. 4.5). Höhere Konzentrationen verursachen keine weitere Steigung.

Trotz des Maximums bei 2 µg DNA/Konstrukt zeigen die Daten aber auch, dass 0,5 µg bis 1 µg DNA/Konstrukt vollkommen ausreichend ist, um TF mit erhöhtem Transaktivierungspotential identifizieren zu können.

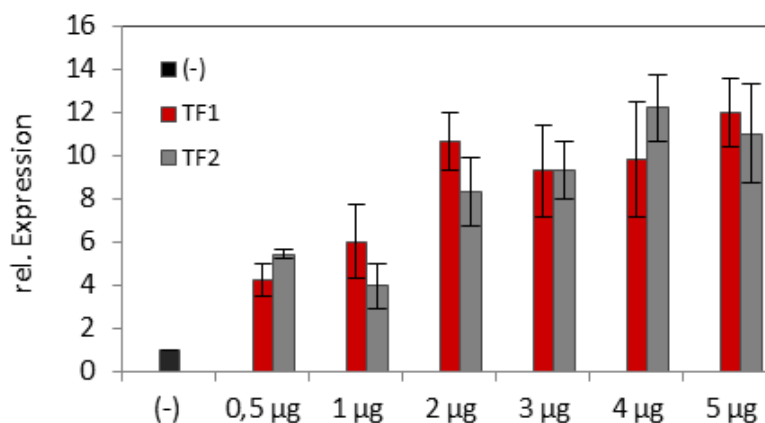


Abb.4.5: Bestimmung der minimal ausreichenden DNA-Menge an das Probenvolumen in einer Mikrotiterplatte

Dargestellt ist die Evaluierung der minimal benötigten Plasmid-DNA-Menge für das PTA-System. Transformiert wurden die TF-Konstrukte TF1 (BD-AtbZIP2) und TF2 (BD-AtbZIP11) in Kombination mit dem Gal4-UAS₄:LUC-Reporter. Die Transaktivierung ist dargestellt als rel. Expression, d. h. als vielfache Änderung zur Negativkontrolle (Gal4-UAS₄:LUC-Reporter ohne koexprimierten TF (-)). Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.1.5 Detektion der in Protoplasten exprimierten Fusionsproteine

Durch den Transfer der TF ORFs in den Expressionsvektor (p35S-HA-GW, p35S-cHA-GW) mittels des Gateway[®]-Systems ist jeder TF entweder N- oder C-terminal mit der Sequenz eines HA-Epitops fusioniert. Damit kann die Expression der TF in den Protoplasten schnell und einfach mit Hilfe eines HA-Epitop-Antikörpers detektiert werden (Ehlert *et al.*, 2006). Stellvertretend für die gesamte TF-Kollektion wurde als Machbarkeitsnachweis eine Western-Analyse für die Untergruppe III der ERF-TF (Nakano *et al.*, 2006) durchgeführt. Für 21 dieser Faktoren wurden dafür eine Protoplasten-Transformationen nach Yoo *et al.* (2007) im 1,5 ml-Maßstab durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine und dem Transfer auf eine Membran erfolgte die immunologische Detektion, (Abb. 4.6). Die Stärke der Expression der verschiedenen ERF-TF in Protoplasten ist sehr variabel, zu erkennen an den unterschiedlichen Bandenstärken. Es gibt aber nicht zwangsläufig einen Zusammenhang zwischen Expressionsstärke und Transaktivierungspotential. So ist z.B. die Expressionsstärke des

Faktors At4g25490 auf dem Western-Blot sehr gering, im PTA-Test, in Kombination mit dem *RD29A*-Promotor, gehört er aber zu den stärksten Aktivatoren.

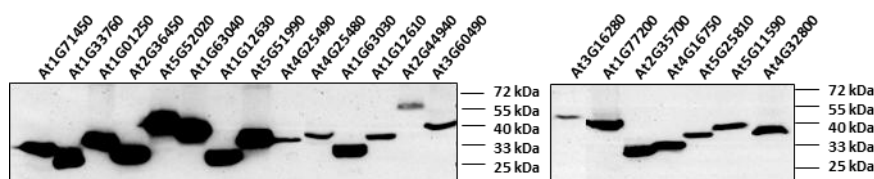


Abb.4.6: Immuno-Blot der Expression von TF-Konstrukten in Arabidopsis Protoplasten

Dargestellt ist die Western-Analyse von in Protoplasten transient exprimierten HA-markierten *Arabidopsis* ERF-TF. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines HA-Epitop-Antikörpers. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.1.6 Reproduzierbarkeit der im PTA-System erhaltenen Transaktivierungsdaten

Das PTA-System sollte als schnelle und günstige *Screening*-Plattform etabliert werden und beinhaltet daher keine Normalisierung durch ein Abgleich-Reportergen. Um zu gewährleisten, dass das PTA-System trotzdem aussagekräftige Resultate liefert, wurde die Reproduzierbarkeit der Daten überprüft. 46 ERF-TF (Nakano *et al.*, 2006) wurden dafür in drei unabhängigen Durchläufen auf ihre Aktivierungseigenschaften bezüglich des bereits gut charakterisierten *RD29A*-Promotors (Kasuga *et al.*, 1999, Kasuga *et al.*, 2004) getestet (Tab. 4.1). Von den 46 getesteten ERF TF können 23 den *RD29A*-Promoter aktivieren (Abb. 4.7). Die stärksten Signale können dabei in allen drei Wiederholungen reproduziert werden. Alle positiven Kandidaten zeigen die Aktivierung immerhin in zwei von drei Durchläufen. Das PTA-System liefert somit wiederholbare Daten und kann als Hochdurchsatzverfahren zur Analyse von Transaktivierungseigenschaften genutzt werden.

ERF TF	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3
At1g46768	1,2	1,5	1,1
At4g06746	0,9	1,4	1,0
At2g23340	0,9	0,9	0,9
At4g36900	1,3	1,3	1,0
At3g50260	0,8	0,8	1,0
At5g67190	0,8	0,9	1,0
At4g31060	2,0	3,0	1,3
At1g21910	1,6	1,7	1,1
At1g44830	3,1	3,4	2,1
At1g77640	1,0	1,1	1,0
At1g22810	1,4	1,5	1,5
At1g71520	1,3	1,7	1,3
At5g21960	1,0	0,9	1,0
At1g19210	1,1	1,4	1,0
At1g74930	1,0	0,9	1,1
At1g33760	2,1	2,6	1,3
At1g71450	1,9	2,5	1,8
At4g25480	23,7	41,2	2,8
At1g12610	14,5	20,2	6,6
At1g63030	6,9	4,9	4,1
At4g25490	50,3	34,5	23,5
At5g51990	2,9	1,5	1,7
At1g01250	2,1	3,7	1,3
At2g36450	7,7	7,0	5,8
At1g12630	2,2	2,3	1,4
At1g63040	1,4	4,0	2,8
At5g52020	1,3	0,9	1,0
At3g16280	1,1	2,7	1,6
At2g35700	6,0	2,0	2,2
At4g16750	6,2	3,9	3,5
At1g77200	4,7	4,8	3,8
At5g11590	6,5	4,4	2,4
At5g25810	6,5	4,4	3,0
At4g32800	5,1	7,5	1,4
At2g44940	1,9	2,7	1,3
At3g60490	3,6	7,8	7,5
At5g19790	1,0	1,5	1,1
At5g25390	1,0	0,8	0,9
At1g22985	1,0	0,7	0,9
At1g71130	1,0	0,9	1,0
At4g11140	0,9	1,4	0,9
At4g27950	1,2	0,8	0,9
At5g53290	1,0	1,1	0,8
At2g46310	1,0	0,8	1,1
At3g23230	0,8	0,7	0,8
At5g47230	1,0	1,0	0,8

Abb.4.7: Reproduzierbarkeit der im PTA-System erhaltenen Daten

Die Reproduzierbarkeit des Systems wurde in drei unabhängigen Wiederholungen eines Experiments analysiert. Getestet wurden jeweils 46 ERF TF der DREB- Unterfamilie (Sakuma *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2006) in Kombination mit dem Promotorkonstrukt Prom_{RD29A}:LUC. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur Negativkontrolle (Prom_{RD29A}:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 3x), dunkles grün: starke Induktion (3 - 20x). Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011A.

4.1.1.7 Die Transaktivierbarkeit von Reporterkonstrukten mit hoher

Grundaktivität

Die Grundaktivität, die man nach der Transformation jedes Promotors messen kann ist sehr unterschiedlich. Zur Demonstration wurden die Promotor-Konstrukte Prom_{35S}:LUC, Prom_{PDF1.2}:LUC, Prom_{ProDH}:LUC, Prom_{ASN1}:LUC, Prom_{RD29A}:LUC, Prom_{LEA76}:LUC und das Gal4₅-GCC₄:LUC-Konstrukt auf ihre Grundaktivität im PTA-System getestet. Im direkten Vergleich zeigt sich, dass viele Konstrukte ohne kotransformierten Effektor eine geringe Grundaktivität aufweisen (z. B. Prom_{RD29A}:LUC, Prom_{PDF1.2}:LUC, Prom_{LEA76}:LUC), während Andere (z. B. Gal4₅-GCC₄:LUC) die Expressionsstärke des konstitutiven Prom_{35S}:LUC-Konstrukt erreichen können (Abb. 4.8 A). Bestimmt wird sie durch die Anzahl endogener Faktoren, die in der Lage sind den Promotor zu aktivieren. Als endogene TF bezeichnet man die Proteine, die im Pflanzengenom natürlicherweise kodiert sind und von der Zelle exprimiert werden. Es stellt sich die Frage, ob Promotoren mit sehr hoher Grundaktivität überhaupt noch weiter aktiviert werden können. Um das zu überprüfen wurden Reporter-Konstrukte mit hoher Grundaktivität ausgewählt und in einem Versuch auf die Möglichkeit einer weiteren Aktivierung getestet. Dafür wurde zunächst das Prom_{ProDH}:LUC-Reporter-Konstrukt (Dietrich, Dissertation 2010) auf die Aktivierung durch AtbZIP2 und AtbZIP44 untersucht. Beide TF können die Expression des Reportergens erheblich weiter steigern (Abb. 4.8 B). In einem zweiten Test wurde das Gal4₅-GCC₄:LUC-Konstrukt zusammen mit ERF-Aktivatoren kotransformiert. Die Ergebnisse zeigen, dass auch die weitere Aktivierung eines Konstrukts mit der Grundaktivität eines *CaMV35S*-getriebenen Reporters durchaus möglich ist. Alle drei ERF-TF sind in der Lage das Konstrukt zum Teil 10-fach stärker zu aktivieren (Abb. 4.8 C). Starke Aktivatoren können also auch unter Verwendung von Promotoren mit sehr hoher Grundaktivität identifiziert werden. Prinzipiell sollte man allerdings für die Untersuchung solcher Promotoren im PTA-System eine zweite Luciferase zur Normalisierung verwenden. Bei einem Konstrukt mit hoher Grundaktivität ist die, durch die Transformationseffizienz bestimmte, Schwankungsbreite des Luciferase-Signals sehr hoch. Eine Kotransformation des Promotorkonstrukts mit verschiedenen TF könnte daher verstärkt zur Identifizierung falsch positiver, als auch falsch negativer Kandidaten führen.

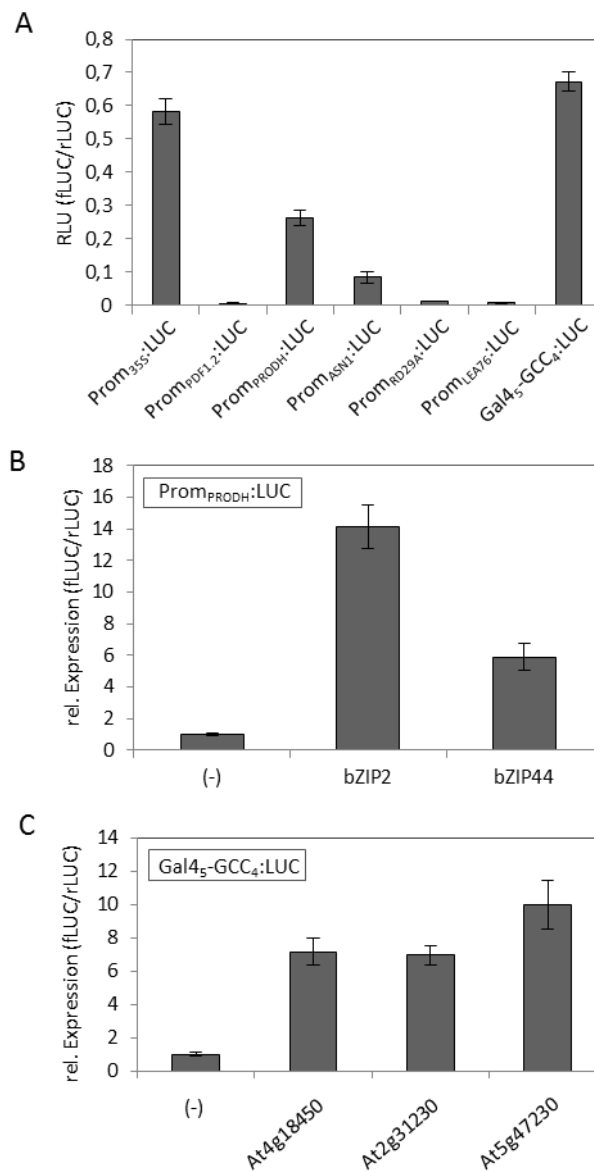


Abb.4.8: Transaktivierung von Reporterkonstrukten mit starker Hintergrundaktivität

Gezeigt sind die unterschiedlichen Grundaktivitäten einiger Promotoren im PTA-System (A). Reporter-Konstrukte mit sehr hoher Grundaktivität, wie Prom_{PRODH}:LUC (B) und Gal4₅-GCC₄:LUC (C), lassen sich durch starke Aktivatoren weiter aktivieren. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Expression ist in RLU (*relative luminescence units*) angegeben (A), bzw. als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt (B, C). Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

Tab.4.1: Position bereits charakterisierter cis-Elemente der Promotoren von RD29A, PDF1.2 LEA76, ASN1 und ProDH

Gezeigt ist die Lage der Motiv-Sequenzen von DRE, GCC und ACGT-like cis-Elementen relativ zum ATG-Start-Kodon. ¹: Nakashima *et al.*, 2006; ²: Brown *et al.*, 2003; ³: Busk und Pages, 1998; ⁴: Dietrich *et al.*, 2010. ⁵: Baena-Gonzalez *et al.*, 2007

Promotor	Cis-Element	Motiv-Sequenz	Position
RD29A ¹	DRE-Element	ATCAAGCCGACACAGA	-214 bis -199
		ATACTACCGACATGAG	-251 bis -236
		ATCATACCGACATGAG	-308 bis -293
		CATGGACCGACTACTA	-358 bis -343
PDF1.2 ²	CGG-Box	GCCGCC	-310 bis -305
Lea76 ^{3,4}	ABRE-like Element	ACGTGTC	-152 bis -146
		ACGTTTC	-170 bis -164
		ACGTAAA	-243 bis -237
		ACGTAGC	-334 bis -328
	ACGT-like Element	TACTCATCCC	-788 bis -779
ASN1 ^{4,5}	ACGT-like Element	TTAACGTTTT	-731 bis -722
		AACACGTGTA	-557 bis -548
		CGGACGTCGT	-377 bis -368
		AACACGTGGA	-354 bis -345
		TCTACGTGCA	-167 bis -158
ProDH ⁴	ACGT-like Element	CACTCATCCT	-842 bis -833
		CTGACGTCCT	-683 bis -674
		ATAACGTAGC	-572 bis -563
		AAAACGTGTA	-197 bis -188
		GACTCATCCT	-714 bis -705
		TTTACGTGCT	-171 bis -162

4.1.1.8 Überprüfung des PTA-Konzeptes anhand einer Transaktivierungsstudie der bereits bekannten Promotoren von *PDF1.2* und *RD29A* mit der AP2/ERF-TF-Familie

Um die prinzipielle Durchführbarkeit des PTA-Systems zu demonstrieren wurde ein Machbarkeitsnachweis erbracht. Für diesen wurden die Transaktivierungseigenschaften der ERF-TF-Familie (Nakano *et al.*, 2006) in Bezug auf die bereits gut charakterisierten Promotoren von *PDF1.2* (Brown *et al.*, 2003) und *RD29A* (Kasuga *et al.*, 1999, Kasuga *et al.*, 2004) untersucht. Es ist bereits bekannt, dass der *RD29A*-Promotor durch abiotischen Stress wie Trockenheit, erhöhte Salzkonzentration und Kälte induziert wird (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994). Der Promotor enthält sogenannte DRE-Elemente (*Dehydration-Responsive Elements*), die vor allem von Mitgliedern der DREB/CBF-Unterfamilie gebunden werden (Stockinger *et al.*, 1997). Der *PDF1.2*-Promotor enthält eine für ERF-TF typische GCC-Box und ist bekannt dafür durch biotische Einflüsse aktiviert zu werden (Fujimoto *et al.*, 2000); (Tab. 4.1). Bisher wurden nur wenige ERF-TF auf ihren Einfluss hinsichtlich Bindung oder Aktivierung beider Promotoren getestet, aber man kann annehmen, dass sehr nah verwandte Faktoren auch ähnliche Eigenschaften aufzeigen. Die ERF-Familie umfasst 122 Mitglieder (Nakano *et al.*, 2006) von denen 107 in der Studie getestet wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Promotoren sich nur durch einzelne nahverwandte Untergruppen der Familie aktivieren lassen (Abb. 4.9). Darüber hinaus ist zu sehen, dass es einen Zusammenhang zwischen Transaktivierung und evolutionärem Kontext gibt. Für die phylogenetische Einordnung der ERF-TF erfolgte eine Stammbaumanalyse. Mit Hilfe der Neighbor-Joining Methode wurden dafür die Sequenzen der AP2-Domänen verglichen. Der resultierende phylogenetische Stammbaum veranschaulicht den evolutionären Zusammenhang weiter (Abb. 4.9). Während der *RD29A*-Promotor von 13 Mitgliedern der DREB-Unterfamilie aktiviert wird, kann der *PDF1.2*-Promoter von 7 nah verwandten Mitgliedern der ERF-Unterfamilie aktiviert werden. Die Daten demonstrieren somit die Spezifität des Systems.

ERF TFs	PromRD29A:Luc	PromPDF1.2:Luc
At3g57600	0,7	0,9
At2g38340	0,7	0,6
At3g11020	0,6	0,4
At5g05410	6,6	0,6
At5g18450	0,7	0,8
At1g75490	1,7	1,2
At2g40340	2,6	1,6
At2g40350	0,8	0,7
At2g20880	0,8	0,8
At4g28140	1,1	1,1
At1g64380	0,5	0,6
At4g13620	0,9	0,7
At2g22200	0,7	0,8
At5g65130	1,9	1,9
At1g36060	0,8	3,2
At4g39780	0,8	1,0
At1g22190	0,9	1,0
At1g78080	0,7	0,5
At3g67488	0,6	0,5
At4g07466	0,5	1,0
At2g23340	0,6	0,7
At4g26900	0,5	0,9
At3g50260	0,5	0,9
At5g67190	0,8	1,1
At4g31060	1,3	1,7
At1g21910	0,8	0,7
At1g44830	2,5	0,8
At1g77640	0,7	0,6
At1g22810	1,2	1,0
At1g71520	1,1	1,2
At5g21960	0,7	0,7
At1g19210	1,2	0,9
At1g74980	0,5	0,5
At1g33760	1,4	0,9
At1g71450	2,0	0,8
At4g25480	9,8	1,7
At1g12610	4,2	3,0
At1g63030	3,2	1,3
At4g25490	6,6	0,9
At5g19900	1,1	0,7
At1g01250	1,2	1,1
At2g36450	1,6	2,1
At1g12630	0,8	0,8
At1g63040	2,9	1,1
At5g20200	2,0	1,0
At3g16280	1,7	0,7
At2g35700	1,2	0,6
At4g16750	5,4	1,0
At1g77200	11,4	1,3
At5g11590	3,6	1,4
At5g25810	3,1	0,9
At4g32800	3,3	1,4
At2g44940	1,2	0,7
At3g60490	3,6	1,6
At5g19790	0,7	0,5
At5g25390	0,7	0,8
At3g29850	0,6	0,6
At1g71130	0,8	1,0
At4g11140	1,0	0,8
At4g23750	0,9	0,9
At4g27950	0,7	0,8
At5g53290	0,7	0,9
At2g46310	0,7	1,2
At3g23230	0,8	0,7
At5g47230	0,5	4,2
At5g61590	0,7	1,1
At5g51190	1,9	1,4
At5g61600	1,0	1,4
At4g17500	0,6	0,5
At5g72200	0,8	3,8
At4g44100	0,7	4,4
At1g43160	2,1	0,8
At5g50080	0,8	0,7
At5g64750	1,2	2,0
At2g33710	0,6	0,8
At5g13330	0,5	0,5
At5g07310	0,5	0,5
At5g18900	0,6	0,6
At3g23220	0,6	6,9
At1g04370	0,6	1,7
At5g49410	0,7	1,8
At4g18450	0,7	2,4
At3g23240	0,7	2,5
At1g06160	0,7	6,3
At2g31230	0,8	19,9
At1g59910	0,7	0,8
At3g14230	0,6	1,0
At1g72360	0,9	1,6
At2g47520	0,9	1,4
At3g16770	0,6	0,7
At1g50640	1,3	1,3
At1g28370	0,9	0,9
At1g28360	2,3	1,2
At5g44210	0,6	0,7
At3g15210	2,1	0,8
At1g12980	0,6	1,2
At1g24590	0,8	0,7
At1g12890	1,7	1,4
At1g28160	0,7	1,4
At5g13910	0,6	0,6
At5g18560	0,8	0,7
At1g25470	0,6	0,5
At1g49120	0,7	0,6
At1g68550	1,2	1,3
At3g25890	1,3	1,5
At2g20350	0,5	0,5
At5g67000	0,7	0,8

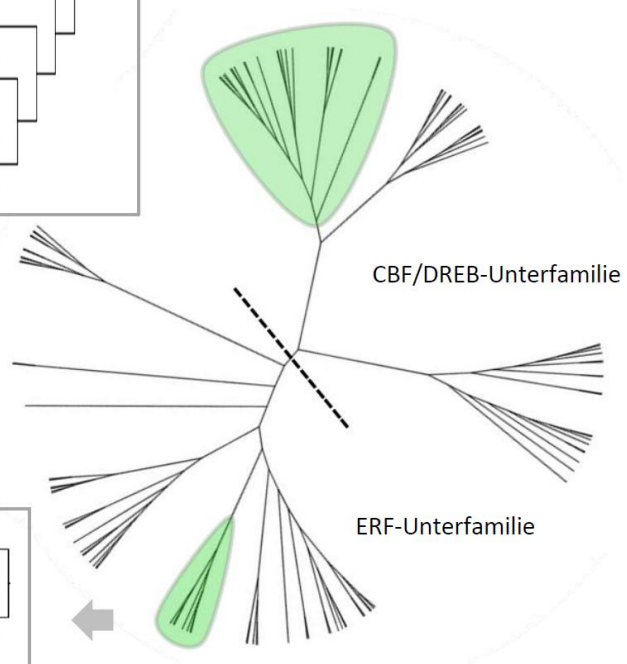
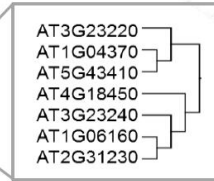


Abb.4.9: Überprüfung des PTA-Konzeptes anhand einer Bindungsstudie der bereits bekannten Promotoren PDF1.2 und RD29A mit der AP2/ERF TF Familie

Gezeigt sind die Aktivierungseigenschaften von 107 verschiedenen ERF TF in Bezug auf die Promotoren PDF1.2 und RD29A. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 3x), dunkles grün: starke Induktion (3 - nx). Die At-Nummern der ERF-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet. Das Auftreten von Transaktivierung innerhalb sehr nah verwandter Untergruppen der ERF TF-Familie ist insbesondere durch eine Zuordnung zu einem phylogenetischen Baum gezeigt. Die gestrichelte Linie unterteilt DREB und ERF-Unterfamilie. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.1.9 Generierung einer TF-Überexpressionsbank mit Hilfe der Gateway®-Technologie

Die Grundlage für den Aufbau einer TF-Kollektion für das PTA-System sind zahlreiche bereits zugängliche sogenannte ORF-Kollektionen (Gong *et al.*, 2004, Mitsuda *et al.*, 2010; Riechmann *et al.*, 2000). In diesen Kollektionen liegen bisher rund 1500 verschiedene *Arabidopsis* TF-Gene als offene Leseraster in Eingangsvektoren Gateway®-kompatibel vor.

Die Gateway®-Technologie ermöglicht dem Nutzer schnell und effizient die offenen Leseraster basen- und orientierungsgenau in verschiedene neue Vektoren zu mobilisieren. Mit der Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens für Protoplastentransformation konnte so eine umfassende Expressionsvektor-Kollektion mit mehr ca. 950 verschiedenen TF aufgebaut werden (siehe Anhang, Tab. 7.6). Für ein effizientes Arbeiten wurden die Konstrukte alle gleich konzentriert nach zugehöriger Familie in Mikrotiterplatten organisiert.

4.1.2 Anwendungsmöglichkeiten des PTA-Systems zur funktionellen Charakterisierung von *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren

4.1.2.1 Detektion von Repressoreigenschaften

Da die Regulation der Transkription nicht nur durch aktivierende Eigenschaften von TF gesteuert wird, sondern ebenso durch repressive Funktionen, sollte das PTA-System auch zur Detektion von transkriptionellen Repressoren genutzt werden können. Dafür wurde die GCC-Box-vermittelte Repression durch EAR (*ERF-associated amphiphilic repression*)-ERF-TF (Ohta *et al.*, 2001) untersucht. Diese EAR-Domänen-tragende TF sind aufgrund ihres konservierten C-terminalen EAR-Motivs aktive Repressoren. Es wird angenommen, dass die Repression durch Änderungen der Chromatinstruktur

verursacht wird (Pazin und Kadonaga, 1997), hervorgerufen durch die Rekrutierung einer Histon-Deacetylase. Im PTA-System wurden fünf EAR-Motiv-tragende ERF-TF zusammen mit dem Gal4₅-GCC₄:LUC Reporter in Protoplasten kotransformiert. Das Konstrukt enthält eine multimerisierte GCC-Box, wodurch die Repression vermittelt werden sollte. Nach der Lumineszenz Messung kann eine Repression der Hintergrundaktivität des Gal4₅-GCC₄:LUC-Konstrukts durch Koexpression aller fünf TF verzeichnet werden (Abb. 4.10 A). Für den Versuch war es nicht nötig, das Grundsignal des Reporters mittels Transaktivierung durch einen starken Aktivator, zu erhöhen. Die Hintergrundaktivität des Gal4₅-GCC₄:LUC-Konstrukts ist bereits ohne Effektor sehr hoch im PTA-System und kann damit effizient durch Zugabe der Repressoren um bis zu 50 % reduziert werden.

In einem zweiten Test wurde die Reprimierbarkeit des PDF1.2-Promotors mit sehr niedriger Grundaktivität untersucht (Abb. 4.10 B). Dieser enthält ebenfalls ein GCC-Element (Tab. 4.1) und sollte dadurch von ERF-TF mit einem EAR-Motiv reprimiert werden können. Das Ergebnis zeigt die Reduktion der Prom_{PDF1.2}:LUC-Grundaktivität durch drei verschiedene EAR-Motiv-tragenden ERF-TF und bestätigt die Annahme, dass selbst Promotoren mit sehr niedriger Grundaktivität nachweislich reprimierbar sind. Die Tests zeigen, dass mit Hilfe des PTA-Systems auch repressive Eigenschaften transkriptioneller Regulatoren spezifisch nachgewiesen werden können.

Die Analyse von Repressoreigenschaften erforderte die Kotransformation eines *Renilla*-Konstrukts zur Normalisierung. Eine Reduktion der Expression kann nur exakt bestimmt werden, wenn die auf Grund variierender Transformationseffizienzen verursachten Schwankungen des Luciferase-Signals durch Kotransformation eines Abgleich-Reporters reduziert werden.

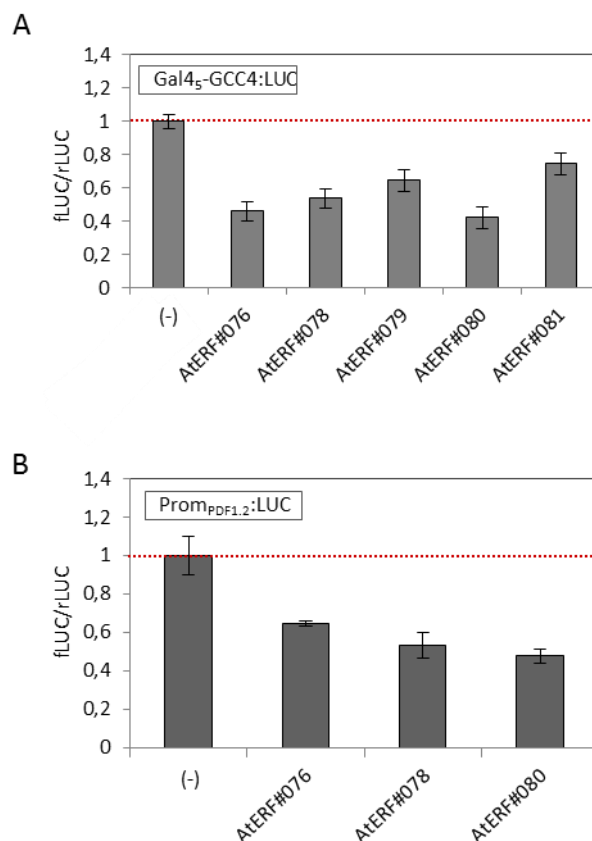


Abb.4.10: Analyse der GCC-Box-vermittelten transkriptionellen Repression durch EAR-ERF-TF

A: Dargestellt ist die Repression der Grundexpression des Gal₄-GCC₄:LUC Reporters durch die Ko-Transformation mit fünf verschiedenen EAR-Motiv-tragenden ERF TF. **B:** Demonstration der Repression des Prom_{PDF1.2}:LUC-Konstrukts mit niedriger Grundaktivität durch ERF-TF mit EAR-Motiv. Die gestrichelte Linie markiert jeweils das Grundniveau des Reporters ohne Effektor. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals (n=3) mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.2.2 Induktion der Promotoraktivität durch verschiedene Stress-Stimuli

Protoplasten sind trotz ihres Zellwandverlustes in der Lage auf verschiedene Änderungen ihrer Umwelt zu reagieren. Jede Zelle stellt das dafür notwendige Perzeptions- und Signaltransduktionssystem. Protoplasten sind damit ideal zur Untersuchung Stimulus-abhängiger Expression. Diese Eigenschaft sollte genutzt werden, um den Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf die Transaktivierung eines Promoters im PTA-System untersuchen zu können.

Für einen ersten Test wurden *Arabidopsis* Protoplasten mit einem *LEA76*-Promotor-Konstrukt (*Late Embryogenesis Abundant76*; Alonso *et al.*, 2009) transformiert und

mit verschiedenen Salzkonzentrationen behandelt (Abb. 4.11 A). Die Zugabe des Salzes erfolgte direkt nach der Transformation, gelöst in WI-Puffer. Nach der Luciferase Messung kann eindeutig gezeigt werden, dass die Expression des *LEA76*-Promoters zunächst mit zunehmender NaCl-Konzentration gesteigert wird. Dabei ist das Maximum von einer 4-fachen Induktion erreicht mit Zugabe von 125 mM NaCl. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Expression wieder ab, wahrscheinlich bedingt durch das Absterben der Protoplasten bei so hohem Salzgehalt. Zu der Annahme führte ein vergleichbarer Konzentrations-Test mit einem konstitutiven Prom_{35S}:LUC-Konstrukt, bei dem die Expression ebenfalls ab einer Konzentration von 150 mM NaCl stark abnahm (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss von NaCl auf die Transaktivierbarkeit des Promotors durch bZIP TF der Gruppe A (Jakoby *et al.*, 2002) untersucht werden (Abb. 4.11 B). Gruppe A-bZIP-TF sind bereits dafür bekannt, involviert in die abiotische Stressantwort zu sein (Fujita *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Uno *et al.*, 2000). Der *LEA76*-Promotor selbst enthält einige spezifische bZIP-Bindestellen (Tab. 4.1). Mit Hilfe des PTA-Systems kann gezeigt werden, dass viele der getesteten bZIP-TF der Gruppe A den *LEA76*-Promotor aktivieren können. Darüber hinaus kann zwischen einer Salz-unabhängigen Aktivierung des Promotors unterschieden werden (z.B. durch AtbZIP13, AtbZIP35, AtbZIP37, AtbZIP38, AtbZIP66) und einer noch verstärkten Salzinduktion durch einige bZIP-Faktoren (z.B. durch AtbZIP37, AtbZIP38, AtbZIP39). Die Expression aller TF, mit Ausnahme von AtbZIP38, kann in einer *Western*-Analyse gezeigt werden (Abb. 4.11 C). In der kodierenden Sequenz von AtbZIP38 wurde direkt vor dem HA-Epitop ein Stopp-Kodon nachgewiesen, weshalb die Detektion über einen HA-Antikörper nicht möglich ist.

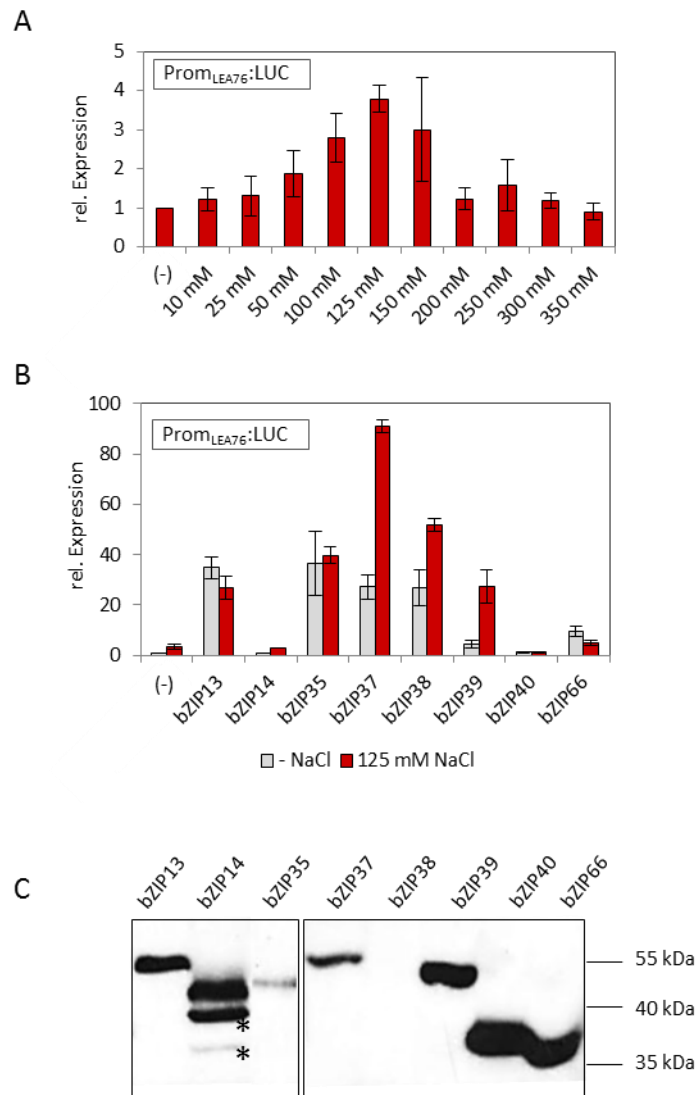


Abb.4.11: Analyse der Salz-induzierten Expression des LEA76-Promoters

Gezeigt ist die gesteigerte Expression des LEA76-Promotors durch Zugabe verschiedener Salzkonzentrationen (A) und die Expression des Promotors mit (rot) und ohne (grau) Salz in Kombination mit bZIP-TF der Gruppe A (Jakoby *et al.*, 2002) (B). Das NaCl wurde in WI-Puffer gelöst und nach der Transformation auf die Protoplasten gegeben. Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (Prom_{LEA76}:LUC ohne NaCl)) dargestellt. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals (n=2) mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. C: Für den Western-Blot wurden Protoplasten im Standardverfahren mit 20 μ g Effektorplasmid transformiert und jeweils 2 Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereinigt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen das HA-Epitop. * kennzeichnet Abbauprodukte des TF. (Abb: in Kooperation mit Laura Hartmann). Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

In einem zweiten Ansatz wurde die Stimulation des *GH3.3*-Promotors durch das Phytohormon Auxin untersucht. Die Induzierbarkeit des Promotors durch das Hormon konnte bereits im Protoplasten-Transformationsverfahren nach Yoo *et al.* (2007) nachgewiesen werden (Weiste, Dissertation 2011). In einem weiteren Test sollte die Induzierbarkeit auch im reduzierten Volumen der Mikrotiterplatte getestet werden. Dafür wurde eine NAA-Konzentrationsreihe in WI-Puffer vorgelegt und nach der Transformation des *GH3.3*-Konstrukts auf die Protoplasten gegeben. Die Luciferase Messung ergab einen massiven Anstieg der *GH3.3*-Expression mit zunehmender Auxin-Konzentration (Abb. 4.12). Bereits durch Zugabe von 0,1 μM des synthetischen Auxins NAA (*Naphthalene-1-Acetic Acid*) steigt die Expression um das 40-fache und ab 4 μM wird ein Plateau zwischen 120- und 180-facher Expression erreicht. Im Gegensatz zur Behandlung mit Salz kommt es bei Auxin auch nach Zugabe physiologisch zu hoher Auxin-Mengen nicht zum Absterben der Protoplasten. Zu sehen ist dies an gleichmäßigen Luciferase-Werten des Abgleich-Reporters *Prom_{35S}:Renilla-LUC* (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsstärke bleibt auch bei Konzentrationen deutlich über 1 μM auf dem gezeigten Niveau (Daten nicht gezeigt). Neben der Negativkontrolle (*GH3.3*-Promoter ohne Auxin) wurde auch eine DMSO-Kontrolle durchgeführt, um sicher zu gehen, dass das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Expression hat.

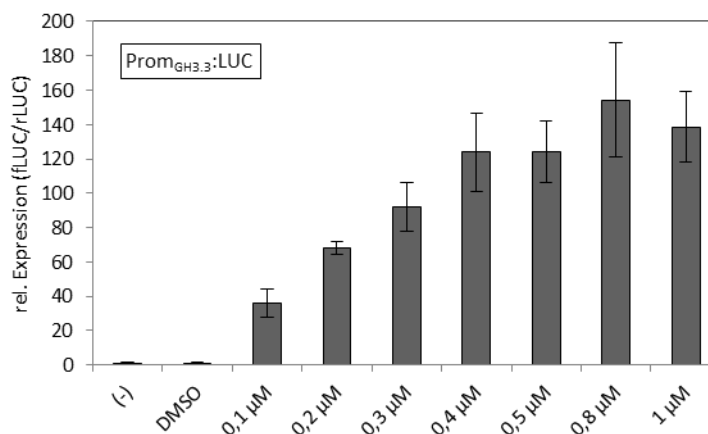


Abb.4.12: Überprüfung der Auxin-Induzierbarkeit des *GH3.3*-Promotors im PTA-System

Dargestellt ist die gesteigerte Expression des *GH3.3*-Promotors induziert durch Zugabe von Auxin (NAA) in steigender Konzentration. Zur Induktion der Promotor-Expression wurde das NAA in WI-Puffer gelöst und nach der Transformation zu den Protoplasten gegeben. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle *Prom_{GH3.3}:LUC* ohne NAA (-)) dargestellt. Die Angaben demonstrieren die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals ($n=3$) mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4.1.2.3 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des PTA-Systems

Bei praktisch allen Prozessen innerhalb einer Zelle spielen Protein-Protein-Interaktionen eine wesentlich Rolle. Dabei wird die physiologische Funktion der Proteine häufig durch die jeweiligen Interaktionspartner beeinflusst. Oft ist die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen von der Heterodimerisierung zweier Faktoren abhängig. Das PTA-System soll auch zur Untersuchung solcher Proteininteraktionen eingesetzt werden.

Grundlage dieser Analyse ist das *Yeast-two-Hybrid* System, das sich den modularen Aufbau des Gal4 Transkriptionsfaktors zu Nutze macht (Fields und Song, 1989). Der Faktor besitzt wie alle primären TF (Def. siehe Einleitung) eine Aktivierungsdomäne und eine Bindedomäne. Diese sind auch dann weiterhin wirksam, wenn man die einzelnen Domänen an Proteine der Wahl fusioniert und diese unabhängig voneinander exprimiert. Gibt es also eine tatsächliche Interaktion der zu untersuchenden Faktoren, kommen Binde- und Aktivierungsdomäne wieder so dicht zueinander, dass sie an die Gal4-Bindestelle des Reporterkonstrukts binden können und die Expression starten. Das gleiche System lässt sich auch in Protoplasten erfolgreich anwenden (Ehlert *et al.*, 2006). Für die Etablierung im 96-Probenmaßstab sollte die mögliche Heterodimerisierung von bZIP63 mit bZIP TF der Gruppe S1 (Jakoby *et al.*, 2002) untersucht werden. Dafür wurde der Gal4-UAS₄:LUC-Reporter kotransformiert mit dem AD-fusionierten bZIP63-Konstrukt und verschiedenen BD-fusionierten bZIP TF. Die Luciferase Messung ergibt eine gesteigerte Gal4-UAS₄:LUC Expression für die Kombination ADbZIP63 und BDbZIP2 sowie für ADbZIP63 und BDbZIP11 (Abb. 4.13). Das Ergebnis zeigt, dass die jeweiligen bZIP-TF wahrscheinlich Heterodimere bilden können. BDbZIP1 und ADbZIP63 interagieren vermutlich nicht. Mit Hilfe des PTA-Systems kann also auch die Wechselwirkung zwischen Proteinen aufgeklärt werden.

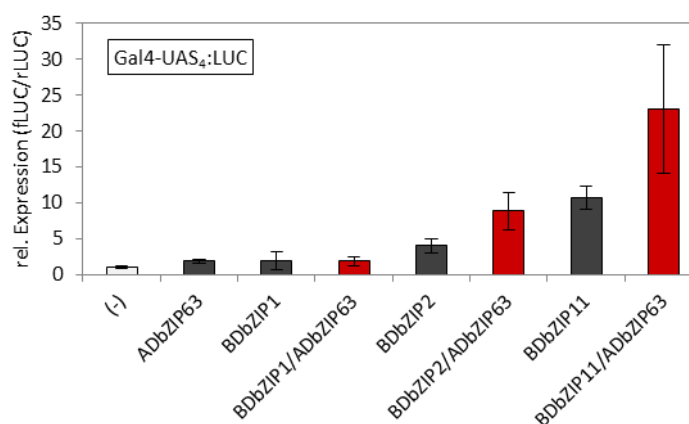


Abb.4.13: Nachweis der Heterodimerisierung von bZIP63 mit bZIP TF der Gruppe S1

Gezeigt ist die *Protoplasten-two-Hybrid* Analyse zwischen AD-bZIP63 (*prey*) und den BD-Fusionskonstrukten für bZIP1, bZIP2 und bZIP11 (*bait*). Die Ko-expression von AD- und BD-Konstrukten ist in rot veranschaulicht. Zur Kontrolle wurden die Aktivierungseigenschaften aller Faktoren auf den Promotor untersucht (grau). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle Gal4-UAS₄:LUC ohne Effektoren (-)) dargestellt. Die Angaben demonstrieren die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD).

4.1.2.4 Analyse des Einflusses von Signal-Molekülen auf die Aktivität von TF

Die Aktivität von TF ist häufig abhängig von Phosphorylierungen. In einer weiteren Studie sollten deshalb funktionelle Wechselwirkungen von TF mit Kinasen nachgewiesen werden. Für den Versuch im PTA-System sollte die Aktivierung des Asparagin-Synthase-Promoters (Prom:_{ASN1}) durch die Gruppe S1-bZIPer bZIP1 und bZIP2 (GBF5) und die Kinase KIN10 im PTA-System demonstriert werden. Baena-Gonzalez *et al.* (2007) konnte diesen, bis heute noch nicht ganz aufgeklärten, Mechanismus in Protoplasten bereits zeigen. Für die Reproduktion dieser Daten im Hochdurchsatzverfahren wurden die Protoplasten neben Promotor und Effektor auch mit einem KIN10-Konstrukt transformiert. Die Auswertung der Messung ergibt eine starke Aktivierung des Promotors bereits allein durch KIN10. Wahrscheinlich sind viele endogene Faktoren aktiv, die in Kombination mit KIN10 den Promotor aktivieren können. Die Aktivität lässt sich aber durch Kotransformation der bZIP-TF signifikant steigern (Abb. 4.14 A).

Ein zweites Beispiel zeigt die funktionelle Interaktion von WRKY33 mit den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen MPK3 und MPK6 (Abb. 4.14 B). Beide Kinasen sind Teil einer Signalkaskade als Antwort auf den Befehl durch Pathogene (Yang *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Kroj *et al.*, 2003; del Pozo *et al.*, 2004; Menke *et al.*,

2004; Beckers *et al.*, 2009). WRKY33 steht am Ende der Kaskade und wird durch MPK3 bzw. MPK6 phosphoryliert. Erst mit der Phosphorylierung erreicht WRKY33 seine volle Aktivität und kann somit das Camalexinbiosynthesegen *PAD3* aktivieren (Mao *et al.*, 2011). Die Ergebnisse des PTA-Tests verdeutlichen diesen Zusammenhang. Die Kinasen MPK3 und MPK6 sowie der TF WRKY33 bewirken allein jeweils eine leichte bis mittlere Aktivierung des *PAD3*-Promotors. Diese Effekte sind wahrscheinlich bedingt durch vorhandene endogene Faktoren der Protoplasten, die in Kombination mit den Kinasen, bzw mit WRKY33 den Promotor aktivieren können. Die Koexpression aller drei Faktoren in Protoplasten resultiert in einer viel stärkeren Aktivierung des *PAD3*-Promotors, als es mit den einzelnen Faktoren der Fall ist. Das PTA-System erlaubt es also auch den Einfluss von Signalmolekülen auf die Aktivität von TF zu untersuchen.

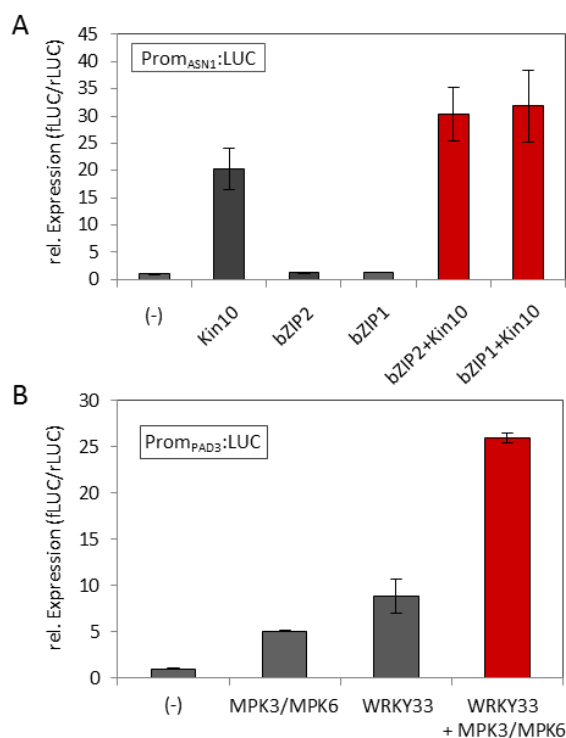


Abb.4.14: Nachweis der funktionellen Interaktion von TF mit Kinasen

Dargestellt ist der Einfluss der Kinase KIN10 auf die Expression des *ASN1*-Promotors in Kombination mit den Gruppe S1-bZIP-TF bZIP1 und bZIP2 (rot) in **A**. Zur Kontrolle wurden die Aktivierungseigenschaften aller Faktoren auf den Promotor untersucht (grau). **B** zeigt die funktionelle Interaktion von WRKY33 mit MAPK3 und MPK6 (rot) in Bezug auf den *PAD3*-Promotor. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle Prom:LUC ohne Effektoren (-)) dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde mehrmals (n=3) mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Abb. modifiziert nach Wehner *et al.*, 2011a.

4.1.3 Anwendung des PTA-Systems in verschiedenen Screening-Ansätzen

Das PTA-System wurde etabliert, um die Funktion von *Arabidopsis* TF schneller aufklären zu können. Dafür sollen interessante Promotor:Reporter-Konstrukte auf eine mögliche Transaktivierung mit der kompletten TF-Expressions-Kollektion getestet werden. Bisher stehen dafür ca. 950 Faktoren zur Verfügung, die in nur 10 Durchläufen des 96-Proben-Hochdurchsatzverfahrens alle getestet werden können. In den folgenden Experimenten sollte das PTA-System in verschiedenen Screening-Ansätzen zur Identifizierung transkriptioneller Regulatoren eingesetzt werden.

4.1.3.1 Analyse zum Einfluss von bZIP Transkriptionsfaktoren auf die Auxin-vermittelte Induktion des *GH3.3*-Promotors

Das Phytohormon Auxin spielt eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Biologie. Es kontrolliert zahlreiche Prozesse während der Musterausbildung in der Embryogenese, sowie bei der lateralen Organentwicklung und der Zellstreckung (Davies *et al.*, 2004). Das am häufigsten natürlich vorkommende Auxin ist die Indol-3-Essigsäure (IAA) (Haagen-Smit *et al.*, 1946; Rensing *et al.*, 2008; De Smet *et al.*, 2011; Abel und Theologis, 2010). In der Pflanzenzelle löst das Hormon eine Signaltransduktionskaskade aus. Steigt der Gehalt an freiem und aktivem Auxin in der Zelle wird der Abbau transkriptioneller *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* (AUX/IAA)-Repressoren induziert (Gray *et al.*, 2001). Dadurch werden die Bindepartner der AUX/IAAs, die *AUXIN RESPONSE FACTORS* (ARFs), dereprimiert und können die Transkription von Auxin-responsiven Genen aktivieren (Zur Übersicht siehe Vanneste und Friml, 2009), indem sie an spezifische *Aux/RE-cis*-Elemente der Promotoren binden (Abb. 4.15); (Ulmasov *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Promotoren Auxin-responsiver Gene neben *Aux/RE-cis*-Elementen auch zahlreiche GRE-Bindestellen (*G-box Related cis-Elements*) aufweisen. Das GRE-Motiv ist das präferierte *cis*-Element für bZIP-TF (Liu *et al.*, 1994; Ulmasov *et al.*, 1995). Deshalb wurde vermutet, dass GRE-bindende bZIP-TF ebenfalls eine Rolle bei der Regulation Auxin-responsiver Gene spielen. Erst kürzlich konnten AtbZIP2, AtbZIP11 und AtbZIP44 als quantitative Modulatoren der Auxin-vermittelten Transkriptionskontrolle identifiziert werden. Sie kontrollieren sowohl die Transkription von Auxin-responsiven Genen als auch die der *AUX/IAA* (Weiste *et al.*, submitted).

AUX/IAAs vermitteln ihre repressive Funktion über ihre Interaktion mit dem Korepressor TOPLESS (TPL), (Liu und Karmarkar, 2008; Szemenyei *et al.*, 2008). Die Interaktion bewirkt die Rekrutierung einer Histon-Deacetylase (HDAC), was letztendlich einen höheren Grad der Kondensation des Chromatins verursacht und die damit verbundene transkriptionelle Inaktivierung (Abb. 4.15). Ein komplementärer Mechanismus zur Aktivierung Auxin-responsiver Gene über die Wirkung einer Histon-Acetyl-Transferase (HAT) konnte noch nicht identifiziert werden. Es wurde aber gezeigt, dass die Auxin-induzierte Expression von Zielgenen der Gruppe S1 bZIP-TF, von der Histon-Acetylierung durch die Acetyl-Transferase GCN5 abhängig ist. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass bZIP-TF der Gruppe S1, C und D das GCN5 assoziierte Adapterprotein ADA2b *in vivo* binden können (Weiste, Dissertation 2011).

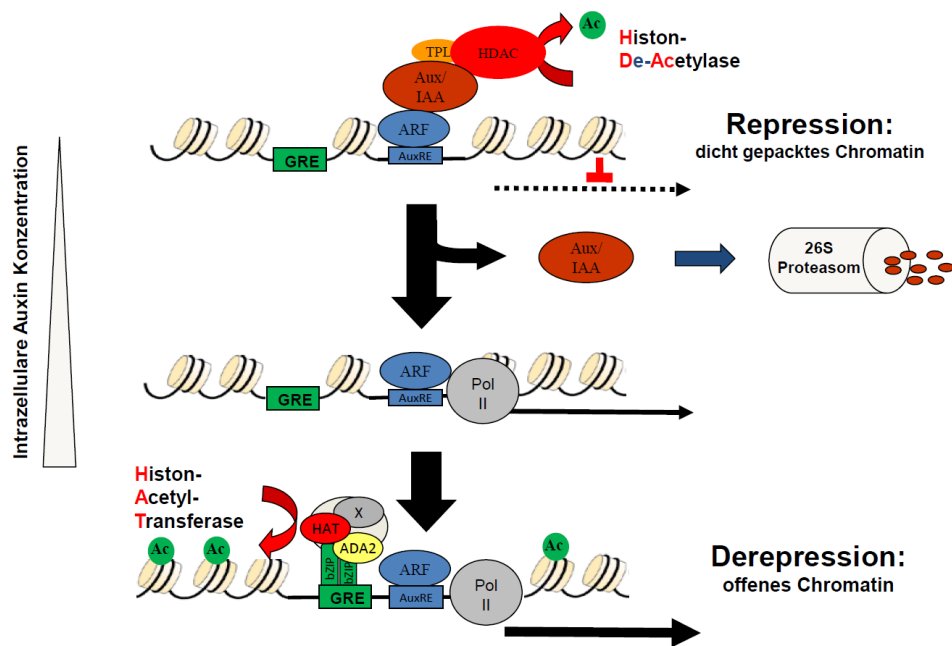


Abb.4.15: Modell zum Einfluss von bZIP-TF auf die Auxin-abhängige Transkription

Bei niedrigen Auxin-Konzentrationen in der Zelle verhindern Aux/IAA-Repressoren die Expression Auxin-responsiver Gene über die Rekrutierung einer Histon-Deacetylase (HDAC), vermittelt durch den Korepressor Topless (TPL). Ein erhöhter Auxingehalt bewirkt den Abbau der Aux/IAA-Repressoren und damit die De-Repression der ARF-Aktivatoren. Zielgene der ARFs werden aktiviert. BZIP-TF der Gruppe S1 können die Auxin-vermittelte Transkription über die Bindung des ADA2-Adapter-Proteins weiter erhöhen. Die ADA2-vermittelte Rekrutierung einer Histon-Acetyl-Transferase (HAT) sorgt für eine Entpackung der Chromatinstruktur. Die Bindung transkriptioneller Koaktivatoren an Auxin-responsive Promotoren wird damit erleichtert. Abb. nach Weiste, Dissertation (2011).

Für AtbZIP2, AtbZIP11 und AtbZIP44 konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Transkription von Auxin-responsiven Genen aktivieren können. Es ist aber nicht bewiesen, ob nicht noch weitere bZIP-TF ähnliche Effekte zeigen. In einem PTA-Test sollte deshalb der Einfluss von weiteren Mitgliedern der bZIP-Familie auf die Auxin-abhängige Aktivierung des *GH3.3*-Promotors untersucht werden. *GH3.3* ist ein Auxin-responsives Gen und in diesem Zusammenhang bereits sehr gut charakterisiert. (Liu *et al.*, 1994; Ulmasov *et al.*, 1995).

63 der 75 verschiedenen bZIP-TF wurden dafür gemeinsam mit einem Prom_{GH3.3}:LUC-Konstrukt in Protoplasten kotransformiert. Die Transformation jedes Ansatzes erfolgte in 4-facher Wiederholung. Zu jeweils zwei der Ansätze wurde nach der Transformation WI-Puffer mit 0,3 µM Auxin gegeben. Die Resuspendierung der Protoplasten in den übrigen zwei Ansätzen erfolgte in WI-Puffer ohne Auxin. Nach der Inkubation über Nacht im Klimaschrank konnte der Versuch in einem dualen Luciferase-Assay ausgewertet werden. Das Ergebnis ist zusammengefasst in Abb. 4.16. Der Test zeigt, dass viele der bZIP-TF den *GH3.3*-Promotor auch bei niedrigen Auxin-Konzentrationen aktivieren können (Abb. 4.16, Farbcode). Insbesondere Mitglieder der Gruppen A, B, D, G und S1 (bZIP11 und bZIP44); (Jakoby *et al.*, 2002) zeigen ein hohes Transaktivierungspotential gegenüber dem Promotor. Aus Gruppe G aktivieren sogar alle getesteten bZIP-TF. Es gibt aber auch Gruppen, deren Mitglieder kein Transaktivierungspotential aufweisen, wie Gruppe C und E. Der Test demonstriert, dass es viele bZIP-TF gibt, die den *GH3.3*-Promotor stärker aktivieren können. Unter hohen Auxin-Konzentrationen zeigt sich, dass der *GH3.3*-Promotor ca. 100-fach induziert ist (Abb. 4.16, Diagramm). In Anwesenheit vieler bZIPer kann die Expression bis zu 400-fach gesteigert werden (bZIP16). Vor allem nah verwandte Mitglieder der Gruppen D, G, B, H und S1 zeigen diesen Effekt.

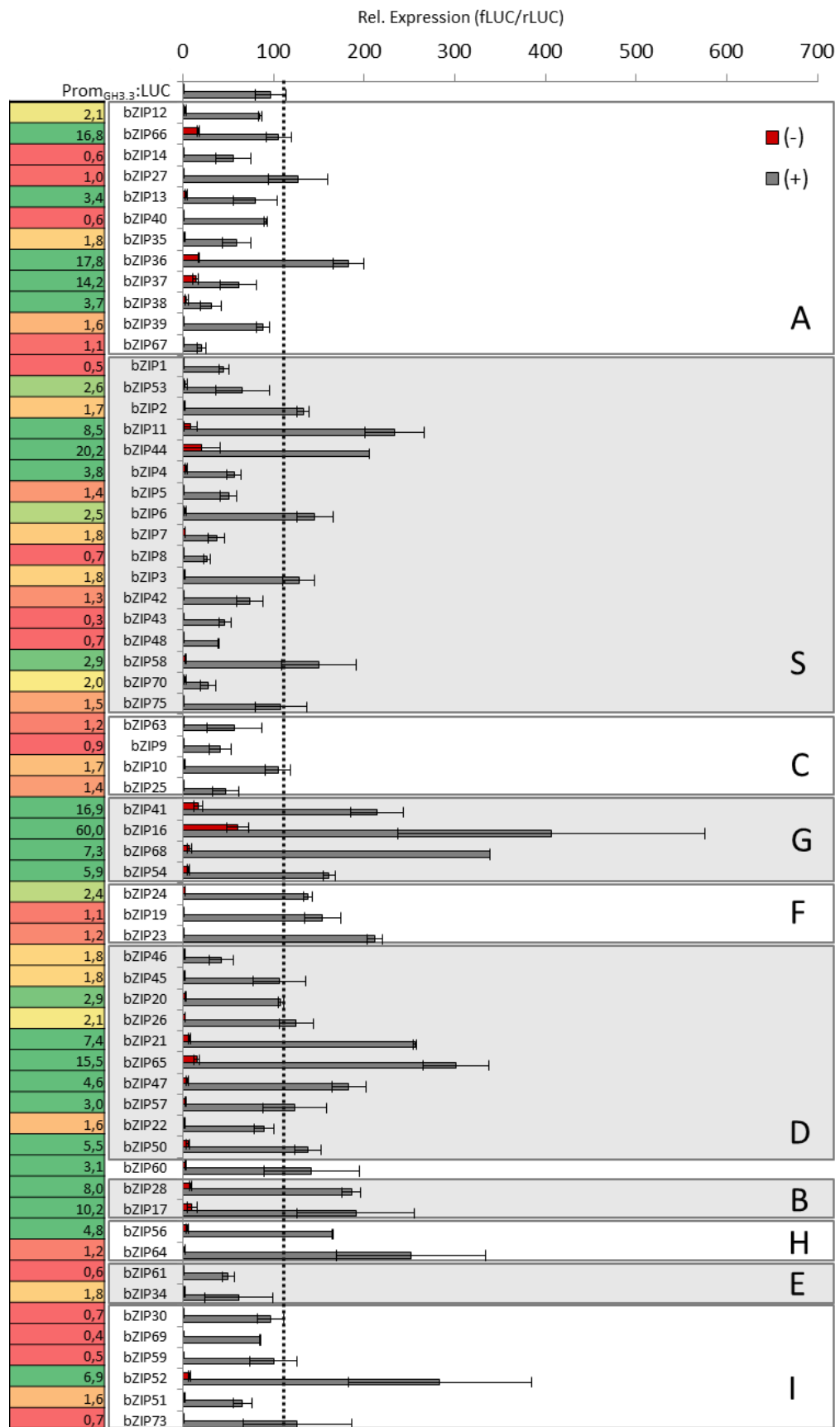


Abb.4.16: PTA-Test zur Identifizierung von bZIP-TF, die in die transkriptionelle Regulation des Auxin-responsiven GH3.3-Promotors involviert sind

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von 63 verschiedenen bZIP-TF in Bezug auf den GH3.3-Promotor mit 0,3 μ M Auxin (grau) und ohne Auxin (rot). Die Transaktivierungseigenschaften der bZIP-TF in Abwesenheit von Auxin sind zur besseren Demonstration zusätzlich in einem Farbcode dargestellt. Rot: keine Induktion (1 - 2x), hell grün: leichte Induktion (2 - 3x), dunkles grün: starke Induktion (3 - nx). Die gestrichelte Linie markiert das Grundniveau des Reporters mit Auxin aber ohne Effektor. Die At-Nummern der bZIP-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (nach Jakoby *et al.*, 2002). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (Prom_{GH3.3}:LUC ohne koexprimierten TF und ohne Auxin)) dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4.1.3.2 Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren des *Arabidopsis thaliana* Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Pflanzen können bei Befall durch pathogene Organismen mit der Bildung von Sekundärmetaboliten wie Camalexin und Indol-Glukosinolaten (IGS) reagieren. Es handelt sich dabei um antimikrobielle Substanzen, deren Synthese von der Aminosäure Tryptophan ausgeht (Abb. 4.17).

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Biosynthesewegs von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten sowohl im Blattgewebe, als auch in der Wurzel sehr koordiniert verläuft (Zhao und Last, 1996; Iven *et al.*, in Druck). Eine koordinierte Regulation wirft die Frage auf, ob möglicherweise ein oder mehrere TF für die transkriptionelle Kontrolle aller beteiligten Gene verantwortlich sind und die Biosynthese somit über eine Art Hauptschalter reguliert wird. Für die Identifizierung eventuell beteiligter TF sollte das PTA-System verwendet werden.

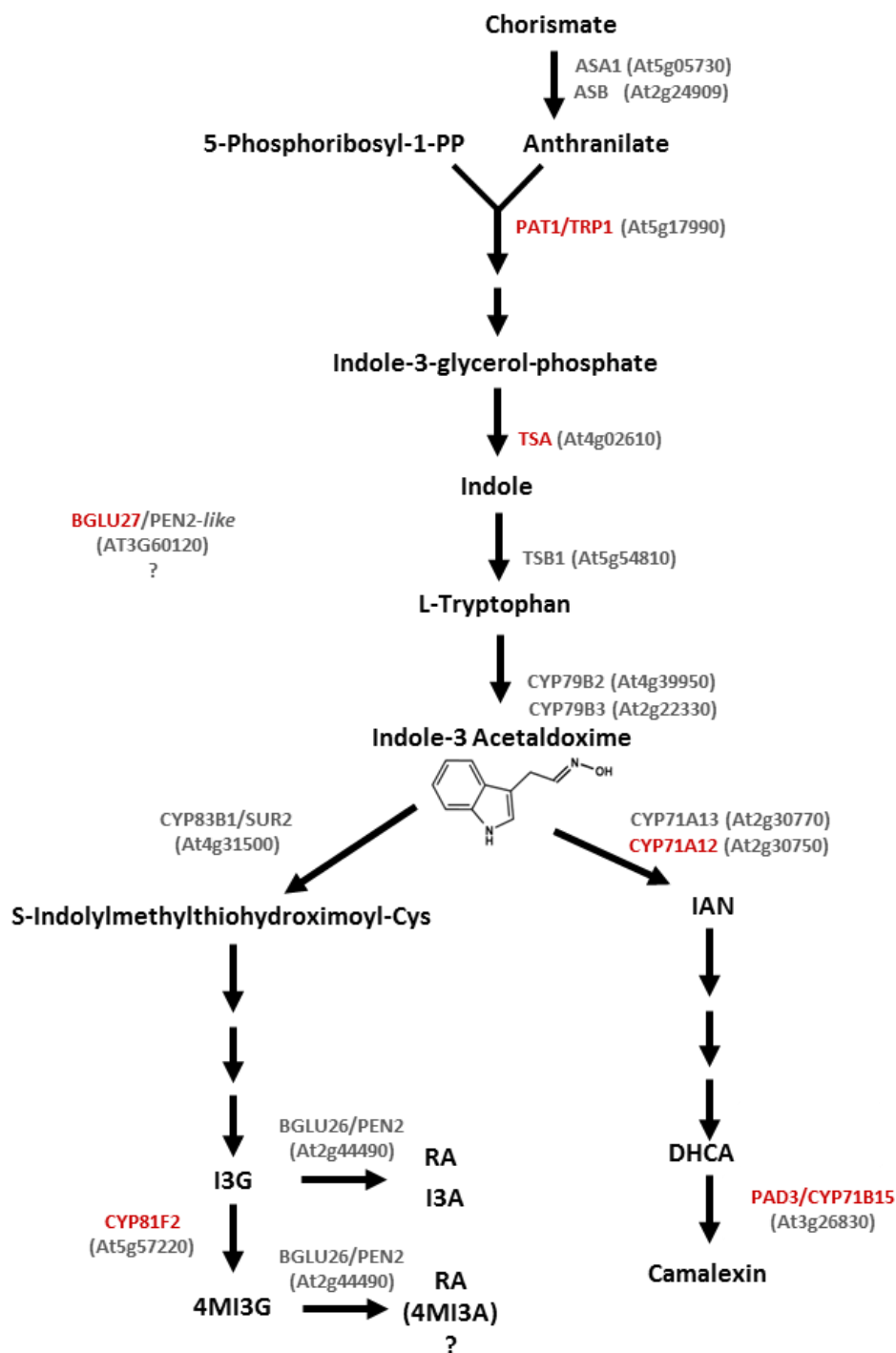


Abb.4.17: Flussdiagramm des Biosynthesewegs von Tryptophan und Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Dargestellt sind die wichtigsten Zwischenprodukte (schwarz) und die beteiligten Enzyme (grau) des Synthesewegs von Tryptophan und abgeleiteten Metaboliten wie Camalexin (rechter Biosyntheseweg) und verschiedener Indol-Glukosinolate (linker Biosyntheseweg). Für Ausgewählte Gene des Biosynthesewegs wurden Promotor:Reporter-Konstrukte im PTA-System untersucht. Die jeweiligen Genprodukte sind in rot hervorgehoben. Die Rolle von *BGLU27* in den Synthesewegen ist nicht geklärt. IAN: Indol-3-Acetonitril, DHCH: Dihydrocamalexinsäure, I3G: Indol-3-ylmethylglukosinolat, 4MI3G: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat, RA: Raphanusamic Acid, I3A: Indol-3-ylmethylamin, 4MI3A: 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin. Modifizierte Abbildung nach Iven *et al.* (in Druck).

4.1.3.2.1 *Screening* der TF-Expressionsvektor-Kollektion auf Transaktivierung von Promotoren ausgewählter Gene des Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Um herauszufinden, ob es TF gibt, die die Expression beteiligter Gene regulieren können, sollte ein umfangreiches *Screening* der PTA-Expressionsvektorkollektion durchgeführt werden. Dafür wurden zunächst für ausgewählte Gene aller Synthesewege Promotor:LUC-Konstrukte hergestellt (Tab. 4.2). Insgesamt sollten 6 Reporter-Konstrukte im PTA-System getestet werden: Prom_{PAT1}:LUC, Prom_{TSA1}:LUC, Prom_{CYP81F2}:LUC, Prom_{CYP71A12}:LUC, Prom_{PAD3}:LUC und Prom_{BGLU27}:LUC. Die genaue Rolle von BGLU27 in diesem Zusammenhang ist noch unklar. Es handelt sich dabei um ein PEN2-Homolog, dessen Transkription durch die *Verticillium*-Infektion ebenfalls stark induziert wurde. PEN2 katalysiert die Synthese von *Raphanusamic Acid* (RA) und Indol-3-ylmethylamin (I3A) aus Indol-3-ylmethylglukosinolat, sowie die Degradation von 4MI3G zu RA in Blättern nach Pilzbefall (Bednarek *et al.*, 2009).

Tab.4.2: Funktion der für Promotor:LUC-Konstrukte ausgewählten Gene aus dem Biosyntheseweg von Tryptophan und Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetaboliten (siehe Abb. 4.17)

Gen-Name	Gen-Produkt	Funktion	Referenz
<i>PAT1</i> (At5g17990)	Phosphoribosyl-Anthranilat-Transferase	Umwandlung von Anthranilat und Phosphoribosyl-pyrophosphat in Phosphoribosyl-anthranilat	Denby <i>et al.</i> , 2005
<i>TSA1</i> (At4g02610)	Tryptophan-Synthase	Umwandlung von Indole-3-Glycerol-phosphat zu Indol	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>CYP81F2</i> (At5g57220)	Cytochrom P450-Protein	Umwandlung von Indol-3-ylmethylglukosinolat in 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat	Bednarek <i>et al.</i> , 2009
<i>CYP71A12</i> (At2g30750)	Cytochrom P450-Protein	Umwandlung von Indol-3-Acetaldoxim in Indol-3-Acetonitril	Millet <i>et al.</i> , 2010; Saga <i>et al.</i> , 2012
<i>PAD3; CYP71B15</i> (At3g26830)	Cytochrom P450-Protein	Umwandlung von Dihydrocamalexinsäure zu Camalexin	Böttcher <i>et al.</i> , 2009
<i>BGLU27</i> (AT3G60120)	BETA GLUCOSIDASE 27	?	Iven <i>et al.</i> , in Druck

Im einem ersten *Screening*-Ansatz sollten die ERF-TF der Kollektion mit allen Promotor:LUC-Konstrukten getestet werden. Ausgewählt wurde die Familie, weil Mitglieder der Gruppe IX (Nakano *et al.*, 2006) bereits dafür bekannt sind, in der pflanzlichen Pathogenabwehr eine Rolle zu spielen (Oñate-Sánchez *et al.*, 2007; Pré *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2007; Berrocal-Lobo und Molina, 2004; Bethke *et al.*, 2009). Weitere Vertreter der Gruppe konnten in einem *Screening* auf Resistenz gegen die systemische Besiedlung von *Verticillium longisporum* als positiv identifiziert werden. Der *Screening*-Ansatz wurde ohne Normalisierung durchgeführt, um alle Promotor-Konstrukte möglichst schnell und günstig, ohne anschließende Zellextraktionsschritte, testen zu können. Bei der Auswertung der Daten wurde gezielt auf Kandidaten geachtet, die viele oder alle der getesteten Promotoren aktivieren können. Das Ergebnis des *Screenings* ist in einem Farbcode dargestellt (Abb. 4.18 A). Insgesamt ist zu erkennen, dass viele ERF-TF einen oder mehrere der untersuchten Promotoren aktivieren können. Zwei der untersuchten Promotor:Reporter-Konstrukte, Prom_{TSAl}:LUC und Prom_{PAD3}:LUC, zeigen besonders viele positive Signale. Ob diese Promotoren wirklich durch so viele ERF-TF aktiviert werden können ist fraglich. Deshalb wurde bei der Auswertung gezielt auf Kandidaten geachtet, die möglichst alle untersuchten Promotoren aktivieren können. Auffallend ist, dass einige sehr nah verwandte TF die Expression der Promotoren induzieren können. Viele ERF-TF der Gruppe I und II können zumindest mehrere der getesteten Promotoren aktivieren. Interessanter ist aber die Gruppe VIII. Viele ERF-TF dieser Gruppe sind in der Lage die Expression der getesteten Reporterkonstrukte zu induzieren. Mitglieder der Untergruppe VIIIa tragen ein hochkonserviertes CMVIII-1-Motiv am C-Terminus, bekannt als EAR-Motiv (Ohta *et al.*, 2001). In der Literatur sind sie beschrieben, die GCC-Box-vermittelte Transkription zu reprimieren (Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001). In diesem Versuch gehören die ERF-TF der Gruppe VIIIa zu den Kandidaten mit den stärksten aktivierenden Eigenschaften.

Neben der Gruppe VIII fallen auch zwei Mitglieder der Gruppe IX ins Auge. AtERF#106 und AtERF#107 zeigen stark erhöhte Transaktivierungseigenschaften nach der Koexpression mit fast allen getesteten Promotoren (Abb. 4.18 A).

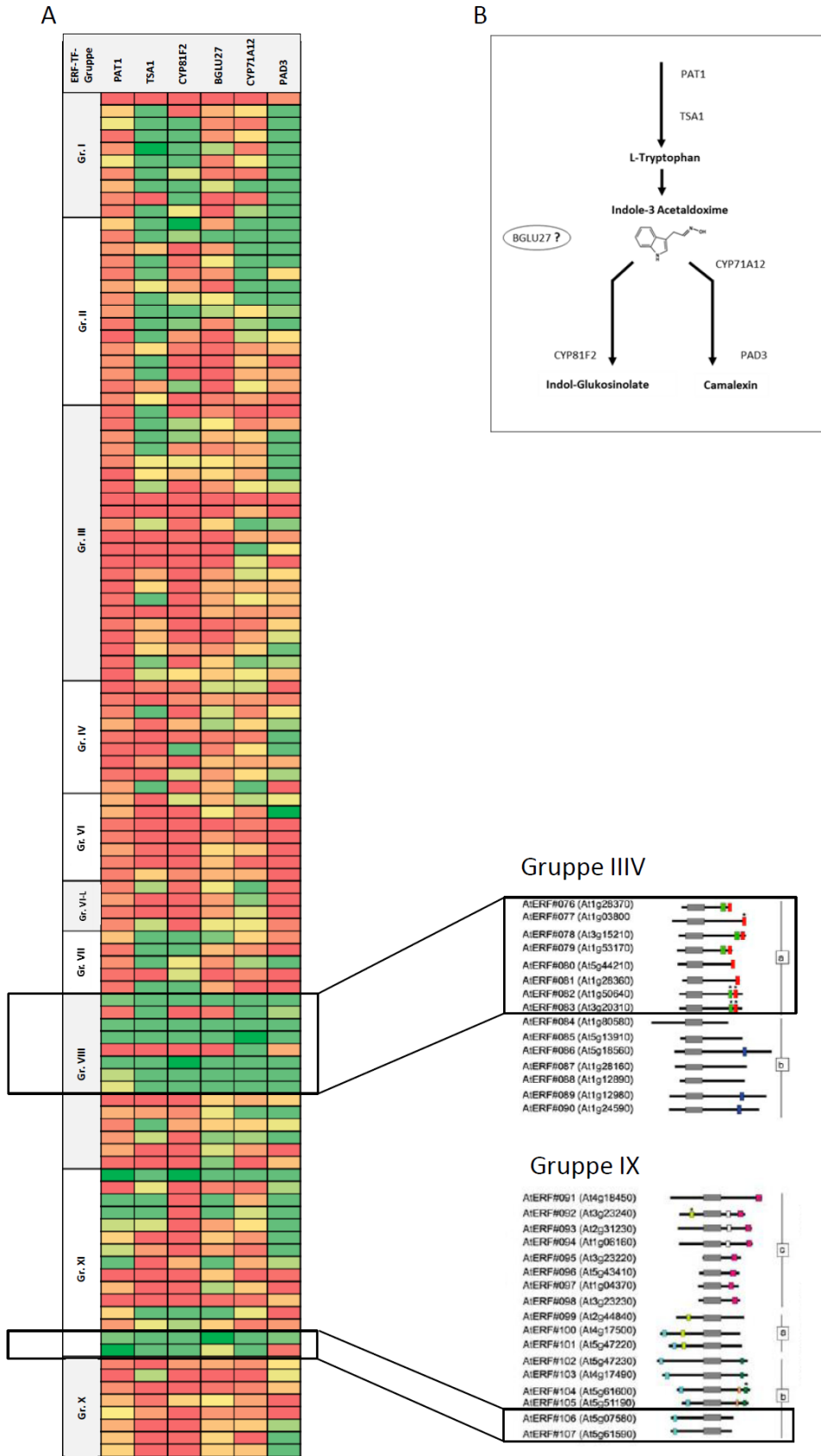


Abb.4.18: Ergebnis des Screenings der ERF-Expressionsvektorkollektion mit Promotoren ausgewählter Gene aus dem Biosyntheseweg von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin

A: Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen ERF-TF in Bezug auf sechs verschiedene Promotoren. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 2x), hell grün: leichte Induktion (2 - 3x), dunkles grün: starke Induktion (3 - nx). Die ERF-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet. Das Auftreten von Transaktivierung innerhalb sehr nah verwandter Untergruppen der ERF TF-Familie ist aufgezeigt durch die phylogenetische Zuordnung nach Nakano *et al.* 2006 (modifizierte Abb.). **B:** Darstellung eines stark vereinfachten Flussdiagramms des Biosynthesewegs von Tryptophan und Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetaboliten. Die zu den untersuchten Promotoren zugehörigen Enzymnamen sind ihrer ungefähren Position im Biosyntheseweg zugeordnet. Die Bedeutung von BGLU27 in diesem Syntheseweg ist nicht geklärt. In Kooperation mit Jasper Schierstedt. Modifizierte Abbildung nach Schierstedt, Bachelor-Arbeit 2011.

Um die erhaltenen Daten zu verifizieren, wurden die ERF-TF der Gruppe VIIIa und AtERF#106 und AtERF#107 in einem dualen Luciferase-PTA-Test auf alle konstruierten Promotoren noch einmal getestet (Abb. 4.19). Die Ergebnisse zeigen einige Abweichungen gegenüber der ersten Analyse ohne Abgleich-Reporter. Nach diesen Ergebnissen aktivieren die EAR-ERFs alle Promotoren der Tryptophan-abgeleiteten Biosynthesewege zu Indol-Glukosinolaten und Camalexin. Die Promotoren der Gene *PAT1* und *TSA1* aus dem Tryptophanbiosyntheseweg werden nicht induziert (Abb. 4.19 A). AtERF#106 und AtERF#107 aktivieren in erster Linie den Promotor von *TSA1* aus dem Tryptophan-Biosyntheseweg, den des *CYP71A12*-Gens aus dem Camalexin-Syntheseweg und den *BGLU27*-Promotor (Abb. 4.19. B). AtERF#106 ist der stärkere Aktivator.

A

ERF TF	PAT1	TSA1	CYP81F2	BGLU27	CYP71A12	PAD3
AtERF#076	1,0	0,4	0,9	4,3	3,1	4,1
AtERF#078	1,1	0,5	1,5	4,2	2,6	3,5
AtERF#079	0,9	0,6	2,1	3,3	4,1	4,8
AtERF#080	0,9	0,2	0,7	3,6	1,7	1,8
AtERF#081	0,6	0,6	3,4	1,0	1,9	1,8
AtERF#082	0,7	1,3	4,9	2,8	2,4	3,2
AtERF#083	0,7	1,1	2,2	3,2	3,5	4,1

B

ERF-TF	PAT1	TSA1	CYP81F2	BGLU27	CYP71A12	PAD3
AtERF#106	1,0	7,8	2,8	12,6	12,1	1,1
AtERF#107	1,8	4,8	1,6	2,6	1,9	0,7

Abb.4.19: Verifizierung der mittels Screening der ERF-Expressionsvektorkollektion gewonnenen Daten

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von ERF-TF der Gruppe VIIIa (A), bzw. von AtERF#106 und AtERF#107 (B) aus Gruppe IX (Nakano *et al.*, 2006), in Bezug auf Promotoren der Gene des Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen.

Die Analyse der ERF-TF zeigt, dass es schwer ist Promotoren mit sehr unterschiedlichen Hintergrundaktivitäten (siehe Anhang: Abb. 7.1) im PTA-System ohne Abgleich-Reporter zu untersuchen und die Daten anschließend direkt miteinander zu vergleichen. Es werden dadurch verstärkt falsch positive TF-Kandidaten identifiziert. Deshalb sollten die weiteren PTA-Tests mit dem dualen Luciferase-System durchgeführt werden. Da die Verwendung eines Abgleich-Reporters die Messung aber deutlich teurer macht, wurde die Analyse zunächst auf einen der Promotoren beschränkt. Darüber sollten Informationen gewonnen werden, ob verstärkt Kandidaten innerhalb einzelner TF-Familien oder Unterfamilien den Test-Promotor aktivieren können, um die weitere Suche nach Regulatoren mehrerer Synthesewege möglicherweise gezielt auf wenige Familien beschränken zu können. Für die Durchführung wurde der *CYP71A12*-Promotor ausgewählt (Millet *et al.*, 2010; Saga *et al.*, 2012). *CYP71A12* kodiert für ein zentrales Enzym aus dem Biosyntheseweg von Indol-3-Acetaldoxim hin zu Camalexin und bisher ist nur sehr wenig über die Regulation des Gens bekannt.

Getestet wurden insgesamt 1004 TF-Expressionsvektor-Klone (darunter ca. 950 verschiedene TF; siehe Anhang, Tab. 7.6). Für einen besseren Überblick wurden die Ergebnisse des *Screenings* in mehreren, zum größten Teil nach TF-Familien geordneten, Farbcodes zusammengestellt. Die Abb. 4.20 – 4.22 zeigen die Resultate der ERF-TF, der WRKY-TF, der MYB-TF und der MADS-TF. Die Ergebnisse aller übrigen Tests sind im Anhang zusammengefasst (Verweis).

Die Ergebnisse der ERF-TF-Familie (Abb. 4.20) zeigen in diesem Ansatz, dass vor allem Mitglieder der ERF-Unterfamilie (Gruppen V bis Xb-L, nach Nakano *et al.*, 2006) den *CYP71A12*-Promotor aktivieren können. Innerhalb dieser Unterfamilie aktivieren in erster Linie wieder die sehr nah verwandten ERF-TF der zwei Gruppen VIII und IX (Nakano *et al.*, 2006), wobei aus Gruppe IX diesmal deutlich mehr

Vertreter den Promotor aktivieren können. Auch in der WRKY-TF-Familie zeigen mehrere Mitglieder einzelner Untergruppen ein erhöhtes Transaktivierungspotential gegenüber dem Promotor (Gruppe II d und III, nach Ling *et al.*, 2011), (Abb. 4.21 A). Interessanterweise, gibt es neben aktivierenden TF unter den WRKY-TF auch einige Mitglieder mit repressiven Eigenschaften, wie WRKY10 und WRKY40. Beide Faktoren können die *CYP71A12*-Promotoraktivität stark reduzieren. Aus der Familie der MADS-TF gibt es zwei nah verwandte Faktoren (AGL92, AGL37) aus der My-Untergruppe (nach Parenicová *et al.*, 2003), die in der Lage sind das getestete Promotorkonstrukt zu aktivieren (Abb. 4.21 B). Innerhalb der Familie der MYB-TF können nur vereinzelte Mitglieder den Promotor aktivieren (Abb. 4.22).

TF-Gruppe	ERF-TF	CYP71A12	TF-Gruppe	ERF-TF	CYP71A12
I	AtERF#053	1,3	V	AtERF#002	0,6
	AtERF#054	1,1		AtERF#005	0,7
	AtERF#055	0,5	VI	AtERF#063	1,6
	AtERF#056	0,9		AtERF#064	1,1
	AtERF#057	0,8		AtERF#065	0,9
	AtERF#058	0,4		AtERF#066	0,7
	AtERF#059	0,5		AtERF#068	0,7
	AtERF#060	1,3		AtERF#069	0,6
	AtERF#061	0,6	AtERF#070	0,7	
AtERF#062	0,6	VI-L	AtERF#116	0,5	
II	AtERF#006		1,2	AtERF#117	0,5
	AtERF#007		1,0	AtERF#118	0,7
	AtERF#008	2,8	AtERF#119	0,7	
	AtERF#009	1,5	VII	AtERF#071	0,9
	AtERF#010	0,8		AtERF#072	1,0
	AtERF#011	1,8		AtERF#073	1,5
	AtERF#012	0,5		AtERF#074	1,5
	AtERF#013	0,4	AtERF#075	1,2	
	AtERF#014	0,5	VIII	AtERF#076	2,1
	AtERF#015	0,5		AtERF#077	0,7
	AtERF#016	0,3		AtERF#078	2,0
AtERF#017	0,3	AtERF#079		2,6	
AtERF#018	0,3	AtERF#080		1,8	
AtERF#019	0,4	AtERF#081		1,7	
AtERF#020	0,6	AtERF#082		1,7	
III	AtERF#021	0,3		AtERF#083	1,6
	AtERF#022	0,3		AtERF#085	0,5
	AtERF#023	0,3		AtERF#086	1,3
	AtERF#024	0,4	AtERF#087	2,6	
	AtERF#025	0,3	AtERF#088	1,1	
	AtERF#026	0,4	AtERF#089	0,8	
	AtERF#027	0,4	AtERF#090	0,9	
	AtERF#028	0,5	IX	AtERF#091	2,7
	AtERF#029	0,4		AtERF#092	0,9
	AtERF#030	0,8		AtERF#093	1,0
	AtERF#031	0,6		AtERF#094	0,6
	AtERF#032	1,1		AtERF#095	0,9
	AtERF#033	0,5		AtERF#096	0,5
AtERF#034	0,5	AtERF#097		0,4	
AtERF#035	0,4	AtERF#098	0,4		
AtERF#036	0,4	AtERF#100	1,2		
AtERF#037	0,3	AtERF#101	0,7		
AtERF#038	0,5	AtERF#102	2,0		
AtERF#039	0,6	AtERF#104	1,9		
AtERF#040	0,5	AtERF#105	1,8		
AtERF#041	0,5	AtERF#106	3,9		
AtERF#043	0,6	AtERF#107	4,3		
IV	AtERF#044	0,7	X	AtERF#108	0,4
	AtERF#045	0,7		AtERF#109	1,6
	AtERF#046	0,7		AtERF#110	1,3
	AtERF#047	0,6		AtERF#111	1,5
	AtERF#048	0,5		AtERF#112	1,3
	AtERF#049	0,7		AtERF#113	0,9
	AtERF#050	0,5	AtERF#115	1,0	
	AtERF#051	1,3	Xb-L	AtERF#120	1,6
AtERF#052	1,0	AtERF#122		1,4	

Abb.4.20: Ergebnis des Screenings der ERF-TF-Expressionsvektorkollektion mit dem CYP71A12-Promotor

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von 112 verschiedenen ERF-TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die ERF-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Nakano *et al.*, 2006). Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

A			B		
TF-Gruppe	WRKY-TF	CYP71A12	TF-Gruppe	MADS-TF	CYP71A12
Gruppe II d	WRKY21	0,7	M α	AGL23	0,7
	WRKY17	5,6		AGL39	0,9
	WRKY15	5,2		AGL83	0,9
	WRKY7	7,3		AGL29	0,7
Gruppe II e	WRKY65	2,9		AGL91	0,7
	WRKY35	1,6		AGL57	0,5
	WRKY22	1,6	M β	AGL53	0,8
WRKY29	1,5	AGL54		0,9	
Gruppe III	WRKY53	0,8		AGL81	1,6
	WRKY41	0,8		AGL98	0,5
	WRKY46	3,5		AGL77	0,6
	WRKY55	4,5		AGL78	0,6
	WRKY70	5,8		AGL50	0,6
	WRKY67	12,2	AGL49	0,6	
	WRKY38	1,1	M γ	AGL92	2,3
WRKY62	1,1	AGL37		2,3	
Gruppe I c	WRKY26	1,7		AGL38	0,6
	WRKY33	2,1	AGL87	0,6	
	WRKY20	1,2	MIKC	AGL7	0,5
	WRKY25	1,1		AGL1	0,4
	WRKY44	0,7		AGL8	0,8
	WRKY1	0,9		AGL79	0,4
	WRKY10	0,3		AGL2	0,8
Gruppe II c	WRKY28	1,7		AGL71	0,9
	WRKY23	1,1		AGL68	0,9
	WRKY75	2,2	AGL69	0,8	
	WRKY45	1,1	AGL25	1,5	
	WRKY56	0,7	AGL21	1,2	
	WRKY43	2,9	AGL16	0,6	
	WRKY12	3,0	AGL15	0,3	
	WRKY13	1,2	AGL101	1,1	
Gruppe II a	WRKY60	0,7	AGL32	0,9	
	WRKY40	0,2			
Gruppe II b	WRKY72	1,0			
	WRKY9	0,6			
	WRKY61	0,9			
	WRKY47	1,8			
	WRKY42	4,5			
	WRKY6	2,1			

Abb.4.21: Ergebnis des Screenings der WRKY-TF- und MADS-TF-Expressionsvektorkollektionen mit dem CYP71A12-Promotor

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von: WRKY-TF (A) und MADS-TF (B) in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die WRKY- und die MADS-TF (*Agamous-like*-TF) sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (WRKY-TF: Ling *et al.*, 2011; MADS-TF: Parenicová *et al.*, 2003). Die Ergebnisse sind als Farbcodes zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

TF-Gruppe	MYB-TF	CYP71A12	TF-Gruppe	MYB-TF	CYP71A12
	MYB27	0,9		MYB95	0,7
	MYB121	0,9		MYB47	0,9
	MYB79	1,2	S9	MYB17	0,8
	MYB71	1,6		MYB106	1,1
	MYB59	1,4		MYB16	0,7
	MYB48	0,9	S24	MYB93	0,5
	MYB57	1,0		MYB92	0,9
S19	MYB24	1,5		MYB53	1,1
	MYB21	0,9	S10	MYB9	2,1
S20	MYB116	0,5	S14	MYB38	0,7
	MYB62	0,6		MYB37	1,4
	MYB108	1,0		MYB84	1,4
S13	MYB86	1,6		MYB87	0,4
	MYB55	0,8		MYB36	1,6
	MYB61	2,6		MYB35	1,0
	MYB67	0,6	S1	MYB60	1,6
	MYB103	0,6		MYB31	0,9
	MYB83	1,1		MYB30	0,7
	MYB46	0,6		MYB96	1,9
S16	MYB45	1,7		MYB94	0,9
	MYB19	0,9		MYB85	1,0
	MYB18	2,3		MYB99	1,2
S12	MYB34	1,9		MYB40	0,7
	MYB51	0,6		MYB43	0,7
	MYB28	1,6		MYB20	0,7
	MYB76	0,9	S2	MYB15	0,8
	MYB29	1,2		MYB14	0,9
S4	MYB32	1,5		MYB13	1,4
	MYB7	1,0		MYB10	1,8
	MYB3	1,0	S3	MYB63	0,5
	MYB6	0,8	S18	MYB101	1,8
S5	MYB123	1,1		MYB81	1,2
S7	MYB111	1,5		MYB65	1,2
	MYB12	0,9		MYB91	1,1
	MYB11	0,9	S21	MYB117	1,0
	MYB5	1,3		MYB69	1,6
S6	MYB113	0,7		MYB56	1,0
	MYB114	0,9		MYB54	0,7
	MYB75	1,0		MYB52	0,8
	MYB82	0,9	S22	MYB73	0,5
S15	MYB0	0,6		MYB70	1,3
	MYB66	0,8		MYB77	0,5
	MYB23	1,3	S23	MYB1	1,4
	MYB49	1,9		MYB109	1,7
S11	MYB41	1,3		MYB25	1,5
	MYB102	1,0			
	MYB74	0,7			

Abb.4.22: Ergebnis des Screenings der MYB-TF-Expressionsvektorkollektion mit dem CYP71A12-Promotor

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen MYB-TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die MYB-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Dubos *et al.*, 2010). Die Ergebnisse sind als Farbcodes zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle

(Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

4.1.3.2.2 Der Einfluss der EAR-Domäne von AtERF#079 auf die Aktivierung des CYP71A12-Promotors

In weiteren Experimenten sollte die Aktivierung der Promotoren der Indol-Glukosinolat- und Camalexinsynthese durch EAR-ERF-TF näher betrachtet werden. Dafür wurde der Einfluss des EAR-Motivs von AtERF#079 auf die Aktivierung des CYP71A12-Promotors untersucht. Das EAR-Motiv der Gruppe VIIIa ERF-TF umfasst die Konsensus-Sequenz ${}^L/FDLN{}^L/F(x)P$. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Sequenz essentiell für die GCC-Box-vermittelte Repression der Transkription durch ERF-TF mit einem EAR-Motiv ist (Ohta *et al.*, 2001). Im Folgenden soll überprüft werden, ob die EAR-Sequenz auch für die Aktivierung des CYP71A12-Promotors notwendig ist. Dafür wurde die DNA-Sequenz des EAR-Motivs von AtERF#079 an sieben Positionen mutiert, was zu einem Austausch von vier Aminosäuren zu je einem Alanin führte (Abb. 4.23 A). Die resultierende Dysfunktion des Motivs wurde in einem Vortest überprüft. Abb. 4.23 B zeigt, dass ATERF#079 in der Lage ist die hohe Grundaktivität des Gal4₅-GCC₄:LUC-Konstrukts zu reprimieren. AtERF#079 mit mutierter EAR-Domäne (mAtERF#079) zeigt diesen Effekt nicht mehr. Die EAR-Motiv-vermittelten Repressoreigenschaften des TF sind im mAtERF#079-Konstrukt nicht mehr ausgeprägt. Jetzt sollte der Einfluss des mutierten Motivs auf die AtERF#079-vermittelte Aktivierung des CYP71A12-Promotors untersucht werden. Dafür wurden die Transaktivierungseigenschaften des AtERF#079- und des mAtERF#079-Konstrukts bezüglich des Promotors im PTA-System getestet. Abb. 4.23 C demonstriert die Aktivierung von Prom_{CYP71A12}:LUC durch den intakten ERF-TF. Eine Aktivierung des Reporter-Konstrukts ist nicht zu sehen, wenn AtERF#079 mit mutiertem EAR-Motiv kotransformiert wird. Eine gleichmäßige Expression von AtERF#079 und mAtERF#079 in Protoplasten wurde in einer Western-Analyse überprüft (Abb. 4.23 D). Die Konsensus-Sequenz ${}^L/FDLN{}^L/F(x)P$ ist also auch essentiell für die Aktivierung des Camalexinbiosynthesegens CYP71A12 durch den ERF-TF AtERF#079.

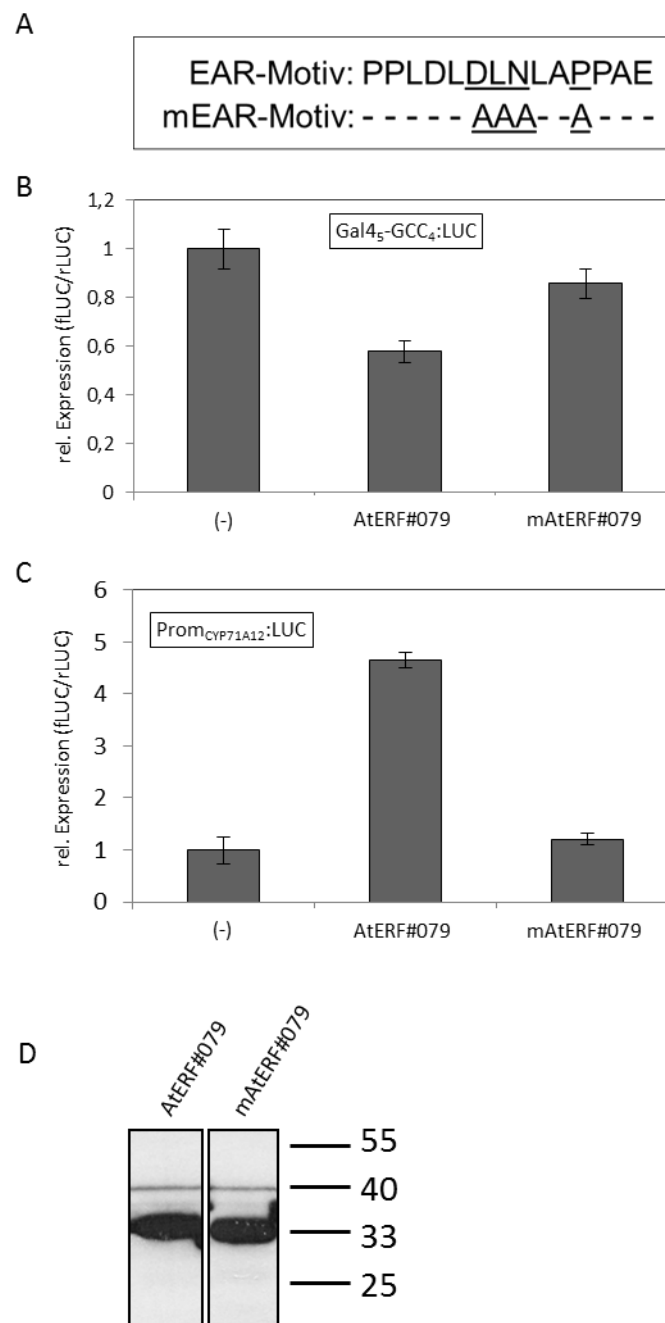


Abb.4.23: Einfluss des EAR-Motivs von AtERF#079 auf die Aktivierung des CYP71A12-Promotors

A: Darstellung der Konsensus-Sequenz des EAR-Motivs mit den Positionsangaben für die gerichtete Mutagenese. **B:** Zur Überprüfung der Dysfunktion des EAR-Motivs von mAtERF#079 ist die Regulation der Expression des Gal₄-GCC₄:LUC Reporters durch Kotransformation mit AtERF#079 und mAtERF#079 dargestellt. **C:** Demonstriert wird der Einfluss der beiden Konstrukte auf die CYP71A12-Expression. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Die Angaben demonstrieren die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

D: Für den Western-Blot wurden Protoplasten im Standardverfahren mit 20 μ g Effektorplasmid transformiert und jeweils 2 Transformationsansätze nach der Inkubation über Nacht in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und vereint. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen das HA-Epitop.

4.1.3.2.3 Identifizierung repressiver Regulatoren der *CYP71A12*-Expression

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts durch AtERF#079 (At1g53170) der Gruppe VIIIa (Nakano *et al.*, 2006) abhängig vom Repression-vermittelnden EAR-Motiv ist. Eine Analyse der Promotorregion von *CYP71A12* ergab, dass es keine ERF-spezifischen *cis*-Elemente innerhalb von 2000 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart gibt (*The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server* (AGRIS); (Davuluri *et al.*, 2003). Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Aktivierung durch eine bisher nicht indentifizierte Aktivierungsdomäne der ERF-TF hervorgerufen wird. Es muss sich also um einen indirekten Aktivierungs-Weg handeln, der über die EAR-Domäne vermittelt wird, vermutlich unter Beteiligung weiterer TF. Bei der Suche nach weiteren beteiligten TF sollte deshalb vor allem auf Repressoren geachtet werden. Die Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors könnte durch eine EAR-Motiv-vermittelte Repression eines anderen Repressors verursacht sein. Während des großen *Screenings* des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts mit unterschiedlichen TF-Kollektionen (Abb. 4.21 A) konnten bereits zwei WRKY-TF, AtWRKY10 und AtWRKY40, mit repressiven Eigenschaften identifiziert werden. In Abb. 4.24 A ist noch einmal gezeigt, dass beide TF in der Lage sind die Grundaktivität des Promotors um mehr als 60 % zu verringern. Damit sind sie gute Kandidaten für eine eventuelle Beteiligung an der indirekten Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors durch EAR-ERF-TF.

Ein weiteres PTA-Experiment sollte einen Hinweis darüber liefern, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten Induktion des *CYP71A12*-Promotors durch AtERF#079 (At1g53170) und dem WRKY-Repressor AtWRKY40 gibt. Dafür wurde die Transaktivierung des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts durch den EAR-ERF-TF in Protoplasten, isoliert aus einer *wrky40-knock-out*-Linie, mit der Transaktivierung in WT-Protoplasten verglichen (Abb. 4.24 B). Die Ergebnisse zeigen, dass in beiden Protoplasten-Linien die Aktivierung des Promotors möglich ist. In der *wrky40*-Linie fällt die Induktion des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts durch AtERF#079 (At1g53170) allerdings schwächer aus.

Auch die Grundaktivität des Promoters ist unterschiedlich in beiden Linien. In der *wrky40-knock-out*-Linie ist sie leicht erhöht im direkten Vergleich zum WT. Das Ergebnis liefert ein Indiz, das möglicherweise AtERF#079 und WRKY40 an der Regulation von *CYP71A12* beteiligt sind.

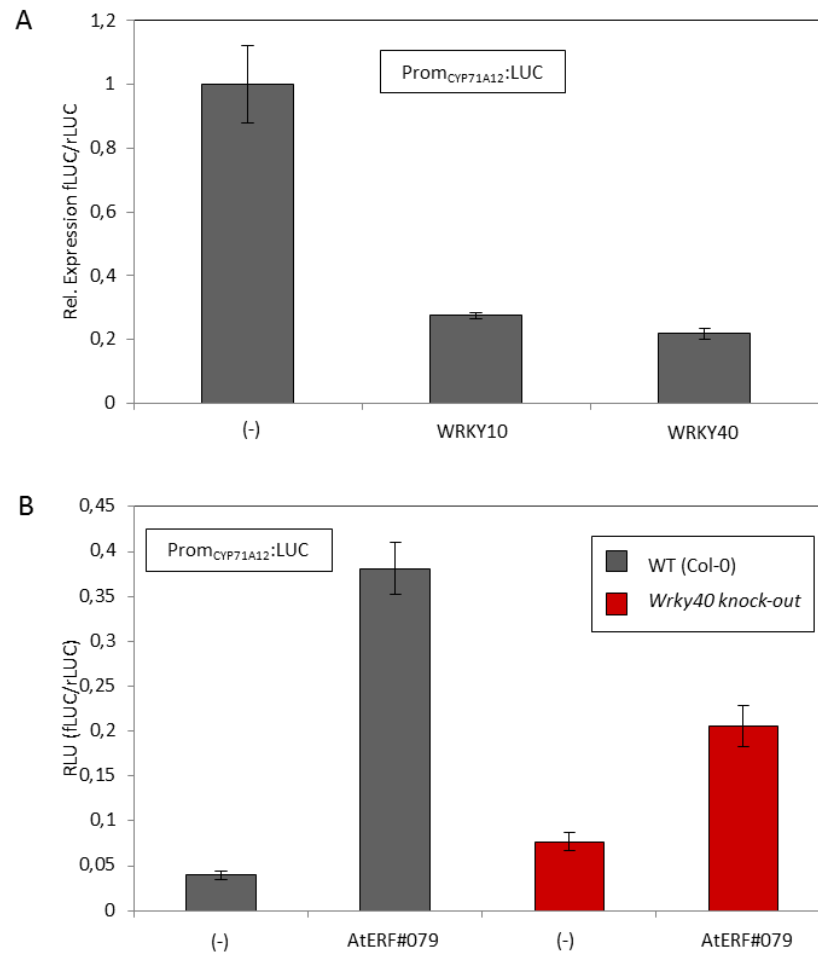


Abb.4.24: Repression der Expression des *CYP71A12*-Promotors durch Regulatoren der WRKY TF-Familie

A: Gezeigt ist die Repression der Grundaktivität des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts durch AtWRKY10 und AtWRKY40. **B:** Darstellung der Grundaktivität des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts und der Transaktivierung des Promotors durch AtERF#079 in WT-Protoplasten (grau) und in *wrky40-knock-out*-Protoplasten (rot). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind in **A** als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt und in **B** als RLU (*relative luminescence units*). Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4.2 *AtTORF-EX-Bank: Screening einer Arabidopsis thaliana* Überexpressionssamenbank auf erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress

Die Komplexität einer vollständigen Pflanze kann nicht nur in einzelnen Zellen untersucht werden. So sind „*loss of function*“-oder „*gain of function*“-Ansätze, verbunden mit stabilen Pflanzentransformationen, trotz effektiver transienter Transformationssysteme unverzichtbar für die Aufklärung regulatorischer Netzwerke. Die Herstellung von Überexpressionslinien ist mit großem arbeitstechnischen und zeitlichem Aufwand verbunden, da jede Linie einzeln transformiert und anschließend charakterisiert werden muss. Um die Analyse solcher Überexpressionspflanzen zu vereinfachen wurde deshalb im Rahmen einer Diplomarbeit von Christoph Weiste (Weiste *et al.*, 2007) ein *batch*-Verfahren zur gleichzeitigen Generierung ganzer Überexpressionssamen-Banken entwickelt (Abb. 1.2). Das Resultat sind Samenkollektionen mit 25-60 verschiedenen *Arabidopsis* TF-Überexpressionslinien, die in verschiedenen *Screening*-Ansätzen eingesetzt werden können. Mit Hilfe des *batch*-Verfahrens wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs neue Samenkollektionen erstellt (Tab. 4.3).

Tab.4.3: Samenmixe der *AtTORF-EX-Bank*

Auflistung der verschiedenen Kollektionen der Überexpressionssamenbank mit entsprechender Anzahl enthaltener TF-ORFs.

Samen-Kollektionen der <i>AtTORF-EX-Bank</i>	Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Kollektionen	TF-Familie	Zahl der enthaltenen TF-ORFs
#1		ERF	32
#2		ERF	30
#3		ERF	30
#4		ERF	25
#5		WRKY	32
#6		WRKY	32
#7		NAC	30
#8		NAC	34
#9		bZIP	56
#10	#10	MYB	30
#11		DOF	29
#12	#12	MIX	60
#13	#13	MIX	60
#14	#14	MIX	60
#15	#15	MIX	60
#16	#16	MIX	48
			$\Sigma=648$

4.2.1 Identifizierung von Überexpressionspflanzen die eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress zeigen

Die AtTORF-EX-Kollektion für ERF-TF wurde bereits im Rahmen einer Arbeit von Christoph Weiste (Weiste *et al.*, 2007) erfolgreich in einem Screening zur Identifizierung von Überexpressionspflanzen gegenüber oxidativem Stress eingesetzt. Dabei konnten Überexpressionslinien des TF At3g23220 (AtERF#095) als resistenter gegenüber der Chemikalie Paraquat identifiziert werden. Der Versuchsansatz mit Paraquat als oxidativen Stress-Geber ist ein schnelles und gut reproduzierbares System und erlaubt die gleichzeitige Durchmusterung mehrerer tausend Pflanzen. In einem erneuten Großansatz sollten deshalb weitere AtTORF-EX-Kollektionen auf Paraquat getestet werden. Dafür wurden in mehreren Teilexperimenten insgesamt 12500 Samen verschiedener Kollektionen auf MS-Medium, versetzt mit 3 μ M Paraquat, ausgelegt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration der WT komplett abstirbt und man so resistente Linien innerhalb der Überexpressionspflanzen identifizieren kann (Weiste *et al.*, 2007). Zur Kontrolle wurden WT-Samen (Col-0) auf MS-Medium mit Paraquat ausgelegt. Die Überprüfung des gleichmäßigen Wachstums von WT und Überexpressionssamen erfolgte auf MS-Platten ohne Zusätze (Abb. 4.25). Nach 10-14 Tagen unter Langtagbedingungen in der Klimakammer war der WT auf den Paraquat-Platten nahezu vollständig abgestorben und überlebende Keimlinge der Überexpressionskollektion konnten näher untersucht werden. Von 12500 ausgelegten Samen der Kollektionen #2, #13, und #15 konnten 119 Keimlinge als potentiell resistent identifiziert werden. Ausgewählt wurden nur Keimlinge, die nach dem Wachstum auf Paraquat noch zwei grüne Keimblätter aufweisen konnten.

Die Identifizierung des jeweiligen überexprimierten TF erfolgte mittels PCR über *att-site*-spezifische Primer und eine anschließende Sequenzierung. Insgesamt konnte bei 68 Keimlingen der transformierte Faktor ermittelt werden. Bei allen Übrigen wurde entweder mit Hilfe der PCR keine spezifische Bande erzielt, oder die Sequenzierung erbrachte kein Ergebnis. Viele der identifizierten TF konnten nur einmal innerhalb des Großansatzes ermittelt werden. Diesen wurde keine besondere Bedeutung in der Resistenz gegenüber oxidativem Stress beigemessen, da bei Screening-Experimenten auch immer eine Anzahl an falsch positiven Kandidaten auftreten kann. Erst die mehrfache Identifizierung wurde als Indiz für eine mögliche Resistenz-vermittelnde

Rolle gewertet. Insgesamt konnten zwölf Faktoren mehrfach gefunden werden (siehe Anhang, Tab. 7.8), davon sechs sogar mehr als zweifach. Unter diesen befinden sich bZIP1 und bZIP44, die beide fünfmal während der Durchmusterung gefunden wurden, und die TF OBP1, sowie zwei weitere DOF-TF und ein *Drought-responsive-family*-Protein (Tab. 4.4).

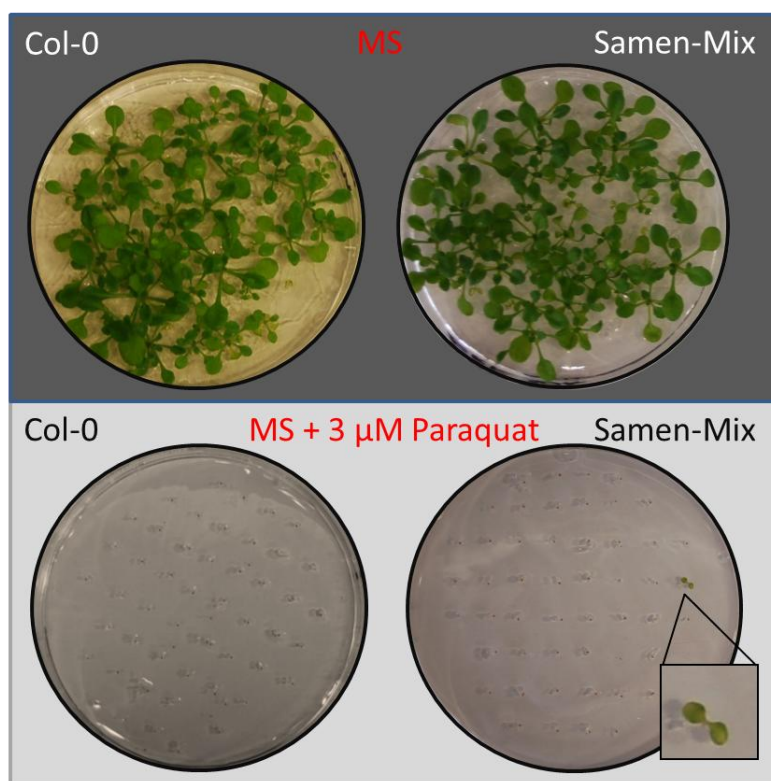


Abb.4.25: Exemplarische Darstellung eines *AtTORF-EX*-Samen-Screenings auf Paraquat inkl. aller Kontrollen

Je 50 Überexpressions-Samen werden auf eine Platte MS-Medium mit 3 μM Paraquat gelegt. Nach 10-14 Tagen ist der WT (Col-0) abgestorben und Überlebende Keimlinge der *AtTORF-EX*-Mixe können analysiert werden. Ein gleichmäßiges Wachstum der Samen wird auf MS-Platten ohne Paraquat überprüft.

Tab.4.4: Auflistung der mehrfach während des Paraquat-Screenings identifizierten TF

At-Nummer	TF-Familie	Beschreibung	Zusätzliche Bezeichnung	Referenz	Häufigkeit im Screen
At5g49450	bZIP-TF	<i>basic leucine-zipper</i>	bZIP1	Dietrich <i>et al.</i> , 2011	5x
At1G75390	bZIP-TF	basic leucine-zipper	bZIP44	-	5x
AT4G02200	-	<i>Drought-responsive-family-Protein</i>	-	-	4x
At3G50410	DOF-TF	Zink-Finger-Protein	OBP1	Chen <i>et al.</i> , 1996	4x
At2g31380	-	Zink-Finger-Protein (<i>Salt tolerance-Homolog</i>)	-	-	3x
At1g21340	DOF-TF	Zink-Finger-Protein	-	-	3x

4.2.2 Analyse von bZIP1 gain of function- und loss of function-Linien

Die während des Screenings der *At*TORF-EX-Bank auf Paraquat identifizierten Überexpressionslinien sollten zur Verifizierung erneut auf ihre Resistenz gegenüber der Chemikalie getestet werden. Leider können die bereits als positiv getesteten Linien der Paraquat-Platten dafür nicht weiter gezogen werden. Die Keimlinge sind durch das Paraquat sehr stark angegriffen. Es zeigte sich, dass ein Umsetzen der Pflanzen auf normales MS-Medium in den meisten Fällen zum Absterben führt. Die Pflänzchen werden deshalb als vollständige Keimlinge in die PCR-Reaktion gegeben. Für eine weitere funktionelle Analyse der potentiell Resistenz-vermittelnden TF müssen unabhängige Linien getestet werden. Im Falle von bZIP1 standen bereits verschiedene gut charakterisierte Mutantenlinien zur Verfügung: Eine Überexpressionslinie (Pro35S:bZIP1), eine bZIP1-*knock-out*-Linie (*bzip1*) und eine *bzip1/bzip53*-doppel-*knock-out*-Linie (Dietrich *et al.*, 2011). BZIP1 und bZIP53 sind sehr nah verwandt und gehören beide zur Gruppe S1 der bZIP-TF-Familie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mitglieder dieser Gruppe eine hohe funktionelle Redundanz aufweisen (Dietrich, Dissertation 2010). *Knock-out*-Linien einzelner TF der Gruppe S1 zeigen häufig keine phänotypischen Veränderungen, da andere bZIP-TF der Gruppe die Funktionen übernehmen. Zur Analyse wurden Samen der Linien zunächst auf MS-Medium ohne Zusätze ausgelegt, um eine gleichmäßige Keimung gewährleisten zu können. Nach 5 Tagen in der Klimakammer unter Langtag-Licht-Regime wurden die Keimlinge auf Platten mit 3 μ M Paraquat umgesetzt. Nach weiteren 5-7 Tagen konnte der Test

ausgewertet werden. Wie in Abb. 4.26 A exemplarisch zu sehen, überlebten deutlich mehr bZIP1-Überexprimierer auf Paraquat als WT und *knock-out*-Pflanzen. Zwischen Letzteren scheint es keine deutlichen Unterschiede zu geben. Zur Verdeutlichung wurden die überlebenden Pflanzen aller Linien mit zwei grünen Keimblättern genau quantifiziert (Abb. 4.26 B). Anhand der Auszählung ist zu erkennen, dass es unter den Prom_{35S}:bZIP1-Pflanzen signifikant mehr Überlebende gibt als beim WT. Bei den *knock-out*-Linien würde man vermuten, dass sie schlechter unter oxidativem Stress wachsen können. Das scheint aber nicht der Fall zu sein, da es keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem WT gibt. Allerdings ist bekannt, dass die bZIP-Faktoren der Gruppe S1 (Jakoby *et al.*, 2002) funktionell redundant sind, so dass wahrscheinlich noch mehr Vertreter ausgeschaltet werden müssen, um einen Phänotyp auf Paraquat zu sehen (Dietrich *et al.*, 2011).

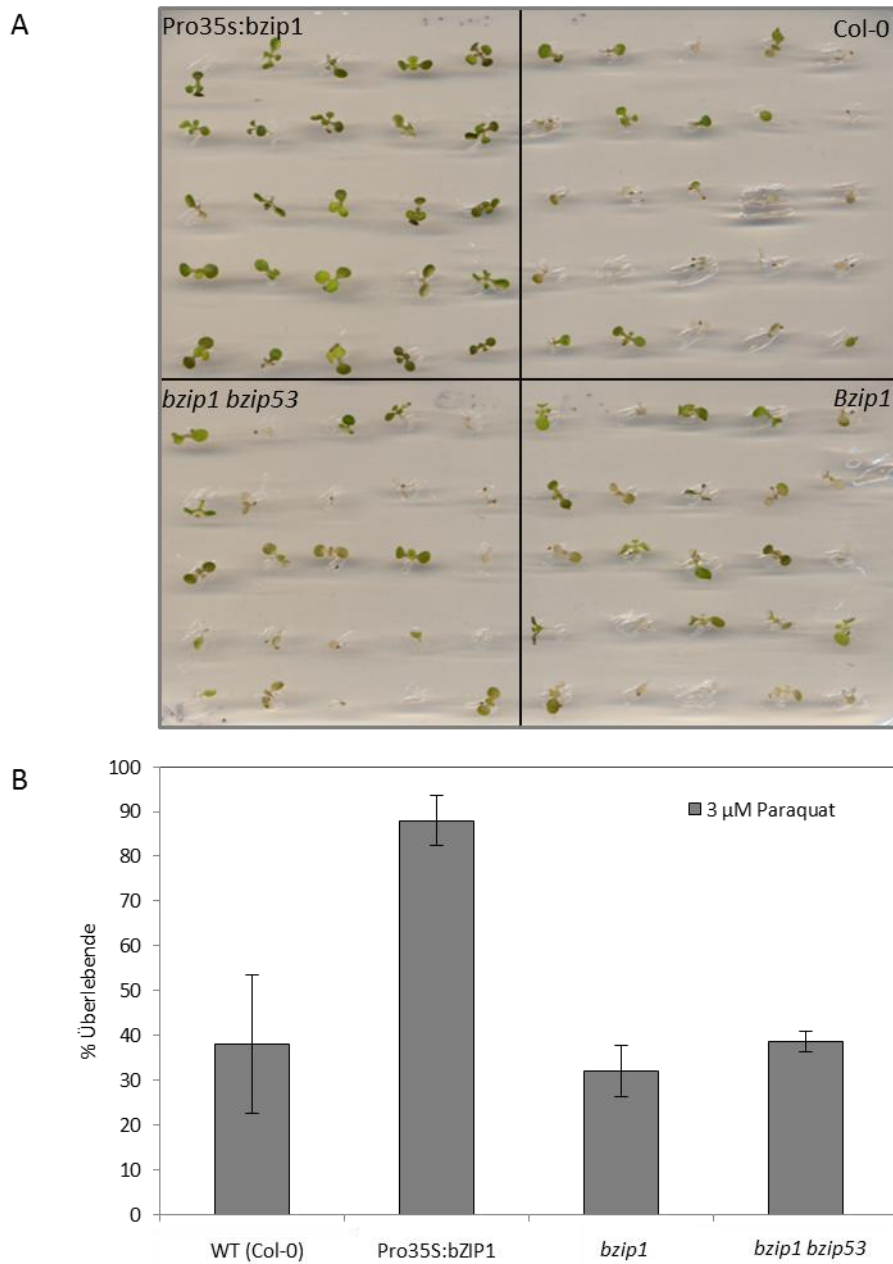


Abb.4.26: Auswertung der Analyse verschiedener *bZIP1*-Überexpressions- und T-DNA-Insertionslinien auf Paraquat.

A: Jeweils 25 Keimlinge aller vier Linien wurden auf eine Platte mit 3 µM Paraquat umgesetzt. Zuvor wurden die Linien 5 Tage auf MS-Medium vorgezogen. Die Auswertung erfolgte nach weiteren 5-7 Tagen unter Langtag-Lichtbedingungen.

B: Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Analyse. Die Balken zeigen die Anzahl Überlebender mit zwei grünen Keimblättern prozentual zu 100 % ausgekeimten Pflanzen auf MS-Medium ohne Paraquat. Insgesamt wurden 50 Keimlinge pro Linie ausgelegt. Der Test wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

5 Diskussion

5.1 Das PTA-System ist eine geeignete *Screening*-Plattform zur Identifizierung aktivierender *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen dieser Dissertation ist eine *Screening*-Plattform entstanden, mit der es möglich ist die Transaktivierungseigenschaften von *Arabidopsis* TF bezüglich beliebiger Promotor:LUC-Konstrukte zu analysieren. Dafür wurde das von Yoo *et al.* (2007) beschriebene Transformationsprotokoll für *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten modifiziert, um eine Durchführung in Mikrotiterplatten zu ermöglichen (Abb. 4.1). Somit können 96 TF in unabhängigen Reaktionen gleichzeitig mit einem Reporterkonstrukt in Protoplasten kotransformiert werden. Alle Transformationsschritte werden mit Multikanalpipetten durchgeführt, wodurch eine routinemäße Anwendung des Systems gewährleistet ist. Darüber hinaus ist es möglich das System weiter zu automatisieren. Wie bereits von De Sutter *et al.* (2005) für ein transientes Assay-System in Tabak-Protoplasten gezeigt wurde, können alle Transformationsschritte des Protokolls auch von einem Pipettier-Roboter durchgeführt werden. Langfristig soll die Anwendung des Systems auf diese Weise noch effizienter gestaltet werden.

Die Transaktivierung eines Promotors durch einen TF, ist über die Luciferase-Reporteraktivität leicht nachzuweisen (Abb. 4.2). Luciferase als Reporter gen hat in dieser Anwendung verschiedene Vorteile. Die Sensitivität der Luciferasemessung ist sehr hoch, was aufgrund des kleinen Probenvolumens wichtig ist. Fluoreszenz-Messungen, z.B. mit *GFP* als Reporter gen, haben dagegen den Nachteil, dass der Hintergrund, aufgrund anderer fluoreszierender Moleküle in der Zelle, häufig sehr hoch ist und damit die Sensitivität der Messung limitiert ist. Im Gegensatz zur häufig in transienten Protoplasten-Assays angewandten β -Glucuronidase-Messung hat die Luciferasemessung darüber hinaus den Vorteil, dass die Lumineszenz in lebenden Protoplasten gemessen werden kann und eine vorherige Zell-Extraktion nicht erforderlich ist (zur Übersicht siehe Kain und Ganguly, 2001).

Im Gegensatz zum ursprünglichen Protokoll von Yoo *et al.* (2007) benötigt das PTA-System deutlich weniger Ausgangsmaterialien, wodurch die Kosten für jede Reaktion erheblich reduziert werden können. Weniger als 2×10^6 Protoplasten sind ausreichend

für 96 Transformationsreaktionen und statt der benötigten 20 µg Gesamt-Plasmid-DNA lassen sich im PTA-System gute Transaktivierungswerte bereits mit 1-2 µg DNA pro Konstrukt erzielen (Abb. 4.5). Damit lassen sich die Kosten für jede Reaktion erheblich reduzieren.

Obwohl das PTA-System keine interne Normalisierung durch Koexpression eines Abgleichreporters enthält, sind die gewonnenen Daten aussagekräftig genug, um die TF identifizieren zu können, die in der Lage sind den getesteten Promotor zu aktivieren. Nach drei Transformations-Durchläufen ausgewählter ERF-TF mit dem Prom_{RD29A}:LUC-Konstrukt konnten insgesamt 61 % aller Transaktivierungen in allen Durchläufen reproduziert werden und 100 % in zwei der drei Wiederholungen (Abb. 4.7). Die Identifizierung der sehr starken Aktivatoren (≥ 5 x) erfolgte ebenfalls zu 100 % in allen Durchläufen. Für Analysen, die eine präzise Quantifizierung der Daten erfordern, wurde eine duale Luciferasemessung etabliert, bei der ein Prom_{35S}:*Renilla*-Konstrukt (Promega) als Abgleichreporter dient. Die experimentelle Varianz kann somit deutlich minimiert werden (Abb. 4.3). Grundsätzlich empfiehlt es sich, das duale Luciferasesystem zu verwenden, wenn die Transaktivierungsstärke exakt bestimmt werden soll, wenn transkriptionelle Repression untersucht wird oder wenn die Grundaktivität eines Promotor-Konstrukts bereits sehr hoch ist. Transaktivierungsdaten von Promotor-Konstrukten mit sehr hoher Grundaktivität weisen eine höhere Varianz auf, weil die, durch die Transformationseffizienz bestimmte, Schwankungsbreite des Promotor-Grundsignals (ohne Effektor) bereits sehr hoch ist. Für einen ersten *Screening*-Ansatz zur Identifizierung transkriptioneller Aktivatoren ist das PTA-System ohne Normalisierung aber aussagekräftig genug.

In einer Machbarkeitsstudie wurde die Spezifität des PTA-*Screening*-Systems eingehend überprüft (Abb. 4.9). Die Ergebnisse einer Kollektion verschiedener ERF-TF, kotransformiert mit den bereits gut charakterisierten Promotoren der Gene *RD29A* und *PDF1.2*, bestätigen die, in vorrausgegangenen Arbeiten publizierten, Bindungseigenschaften von ERF-TF (Brown *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2000; Sakuma *et al.*, 2002). Mitglieder der DREB-Unterfamilie aktivieren in erster Linie den *RD29A*-Promotor, der einige DRE-Elemente aufweist. Vertreter der ERF-Unterfamilie dagegen aktivieren verstärkt den GCC-Element-tragenden *PDF1.2*-Promotor. Sakuma *et al.* (2002) konnte zeigen, dass sich DREB- und ERF-TF in ihren Bindungseigenschaften,

aufgrund von zwei unterschiedlich konservierten Aminosäuren der AP2-Domäne, unterscheiden. TF der ERF-Unterfamilie weisen an Position 14 ein Valin (V14) auf und an Position 19 häufig ein Glutamat (E19), während bei TF der DREB-Unterfamilie an diesen Positionen Alanin (A14) und Aspartat (D19) hochkonserviert ist. In Bindungsstudien konnte demonstriert werden, dass für die Bindung von TF der ERF-Familie an DRE-Elemente die Position V14 von großer Bedeutung ist und für die Bindung an GCC-Elemente die Positionen A14 und D19. Da nicht alle Mitglieder der jeweiligen Unterfamilien die entsprechenden Test-Promotoren aktivieren konnten, ist es wahrscheinlich, dass noch weitere Abschnitte für die Transaktivierung der Promotoren entscheidend sind. Welche Aminosäuresequenzen noch bedeutend sind ist unklar, aber es fällt auf, dass die sehr nah verwandten aktivierenden TF der DREB- und der ERF-Unterfamilie jeweils konservierte Bereiche gemeinsam haben. So weisen z.B. alle nah verwandten DREB-Faktoren, die ein erhöhtes Transaktivierungspotential gegenüber dem *RD29A*-Promotor zeigen, das von Nakano *et al.* (2007) charakterisierte CMIII-1-Motiv auf. Alle nah verwandten Mitglieder der ERF-Unterfamilie, die den *PDF1.2*-Promotor aktivieren, beinhalten dagegen das konservierte CMIX-1-Motiv. Diese Daten sprechen für einen Zusammenhang zwischen phylogenetischen und funktionellen Eigenschaften der TF gegenüber den Test-Promotoren.

Für die Anwendung des PTA-Systems wurde eine umfassende *Arabidopsis* TF-Kollektion aufgebaut (siehe Anhang, Tab. 7.6). Ca. 950 verschiedene Gateway®-kompatible TF-Expressionsvektoren stehen bisher für diverse *Screening*-Ansätze zur Verfügung. Wenn man davon ausgeht, dass in *Arabidopsis* ca. 1500-2000 Gene für TF kodieren (Guo *et al.*, 2005; Perez-Rodriguez *et al.*, 2010; Ramirez und Basu 2009; Riechmann *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.*, 2010), deckt die Expressionsvektorkollektion bereits jetzt mehr als die Hälfte, bzw. zwei Drittel des *Arabidopsis* TF-ORFeoms ab. Die Kollektion soll noch weiter ausgebaut werden und zukünftig alle *Arabidopsis* TF umfassen. Allerdings überschneiden sich die verschiedenen ORF-Banken zu weiten Teilen (etwa 65 %) und einige *Arabidopsis* TF sind in keiner der Kollektionen enthalten. Um diese Faktoren trotzdem in die Kollektion aufnehmen zu können, müssen erst die kodierenden Sequenzen mit Hilfe isolierter Gesamt-RNA amplifiziert werden. Die Transkript-Menge einiger Faktoren ist allerdings so niedrig, dass zuvor die Transkription gezielt durch externe Stimuli induziert werden muss.

5.2 In der Anwendung bietet das PTA-System erhebliche Vorteile gegenüber anderen Methoden

Screening-Analysen zur Untersuchung von *cis-trans*-Wechselwirkungen zwischen transkriptionellen Regulatoren und ihren Ziel-Promotorsequenzen wurden bisher in erster Linie mit *South-Western*-Analysen oder *Yeast-one-Hybrid*-Ansätzen durchgeführt. Die *South-Western-Screening*-Analyse hat allerdings den Nachteil, dass es sich um einen *in vitro*-Ansatz handelt und gewonnene Ergebnisse nicht unbedingt den Tatsachen in einer lebenden Zelle entsprechen. *Yeast-one-Hybrid*-Ansätze haben diesen Nachteil nicht. Dafür sind die verwendeten cDNA-Banken nicht immer für die Untersuchung transkriptioneller Regulatoren geeignet. In den Kollektionen sind TF häufig unterrepräsentiert, weil sie nur schwach exprimiert werden und die cDNA-Banken aus isolierter Gesamt-RNA gewonnen werden. Inzwischen sind allerdings zahlreiche *Yeast-one-Hybrid*-Plattformen publiziert worden, die auf speziellen TF-cDNA-Banken beruhen (Mitsuda *et al.*, 2010; Castrillo *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2011). Der Ansatz von Ou *et al.* (2011) geht noch einen Schritt weiter. Die TF-Kollektion ist hier bereits in Mikrotiterplatten angeordnet und kann mit Hilfe eines Kreuzungsverfahrens unabhängig mit dem Reporter-Konstrukt in Hefe koexprimiert werden. Aufwändige Re-Isolationsschritte zur Identifizierung positiver Kolonien sind nicht nötig, da sie über die Plattenposition identifiziert werden können.

Trotz dieser Neuerungen bietet das PTA-System einige weitere Vorteile. Ein entscheidender Punkt ist, dass die PTA-Analyse in Pflanzenzellen durchgeführt wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Bedingungen in Hefezellen von denen pflanzlicher Zellen unterscheiden. Vor allem die Ausstattung mit weiteren Kofaktoren kann unterschiedlich sein und erheblichen Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben. Demonstriert werden konnte das in Studien, in denen Proteinfunktionen in beiden Systemen untersucht und miteinander verglichen wurden (Ehlert *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist die Analyse pflanzlicher „Vollängen“-Promotoren in Hefe oft nicht möglich, weil die Distanz, über welche die Transkription aktiviert werden kann, in Hefe häufig bei nur ca. 400 Basenpaaren liegt (Dobi und Winston, 2007; Mitsuda *et al.*, 2010). Aus diesem Grund werden in *Yeast-one-Hybrid*-Systemen vor allem Promotorfragmente oder multimerisierte *cis*-Elemente untersucht. Im PTA-System können dagegen „Vollängen“-Promotoren auf Transaktivierung getestet werden.

Im Vergleich zum *Yeast-one-Hybrid*-Verfahren, ist die PTA-Analyse schneller durchführbar und mit weniger Arbeitsaufwand verbunden. Sie erfordert weder sterile Techniken noch komplexe Medien. Zudem liegt die Plasmid-DNA der TF bereits organisiert in Mikrotiterplatten vor und kann schnell und einfach mit einem Promotor-Konstrukt der Wahl kombiniert und in Protoplasten transformiert werden. Die Transformation von 96 verschiedenen Ansätzen mit anschließender Luciferasemessung ist deshalb innerhalb von nur 48 Stunden realisierbar. Die Expressionszeit lässt sich sogar noch weiter reduzieren. Starke Transaktivierungssignale können bereits sechs Stunden nach der Transformation detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das effiziente *Yeast-one-Hybrid-Screening*-System von Ou *et al.* (2011) benötigt mit 10-13 Tagen deutlich mehr Zeit.

Ein weiterer Vorteil der transienten Expression in Protoplasten ist, dass in einer *Western*-Analyse schnell und einfach detektiert werden kann, ob und wie stark ein TF exprimiert wird. Alle TF-cDNAs liegen an eine HA-Epitop-Sequenz fusioniert in Gateway[®]-kompatiblen Expressionsvektoren vor. Je nachdem, aus welcher ORF-Kollektion der Eingangsvektor stammt, wurde die TF-Sequenz entweder N-terminal oder C-terminal an die HA-Epitop-Sequenz fusioniert. Eingangsvektoren der Kollektion von Gong *et al.* (2004) konnten nur C-terminal fusioniert werden, weil eine N-terminale Fusion die Verschiebung des TF-Leserasters zur Folge gehabt hätte. Da das Transformationsprotokoll zur Analyse der TF-Expression im *Western Blot* in wesentlichen Punkten dem des Hochdurchsatzverfahrens entspricht, kann auch diese Analyse wesentlich schneller als in einem Hefe-Expressions-System durchgeführt werden.

Im PTA-System können auch Regulatoren mit repressiven Eigenschaften identifiziert werden. Detektiert wird die transkriptionelle Repression über die Reduktion der Grundaktivität des Luciferase-Reporters. Die Verwendung eines Abgleich-Reporters erlaubt zudem eine präzise Quantifizierung der Repression. Experimente demonstrieren, dass sowohl die Expression von Promotor-Konstrukten mit hoher Grundaktivität, als auch die der Konstrukte mit sehr niedriger Grundaktivität durch Koexpression aktiver Repressoren reduziert werden kann (Abb. 4.10). Im *Yeast-one-Hybrid*-System lassen sich repressive Eigenschaften transkriptioneller Regulatoren schwer nachweisen. Positive Kolonien werden im Verfahren über die transkriptionelle Aktivierung eines

Reportergens identifiziert, dessen Genprodukt entweder das Wachstum der Zellen auf einem Selektionsmedium ermöglicht, oder einen Farbumschlag katalysiert. Prinzipiell ist es natürlich möglich einen konstitutiv aktiven Reporter zu verwenden, dessen Transkription durch Koexpression eines Repressor reduziert werden kann. Weil die Expression eines Reporters aber meistens nur partiell reprimiert wird, lässt sich ein solcher Effekt über Selektionsmedien oder Farbumschläge schwer eindeutig nachweisen.

Das PTA-System ist auch gut geeignet, um die Stimulus-induzierte Expression verschiedener Promotor-Konstrukte zu untersuchen (Abb. 4.11). Im Gegensatz zu Hefe-Zellen enthalten Protoplasten das notwendige Perzeptions- und Signal-Transduktionssystem, um Stimuli, wie Salz und verschiedene Hormone, aber auch oxidativen Stress oder Pathogen-assoziierte Signalstoffe zu erkennen (Asai *et al.*, 2002, Ulmasov *et al.*, 1997). Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit den Einfluss von Kinasen oder Phosphatasen auf regulatorische Prozesse im PTA-System zu untersuchen. Die Analyse der Transaktivierung kann dafür mit der Koexpression verschiedener anderer Faktoren, wie interagierenden Signalfaktoren kombiniert werden (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2007). Eine vergleichbare Analyse ist in Hefe schwer realisierbar, weil eine zusätzliche Steigerung der Transaktivierung durch Signalmoleküle nicht detektiert werden kann. Allerdings sollte auch im PTA-System immer der Einfluss der Signalmoleküle auf das Promotor:LUC-Konstrukt in einem unabhängigen Transformationsansatz überprüft werden. Die Koexpression konstitutiv aktiver Kinasen führt häufig schon allein zu einer starken Aktivierung des Promotors (Abb. 4.14), wahrscheinlich bedingt durch endogene Faktoren, die phosphoryliert werden.

Das Hochdurchsatz-Protokoll des PTA-Systems kann auch zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, als *Protoplast-Two-Hybrid-Variante*, adaptiert werden. Ehlert *et al.* (2006) demonstrierte bereits, dass Wechselwirkungen zwischen Proteinen mit dem von Yoo *et al.* (2007) etablierten Protoplasten-Transformationssystem nachgewiesen werden können. Da sich die Anzahl der Transformationsansätze bei der Untersuchung verschiedener Kombinationen putativer Interaktionspartner schnell summieren kann, ist ein Hochdurchsatzverfahren an dieser Stelle sinnvoll. Allerdings muss dafür eine entsprechende Expressionsvektor-Kollektion mit AD (Aktivierungsdomäne)- und BD

(Bindedomäne)-fusionierten TF aufgebaut werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine entsprechende Kollektion für *Arabidopsis* bZIP-TF angefertigt (siehe Anhang, Tab. 7.7).

Gegenüber anderen Methoden zur Detektion von Protein-Interaktionen hat ein Protoplasten-System verschiedene Vorteile. Im Gegensatz zu Methoden, wie FRET (Förster-Resonanz-Energietransfer, zur Übersicht siehe Jares-Erijman und Jovin) oder BiFC (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, Hu *et al.*, 2002), ist die Analyse von Protein-Interaktionen in Protoplasten sehr einfach in der Durchführung und erfordert keine besondere Ausstattung des Labors. Zudem besteht die Möglichkeit, die Stärke der Interaktion, über die Verwendung eines Abgleich-Reporters, genau zu quantifizieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Protoplasten Interaktionen zwischen Proteinen auch dann detektiert werden können, wenn das Bindedomänen-tragende *bait*-Protein intrinsische Aktivierungseigenschaften aufweist (Ehlert *et al.*, 2006). Im Hefesystem kann die Interaktion dann häufig nicht mehr nachgewiesen werden (Luban *et al.*, 1995). Trotz dieser Vorteile sind auch die Möglichkeiten des PTA-System limitiert. Wie im *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren muss die Interaktion der Proteine im Zellkern stattfinden, damit die Transkription des Reportergens initiiert werden kann. Methoden, wie FRET oder BiFC, haben eine solche Einschränkung nicht und bieten zudem die Möglichkeit der genauen Lokalisierung einer Interaktion. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass die Interaktion von Fusionsproteinen durch die jeweiligen Domänen beeinflusst werden kann. Häufig ist es entscheidend, ob Binde- und Aktivierungsdomäne N-oder C-terminal an die jeweiligen Interaktionspartner fusioniert sind (Ehlert *et al.*, 2006). Um eine Interaktion sicher zu bestimmen, sollten daher beide Fusions-Möglichkeiten getestet werden.

Das PTA-System könnte auch in *loss-of-function*-Analysen zur Anwendung kommen. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit den Effekt der RNA-Interferenz als Ansatz reverser Genetik in Protoplasten zu nutzen. Mit der Transformation spezifischer RNAi-Konstrukte könnte die Expression von Zielgenen vermindert werden. Dass ein solcher Ansatz in Protoplasten realisierbar ist, konnte bereits von Zhai *et al.* (2009) demonstriert werden. Die Expression von Zielgenen könnte auch durch die Transformation von TF mit einer EAR-Repressor-Motiv-Fusions reduziert werden. Die Effizienz eines solchen Ansatzes müsste allerdings erst geprüft werden.

Für alle PTA-Analysen dieser Arbeit wurden *Arabidopsis* Blatt-Mesophyll-Protoplasten verwendet. Allerdings können Protoplasten auch aus anderen Teilen der Pflanze, wie z. B. aus der Wurzel, isoliert werden (Demidchik und Tester, 2002). Da auch Gewebespezifische Unterschiede in der Ausstattung der Zelle mit weiteren Kofaktoren vorkommen können, ist eine Analyse in Wurzelprotoplasten sinnvoll wenn Fragestellungen auch die Wurzel betreffen. Gewebe-spezifische Unterschiede transkriptioneller Regulation könnten zudem untersucht werden.

Das PTA-System konnte als effektive *Screening*-Plattform, zur Identifizierung transkriptioneller Regulatoren, etabliert werden. Es ist aber zu beachten, dass es sich ein artifizielles System handelt. Die Isolation der Protoplasten aus dem Blattgewebe führt zu erheblichen Veränderungen der pflanzlichen Physiologie. Mit dem Verlust der Zellwand können beispielsweise wichtige Rezeptoren wegfallen, wodurch auch die Anpassung der Zelle auf Veränderungen ihrer Umgebung eingeschränkt wäre. Darüber hinaus werden die TF in der Protoplastenzelle sehr stark überexprimiert und können dadurch auch pleiotrope Effekte hervorrufen. So könnte die artifizuell hohe Konzentration eines TF die Transaktivierung eines Promotorelements bewirken, das unter physiologischen Konzentrationen des Faktors nicht induziert worden wäre. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Überexpression der TF die Gen-Expressions-Maschinerie, auf Kosten der Synthese essentieller endogener Faktoren, auslastet. Dadurch verursachte Veränderungen der Zellphysiologie könnten das Messergebnis beeinflussen. Des Weiteren gibt die Analyse einzelner Zellen nicht automatisch Aufschluss auf die Mechanismen einer intakten Pflanze. Die tatsächliche Bedeutung identifizierter TF sollte also immer in weiteren Experimenten verifiziert werden.

5.3 Mit Hilfe des PTA-Systems lassen sich potentielle Regulatoren pflanzlicher Stressantworten identifizieren

Nach der Etablierung des PTA-Systems wurde die *Screening*-Methode eingesetzt, um TF zu identifizieren, die in verschiedene Regulationsmechanismen pflanzlicher Stressantworten involviert sind. Das Ziel der ersten Analyse war es, den Einfluss von bZIP-TF auf die Auxin-vermittelte Induktion des *GH3.3*-Promotors zu untersuchen. In einem zweiten *Screening*-Ansatz sollten TF identifiziert werden die an der koordinierten Regulation des Biosynthesewegs von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten

wie Indol-Glukosinolate und Camalexin beteiligt sind. In beiden Versuchen erwies sich das PTA-System als geeignete Methode relevante TF identifizieren zu können.

5.3.1 Die Auxin-vermittelte Expression des *GH3.3*-Gens kann durch viele Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie gesteigert werden.

Analysen der Promotorregionen Auxin-responsiver Gene zeigten, dass neben Aux/RE auch typische *cis*-regulatorische Elemente für bZIP-TF (GRE-Bindestellen, Liu *et al.*, 1994; Ulmasov *et al.*, 1995) zu finden sind (Weiste, Dissertation, 2011). Die Mutation aller GRE-Elemente des Auxin-responsiven *GH3.3*-Promotors führt zu einer signifikanten Reduktion der Auxin-Induzierbarkeit. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass die TF bZIP2, bZIP11 und bZIP44 aus der Gruppe S1, sowie bZIP-TF der Gruppe C (Jakoby *et al.*, 2002) die Expression Auxin-responsiver Gene, wie *GH3.3*, aktivieren können. Das Transaktivierungspotential erhöht sich, wenn die intrazelluläre Auxin Konzentration steigt. Die Ergebnisse führten zur Schlussfolgerung, dass die getesteten bZIP-TF die Expression Auxin-responsiver Gene quantitativ modulieren können. Bisher ist allerdings unklar wie viele bZIP-TF wirklich aktivierende Effekte auf die *GH3.3*-Expression zeigen. Die Ergebnisse des PTA-Screenings von 63 verschiedenen bZIP-TF auf den *GH3.3*-Promotor können eindeutig demonstrieren, dass weit mehr bZIP-TF in der Lage sind die Auxin-induzierte *GH3.3*-Expression zu verstärken, als bisher angenommen (Abb. 4.16). Insbesondere TF der Gruppen A, B, D, G und S1 (Jakoby *et al.*, 2002) zeigen ein erhöhtes Transaktivierungspotential. Als Mitglieder der Gruppe S1, konnten die bereits beschriebenen aktivierenden Eigenschaften der bZIP-TF bZIP2, bZIP11 und bZIP44 bestätigt werden, was die Reproduzierbarkeit des PTA-Systems belegt. Insgesamt fällt das Transaktivierungspotential einiger Faktoren (bZIP2, bZIP53) etwas schwächer aus, als es in der Dissertation von Christoph Weiste gezeigt werden konnte. Diese Abweichungen können auf Unterschieden im Protokoll des verwendeten Protoplasten-Systems beruhen. Das geringere Probenvolumen im PTA-System, die Verwendung eines anderen Reportersystems, sowie die Durchführung aller Transformationsschritte in Mikrotiterplatten, könnten Auswirkungen auf das Transaktivierungspotential haben. Die Analyse des Einflusses von Auxin auf die Expression von *GH3.3* bestätigte zum einen die Induzierbarkeit des Promotors durch das Phytohormon und zeigte zum anderen, dass mit Zugabe von Auxin, das Transaktivierungspotential sehr vieler bZIP-

TF weiter gesteigert werden kann. Diesen Effekt demonstrieren in erster Linie Mitglieder der Gruppen D, B, H, G und S1 (Jakoby *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt, ist für die TF der Gruppe S1 (bZIP2, bZIP11 und bZIP44) eine gesteigerte Aktivierung des Promotors durch erhöhte Auxin-Konzentration in der Dissertation von Christoph Weiste beschrieben. *Genevestigator*-Daten zeigen, dass die Expression von *GH3.3* auch durch Energieverarmung nach einer verlängerten Nacht induziert wird (Hruz *et al.*, 2008). *GH3.3* katalysiert die Konjugation des Phytohormons Auxin zu Aminosäuren, wodurch die Konzentration an aktivem Auxin in der Zelle reduziert wird (Woodward *et al.*, 2005). Daher könnte *GH3.3* während der verlängerten Nacht induziert werden, um Auxin-vermittelte Wachstumsprozesse, als Anpassung an einen niedrigen Energiestatus, zu verhindern. Möglicherweise sind bZIP-TF der Gruppe S1 daher an der Regulation der Auxin-Homöostase beteiligt. Interessant ist, dass TF der Gruppe G den Promotor weit höher aktivieren können als die in diesem Zusammenhang beschriebenen bZIP-TF. Mitglieder der Gruppe G wurden bisher fast ausschließlich mit der Regulation licht-responsiver Promotoren in Verbindung gebracht (Weisshaar *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1992; Kircher *et al.*, 1998). Über Mitglieder der Gruppe D weiß man, dass sie in die pflanzliche Pathogenantwort involviert sind (Singh *et al.*, 2002; Eulgem, 2005). Für die zwei Vertreter der Gruppe H bZIP56 und bZIP64 gibt es Hinweise für eine Beteiligung an der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums. Diese wird durch das Auftreten falsch gefalteter Proteine als Folge verschiedener Stresseinwirkungen ausgelöst (Liu *et al.*, 2007). Hinweise auf eine Beteiligung der bZIP-TF an der Regulation Auxin-responsiver Gene gibt es bisher nicht, aber möglicherweise sind auch diese bZIP-TF an der Regulation der Auxin-Homöostase unter verschiedenen Stresseinwirkungen beteiligt.

In weiteren Untersuchungen könnte analysiert werden, ob die Auxin-vermittelte Aktivierung des *GH3.3*-Promotors durch die verschiedenen bZIP-TF immer von der Histon-Acetylierung durch die Acetyl-Transferase GCN5 abhängig ist, oder ob einige bZIP-TF unabhängig die Expression von *GH3.3* induzieren können. Die Analyse kann ebenfalls mit Hilfe eines spezifischen GCN5-Inhibitors in einem Protoplastensystem erfolgen. Bei einer GCN5-abhängigen Induktion des *GH3.3*-Gens sollte die Auxin-vermittelte Expression nach Zugabe des Inhibitors deutlich gemindert sein. Auf eine GCN5-unabhängige Induktion dürfte der Inhibitor dagegen keinen Einfluss haben.

5.3.2 Mit Hilfe des PTA-Systems konnten potentielle Regulatoren der Biosynthesewege von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin identifiziert werden

Sowohl für den oberirdischen Teil von *Arabidopsis*, als auch für die Wurzel ist beschrieben, dass die Regulation der Biosynthesewege von Tryptophan, Camalexin und Indol-Glukosinolaten nach Pathogenbefall sehr koordiniert verläuft (Zhao und Last, 1996; Iven *et al.*, in Druck). Dies führte zu der Annahme, dass möglicherweise die Expression zentraler Gene der Synthesewege nach Pathogenbefall durch einen oder mehrere gemeinsame Regulatoren induziert wird. Auf der Suche nach solchen transkriptionellen Regulatoren wurden „Marker“-Promotoren ausgewählter Gene aller drei Synthesewege auf Transaktivierung durch TF der Expressionsvektorkollektion im PTA-System untersucht. In erster Linie wurden dafür die Gene ausgewählt, deren Transkription nach Befall von *Arabidopsis* durch den Pilz *Verticillium longisporum* sehr stark hochreguliert wurde (siehe Array-Daten, Iven, Dissertation 2009).

Für die erste *Screening*-Analyse wurden ERF-TF ausgewählt, weil viele Mitglieder der Familie, durch Pathogen-Stimuli transkriptionell induziert werden und zur Pathogen-Resistenz der Pflanzen beitragen (Libault *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2005; Gutterson und Reuber, 2004). Um Kosten einzusparen, wurde die erste Analyse der ERF-TF ohne Verwendung eines Abgleich-Reportergens durchgeführt. Bei der Verifizierung gewonnener Daten in einem dualen Luciferase-System konnten viele der Ergebnisse bestätigt werden, wobei aber in einigen Fällen Kandidaten auch als falsch positiv oder falsch negativ identifiziert wurden. Insgesamt stellte sich an dieser Stelle heraus, dass der direkte Vergleich mehrerer Promotoren, mit sehr unterschiedlichen Hintergrundaktivitäten, schwierig ist. Alle weiteren PTA-Tests wurden deshalb mit einem Abgleich-Reporter zur Normalisierung der Daten durchgeführt. Da eine duale Luciferase-Messung das System aber deutlich teurer macht, wurde die weitere Suche zunächst auf transkriptionelle Regulatoren des *CYP71A12*-Promotors begrenzt. Auf diese Weise sollten in einem ersten Schritt TF identifiziert werden, die an der Regulation eines zentralen Gens der Camalexin-Synthese beteiligt sind, um in anschließenden Untersuchungen das Transaktivierungspotential identifizierter TF gegenüber allen Promotoren zu prüfen.

Die Ergebnisse des ersten *Screenings* der ERF-TF zeigen, dass die Expression einer oder mehrerer der getesteten Promotoren durch sehr nah verwandte Vertreter aus zwei

phylogenetischen Untergruppen der ERF-TF durch Kooexpression induziert werden kann, was dafür spricht, dass diese TF an einer koordinierten Regulation beteiligt sein könnten. Bei den identifizierten TF handelt es sich um Mitglieder der von Nakano *et al.* (2006), nach phylogenetischen Aspekten eingeteilten Gruppen VIII und IX. Die Transaktivierungsdaten der identifizierten ERF-Faktoren beider Gruppen wurden in einem zweiten PTA-Test, unter Verwendung eines Abgleich-Reporters überprüft. Die Ergebnisse des dualen Luciferase-Tests zeigen, dass nicht alle, aber immer mehrere der getesteten Promotoren durch die ERF-TF aktiviert werden.

Die zur Gruppe IX der ERF-Familie gehörenden TF AtERF#106 und AtERF#107 aktivieren verstärkt den *TSA1*-Promotor aus dem Biosyntheseweg von Tryptophan, den *CYP71A12*-Promotor aus der Camalexin-Synthese und den *BGLU27*-Promotor (Abb. 4.19 B), wobei AtERF#106 das stärkere Transaktivierungspotential aufweist. Obwohl in diesem Fall keiner der beiden identifizierten ERF-TF Promotoren aus jedem der drei Synthesewege aktivieren kann, zeigen sich in Bezug auf einzelne Synthesewege interessante Zusammenhänge im Regulationsmuster. Vielleicht sind die TF nur an der Regulation der Tryptophan- und der Camalexin-Biosynthese beteiligt, wobei *PAD3* unabhängig, über den bereits bekannten TF WRKY33, reguliert werden könnte (Qiu *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2011). Interessant ist, dass der *BGLU27*-Promotor immer ähnliche Regulationsmuster aufweist, wie der *CYP71A12*-Promotor. Das könnte ein Hinweis sein, dass das PEN2-Homolog vielleicht eine Rolle im Syntheseweg zu Camalexin spielt. AtERF#106 und AtERF#107 sind bisher funktionell nicht charakterisiert. Dass Mitglieder dieser Gruppe bei der Analyse gefunden wurden ist aber nicht überraschend. Andere Vertreter der Gruppe IX sind bereits dafür bekannt, in der pflanzlichen Pathogenabwehr eine Rolle zu spielen. Die Überexpression von ERF1 (AtERF#092), AtERF14 (AtERF#097) und ORA59 (AtERF#094) führt beispielsweise zu einer erhöhten Resistenz gegenüber verschiedenen biotischen Stressfaktoren (Oñate-Sánchez *et al.*, 2007; Pré *et al.*, 2008; Berrocal-Lobo und Molina, 2004). Darüber hinaus konnte Tim Iven (Dissertation, 2009) Überexpressionslinien von AtERF#106 und den nah verwandten ERF-TF AtERF#105 in einem *Screening*-Ansatz der *AtTORF-EX*-Bank auf erhöhte Toleranz gegenüber der systemischen Kolonisierung durch *Verticillium longisporum* identifizieren. In der gleichen Arbeit wurde zudem gezeigt, dass AtERF#105 nach Befall durch den Pilz transkriptionell induziert wird. Ein weiterer nah

verwandter Vertreter der Gruppe IXb, AtERF#104, ist dafür bekannt, in Kontrollmechanismen der basalen Immunantwort von *Arabidopsis* involviert zu sein (Bethke *et al.*, 2009). Sowohl *knock-out*-Linien als auch Überexpressionslinien von AtERF#104 weisen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea* auf. Diese, im ersten Moment, widersprüchliche Beobachtung lässt vermuten, dass im Falle des TF AtERF#104 die Konzentration für die Ausprägung einer unterstützenden Funktion in der Pathogenantwort entscheidend ist.

Die identifizierten TF der Gruppe VIIIa induzierten in erster Linie die Promotoren der Gene der Camalexin-Synthese (*CYP71A12*, *CYP71A13* (Daten siehe Anhang) oder *PAD3*), der Indol-Glukosinolat-Synthese (*CYP81F2*), sowie den Promotor des, in diesem Zusammenhang noch unbekanntes, *PEN2*-Homologs *BGLU27* (Abb. 4.19 A). Promotoren der Gene aus dem Tryptophan-Biosyntheseweg wurden von diesen ERF-TF nicht induziert. Die Daten führen zur Hypothese, dass möglicherweise ERF-TF der Gruppe VIIIa an der Regulation der Synthese der Tryptophan-abgeleiteten Sekundärmetabolite beteiligt sind. Unter den TF der Gruppe VIIIa zeigen AtERF#080 und AtERF#081 die geringste Aktivierung. Auffallend ist, dass gerade diese beiden Faktoren das von Nakano *et al.* (2006) beschriebene CMVIII-2-Motiv nicht aufweisen. Das Motiv ist bisher funktionell nicht charakterisiert, weshalb an der Stelle auch keine Aussagen über einen möglichen Zusammenhang mit der Aktivierung der getesteten Promotoren getroffen werden können.

Dass Vertreter der Gruppe VIII der ERF-TF-Familie im *Screening* gefunden wurden ist überraschend. Mitglieder dieser Gruppe sind bisher in erster Linie als direkte Repressoren der Transkription bekannt (Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001) und aktivierende Eigenschaften sind bisher nicht beschrieben. Interessant ist, dass fast alle dieser ERF-TF zur Untergruppe VIIIa gehören und damit das typische EAR-Repressor-Motiv am C-Terminus aufweisen (Ohta *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* sind Faktoren dieser Gruppe bisher nur als negative Regulatoren der Pathogenantwort beschrieben. AtERF4 (AtERF#079) zum Beispiel ist ein negativer Regulator der Jasmonsäure-vermittelten Expression relevanter Gene der Pathogenabwehr. Darüber hinaus zeigen Überexpressionslinien von AtERF4 eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Fusarium oxysporum* (McGrath *et al.*, 2005). Es gibt auch zahlreiche Hinweise, dass TF der Gruppe VIIIa an der Regulation der Abscisinsäure- und der Ethylen-Antwort beteiligt

sind (Yang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011). Die Überexpression des TF AtERF4 in *Arabidopsis* führt zu einer reduzierten Sensitivität gegenüber Abscisinsäure und die Linien weisen zudem einen Ethylen-insensitiven Phänotyp auf. In *knock-out*-Linien ist die Ethylen-Emission gegenüber WT-Pflanzen erhöht. Hinweise auf eine Verbindung mit der Camalexin- und Indol-Glukosinolat-Synthese gibt es nicht.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, warum aktive Repressoren wie die EAR-ERF-TF der Gruppe VIIIa in der Lage sind die Expression einiger der getesteten Promotoren zu induzieren. Ein PTA-Test mit einem AtERF#079-Konstrukt, bei dem die EAR-Domäne mutiert wurde, zeigt, dass die Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors von einer intakten EAR-Domäne abhängig ist (Abb. 4.23). Die Ergebnisse konnten auch für den Promotor des funktionell redundanten *CYP71A13*-Gens bestätigt werden (siehe Anhang, Abb. 7.2). Wie *CYP71A12*, kodiert auch *CYP71A13* für eine Cytochrom P450 Monooxygenase, die bei der Camalexin-Synthese die Umwandlung von Tryptophan in Indol-3-Acetonitril katalysiert (Nafisi *et al.*, 2007; Millet *et al.*, 2010). Die Analyse der Expression der Gene mit der öffentlichen Datenbank Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008) zeigt, dass beide Gene durch verschiedene biotische Stress-Stimuli induziert werden und insgesamt sehr ähnliche Expressionsmuster aufweisen. Allerdings wird *CYP71A12*, im Gegensatz zu *CYP71A13* verstärkt in der Wurzel exprimiert (Abb. 5.1), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Enzyme die gleiche Reaktion in unterschiedlichen Teilen der Pflanze katalysieren. Dass die Promotoren beider Gene durch die gleichen ERF-TF der Gruppe VIIIa induziert werden und der Effekt in beiden Fällen von der EAR-Repressor-Domäne abhängt, spricht dafür, dass die Transaktivierung mit der Funktionalität der Gene zusammenhängt.

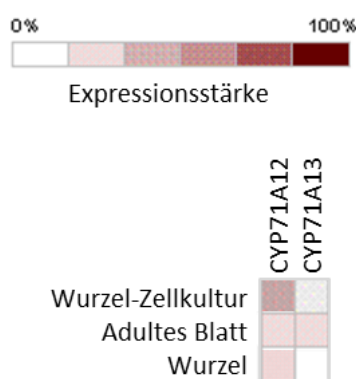


Abb. 5.1: Genevestigator-Analyse der Camalexin-Synthesegene *CYP71A12* und *CYP71A13*.

Die Expressionsstärke der Gene in verschiedenen Geweben, bzw. Zellkulturen, ist in einer Farbskala dargestellt. Dunkelrote Felder demonstrieren eine hohe Expression, weiße Felder keine Expression.

Die Promotorregionen von *CYP71A12* und *CYP71A13* weisen keine GCC-Elemente auf (siehe Anhang, Tab. 7.1 und Tab. 7.2), an die ERF-TF typischerweise binden. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Aktivierung über eine direkte Bindung des TF an den Promotor ausgelöst wird. Auf Grund der Tatsache, dass die EAR-Domäne für die Aktivierung des Promotors essentiell ist, ist es wahrscheinlich, dass die Promotoren über einen indirekten Mechanismus induziert werden, bei dem die repressiven Eigenschaften von AtERF#079 eine Rolle spielen. Der ERF-Repressor könnte die Transkription eines weiteren Repressors hemmen, der normalerweise für die Unterdrückung des *CYP71A12*-Gens verantwortlich ist (Abb. 5.2). Aktivatoren könnten daraufhin die Expression von *CYP71A12* initiieren, weil dafür notwendige *cis*-Elemente nicht mehr durch den Repressor blockiert werden. Auf der Suche nach TF, die in der Lage sind die Aktivität des *CYP71A12*-Promotors zu reprimieren, konnten Mitglieder der WRKY-Familie als interessante Kandidaten identifiziert werden. Die TF WRKY10 und WRKY40 können die Grundaktivität des Promotor-Konstrukts erheblich reduzieren (Abb. 4.24). Es ist bereits bekannt, dass WRKY40 auch die Expression des *CYP71A13*-Gens reprimieren kann. Darüber hinaus weisen *wrky40wrky18*-Doppelmutanten eine erhöhte Akkumulation von Camalexin auf (Pandey *et al.*, 2010), was belegt, dass WRKY40 in die Regulation des Synthesewegs von Camalexin involviert ist. Ob WRKY40 und WRKY10 auch an der Regulation von *CYP71A12* durch EAR-ERF-TF beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr geklärt werden. Im direkten Vergleich der Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors durch AtERF#079 in WT-Protoplasten und in Protoplasten, isoliert aus einer *wrky40*-Mutante, zeigt sich allerdings, dass die Induktion des Prom_{CYP71A12}:LUC-Konstrukts in der Mutante schwächer ist. Darüber hinaus ist auch die Grundaktivität des Promotors in der *wrky40*-Mutante im Vergleich zum WT leicht erhöht. Beide Effekte lassen sich erklären, wenn WRKY40 ein Repressor der *CYP71A12*-Aktivität sein sollte. Die Grundaktivität des Promotors würde sich erhöhen, wenn der Repressor wegfällt. Darüber hinaus wäre auch die Transaktivierung durch AtERF#079 schwächer, weil die Transkription des zu reprimierenden Zielgens bereits ausgeschaltet ist. Dass beide Effekte in der *wrky40*-Mutante so schwach ausfallen, könnte mit der funktionellen Redundanz zwischen den TF WRKY40, WRKY18 und WRKY60 erklärt werden (Pandey *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2006). In vielen Analysen zeigen Doppel- oder Trippelmutanten deutlich stärkere

Effekte. *Yeast-two-Hybrid*-Studien zeigen zudem, dass die drei WRKY-TF miteinander interagieren können und die Bindungsaffinität zu Promotor-Elementen zum Teil zunimmt, wenn sie als Heterodimere binden (Xu *et al.*, 2006). Eine solche Steigerung der Bindungsaffinität konnte für Heterodimere aus WRKY40 und WRKY18 beobachtet werden, sowie für WRKY18 und WRKY60. Als Aktivatoren der *CYP71A12*-Expression könnten ebenfalls WRKY-TF in Frage kommen. Der *CYP71A12*-Promotor weist eine WRKY-Bindestelle auf (Verweis auf Anhang) und unter den aktivierenden TF der PTA-Expressionsvektorkollektion zeigen TF der WRKY-Familie, wie beispielsweise WRKY67 und WRKY70, die stärksten Effekte. WRKY70 ist bereits als positiver Regulator in der basalen Immunantwort gegen *Pseudomonas syringae* beschrieben und phylogenetisch nah verwandt mit WRKY67. Konkrete Hinweise auf eine Beteiligung in der Regulation der Camalexin-Synthese gibt es aber bisher nicht. An dieser Stelle können deshalb nur potentielle TF-Kandidaten ausgewählt werden, deren tatsächliche Relevanz in diesem Zusammenhang in weiteren Untersuchungen erst noch geklärt werden muss.

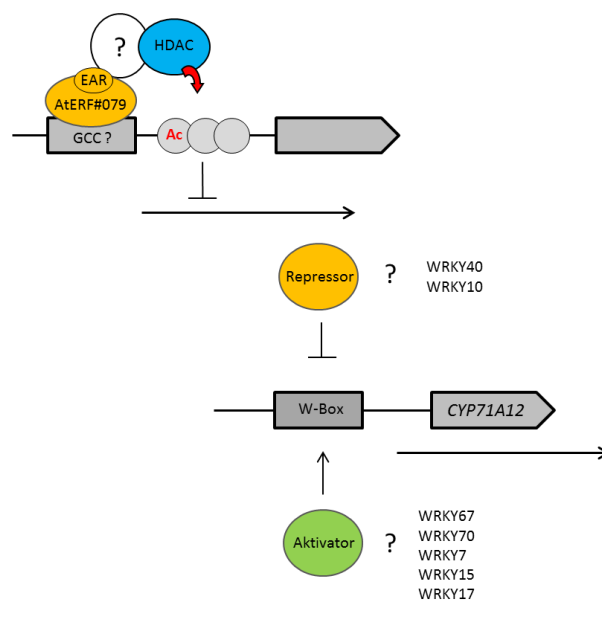


Abb.: Hypothetisches Modell zur indirekten Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors durch den EAR-ERF-TF AtERF#079

Der *CYP71A12*-Promotor wird über die Repression eines Repressors initiiert. Der EAR-Domänen-Faktor AtERF#079 bindet an die Promotorregion eines Zielgens und reprimiert über die Rekrutierung einer Histon-Deacetylase (HDAC) die Expression eines Repressors (rot) der *CYP71A12*-Transkription, Aktivatoren (grün) können daraufhin die Synthese von *CYP71A12*-Transkripten aktivieren.

Die Analyse der Promotorregionen der WRKY-Gene ergab, dass *WRKY10* und *WRKY40* keine GCC-Boxen aufweisen (siehe Anhang, Tab. 7.3 und 7.5). Damit ist es unwahrscheinlich, dass AtERF#079 direkt an den Promotor der Repressorgene binden kann. In der Promotorregion von *WRKY18* befindet sich ein GCC-Element (siehe Anhang, Tab. 7.4), aber die regulatorischen Eigenschaften des TF auf den *CYP71A12*-Promotor konnten nicht getestet werden, weil er in der TF-Kollektion bisher nicht enthalten ist.

Letztendlich kann die indirekte Aktivierung des *CYP71A12*-Promotors durch den EAR-ERF-TF über etliche Ebenen der Transkriptionsregulation verlaufen. Ob Repressoren, wie *WRKY10* oder *WRKY40* dabei tatsächlich eine Rolle spielen bleibt Spekulation. An dieser Stelle werden auch die Grenzen des PTA-Systems aufgezeigt, weil zwischen direkten und indirekten Regulationsmechanismen nicht differenziert werden kann. Eventuell könnten indirekte Effekte reduziert werden, wenn die Expressionszeit der Konstrukte im PTA-System herab gesetzt wird. Die Expressionszeit darf dabei aber auch nicht so weit reduziert werden, dass die Transaktivierung direkter Aktivatoren oder Repressoren nicht mehr detektiert werden kann.

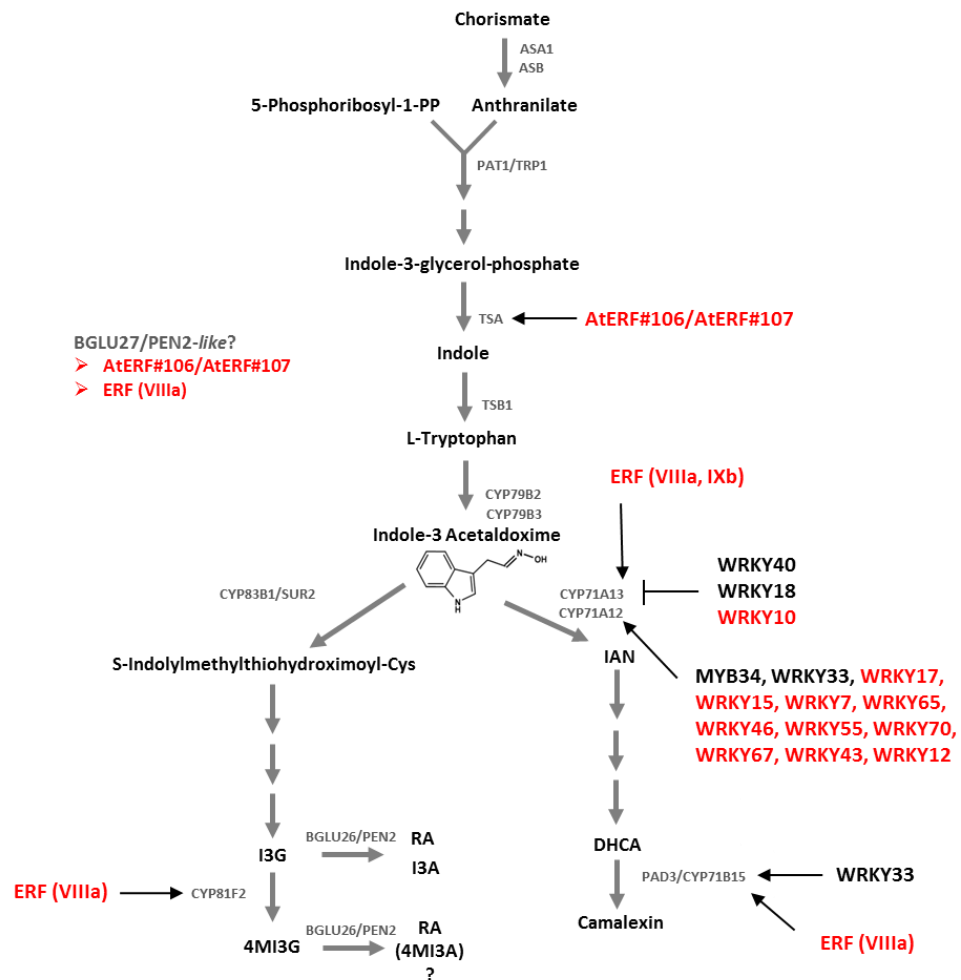


Abb.5.3: Mit Hilfe des PTA-Systems identifizierte transkriptionelle Regulatoren der Biosynthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten

Übersicht bereits bekannter (in schwarz gekennzeichnet), sowie neuer putativer Regulatoren der Synthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin (in rot gekennzeichnet). Die Pfeile kennzeichnen mögliche Zielgene der TF. Die Rolle von *BGLU27* in den Synthesewegen ist nicht geklärt.

Abkürzungen: IAN: Indol-3-Acetonitril, DHCH: Dihydrocamalexinsäure, I3G: Indol-3-ylmethylglukosinolat, 4MI3G: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat, RA: Raphanusamic Acid, I3A: Indol-3-ylmethylamin, 4MI3A: 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin. Modifizierte Abbildung nach Iven *et al.*, in Druck.

Mit der Analyse des *CYP71A12*-Promotors im PTA-System konnten weitere potentielle Regulatoren des zentralen Camalexinsynthese-Gens identifiziert werden. Die Ergebnisse des Screenings von insgesamt 1004 TF-Expressionsvektor-Klonen (mit ca. 950 verschiedenen TF) zeigen, dass etwa 10 % der TF ein erhöhtes Transaktivierungspotential aufweisen. In erster Linie sind viele Faktoren der ERF- und der WRKY-TF-Familie unter diesen TF (Abb. 4.20-4.21). Aus anderen TF-Familien (MYB, MADS, bHLH u.a.) konnten einzelne TF als aktivierend identifiziert werden

(siehe Abb. 4.22 und Anhang, Abb. 7.3-7.4). Diesmal konnten deutlich mehr ERF-Aktivatoren aus der Gruppe IX identifiziert werden. Interessanterweise zeigt dieser Test, dass alle ERF-TF der Untergruppe IXb den *CYP71A12*-Promotor aktivieren können. In weiteren PTA-Tests muss an dieser Stelle noch geklärt werden, ob das nur den *CYP71A12*-Promoter betrifft, oder ob alle Mitglieder der Untergruppe das gleiche Transaktivierungsmuster aufweisen. Der PTA-Test der ERF-TF ohne Normalisierung liefert keine Hinweise darauf.

Neben ERF-TF sind auch WRKY-TF dafür bekannt an der Pathogenantwort in *Arabidopsis* beteiligt zu sein (Singh *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass auch viele der aktivierenden WRKY-TF phylogenetisch nah miteinander verwandt sind und vor allem den Untergruppen IId und III zugeordnet werden können (Ling *et al.*, 2011). Über die Gruppe III der WRKY-TF weiß man, dass fast alle Mitglieder durch Salizylsäure induziert werden können (Kalde *et al.*, 2003). Einige der WRKY-TF der Gruppe III sind darüber hinaus bereits dafür bekannt in die Pathogenantwort von *Arabidopsis* involviert zu sein. Die identifizierten TF WRKY46 und WRKY70 sind zusammen mit WRKY53 in die basale Immunantwort gegen *Pseudomonas syringae* involviert (Hu *et al.*, 2012). Überexpressionslinien für WRKY46 weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Pathogen auf, während *wrky46wrky70-* und *wrky46wrky53*-Doppelmutanten-Linien suszeptibler sind (Hu *et al.*, 2012). Resistenz und Suszeptibilität korrelieren zudem mit verstärkter oder reduzierter Expression des PR-Gens *PR1*. Neben WRKY46 und WRKY70, wurden auch WRKY55 und WRKY67 aus Gruppe III als aktivierend identifiziert. Allerdings sind beide Faktoren bisher funktionell nicht charakterisiert. Aus der Gruppe IId der WRKY-Familie konnten die TF WRKY17, WRKY15, WRKY7, und WRKY65 den *CYP71A12*-Promotor aktivieren. WRKY17 ist eigentlich zusammen mit WRKY11 als negativer Regulator der basalen Resistenz beschrieben (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Mutanten-Analysen demonstrieren, dass *wrky11wrky17*-Doppel-*knock-out*-Linien eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten und avirulenten *Pseudomonas syringae* Stämmen aufweisen. Weshalb WRKY17 in diesem *Screening* aktivierende Eigenschaften zeigt ist noch unklar.

Von den bereits bekannten Regulatoren der Biosynthesewege von Tryptophan, Camalexin und Indol-Glukosinolaten, zeigen nur die TF WRKY33 und MYB34 ein

leicht erhöhtes Transaktivierungspotential gegenüber dem *CYP71A12*-Promotor (Abb. 4.21 und 4.22). MYB51 konnte nicht getestet werden, weil er bisher nicht in der TF-Kollektion enthalten ist. Über WRKY33 weiß man, dass der TF die Expression von *PAD3* initiiert und darüber den letzten Schritt der Camalexin-Synthese reguliert. Es wird aber auch vermutet, dass der TF an weiteren Schritten der Synthesewege beteiligt sein könnte. Die Expression von *PAD3* und *CYP71A13* wird in *wrky33*-Mutanten-Linien, im Gegensatz zum WT, nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* nicht mehr induziert, was dafür spricht, dass WRKY33 auch für die Akkumulation der *CYP71A13*-mRNA verantwortlich ist (Qiu *et al.*, 2008). Die Ergebnisse des PTA-Screenings sprechen dafür, dass WRKY33 zumindest die Expression des funktionell redundanten *CYP71A12*-Gens regulieren kann. Das *trans*-Aktivierungspotential gegenüber dem *CYP71A12*-Promotor ist zwar nicht besonders hoch, aber es könnte sein, dass der TF, wie im Falle der *PAD3*-Induktion, erst über eine Phosphorylierung aktiviert werden muss (Qiu *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2011). Um das zu prüfen, kann der *CYP71A12*-Promotor zusammen mit WRKY33, sowie den MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 in Protoplasten koexprimiert werden.

Der TF MYB34 (ATR1) ist bisher nur dafür bekannt, an der Regulation einiger Gene der Synthesewege von Tryptophan und Indol-Glukosinolaten in *Arabidopsis* beteiligt zu sein. Da der TF auch ein erhöhtes Transaktivierungspotential gegenüber dem *CYP71A12*-Promotor aufweist, sollte er in weiteren Analysen auf allen Promotoren getestet werden.

Auch die repressiven Eigenschaften von WRKY40 konnten in der Analyse bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass der TF nicht nur die Expression des *CYP71A13*-Gens negativ beeinflusst, sondern auch die Promotoraktivität des funktionell redundanten Gens *CYP71A12* reprimiert. Zudem konnte ein zweiter WRKY-TF als Repressor der *CYP71A12*-Promotor-Aktivität identifiziert werden. WRKY10 ist bisher nur in der Regulation der Samengröße von *Arabidopsis* beschrieben (Luo *et al.*, 2005), repressive Eigenschaften wurden dem TF bisher nicht zugeschrieben.

Der in der Regulation der Biosynthese von Camalexin beschriebene TF ANAC042 zeigt keinerlei Transaktivierungspotential gegenüber dem *CYP71A12*-Promotor (siehe Anhang, Abb. 7.5). Widersprüchlich zu bereits publizierten Daten ist das Ergebnis aber nicht. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass der TF in der Regulation der Camalexin-

Synthese eine Rolle spielt. Mutanten von *ANAC042* weisen eine geringere Transkript-Menge der Synthesegene *CYP71A12*, *CYP71A13* und *CYP71B15* auf und die Camalexin-Produktion ist in der *knock-out*-Linie beeinträchtigt (Saga *et al.*, 2012). Eine direkte transkriptionelle Aktivierung von *CYP71A12* durch *ANAC042* ist nicht beschrieben. Hinzu kommt, dass der *CYP71A12*-Promotor das für *ANAC042* beschriebene Bindemotiv RRYGCCGT (Wu *et al.*, 2012) nicht aufweist (siehe Anhang, Tab. 7.1).

Mit Hilfe des PTA-System konnten im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe potentieller Regulatoren der Biosynthese von Tryptophan, Camalexin und Indol-Glukosinolaten identifiziert werden. Innerhalb der jeweiligen TF-Familien stehen die identifizierten Kandidaten oft in einem nahen verwandtschaftlichen Verhältnis, was für funktionelle Ähnlichkeiten der TF spricht und die Spezifität des PTA-Systems bestätigt. Des Weiteren sind viele der TF bereits in der Pathogenantwort von *Arabidopsis* beschrieben. Rückschlüsse, dass die koordinierte Regulation der Biosynthesewege auf einem oder mehreren Hauptregulator/-en beruht, können an dieser Stelle allerdings noch nicht getroffen werden. Zwar konnten einige ERF-TF identifiziert werden, die jeweils Promotoren von Genen unterschiedlicher Syntheseweige aktivieren, aber keiner davon war in der Lage alle getesteten Promotoren zu induzieren. Allerdings wurde bisher auch nur ein kleiner Teil der TF-Kollektion auf allen Promotoren getestet. Für die TF, die im großen *Screening*-Ansatz des *CYP71A12*-Promotors identifiziert wurden, muss in weiteren PTA-Analysen noch geklärt werden, ob sie an der Regulation weiterer Gene aus der Biosynthese von Tryptophan, Camalexin und Indol-Glukosinolaten beteiligt sind. Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass die koordinierte Regulation durch viele unabhängige TF gesteuert wird und es keinen zentralen Regulator aller Synthesewege gibt.

Des Weiteren muss noch geklärt werden, ob die Regulation der Biosynthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten in der Wurzel über andere Faktoren koordiniert wird als im oberirdischen Teil von *Arabidopsis*. Die spezifische *Array*-Analyse *Verticillium*-infizierter *Arabidopsis*-Wurzeln ergab allerdings keinerlei Veränderungen in der Transkript-Menge der bereits beschriebenen TF MYB51, MYB34 oder WRKY33 (Iven *et al.*, in Druck). Möglich wäre auch, dass die TF post-transkriptionell reguliert werden. Da sich Protoplasten prinzipiell auch aus

BZIP44 ist bisher funktionell noch nicht charakterisiert worden. Eine *Genevestigator*-Analyse (Hruz et al., 2008) zeigte, dass die Expression des TF vor allem durch Kälte, Trockenheit und Hitze induziert wird. Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress gibt es bisher nicht. Weil die Überexpression von *bZIP44* in *Arabidopsis* zu Zwergwuchs führt, konnte eine unabhängige Linie nicht mehr auf erhöhte Paraquat-Resistenz getestet werden. Identifiziert werden konnte der TF wahrscheinlich deshalb, weil in der *AtTORF-EX*-Bank vermutlich keine starken *bZIP44*-Überexprimierer enthalten sind. An dieser Stelle wird der Vorteil der Kollektion aufgezeigt, dass sie ein breites Spektrum verschieden starker Überexprimierer bietet.

Mit der Analyse einer unabhängigen Überexpressionslinie von *bZIP1* kann bestätigt werden, dass die Überexpression des TF tatsächlich zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Paraquat führt. Zusätzlich wurden auch eine *bzip1-knock-out*-Linie und eine *bzip1bzip53-doppel-knock-out*-Linie auf verminderte Resistenz gegenüber der Chemikalie getestet. Allerdings zeigt keine der Mutanten phänotypische Unterschiede zum WT (Abb. 4.26). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da bereits demonstriert werden konnte, dass Mitglieder der Gruppe S1 eine hohe funktionelle Redundanz aufweisen, weshalb selbst Doppel-*knock-out*-Linien häufig keine phänotypischen Veränderungen zeigen (Dietrich et al., 2011). Die Analyse der verminderten Resistenz von Mutanten-Linien auf Paraquat sollte deshalb mit weiteren mehrfach-*knock-out*-Linien für bZIP-TF wiederholt werden.

Zwei der weiteren identifizierten TF aus dem *Screening*-Ansatz der *AtTORF-EX*-Bank gehören zur Familie der DOF-TF. Bei einem der Faktoren handelt es sich um OBP1 (OBF-BINDING-PROTEIN 1). Es ist bekannt, dass OBP1 mit der Promotorregion von *GST6* (GLUTATHION-S-TRANSFERASE-6) interagiert und damit die Bindung der bZIP-Faktoren TGA4 und TGA5 an *ocs*(Octopin-Synthase)-Elemente des Promotors begünstigt (Chen et al., 1996). Es wird vermutet, dass durch eine mögliche Interaktion von OBP1 und TGA-Faktoren die *GST6*-Expression begünstigt wird. Die GLUTATHION-S-TRANSFERASE-6 wird durch oxidativen Stress induziert und ist darüber hinaus an Schutzreaktionen gegen oxidative Schädigungen beteiligt (Chen et al., 1999). Man weiß, dass Glutathion-S-Transferasen die Konjugation von reduziertem Glutathion mit reaktiven Sauerstoffspezies katalysieren, woraufhin die Konjugate in die

Vakuole transportiert werden (Edwards et al., 2000). Dass die Überexpression von OBP1 zu einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress führt ist daher durchaus vorstellbar und sollte mit einer unabhängigen Überexpressionslinie überprüft werden. Da die Generierung einer solchen Linie aber sehr zeitaufwändig ist, konnte die Verifizierung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Der zweite identifizierte DOF-TF (At1g21340) aus dem *AtTORF-EX-Screening*-Ansatz ist bisher funktionell nicht charakterisiert. Es besteht auch keine nähere Homologie zu OBP1. Hinweise, dass der TF an der Regulation der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sein könnte, gibt es bisher nicht. Dafür ergab die *Genevestigator*-Analyse (Hruz et al., 2008) der verbleibenden zwei TF-Kandidaten (At4g02200 und At2g31380), dass die Expression beider Faktoren durch oxidativen Stress induziert wird. Funktionell sind die Faktoren aber auch nicht beschrieben. Die tatsächliche Relevanz in der pflanzlichen Antwort auf oxidativen Stress muss daher in weiteren *gain of function*- und *loss of function*-Analysen geklärt werden.

Insgesamt konnten bei der Durchmusterung der *AtTORF-EX*-Bank auf erhöhte Toleranz gegenüber Paraquat einige vielversprechende TF-Kandidaten identifiziert werden. Im Fall von bZIP1 konnte die Resistenz-vermittelnde Eigenschaft bereits mit der Untersuchung einer unabhängigen Überexpressionslinie bestätigt werden. Für andere TF, wie OBP1, gibt es bereits konkrete Hinweise auf eine mögliche Funktion in der pflanzlichen Antwort auf oxidativen Stress. Es zeigt sich damit erneut, dass die Überexpressionssamen-Kollektion eine geeignete Plattform zur funktionellen Analyse von *Arabidopsis* TF darstellt.

6 Literaturverzeichnis

Abel, S., and Theologis, A. (2010) Odyssey of Auxin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **10**.

Alam, J., Cook, J.L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.*, **188**, 245-54.

Alonso, R., Onate-Sanchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J. and Dröge-Laser, W. (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell*, **21**, 1747-1761.

Altenbach, D. and Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, no. **9**, 1031-9.

Alvarez, M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, **44**, 429-442.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, **415**, 977-983.

Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.

Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., and Conrath, U. (2009) Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **21**, 944-953.

Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., et al. (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, **323**, 101-6.

Bender, J. and Fink, G. (1998) A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5655-5660.

Bernard P., Kezdy K.E., Van Melder L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N. and Couturier M. (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol*, **234**, 534-41.

Berrocal-Lobo, M. and Molina, A. (2004) Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus Fusarium oxysporum. *Mol Plant Microbe Interact.*, **17**, 763-70.

Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J. (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8067-8072.

- Bittel P. and Robatzek S.** (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 335-341.
- Blackwood, E. M. and Kadonaga, J. T.** (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, **281**, 60–63.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F.** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, **53**, 1367-1376.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., Denby, K.J.** (2005) Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J*, **44**, 25-36.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., and Glawischnig, E.** (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **21**, 1830-1845.
- Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U.K., Weintraub, H.** (1980) The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1-20.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J. and Manners, J.M.** (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **132**, 1020-1032.
- Carey M.** (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*, **92**, 5–8.
- Castrillo, G., Turck, F., Leveugle, M., Lecharny, A., Carbonero, P., Coupland, G., Paz-Ares, J., and Oñate-Sánchez, L.** (2011). Speeding Cis-Trans Regulation Discovery by Phylogenomic Analyses Coupled with Screenings of an Arrayed Library of Arabidopsis Transcription Factors. *PLoS ONE*, **6**, e21524.
- Celenza, J.L., Quiel, J.A., Smolen, G.A., Merrih, H., Silvestro, A.R., Normanly, J., Bender, J.** (2005) The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol*, **137**, 253-262.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. and Luan, S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **129**, 661-677.
- Chen, W., Chao, G., Singh, K.B.** (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBPI-binding sites. *Plant J.*, **10**, 955-966.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G. and Ausubel, F.M.** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, **323**, 95-101.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**, 735-43.
- Davies, P.J.** (2004) Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! *London: Kluwer Academic Publishers*, 3rd edition.

- Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., Grotewold, E.** (2003) AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics*, **4**, 25.
- Da Cunha, L., Sreerekha, M.V., Mackey, D.** (2007) Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 349-357.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses *Cell Mol Life Sci*, **57**, 779-795.
- Demidchik, V. and Tester, M.** (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol*, **128**, 379-87.
- De Smet, I., Voss, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R.E., Swarup, R., Kerr, I., Hodgman, C., Bock, R., Bennett, M., Jurgens, G., Beeckman, T.** (2011) Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant Physiol*, **155**, 209-221.
- De Wit, P.J.** (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2726-2732.
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., et al.** (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, **434**, 980-6.
- Del Pozo, O., Pedley, K.F., and Martin, G.B.** (2004) MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J.*, **23**, 3072–3082.
- Denby, K.J., Jason, L.J., Murray, S.L., Last, R.L.** (2005) *ups1*, an Arabidopsis thaliana camalexin accumulation mutant defective in multiple defence signalling pathways. *Plant J.*, **5**, 673-684.
- Desikan, R., A-H-Mackerness, S., Hancock, J.T., Neill, S.J.** (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*, **127**, 159-172.
- Dietrich, K.** (2010) Die Rolle der beiden Transkriptionsfaktoren AtbZIP1 und AtbZIP53 aus Arabidopsis thaliana in der Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangelbedingungen. Dissertation
- Dietrich, K., Weltmeier, F., Ehlert, A., Weiste, C., Stahl, M., Harter, K., Dröge-Laser, W.** (2011) Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell*, **23**, 381-395.
- Dobi, K.C., Winston, F.** (2007) Analysis of transcriptional activation at a distance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**, 5575-86.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, **11**, 539-548.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L.** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, **15**, 573-81.

Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.*, **5**, 193-198.

Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C.S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J. and Dröge-Laser, W. (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.*, **46**, 890-900.

Ernst, H.A., Olsen, A.N., Larsen, S. and Lo Leggio, L. (2004) Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep.*, **5**, 297 – 303.

Eulgem, T. (2005) Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends Plant Science*, **10**, 71-78.

van Esse H.P., Van't Klooster J.W., Bolton M.D., Yadeta K.A., van Baarlen P., Boeren S., Vervoort J., de Wit P. and Thomma B. (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell*, **20**, 1948-63.

Fan, W. and Dong, X. (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 1377–1389.

Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M. and Dewdney J. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.*, **144**, 367-79

Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.

Flor H.H. (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathol.*, **9**, 275-296

Fradin E.F. and Thomma B. (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 71-86.

Franke, R. and Schreiber, L. (2007) Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 252-259.

Fode, B., and Gatz, C. (2009) Chromatin immunoprecipitation experiments to investigate in vivo binding of Arabidopsis transcription factors to target sequences. *Methods Mol Biol.*, **479**, 261-272.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, **12**, 393-404.

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005) AREB1 Is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 3470-3488.

- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 436-442.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., et al.** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 1988–1993.
- Germann, S., and Gaudin, V.** (2011) Mapping in vivo protein-DNA interactions in plants by DamID, a DNA adenine methylation-based method. *Methods Mol Biol*, **754**, 307-321.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.P., Müller, C., Weisshaar, B., Flügge, U.I.** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **50**, 886-901.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 205-227.
- Glawischnig, E.** (2007) Camalexin. *Phytochemistry*, **68**, 401-6
- Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Perez-Perez, J., Oliveros, J.C., Lorenzo, O., and Solano, R.** (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant J*, **66**, 700-711.
- Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G., Pan, Y., Du, Y.L., Wang, D.H., Yang, J.Y., Hu, L.D., Liu, X.F., Dong, C.X., Ma, L., Chen, Y.H., Yang, X.Y., Gao, Y., Zhu, D., Tan, X., Mu, J.Y., Zhang, D.B., Liu, Y.L., Dinesh-Kumar, S.P., Li, Y. and Zhu, Y.X. et al.** (2004) Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol.*, **135**, 773-782.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M.** (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**, 271.
- Grubb, C.D. and Abel, S.** (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, **11**, 89-100.
- Guarente, L.** (1988) UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell*, **52**, 303–305.
- Guo, A., He, K., Liu, D., Bai, S., Gu, X., Wei, L. and Luo, J.** (2005) DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics*, **21**, 2568-2569.
- Gutterson, N., Reuber, T.L.** (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 465-471.
- Haagen-Smit, A.J. D.W., Wittwer, S.H., Murneek, A.E.** (1946) Isolation of 3-indoleacetic acid from immature corn kernels. *Am J Bot*, **33**, 118-120.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Heath, M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, **44**, 321-334.

Heazlewood , J.L. , Verboom , R.E. , Tonti-Filippini , J. , Small , I. and Millar , A.H. (2007) SUBA: the Arabidopsis subcellular database. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D213 – D218.

He J.X. , Gendron , J.M. , Yang , Y. , Li J. and Wang , Z.Y. (2002) The GSK3- like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 10185 – 10190.

Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P.C. (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol.*, **20**, 735-47.

Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A. and Dröge-Laser, W. (2002) The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol Genet Genomics*, **267**, 16-26.

Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1992) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology*, **24**, 377-81.

Honma, T. and Goto, K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409**, 525–529.

Horak, C.E. and Snyder, M. (2002) ChIP-chip: a genomic approach for identifying transcription factor binding sites. *Methods Enzymol*, **350**, 469-83.

Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell*, **4**, 789–798.

Hu, Y., Dong, Q., Yu, D. (. 2012) Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci*, **185**, 288-297.

Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z.F. (2011) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep*, **39**, 969–987

Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H., Kondou, Y., Tshuhara, Y., Suzuki, K., Ishikawa, A., Seki, M., Fujita, M., Motohashi, R., Nagata, N., Takagi, T., Shinozaki, K., and Matsui, M. (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J.*, **48**, 974-985.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.

Invitrogen (2001) Proquest Two-Hybrid System. Instruction Manual.

Iven, T. (2009) Transkriptomanalyse der Arabidopsis-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort. Dissertation.

Iven, T., König, S., Singh, S., Braus-Stromeier, S.A., Bischoff, M., Tietze, L.F., Braus,G.H., Lipka, V., Feussner, I., Dröge-Laser, W. Transcriptional activation and

production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. In Druck.

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

Jares-Erijman, E.A. and Jovin, T.M. (2006) Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 409-416.

Jin, H., Liu, Y., Yang, K.-Y., Kim, C.Y., Baker, B., and Zhang, S. (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J.*, **33**, 719–731.

Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M., Okamoto, J.K. (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, **6**, 1211-1225.

Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., Wold, B. (2007) Genome-wide mapping of in vivo protein–DNA interactions. *Sci.*, 316, 1497–1502.

Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-9.

Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D., Kroj, T. (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **18**, 3289-3302.

Kain, S.R. and Ganguly, S. (2001) Overview of genetic reporter systems. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 9, Unit9.6.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 287-291.

Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 346-350.

Kim, S., Kang, J.Y., Cho, D.I., Park, J.H. and Kim, S.Y. (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.*, **40**, 75-87.

Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E., Frohnmeyer, H. (1998) CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol Gen Genet.*, **257**, 595-605.

Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., Denby, K.J. (2005) Secondary metabolites influence *Arabidopsis*/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J.*, **44**, 25-36.

- Koncz, C. and Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*, **204**, 383-396.
- Kondou, Y., Higuchi, M., and Matsui, M.** (2010) High-Throughput Characterization of Plant Gene Functions by Using Gain-of-Function Technology. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 373-393.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Zeng, W. and Sheen, J.** (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature*, **395**, 716-720.
- Koornneef, A. and Pieterse, C.M.J.** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, **146**, 839-844.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J., and Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2256–2264.
- Kuromori, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K., and Matsui, M.** (2009) Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1215-1231.
- Kyhse-Anderson, J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, **10**.
- Le Gouill, C., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J.** (1994) Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal biochem*, **219**, 164.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Latchman, D.S.** (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, **12**, 1305-12.
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., Stacey, G.** (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 900-911.
- Ling, J., Jiang, W., Zhang, Y., Yu, H., Mao, Z., Gu, X., Huang, S., Xie, B.** (2011) Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. *BMC Genomics*, **28**, 471.
- Lipka, U., Fuchs, R., Lipka, V.** (2008) Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 404-411.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science*, **18**; 310, 1180-1183.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H.** (2007) An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell.*, **19**, 4111-4119.

- Liu, Z. and Karmarkar, V.** (2008) Groucho/Tup1 family co-repressors in plant development. *Trends Plant Sci*, **13**, 137-144.
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell*, **6**, 645-657.
- López-Pérez L., Martínez-Ballesta Mdel C., Maurel C., Carvajal M.** (2009) Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*, **70**, 492–500.
- Luban, J. and Goff, S.P.** (1995) The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr Opin Biotechnol*, **6**, 59-64.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R.** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**, 165-178.
- Luo, M., Dennis, E.S., Berger, F., Peacock, W.J., Chaudhury, A.** (2005) MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17531-17536.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., and Zhanga S.** (2011) Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**,1639-53.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W.** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-46.
- Meng, X., Brodsky, M.H. and Wolfe, S.A.** (2005) A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 988-994.
- Menke, F.L.H., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., and Klessig, D.F.** (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 897–907.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R.** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant*, **133**, 481-489.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D. and Ausubela, F.M.** (2010) Innate Immune Responses Activated in Arabidopsis Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *Plant Cell*, **3**, 973-990.
- Mitsuda N. and Ohme-Takagi M.** (2009) Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1232–1248.
- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M. and Ohme-Takagi, M.** (2010) Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 2145-2151
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, **7**, 405-410.

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

Münch S., Lingner U., Floss D.S., Ludwig N., Sauer N. and Deising H.B. (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiol.*, **165**, 41-51.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.

Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., Glazebrook, J. (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell.*, **19**, 2039-2052.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.*, **140**, 411-432.

Niks, R.E., Marcel, T.C. (2009) Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytol*, **182**, 817-828.

Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev*, **198**, 249–266.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, **13**, 1959-1968.

Oñate-Sánchez, L., Anderson, J.P., Young, J., Singh, K.B. (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol.*, **143**, 400-409.

Onate-Sanchez, L. and Singh, K.B. (2002) Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.*, **128**, 1313–1322.

Orlando V. (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 99-104.

Ou, B., Yin, K.Q., Liu, S.N., Yang, Y., Gu, T., Wing Hui, J.M., Zhang, L., Miao, J., Kondou, Y., Matsui, M., Gu, H.Y., and Qu, L.J. (2011). A high-throughput screening system for Arabidopsis transcription factors and its application to med25-dependent transcriptional regulation. *Mol Plant*, **4**, 546-555.

Pandey, S.P., Roccaro, M., Schön, M., Logemann, E., Somssich, I.E. (2010) Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *Plant J.*, **64**, 912-923.

Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C., Colombo, L. (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell*, **15**, 1538-1551.

Paz-Ares, J. (2002). REGIA, an EU project on functional genomics of transcription factors from Arabidopsis thaliana. *Comp. Funct. Genom.*, **3**, 102–108.

- Pazin, M.J., Kadonaga, J.T.** (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*, **89**, 325-328.
- Pedras M.S. and Ahiahonu P.W.K.** (2005) Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*, **66**, 391-411.
- Perez-Rodriguez, P., Riano-Pachon, D.M., Correa, L.G., Rensing, S.A., Kersten, B. and Mueller-Roeber, B.** (2010) PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.*, **38**, D822-827.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., Ohlrogge, J.B.** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, **13**, 236-46.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M., Memelink, J.** (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol*, **147**, 1347-1357.
- Ptashne, M.** (1992) A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms (*Cambridge, MA: CellPress*).
- Ptashne, M.** (2005) Regulation of transcription: from lambda to eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 275-279.
- Qiu J.-L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., et al.** (2008) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal*, **27**, 2214-21.
- Ramirez, S.R. and Basu, C.** (2009) Comparative analyses of plant transcription factor databases. *Curr. Genomics.*, **10**, 10-17.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Nannett, N., Kanin, E., Volker, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.R., Young, R.A.** (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Sci.*, **290**, 2306-2309.
- Ren D., Liu Y., Yang K.-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J. and Zhang S.** (2008) A fungal responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *PNAS*, **105**, 5638-43.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin IT, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y and Boore, J.L. et al.** (2008) The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, **319**, 64-69.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.** (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-2110.
- Roberts, R.J.** (1985) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*, **13**, 165-200.
- Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., Thiessen, N., Griffith, O.L., He, A., Marra, M.,**

- Snyder, M., Jones S.** (2007) Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nature*, **4**, 651–657.
- Robertson, M., Helliwell, C.A. and Dennis, E.S.** (2008) Post-translational modifications of the endogenous and transgenic FLC protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1859–1866.
- Roeder, R.G.** (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-335.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J.** (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, **15**, 247-258.
- Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N., Shibata, D., Ohta, D.** (2012) Identification and characterization of ANAC042, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **25**, 684-696.
- Saini, G., Meskauskiene, R., Pijacka, W., Roszak, P., Sjögren, L.L., Clarke, A.K., Straus, M., Apel, K.** (2011) 'happy on norflurazon' (hon) mutations implicate perturbation of plastid homeostasis with activating stress acclimatization and changing nuclear gene expression in norflurazon-treated seedlings. *Plant J.*, **65**, 690-702.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, **74**, 5463-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F.** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*, **46**, 941-950.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **97**, 11655-11660.
- Schindler, U., Menkens, A.E., Beckmann, H., Ecker, J.R., Cashmore, A.R.** (1992) Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed *Arabidopsis* GBF bZIP proteins. *EMBO J.*, **11**, 1261-1273.
- Schierstedt, J.** (2001) Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren des *Arabidopsis* Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Camalexin und Indol-Glukosinolaten. Bachelorarbeit.
- Schwessinger B. and Zipfel C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 389-95.
- Singh, H., Lebowitz, J.H., Baldwin, A.S., Jr., and Sharp, P.A.** (1988) Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell*, **52**, 415-423.
- Singh, K.B.** (1998) Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol*, **118**, 1111-1120.

- Singh, K., Foley, R.C. and Oñate-Sánchez, L.** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 430-436.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., Ecker, J.R.** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, **12**, 3703-3714.
- Southern, E.M.** (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **100**, 319-23.
- Spoel, S.H. and Dong, X.** (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host & Microbe*, **3**, 348-351.
- Sprenger-Haussels, M. and Weisshaar, B.** (2000) Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, **22**, 1-8.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F.** (1997) Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1035-1040.
- Sun W., Dunning F.M., Pfund C., Weingarten R. and Bent A.F.** (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant Cell*, **18**, 764-79.
- Suzuki, K. et al.** (1998) Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant J.*, **15**, 657-665.
- Szemenyei, H., Hannon, M., Long, J.A.** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science*, **319**, 1384-1386.
- Takahashi, S., Murata, N.** (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci*, **13**, 178-182.
- Thomma B.P., Nelissen I., Eggermont K. and Broekaert W.F.** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, **19**, 163-71.
- Tuerk, C., and Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** (1995) Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell*, **7**, 1611.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11632-11637.
- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. and Farmer E.E.** (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell*, **6**, 1191-1192.

Vanneste, S and Friml, J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, **136**, 1005-1016.

Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K. (1991) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO*, **10**, 1777-1786.

Weiste, C. (2011) Arabidopsis basic leucine Zipper transcription factors function as quantitative modulators of auxin mediated transcription. Dissertation.

Weiste, C., Iven, T., Fischer, U., Onate-Sanchez, L. and Dröge-Laser, W. (2007) In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. *Plant J.*, **52**, 382-390.

White, J., Chang, S.Y. and Bibb, M.J. (1990) A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, **18**, 1062.

Woodward, A.W. and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, **95**, 707-737.

Wu, A., Allu, A.D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanor, M.I., Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., Fernie, A.R., Kaufmann, K., Xue, G.P., Mueller-Roeber, B., Balazadeh, S. (2012) JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species-Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**, 482-506.

Xu, X., Chen, C., Fan, B., Chen, Z. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*, **18**, 1310-1326.

Xue, G.P. (2005) A CELD-fusion method for rapid determination of the DNA-binding sequence specificity of novel plant DNA-binding proteins. *Plant J.*, **41**, 638-649.

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.*, **2**, 251-164.

Yanagisawa, S. (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, **7**, 555-560.

Yang, K.-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogenactivated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 741-746.

Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., Li-Jia, Q. (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol.*, **60**, 107-124.

Yilmaz, A., Mejia-Guerra, M.K., Kurz, K., Liang, X., Welch, L. and Grotewold, E. (2010) AGRIS: the Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an update. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D1118-22.

Yoo, S.D., Cho, Y.H., Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protoc.*, **7**,1565-1572.

Yu, D., Chen, C., Chen, Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*, **13**, 1527-1539.

Zhai, Z., Sooksa-nguan, T., Vatamaniuk, O.K. (2009) Establishing RNA interference as a reverse-genetic approach for gene functional analysis in protoplasts. *Plant Physiol*, **149**, 642-52.

Zhang, R., Wang, B., Ouyang, J., Li, J., Wang, Y. (2008) Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *J Integr Plant Biol.*, **9**,1070-1077.

Zhao, J. and Last, R. L. (1996) Coordinate Regulation of the Tryptophan Biosynthetic Pathway and Indolic Phytoalexin Accumulation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **8**, 2235-2244.

Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**, 191-202.

7 Anhang

7.1 Grundaktivitäten der Promotor:LUC-Konstrukte von ausgewählten Gene der Biosynthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin

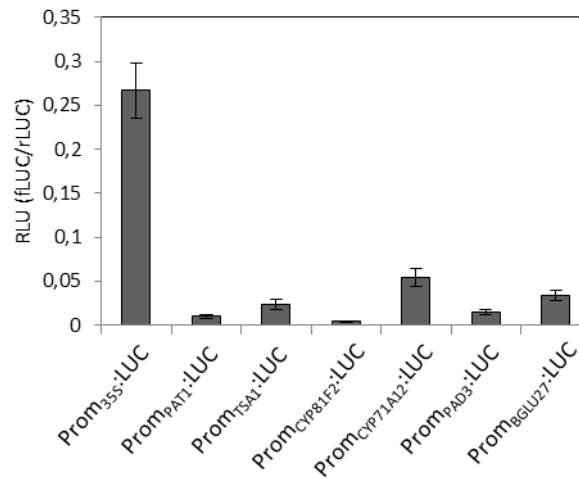


Abb.4.8: Grundaktivität der Promotoren verschiedener Gene aus der Biosynthese von Tryptophan, Indol-Glukosinolaten und Camalexin

Gezeigt sind die unterschiedlichen Grundaktivitäten einiger Promotoren im PTA-System. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Expression ist in RLU (*relative luminescence units*) angegeben. Die Angaben zeigen die Mittelwerte von sechs unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD).

7.2 Einfluss der EAR-ERF-TF auf die *CYP71A13*-Promotor-Aktivität

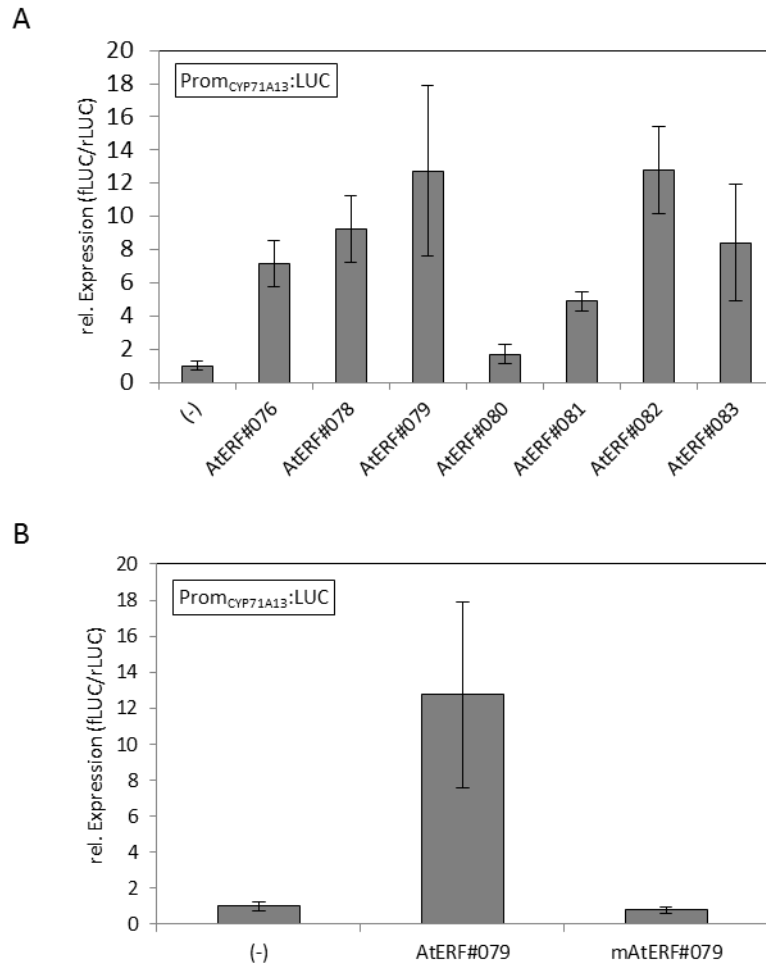


Abb.7.2 A: Einfluss der EAR-ERF-TF auf die *CYP71A13*-Promotor-Aktivität

Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von ERF-TF der Gruppe VIIIa (Nakano et al. 2006) in Bezug auf Promotoren der Gene des Sekundärstoffwechsels zur Synthese von Tryptophan und abgeleiteten Sekundärmetaboliten. Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Angaben zeigen die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen

Abb.7.2. B: Einfluss des EAR-Motivs von AtERF#079 auf die Aktivierung des *CYP71A13*-Promotors

Demonstriert wird der Einfluss der beiden Konstrukte AtERF#079 und mAtERF#079 auf die *CYP71A13*-Expression. Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwerte durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC). Die Ergebnisse der Messung sind als rel. Expression (vielfache Änderung zur Negativkontrolle (-)) dargestellt. Die Angaben demonstrieren die Mittelwerte von vier unabhängigen Transformationsansätzen (\pm SD). Der Versuch wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

7.3 Weitere Ergebnisse des PTA-Screenings des *CYP71A12*-Promotors

A

TF-Gruppe	bZIP-TF	CYP71A12
A	bZIP12	2,5
	bZIP66	1,1
	bZIP14	1,2
	bZIP13	1,0
	bZIP40	1,5
	bZIP35	0,5
	bZIP36	1,6
	bZIP37	0,8
	bZIP38	0,5
	bZIP39	0,4
bZIP67	1,9	
S	bZIP1	1,4
	bZIP53	1,2
	bZIP2	1,8
	bZIP11	0,4
	bZIP44	1,0
	bZIP4	0,6
	bZIP5	0,4
	bZIP6	0,8
	bZIP7	1,6
	bZIP8	1,0
	bZIP3	1,6
	bZIP42	1,4
	bZIP43	0,9
	bZIP48	0,4
bZIP58	0,8	
bZIP70	1,2	
bZIP75	1,0	
C	bZIP63	1,0
	bZIP9	1,1
	bZIP10	0,3
	bZIP25	0,6
G	bZIP41	0,5
	bZIP16	0,5
	bZIP68	0,7
	bZIP54	1,0
F	bZIP24	0,3
	bZIP19	0,9
	bZIP23	0,9
D	bZIP46	0,5
	bZIP45	0,8
	bZIP20	0,4
	bZIP26	0,5
	bZIP21	0,9
	bZIP65	0,8
	bZIP47	0,6
	bZIP57	1,0
	bZIP22	0,3
	bZIP50	0,6
bZIP60	0,5	
B	bZIP17	0,9
H	bZIP56	0,7
	bZIP64	1,2
E	bZIP61	0,7
	bZIP34	0,7
I	bZIP30	1,1
	bZIP69	0,8
	bZIP59	1,1
	bZIP52	1,0
	bZIP51	0,6
	bZIP73	1,3

B

TF-Gruppe	bHLH-TF	CYP71A12
I	AtbHLH67	0,7
	AtbHLH97	0,8
	AtbHLH57	2,2
	AtbHLH99	0,6
	AtbHLH96	0,6
	AtbHLH94	0,4
	AtbHLH98	0,6
	AtbHLH45	0,6
	AtbHLH55	1,7
	AtbHLH36	0,9
	AtbHLH101	1,4
	AtbHLH38	0,7
	AtbHLH39	0,6
II	AtbHLH91	1,2
	AtbHLH89	0,8
III	AtbHLH29	0,4
	AtbHLH61	0,7
	AtbHLH27	0,6
	AtbHLH13	0,9
	AtbHLH6	1,0
	AtbHLH42	0,5
	AtbHLH12	0,5
IV	AtbHLH25	0,5
	AtbHLH47	0,6
	AtbHLH121	1,0
	AtbHLH105	0,4
	AtbHLH34	0,5
V	AtbHLH92	0,5
	AtbHLH102	0,5
	AtbHLH46	1,1
	AtbHLH30	0,7
	AtbHLH32	0,4
VII	AtbHLH107	0,8
	AtbHLH106	0,7
	AtbHLH8	0,6
	AtbHLH26	2,1
VIII	AtbHLH72	1,0
	AtbHLH16	0,4
	AtbHLH87	0,8
	AtbHLH88	2,5
IX	AtbHLH37	0,6
	AtbHLH40	0,7
	AtbHLH83	0,7
	AtbHLH86	0,5
	AtbHLH122	1,3
X	AtbHLH81	0,4
	AtbHLH112	1,3
XI	AtbHLH82	0,3
	AtbHLH7	0,8
	AtbHLH59	0,5
XII	AtbHLH75	0,5
	AtbHLH49	0,4
	AtbHLH76	0,5
	AtbHLH78	0,4
	AtbHLH62	0,3
	AtbHLH77	0,7
	AtbHLH60	1,6
	AtbHLH31	1,2
AtbHLH79	1,2	

Abb.7.3: Ergebnis des Screenings der bZIP-TF- und der bHLH-Expressionsvektorkollektion mit dem CYP71A12-Promotor

A: Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen bZIP-TF in Bezug auf den *CYP71A12*-Promotor. Die bZIP-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Jakoby et al., 2002). **B:** Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen bHLH-TF in Bezug auf den *CYP71A12*-Promotor. Die bHLH-TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Heim et al., 2003). Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

A

TF-Gruppe	MYB-rel.-TF	CYP71A12	
CCA1-like	At2g13960	0,8	
	At1g01520	2,8	
	At1g18330	1,1	
	At1g74840	0,9	
	At2g46830	0,9	
	At3g16350	1,5	
	At4g01280	1,1	
	At5g02840	0,8	
	At5g37260	2,0	
	At5g47390	2,1	
	At5g52660	1,9	
	At5g56840	1,0	
	CPC-like	At1g01380	6,2
		At1g71030	1,8
At2g30420		5,3	
At2g46410		2,0	
At4g01060		1,3	
At5g53200		2,1	
At1g09710		1,4	
TRF-like	At1g58220	1,3	
	At1g06910	2,2	
	At1g15720	1,8	
	At1g17460	1,3	
	At1g72650	1,2	
	At3g49850	1,0	
	At5g67580	1,2	
l-box-binding	At4g39250	0,7	

B

TF-Gruppe	DOF-TF	CYP71A12
I	At4g21030	1,1
	At4g21050	1,3
	At4g21040	0,7
	At4g21080	1,5
II	At1g29160	0,9
	At2g34140	1,1
	At1g69570	1,4
III	At1g21340	1,2
	At3g52440	1,4
	At3g45610	0,7
	At5g60200	0,9
	At4g24060	1,0
	At1g64620	0,9
	At2G46590	1,1
	At3g61850	1,4
	At4g00940	0,8
IV	At3g50410	0,9
	At5g66940	3,3
	At1g51700	0,6
	At3g21270	0,8
	At4g38000	2,2
	At5g65590	0,5
V	At1g28310	0,7
	At2g37590	0,9
	At3g55370	0,9
VI	At1g07640	0,5
	At5g60850	0,9
VII	At5g62940	1,9

C

C2H2-TF	CYP71A12
At1g66140	1,9
At1g67030	1,9
At1g72050	1,0
At1g75710	1,5
At1g80730	0,8
At2g02070	2,5
At2g02080	1,5
At3g23140	1,1
At1g02030	0,4
At1g02040	0,4
At1g03840	1,1
At1g11490	0,8
At1g24625	1,8
At1g26590	1,2
At1g26610	1,0
At1g27730	1,2
At1g30970	1,1
At1g34370	1,0
At1g68130	1,3
At2g01940	1,2
At2g26940	1,0
At2g28200	1,4
At2g28710	0,9
At3g01030	1,0
At3g13810	1,3
At3g27970	0,8

D

C2H2-CO-like-TF	CYP71A12
At5g15840	0,4
At3g02380	0,6
At5g24930	1,2
At2g24790	0,6
At5g57660	0,5
At1g68520	0,8
At1g73870	1,0
At1g25440	0,7
At2g33500	1,1

Abb.7.4: Ergebnis des Screenings der MYB-related-TF, der DOF-TF, der C2H2-TF und der C2H2-CO-likeTF der Expressionsvektorkollektion auf dem CYP71A12-Promotor

A: Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen MYB-related-TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Yanhui et al., 2006). **B:** Induktionseigenschaften von verschiedenen DOF-TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die TF sind entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft geordnet (Yanagisawa, 2002). **C, D:** Induktionseigenschaften von verschiedenen C2H2- und C2H2-CO-like-TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

At-Nr.	CYP71A12	At-Nr.	CYP71A12	At-Nr.	CYP71A12	At-Nr.	CYP71A12
At1g70000	0,7	At1g19490	1,7	At5g60200	1,5	At4g36540	0,5
At3g49760	0,8	At4g34530	0,2	At2g46590	1,4	At4g31060	0,4
At5g60140	0,9	At5g06250	1,1	At1g75490	1,3	At1g63100	1,3
At1g01030	1,4	At5g14000	1,6	At3g14230	1,2	At1g06160	0,9
At3g18960	1,1	At3g14180	1,7	At2g43220	0,8	At5g44210	1,3
At1g06070	0,5	At3g50330	1,0	At2g31370	2,6	At2g20570	0,2
At1g35460	0,7	At4g36990	2,8	At2g27990	1,0	At3g02990	0,9
At2g40950	0,4	At4g17570	1,5	At1g54360	1,2	At3g62340	1,1
At1g74840	1,5	At3g24120	1,1	At1g25560	1,2	At4g01460	0,4
At1g28370	2,4	At3g25710	0,8	At2g39250	1,0	At4g39780	1,1
At4g13620	1,2	At5g17690	0,7	At5g66940	0,6	At3g53310	0,8
At3g61970	0,7	At5g18300	0,9	At4g38900	1,1	At1g72360	1,0
At5g15830	0,6	At4g13980	1,2	At1g25470	0,9	At5g53290	0,8
At3g54610	0,8	At4g33880	0,9	At5g66700	2,0	At2g38300	1,4
At1g61660	1,0	At5g02460	0,9	At1g33760	0,5	At1g64000	0,9
At3g16350	0,6	At5g54070	0,7	At2g47700	1,4	At5g60200	0,6
At3g11280	1,0	At3g19860	0,9	At1g59530	0,7	At4g30180	0,7
At1g36060	0,4	At1g10120	0,3	At1g44830	0,7	At4g01580	0,7
At4g25480	0,6	At5g50820	1,0	At1g26960	1,3	At2g22200	0,3
At1g16640	0,5	At3g17100	1,0	At1g50680	0,9	At5g13910	0,4
At5g60830	0,6	At5g64340	1,1	At2g03710	1,0	At1g08010	0,8
At5g45710	0,6	At1g21340	0,8	At1g74930	0,5	At1g12610	0,7
At1g66470	0,6	At4g21050	0,7	At1g49120	0,9	At5g09460	1,0
At5g08141	3,0	At3g51910	1,1	At4g37750	1,9	At5g67580	0,4
At3g22830	1,2	At3g50750	0,6	At1g77200	0,6	At2g42300	0,4
At1g53170	2,9	At1g18400	0,6	At3g61890	1,8	At1g34190	0,7
At4g27950	1,1	At2g33550	1,0	At3g25730	0,4	At2g01760	1,0
At1g49480	0,6	At3g20640	1,4	At1g71520	0,7	At4g30410	1,3
At5g05090	1,0	At5g65320	0,7	At5g60120	0,8	At4g23750	1,2
At3g56400	1,9	At4g31610	1,1	At3g15210	1,6	At2g25820	1,2
At1g69010	0,7	At1g02220	1,2	At5g60850	0,7	At4g29930	0,3
At4g11140	1,5	At3g24520	0,8	At3g50260	0,7	At2g20880	0,7
At5g02840	1,0	At1g78700	0,6	At2g46960	0,8	At5g59430	0,5
At3g20310	1,8	At1g09710	0,7	At1g43160	0,7	At3g10500	0,6
At5g11590	0,7	At5g28300	0,8	At3g57600	1,2	At2g31220	0,4
At1g14600	0,6	At5g15160	0,8	At1g12630	1,0	At5g05550	1,0
At3g06760	0,7	At4g31270	0,9	At4g18020	0,5	At4g34410	1,3
At1g51140	0,6	At5g26990	0,8	At2g34000	1,0	At2g18300	1,0
At3g57800	0,9	At3g29035	1,2	At1g64620	0,9	At5g62610	0,3
At1g12890	1,9	At4g17750	0,6	At4g12210	1,8	At1g02210	0,7
At5g08520	1,3	At1g22640	0,8	At1g63030	1,0	At3g12390	0,6
At4g32800	0,5	At1g09770	0,5	At3g58120	0,6	At1g56280	0,5
At5g18560	1,8	At4g25400	0,6	At4g24540	0,8	At4g31805	0,5
At1g25550	1,1	At1g19000	0,4	At2g18160	0,8	At1g19350	0,3
At5g49230	0,6	At5g54680	0,9	At5g06500	1,5	At5g43650	0,4
At1g72210	0,5	At4g30935	0,8	At2g40350	1,2	At5g18090	0,7
At5g50010	0,6	At1g77850	1,3	At2g21230	0,5	At3g60490	0,6
At1g22190	0,7	At1g05710	1,2	At3g50410	1,3	At5g52660	0,6
At5g56840	0,6	At2g21650	0,6	At4g34590	0,6	At5g16560	1,2
At1g01520	0,7	At1g17460	0,6	At2g28910	1,0	At2g02060	0,5
At5g21960	0,2	At1g49950	0,8	At4g25470	0,6	At1g05805	0,6
At1g49560	1,8	At5g23650	0,7	At5g29000	0,5	At2g43060	0,8
At5g64610	0,6	At4g10350	0,5	At4g11660	0,9	At1g01010	0,7
At2g42280	0,3	At1g68920	0,3	At1g51120	1,4	At5g25390	0,8
At3g47640	0,4	At1g14200	0,9	At3g21270	1,0	At3g09600	1,0
At2g47520	0,4	At1g74500	0,7	At4g38140	1,0	At3g06590	0,7
At5g47390	0,9	At4g01980	0,6	At2g30580	0,9	At3g49850	0,4
At1g01250	0,4	At1g72650	0,4	At3g16870	3,1	At1g60240	0,6
At5g43410	1,0	At1g19040	0,6	At1g68840	0,4	At5g61430	0,6
At1g67710	0,3	At1g13300	2,3	At1g75390	0,8	At4g10480	0,7
At2g42660	0,4	At4g02590	1,3	At3g47620	0,7	At3g05700	1,1
At4g02200	0,3	ANAC042	0,9	At1g69780	0,5	At2g40340	0,9

At-Nr.	CYP71A12
At4g29680	0,5
At5g09750	0,9
At4g38660	1,0
At4g29470	0,9
At2g43010	0,2
At1g30210	0,6
At1g67260	1,3
At1g68800	1,6
At1g69690	0,8
At1g72010	1,9
At2g31070	1,0
At2g45680	1,1
At3g02150	0,6
At3g15030	0,4
At3g27010	1,2
At3g47620	0,5
At4g18390	0,7
At5g08070	0,5
At5g08330	1,1
At5g41030	1,0
At1g77570	1,1
At1g32330	0,8
At2g41690	0,5
At3g02990	0,6
At3g22830	1,3
At3g24520	0,6
At3g51910	2,9
At5g43840	0,6
At5g45710	0,7
At5g62020	1,0
At1g27360	0,9
At1g27370	2,0
At1g53160	1,5
At2g33810	0,8
At2g42200	1,0
At3g57920	0,4
At5g18830	0,7
At5g50570	0,7
At5g50670	0,8
At1g16070	0,6
At1g25280	0,7
At1g43640	1,0
At1g53320	0,9
At2g47900	2,8
At3g06380	0,9
At5g18680	0,6
At1g13260	0,7
At1g50680	0,7
At1g51120	1,0
At1g68840	0,5
At3g25730	0,8
At1g15360	0,9
At5g11190	0,9
At5g59570	0,4
At5g60050	0,4
At1g43950	0,4
At2g33860	0,4
At5g42630	1,0
At5g44190	0,5
At5g47660	1,1
At5g59430	0,6
At5g20730	4,0
At1g19850	0,5
At3g61830	0,4
At5g17780	0,7
At5g28300	0,8
At5g37260	0,2
At3g55980	0,7

At-Nr.	CYP71A12
At4g29190	1,0
At5g06420	0,9
At5g06770	0,7
At5g07500	1,4
At5g16540	1,0
At5g44260	1,2
At5g63260	1,0
At3g50650	0,6
At3g60630	0,6
At4g36710	0,9
At3g13840	0,8
At4g37650	0,9
At4g00150	0,9
At3g49950	0,7
At3g20910	0,7
At1g54830	1,1
At2g34720	0,6
At2g37060	0,6
At1g07520	0,6
At5g17490	1,6
At2g27220	0,6
At2g37120	1,2
At5g42820	0,4
At5g46730	0,8
At4g31060	0,8
At5g23280	0,5
At5g51910	1,0
At2g37000	1,0
At5g23090	0,9
At3g12130	0,6
At2g41900	0,6
At2g15660	0,7
At1g46408	2,3
At1g69120	1,1
At1g26870	0,8
At2g47620	1,0
At5g04110	1,1
At4g30080	1,0
At2g28350	1,7
At4g23980	1,4
At5g37020	1,0
At3g62100	1,2
At4g14550	0,8
At1g04100	0,9
At1g04250	1,2
At3g23050	0,6
At3g04730	0,9
At4g29080	0,6
At3g16500	1,1
At1g51950	0,9
At4g32280	1,8
At3g20770	1,4
At2g27050	1,7
At5g21120	1,3
At3g11260	0,5
At3g61890	1,4
At1g26960	2,5
At4g35550	0,6
At4g36660	0,9
At4g36740	2,7
At4g40060	0,9
At5g03790	1,5
At5g65310	4,4
At1g69780	2,0
At2g01430	0,6
At3g01470	3,0
At3g60390	0,7
At3g48440	1,1

At-Nr.	CYP71A12
At1g04850	0,8
At1g43860	0,7
At5g43620	0,7
At1g55460	0,9
At1g55700	0,8
At1g66500	0,9
At2g01530	1,5
At5g44160	1,7
At3g05760	1,6
At3g46070	1,0
At3g46080	0,7
At3g46090	0,9
At3g49930	0,7
At3g53600	1,1
At3g53820	1,6
At3g57480	1,3
At3g62240	0,9
At2g22670	1,0
At3g15170	0,4
At3g29035	0,8
At5g46590	0,6
At1g13450	0,7
At1g49560	3,8
At1g55050	0,3
At1g63850	0,4
At1g65580	0,2
At1g76880	0,2
At1g76890	0,2
At2g03500	0,3
At2g13690	0,6
At2g20400	0,3
At2g33550	0,5
At2g38250	0,4
At2g42660	1,0
At3g10000	0,5
At3g12730	0,3
At3g19670	0,4
At3g25990	0,4
At3g27220	0,2
At3g46640	0,4
At3g47680	0,3
At3g53440	0,4
At3g56920	0,7
At4g01130	0,5
At4g11400	0,7
At4g16420	0,7
At4g17695	0,7
At4g26650	2,1
At4g28610	0,6
At4g31270	0,7
At4g33540	0,6
At4g35610	1,3
At4g36250	0,4
At4g37240	2,2
At5g01380	1,1
At3g01770	0,8
At3g05380	1,0
At3g06400	0,4
At3g07565	0,7
At3g07740	0,6
At3g09030	0,5
At5g03680	0,6
At5g05090	0,4
At5g07670	0,4
At5g10940	0,4
At5g16560	4,1
At3g47120	0,8

At-Nr.	CYP71A12
At3g42790	0,3
At3g11200	0,4
At5g05610	0,2
At3g23030	1,2
At1g15580	0,4
At2g33310	0,4
At1g80390	0,4
At3g17600	0,3
At4g28640	0,4
At1g73730	4,2
At5g10120	0,6
At5g66700	1,6
At2g28610	0,6
At2g33880	0,5
At3g01220	1,4
At4g37790	0,5
At1g20700	0,3
At2g01500	0,5
At2g22430	1,2
At3g18010	0,7
At4g36870	0,7
At3g57670	0,5
At3g58070	0,7
At4g39920	0,6
At5g04340	0,5
At5g15480	1,8
At5g25160	0,6
At5g40710	0,5
At5g25190	0,8
At1g51190	2,0
At1g79700	1,5
At2g28550	1,1
At3g20840	0,9
At5g17430	2,6
At5g65510	2,0
At5g67180	0,6
At1g47870	0,8
At4g36920	0,7
At2g44840	1,5
At3g54990	0,9
At2g41710	2,6
At4g37750	1,7
At5g10510	3,4
At1g25550	1,4
At1g67710	1,6
At1g68670	2,2
At1g69580	1,4
At2g01760	1,1
At2g20570	0,7
At2g38300	1,6
At3g16857	1,4
At3g24120	1,2
At3g25790	2,1
At4g04580	1,5
At4g13640	2,7
At4g18020	1,6
At4g31920	2,0
At4g37180	1,6
At5g18240	1,1
At5g29000	0,8
At5g58080	1,7
At1g03790	1,9
At1g04990	2,5
At1g07360	1,3
At1g27650	1,7
At1g68200	2,4
At3g51950	1,4

Abb.7.5: Ergebnis des Screenings verschiedener TF der Expressionsvektorkollektion auf dem CYP71A12-Promotor

A: Gezeigt sind die Induktionseigenschaften von verschiedenen TF in Bezug auf den CYP71A12-Promotor. Die Ergebnisse sind als Farbcode zusammengefasst, wobei die Transaktivierungseigenschaften jedes TF als vielfache Änderung zur jeweiligen Negativkontrolle (Prom:LUC ohne koexprimierten TF) dargestellt sind. Rot: keine Induktion (1 - 1,5x), hell grün: leichte Induktion (1,5 - 2x), dunkles grün: starke Induktion (2 - nx). Zur Normalisierung wurden *Firefly*-Messwertes durch *Renilla*-Messwerte dividiert (fLUC/rLUC).

7.4 Promotor-Bindestellen der Gene CYP71A12, CYP71A13, WRKY40, WRKY18 und WRKY10

Tab. 7.1: Promotor-Bindestellen von CYP71A12, nach AGRIS (The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, Davuluri et al., 2003)

Name der Bindestelle (BS)	Start im Genom	Ende im Genom	Sequenz	TF-Familie
AtMYC2 BS in RD22	13109148	13109153	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	13110148	13110153	cacatg	BHLH
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	13109204	13109211	aaattaa	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	13109627	13109632	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	13110393	13110398	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	13110356	13110361	actcat	bZIP
W-box Promotormotiv	13109284	13109289	ttgacc	WRKY
ATHB2 Promotormotiv	13109918	13109926	taataatta	HB
CCA1 Promotormotiv	13109863	13109870	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 Promotormotiv	13108822	13108828	acacgag	bZIP
DPBF1&2 Promotormotiv	13109063	13109069	acacgag	bZIP
DPBF1&2 Promotormotiv	13109147	13109153	acacatg	bZIP
MYB3 Promotormotiv	13108934	13108941	taactaac	MYB
MYB3 Promotormotiv	13109192	13109199	taactaac	MYB
MYB4 Promotormotiv	13108935	13108941	aactaac	MYB
MYB4 Promotormotiv	13109193	13109199	aactaac	MYB
MYB4 Promotormotiv	13109068	13109074	aactaac	MYB
MYB4 Promotormotiv	13108827	13108833	aactaac	MYB
RAV1-A Promotormotiv	13109644	13109648	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Promotormotiv	13108573	13108577	caaca	ABI3VP1
LFY Konsensus-Motiv	13109932	13109937	ccagtg	LFY
LFY Konsensus-Motiv	13109932	13109937	ccactg	LFY
BoxII Promotormotiv	13109426	13109431	ggttaa	...
BoxII Promotormotiv	13109465	13109470	ggttaa	...
<i>Evening Element</i> Promotormotiv	13108702	13108710	aaaatatct	...
GATA Promotormotiv	13108960	13108965	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109218	13109223	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109386	13109391	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109773	13109778	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13110144	13110149	tgatag	...
GATA Promotormotiv	13109908	13109913	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109714	13109719	tgatag	...

GATA Promotormotiv	13109360	13109365	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109275	13109280	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13109011	13109016	agataa	...
GATA Promotormotiv	13108771	13108776	agataa	...
GATA Promotormotiv	13108504	13108509	agataa	...
T-box Promotormotiv	13110194	13110199	actttg	...
T-box Promotormotiv	13109978	13109983	actttg	...
T-box Promotormotiv	13109129	13109134	actttg	...
SORLREP3	13109996	13110004	tgtatat	...
SORLIP1	13109982	13109987	agccac	...

Tab. 7.2: Promotor-Bindestellen von CYP71A13, nach AGRIS (The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, Davuluri et al., 2003)

Name der Bindestelle (BS)	Start im Genom	Ende im Genom	Sequenz	TF-Familie
AtMYB2 BS in RD22	13120865	13120871	ctaacca	MYB
AtMYC2 BS in RD22	13119106	13119111	cacatg	BHLH
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	13120432	13120439	aaattaa	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	13121010	13121015	actcat	bZIP
W-Box Promotormotiv	13119218	13119223	ttgacc	WRKY
ATHB2 Bindestelle-Motiv	13120599	13120607	taataatta	HB
CCA1 Bindestelle-Motiv	13120406	13120413	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	13119089	13119095	acacgag	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	13119105	13119111	acacatg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	13120042	13120048	acacaag	bZIP
MYB4 Bindestelle-Motiv	13119873	13119879	aactaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	13120354	13120360	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	13120863	13120869	aactaac	MYB
RAV1-A Bindestelle-Motiv	13119103	13119107	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	13120483	13120487	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	13120410	13120414	caaca	ABI3VP1
BoxII Promotormotiv	13119382	13119387	ggttaa	...
BoxII Promotormotiv	13120984	13120989	ggttaa	...
DRE-like Promotormotiv	13120725	13120733	agccgacct	...
GATA Promotormotiv	13119284	13119289	tgatag	...
GATA Promotormotiv	13119937	13119942	tgataa	...
GATA Promotormotiv	13120718	13120723	tgatag	...
GATA Promotormotiv	13119804	13119809	agataa	...
GATA Promotormotiv	13119266	13119271	agataa	...
GATA Promotormotiv	13119188	13119193	agataa	...
Nonamer Promotormotiv	13120321	13120329	agatcgacg	...
T-Box Promotormotiv	13120070	13120075	actttg	...
T-Box Promotormotiv	13120894	13120899	actttg	...

Tab. 7.3: Promotor-Bindestellen von WRKY40, nach AGRIS (The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, Davuluri et al., 2003)

Name der Bindestelle (BS)	Start im Genom	Ende im Genom	Sequenz	TF-Familie
AtMYC2 BS in RD22	30369020	30369025	cacatg	BHLH
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF 5 BS in ProDH	30368467	30368472	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF 5 BS in ProDH	30369895	30369900	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF 5 BS in ProDH	30368780	30368785	actcat	bZIP
ARF1 Bindestelle-Motiv	30368149	30368154	tgtctc	ARF
ARF1 Bindestelle-Motiv	30369220	30369225	tgtctc	ARF
CCA1 Bindestelle-Motiv	30367819	30367826	aaaaatct	MYB-related
CCA1 Bindestelle-Motiv	30370049	30370056	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30368316	30368322	acacgtg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30369232	30369238	acacttg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30369143	30369149	acacaag	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30368984	30368990	acacaag	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30368973	30368979	acaccgg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30368670	30368676	acacaag	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30368316	30368322	acacgtg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	30367968	30367974	acacaag	bZIP
MYB Promotor-Bindestelle	30368892	30368899	aaccaacc	MYB
MYB1 Bindestelle-Motiv	30369132	30369139	atccaacc	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	30367983	30367989	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	30368893	30368899	accaacc	MYB
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30369295	30369299	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30369786	30369790	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30369393	30369397	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30369147	30369151	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30369034	30369038	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30368822	30368826	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30368434	30368438	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30368425	30368429	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30368251	30368255	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30367972	30367976	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	30367761	30367765	caaca	ABI3VP1
LFY Konsensus-Motiv	30368248	30368253	ccactg	LFY
LFY Konsensus-Motiv	30369076	30369081	ccaatg	LFY
LFY Konsensus-Motiv	30369512	30369517	ccaatg	LFY
ABRE-like Bindestelle-Motiv	30368317	30368324	cacgtgta	...
ABRE-like Bindestelle-Motiv	30368314	30368321	cacgtgta	...
ARF Bindestelle-Motiv	30368149	30368154	tgtctc	...
ARF Bindestelle-Motiv	30369220	30369225	tgtctc	...
BoxII Promotormotiv	30368362	30368367	ggttaa	...
BoxII Promotormotiv	30369938	30369943	ggttaa	...
BoxII Promotormotiv	30368166	30368171	ggttaa	...
GATA Promotormotiv	30368006	30368011	agataa	...
GATA Promotormotiv	30368449	30368454	agataa	...
GATA Promotormotiv	30369534	30369539	tgataa	...
GATA Promotormotiv	30368713	30368718	agatag	...

GATA Promotormotiv	30368617	30368622	agatag	...
GATA Promotormotiv	30368325	30368330	agatag	...
G-Box Promotormotiv	30368317	30368322	cacgtg	...
G-Box Promotormotiv	30368316	30368321	cacgtg	...
IBox Promotormotiv	30368109	30368114	gataag	...
L1-Box Promotormotiv	30369326	30369333	taaagca	...
L1-Box Promotormotiv	30369661	30369668	taaagta	...
T-Box Promotormotiv	30367781	30367786	actttg	...
T-Box Promotormotiv	30368754	30368759	actttg	...
T-Box Promotormotiv	30369607	30369612	actttg	...
TELO-Box Promotormotiv	30370029	30370037	aaaccctaa	...
SORLIP1	30368876	30368881	agccac	...
SORLIP2	30368160	30368164	gggcc	...
SORLIP2	30368232	30368236	gggcc	...
SORLIP2	30368267	30368271	gggcc	...
SORLIP2	30368971	30368975	gggcc	...
SORLIP2	30368267	30368271	gggcc	...
SORLIP2	30368244	30368248	gggcc	...

Tab. 7.4: Promotor-Bindestellen von WRKY18, nach AGRIS (The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, Davuluri et al., 2003)

Name der Bindestelle (BS)	Start im Genom	Ende im Genom	Sequenz	TF-Familie
AtMYB2 BS in RD22	15381359	15381365	ctaacca	MYB
AtMYC2 BS in RD22	15381049	15381054	cacatg	BHLH
AtMYC2 BS in RD22	15380777	15380782	cacatg	BHLH
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	15382107	15382114	aaataaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	15383110	15383117	aaataaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	15382899	15382906	aaataaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	15381678	15381685	aaataaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS2 IN AG	15383129	15383136	aaattagt	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS2 IN AG	15380497	15380504	aaattagt	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS3 IN AG	15380498	15380505	actaattt	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS3 IN AG	15383130	15383137	actaattt	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	15381294	15381299	actcat	bZIP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	15381838	15381843	actcat	bZIP
W-Box Promotormotiv	15380315	15380320	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	15383054	15383059	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	15382062	15382067	ttgact	WRKY
W-Box Promotormotiv	15382053	15382058	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	15382046	15382051	ttgact	WRKY
W-Box Promotormotiv	15381552	15381557	ttgact	WRKY
W-Box Promotormotiv	15381119	15381124	ttgact	WRKY

ARF1 Bindestelle-Motiv	15383151	15383156	tgtctc	ARF
CCA1 Bindestelle-Motiv	15381770	15381777	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	15381575	15381581	acacggg	bZIP
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	15380912	15380918	acacaag	bZIP
HSEs Bindestelle-Motiv	15380440	15380449	agaaatttct	HSF
HSEs Bindestelle-Motiv	15380439	15380448	agaaatttct	HSF
MYB Bindestelle-Motiv	15382402	15382409	cacctaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	15381431	15381437	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	15381935	15381941	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	15382403	15382409	acctaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	15383125	15383131	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	15380402	15380408	accaaac	MYB
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15380949	15380953	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15382444	15382448	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15383031	15383035	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15383124	15383128	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15382768	15382772	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15381823	15381827	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	15381563	15381567	caaca	ABI3VP1
LFY Konsensus-Motiv	15382049	15382054	ccattg	LFY
ARF Bindestelle-Motiv	15383151	15383156	tgtctc	...
BoxII Promotormotiv	15381883	15381888	ggtaa	...
BoxII Promotormotiv	15382653	15382658	ggtaa	...
DRE-like Promotormotiv	15381725	15381733	taccgactt	...
DRE-like Promotormotiv	15382029	15382037	tgccgacct	...
DRE-like Promotormotiv	15381665	15381673	agccgacaa	...
GATA Promotormotiv	15380393	15380398	agataa	...
GATA Promotormotiv	15381209	15381214	agataa	...
GATA Promotormotiv	15382508	15382513	tgataa	...
GATA Promotormotiv	15382892	15382897	agatag	...
GATA Promotormotiv	15382846	15382851	agataa	...
GATA Promotormotiv	15382304	15382309	tgataa	...
GATA Promotormotiv	15381737	15381742	tgataa	...
GCC-Box Promotormotiv	15381480	15381485	gccgcc	...
IBox Promotormotiv	15381210	15381215	gataag	...
IBox Promotormotiv	15382303	15382308	gataag	...
T-Box Promotormotiv	15381425	15381430	actttg	...
T-Box Promotormotiv	15382797	15382802	actttg	...
T-Box Promotormotiv	15382446	15382451	actttg	...
T-Box Promotormotiv	15380625	15380630	actttg	...

Tab. 7.5: Promotor-Bindestellen von WRKY10, nach AGRIS (The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, Davuluri et al., 2003)

Name der Bindestelle (BS)	Start im Genom	Ende im Genom	Sequenz	TF-Familie
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	20780365	20780372	aaattaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	20781727	20781734	aaattaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	20781964	20781971	aaattaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i> BS1 IN AG	20781663	20781670	aaattaa	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywise</i>	20780182	20780189	aaattaa	Homeobox

<i>se</i> BS1 IN AG				
<i>Bellringer/replumless/pennywi</i> <i>se</i> BS2 IN AG	20781058	20781065	aaattagt	Homeobox
<i>Bellringer/replumless/pennywi</i> <i>se</i> BS3 IN AG	20781059	20781066	actaattt	Homeobox
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/G BF5 BS in ProDH	20780037	20780042	actcat	bZIP
W-Box Promotormotiv	20780213	20780218	ttgact	WRKY
W-Box Promotormotiv	20780556	20780561	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	20780654	20780659	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	20781942	20781947	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	20780743	20780748	ttgacc	WRKY
W-Box Promotormotiv	20779972	20779977	ttgacc	WRKY
ATHB2 Bindestelle-Motiv	20781050	20781058	taatcatta	HB
ATHB6 Bindestelle-Motiv	20780925	20780933	caattatta	HB
CCA1 Bindestelle-Motiv	20781130	20781137	aacaatct	MYB-related
DPBF1&2 Bindestelle-Motiv	20782163	20782169	acactag	bZIP
MYB Bindestelle-Motiv	20781532	20781539	aaccaaac	MYB
MYB Bindestelle-Motiv	20781812	20781819	aaccaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	20781533	20781539	accaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	20781585	20781591	aacaaac	MYB
MYB4 Bindestelle-Motiv	20781812	20781818	accaaac	MYB
MYB4 binding site motif	20781145	20781151	aactaac	MYB
RAV1-A Bindestelle-Motiv	20779976	20779980	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	20780120	20780124	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	20781584	20781588	caaca	ABI3VP1
RAV1-A Bindestelle-Motiv	20781739	20781743	caaca	ABI3VP1
LFY Konsensus-Motiv	20781924	20781929	ccaatg	LFY
BoxII Promotormotiv	20780470	20780475	gggttaa	...
BoxII Promotormotiv	20781017	20781022	gggttaa	...
BoxII Promotormotiv	20781269	20781274	gggttaa	...
BoxII Promotormotiv	20780061	20780066	gggttaa	...
GATA Promotormotiv	20780131	20780136	tgataa	...
GATA Promotormotiv	20780481	20780486	agatag	...
GATA Promotormotiv	20780888	20780893	tgataa	...
GATA Promotormotiv	20781553	20781558	tgataa	...
GATA Promotormotiv	20781677	20781682	tgataa	...
GATA Promotormotiv	20782151	20782156	tgataa	...
GATA Promotormotiv	20780143	20780148	agataa	...
Ibox Promotormotiv	20780486	20780491	gataag	...
T-Box Promotormotiv	20780633	20780638	actttg	...
T-Box Promotormotiv	20781982	20781987	actttg	...
SORLREP3	20781767	20781775	tgtatatat	...

7.5 PTA-Expressionsvektor-Kollektion

Tab. 7.6: Liste der verschiedenen Arabidopsis TF in Expressionsvektoren

Platten-Nr.	Position	TF-Kollektion	At-Nr.	Expressionsvektor
1	A1	TF-Mix	At1g70000	p35S-HA-GW
1	A2	TF-Mix	At1g74840	p35S-HA-GW
1	A3	TF-Mix	At3g11280	p35S-HA-GW
1	A4	TF-Mix	At3g22830	p35S-HA-GW
1	A5	TF-Mix	At5g02840	p35S-HA-GW
1	A6	TF-Mix	At5g08520	p35S-HA-GW
1	A7	TF-Mix	At5g56840	p35S-HA-GW
1	A8	TF-Mix	At5g47390	p35S-HA-GW
1	A9	TF-Mix	At1g63100	p35S-HA-GW
1	A10	TF-Mix	At3g53310	p35S-HA-GW
1	A11	TF-Mix	At4g01580	p35S-HA-GW
1	A12	TF-Mix	At5g18090	p35S-HA-GW
1	B1	TF-Mix	At3g49760	p35S-HA-GW
1	B2	TF-Mix	At1g28370	p35S-HA-GW
1	B3	TF-Mix	At1g36060	p35S-HA-GW
1	B4	TF-Mix	At1g53170	p35S-HA-GW
1	B5	TF-Mix	At3g20310	p35S-HA-GW
1	B6	TF-Mix	At4g32800	p35S-HA-GW
1	B7	TF-Mix	At1g01520	p35S-HA-GW
1	B8	TF-Mix	At1g01250	p35S-HA-GW
1	B9	TF-Mix	At1g06160	p35S-HA-GW
1	B10	TF-Mix	At1g72360	p35S-HA-GW
1	B11	TF-Mix	At2g22200	p35S-HA-GW
1	B12	TF-Mix	At3g60490	p35S-HA-GW
1	C1	TF-Mix	At5g60140	p35S-HA-GW
1	C2	TF-Mix	At4g13620	p35S-HA-GW
1	C3	TF-Mix	At4g25480	p35S-HA-GW
1	C4	TF-Mix	At4g27950	p35S-HA-GW
1	C5	TF-Mix	At5g11590	p35S-HA-GW
1	C6	TF-Mix	At5g18560	p35S-HA-GW
1	C7	TF-Mix	At5g21960	p35S-HA-GW
1	C8	TF-Mix	At5g43410	p35S-HA-GW
1	C9	TF-Mix	At5g44210	p35S-HA-GW
1	C10	TF-Mix	At5g53290	p35S-HA-GW
1	C11	TF-Mix	At5g13910	p35S-HA-GW
1	C12	TF-Mix	At5g52660	p35S-HA-GW
1	D1	TF-Mix	At1g01030	p35S-HA-GW
1	D2	TF-Mix	At3g61970	p35S-HA-GW
1	D3	TF-Mix	At1g16640	p35S-HA-GW
1	D4	TF-Mix	At1g49480	p35S-HA-GW
1	D5	TF-Mix	At1g14600	p35S-HA-GW
1	D6	TF-Mix	At1g25550	p35S-HA-GW
1	D7	TF-Mix	At1g49560	p35S-HA-GW
1	D8	TF-Mix	At1g67710	p35S-HA-GW
1	D9	TF-Mix	At2g20570	p35S-HA-GW
1	D10	TF-Mix	At2g38300	p35S-HA-GW
1	D11	TF-Mix	At1g56280	p35S-HA-GW
1	D12	TF-Mix	At5g16560	p35S-HA-GW
1	E1	TF-Mix	At3g18960	p35S-HA-GW
1	E2	TF-Mix	At5g15830	p35S-HA-GW
1	E3	TF-Mix	At5g60830	p35S-HA-GW
1	E4	TF-Mix	At5g05090	p35S-HA-GW
1	E5	TF-Mix	At3g06760	p35S-HA-GW
1	E6	TF-Mix	At5g49230	p35S-HA-GW
1	E7	TF-Mix	At5g64610	p35S-HA-GW

1	E8	TF-Mix	At2g42660	p35S-HA-GW
1	E9	TF-Mix	At3g02990	p35S-HA-GW
1	E10	TF-Mix	At1g64000	p35S-HA-GW
1	E11	TF-Mix	At4g31805	p35S-HA-GW
1	E12	TF-Mix	At2g02060	p35S-HA-GW
1	F1	TF-Mix	At1g06070	p35S-HA-GW
1	F2	TF-Mix	At3g54610	p35S-HA-GW
1	F3	TF-Mix	At5g45710	p35S-HA-GW
1	F4	TF-Mix	At3g56400	p35S-HA-GW
1	F5	TF-Mix	At1g51140	p35S-HA-GW
1	F6	TF-Mix	At1g72210	p35S-HA-GW
1	F7	TF-Mix	At2g42280	p35S-HA-GW
1	F8	TF-Mix	At4g02200	p35S-HA-GW
1	F9	TF-Mix	At3g62340	p35S-HA-GW
1	F10	TF-Mix	At5g60200	p35S-HA-GW
1	F11	TF-Mix	At1g19350	p35S-HA-GW
1	F12	TF-Mix	At1g05805	p35S-HA-GW
1	G1	TF-Mix	At1g35460	p35S-HA-GW
1	G2	TF-Mix	At1g61660	p35S-HA-GW
1	G3	TF-Mix	At1g66470	p35S-HA-GW
1	G4	TF-Mix	At1g69010	p35S-HA-GW
1	G5	TF-Mix	At3g57800	p35S-HA-GW
1	G6	TF-Mix	At5g50010	p35S-HA-GW
1	G7	TF-Mix	At3g47640	p35S-HA-GW
1	G8	TF-Mix	At4g36540	p35S-HA-GW
1	G9	TF-Mix	At4g01460	p35S-HA-GW
1	G10	TF-Mix	At4g30180	p35S-HA-GW
1	G11	TF-Mix	At5g43650	p35S-HA-GW
1	G12	TF-Mix	At2g43060	p35S-HA-GW
1	H1	TF-Mix	At2g40950	p35S-HA-GW
1	H2	TF-Mix	At3g16350	p35S-HA-GW
1	H3	TF-Mix	At5g08141	p35S-HA-GW
1	H4	TF-Mix	At4g11140	p35S-HA-GW
1	H5	TF-Mix	At1g12890	p35S-HA-GW
1	H6	TF-Mix	At1g22190	p35S-HA-GW
1	H7	TF-Mix	At2g47520	p35S-HA-GW
1	H8	TF-Mix	At4g31060	p35S-HA-GW
1	H9	TF-Mix	At4g39780	p35S-HA-GW
1	H10	TF-Mix	At5g64750	p35S-HA-GW
1	H11	TF-Mix	At2g35310	p35S-HA-GW
1	H12	TF-Mix	At3g51960	p35S-HA-GW
2	A1	TF-Mix	At1g19490	p35S-HA-GW
2	A2	TF-Mix	At3g24120	p35S-HA-GW
2	A3	TF-Mix	At5g54070	p35S-HA-GW
2	A4	TF-Mix	At3g51910	p35S-HA-GW
2	A5	TF-Mix	At3g24520	p35S-HA-GW
2	A6	TF-Mix	At4g17750	p35S-HA-GW
2	A7	TF-Mix	At1g05710	p35S-HA-GW
2	A8	TF-Mix	At1g74500	p35S-HA-GW
2	A9	TF-Mix	At5g09460	p35S-HA-GW
2	A10	TF-Mix	At4g29930	p35S-HA-GW
2	A11	TF-Mix	At2g18300	p35S-HA-GW
2	A12	TF-Mix	At3g06590	p35S-HA-GW
2	B1	TF-Mix	At4g34530	p35S-HA-GW
2	B2	TF-Mix	At3g25710	p35S-HA-GW
2	B3	TF-Mix	At3g19860	p35S-HA-GW
2	B4	TF-Mix	At3g50750	p35S-HA-GW
2	B5	TF-Mix	At1g78700	p35S-HA-GW
2	B6	TF-Mix	At1g22640	p35S-HA-GW
2	B7	TF-Mix	At2g21650	p35S-HA-GW
2	B8	TF-Mix	At4g01980	p35S-HA-GW

2	B9	TF-Mix	At5g67580	p35S-HA-GW
2	B10	TF-Mix	At2g20880	p35S-HA-GW
2	B11	TF-Mix	At5g62610	p35S-HA-GW
2	B12	TF-Mix	At3g49850	p35S-HA-GW
2	C1	TF-Mix	At5g06250	p35S-HA-GW
2	C2	TF-Mix	At5g17690	p35S-HA-GW
2	C3	TF-Mix	At1g10120	p35S-HA-GW
2	C4	TF-Mix	At1g18400	p35S-HA-GW
2	C5	TF-Mix	At1g09710	p35S-HA-GW
2	C6	TF-Mix	At1g09770	p35S-HA-GW
2	C7	TF-Mix	At1g17460	p35S-HA-GW
2	C8	TF-Mix	At1g72650	p35S-HA-GW
2	C9	TF-Mix	At2g42300	p35S-HA-GW
2	C10	TF-Mix	At5g59430	p35S-HA-GW
2	C11	TF-Mix	At1g02210	p35S-HA-GW
2	C12	TF-Mix	At1g60240	p35S-HA-GW
2	D1	TF-Mix	At5g14000	p35S-HA-GW
2	D2	TF-Mix	At5g18300	p35S-HA-GW
2	D3	TF-Mix	At5g50820	p35S-HA-GW
2	D4	TF-Mix	At2g33550	p35S-HA-GW
2	D5	TF-Mix	At5g28300	p35S-HA-GW
2	D6	TF-Mix	At4g25400	p35S-HA-GW
2	D7	TF-Mix	At1g49950	p35S-HA-GW
2	D8	TF-Mix	At1g19040	p35S-HA-GW
2	D9	TF-Mix	At1g34190	p35S-HA-GW
2	D10	TF-Mix	At3g10500	p35S-HA-GW
2	D11	TF-Mix	At3g12390	p35S-HA-GW
2	D12	TF-Mix	At5g61430	p35S-HA-GW
2	E1	TF-Mix	At3g14180	p35S-HA-GW
2	E2	TF-Mix	At4g13980	p35S-HA-GW
2	E3	TF-Mix	At3g17100	p35S-HA-GW
2	E4	TF-Mix	At3g20640	p35S-HA-GW
2	E5	TF-Mix	At5g15160	p35S-HA-GW
2	E6	TF-Mix	At1g19000	p35S-HA-GW
2	E7	TF-Mix	At5g23650	p35S-HA-GW
2	E8	TF-Mix	At1g13300	p35S-HA-GW
2	E9	TF-Mix	At2g01760	p35S-HA-GW
2	E10	TF-Mix	At2g31220	p35S-HA-GW
2	E11	TF-Mix	At1g01010	p35S-HA-GW
2	E12	TF-Mix	At4g10480	p35S-HA-GW
2	F1	TF-Mix	At3g50330	p35S-HA-GW
2	F2	TF-Mix	At4g33880	p35S-HA-GW
2	F3	TF-Mix	At5g64340	p35S-HA-GW
2	F4	TF-Mix	At5g65320	p35S-HA-GW
2	F5	TF-Mix	At4g31270	p35S-HA-GW
2	F6	TF-Mix	At5g54680	p35S-HA-GW
2	F7	TF-Mix	At4g10350	p35S-HA-GW
2	F8	TF-Mix	At4g02590	p35S-HA-GW
2	F9	TF-Mix	At4g30410	p35S-HA-GW
2	F10	TF-Mix	At5g05550	p35S-HA-GW
2	F11	TF-Mix	At5g25390	p35S-HA-GW
2	F12	TF-Mix	At3g05700	p35S-HA-GW
2	G1	TF-Mix	At4g36990	p35S-HA-GW
2	G2	TF-Mix	At5g02460	p35S-HA-GW
2	G3	TF-Mix	At1g21340	p35S-HA-GW
2	G4	TF-Mix	At4g31610	p35S-HA-GW
2	G5	TF-Mix	At5g26990	p35S-HA-GW
2	G6	TF-Mix	At4g30935	p35S-HA-GW
2	G7	TF-Mix	At1g68920	p35S-HA-GW
2	G8	TF-Mix	At2g40340	p35S-HA-GW
2	G9	TF-Mix	At4g23750	p35S-HA-GW

2	G10	TF-Mix	At4g34410	p35S-HA-GW
2	G11	TF-Mix	At3g09600	p35S-HA-GW
2	G12	TF-Mix	At1g08010	p35S-HA-GW
2	H1	TF-Mix	At4g17570	p35S-HA-GW
2	H3	TF-Mix	At4g21050	p35S-HA-GW
2	H4	TF-Mix	At1g02220	p35S-HA-GW
2	H5	TF-Mix	At3g29035	p35S-HA-GW
2	H6	TF-Mix	At1g77850	p35S-HA-GW
2	H7	TF-Mix	At1g14200	p35S-HA-GW
2	H8	TF-Mix	At1g12610	p35S-HA-GW
2	H9	TF-Mix	At2g25820	p35S-HA-GW
2	H10	TF-Mix	At2g36450	p35S-HA-GW
2	H11	TF-Mix	At4g25490	p35S-HA-GW
2	H12	TF-Mix	At1g59750	p35S-HA-GW
3	A1	TF-Mix	At5g60200	p35S-HA-GW
3	A2	TF-Mix	At2g27990	p35S-HA-GW
3	A3	TF-Mix	At1g25470	p35S-HA-GW
3	A4	TF-Mix	At1g44830	p35S-HA-GW
3	A5	TF-Mix	At1g49120	p35S-HA-GW
3	A6	TF-Mix	At1g71520	p35S-HA-GW
3	A7	TF-Mix	At2g46960	p35S-HA-GW
3	A8	TF-Mix	At2g34000	p35S-HA-GW
3	A9	TF-Mix	At4g24540	p35S-HA-GW
3	A10	TF-Mix	At3g50410	p35S-HA-GW
3	A11	TF-Mix	At4g11660	p35S-HA-GW
3	A12	TF-Mix	At3g16870	p35S-HA-GW
3	B1	TF-Mix	At2g46590	p35S-HA-GW
3	B2	TF-Mix	At1g54360	p35S-HA-GW
3	B3	TF-Mix	At5g66700	p35S-HA-GW
3	B4	TF-Mix	At1g26960	p35S-HA-GW
3	B5	TF-Mix	At4g37750	p35S-HA-GW
3	B6	TF-Mix	At5g60120	p35S-HA-GW
3	B7	TF-Mix	At1g43160	p35S-HA-GW
3	B8	TF-Mix	At1g64620	p35S-HA-GW
3	B9	TF-Mix	At2g18160	p35S-HA-GW
3	B10	TF-Mix	At4g34590	p35S-HA-GW
3	B11	TF-Mix	At1g51120	p35S-HA-GW
3	B12	TF-Mix	At1g68840	p35S-HA-GW
3	C1	TF-Mix	At1g75490	p35S-HA-GW
3	C2	TF-Mix	At1g25560	p35S-HA-GW
3	C3	TF-Mix	At1g33760	p35S-HA-GW
3	C4	TF-Mix	At1g50680	p35S-HA-GW
3	C5	TF-Mix	At1g77200	p35S-HA-GW
3	C6	TF-Mix	At3g15210	p35S-HA-GW
3	C7	TF-Mix	At3g57600	p35S-HA-GW
3	C8	TF-Mix	At4g12210	p35S-HA-GW
3	C9	TF-Mix	At5g06500	p35S-HA-GW
3	C10	TF-Mix	At2g28910	p35S-HA-GW
3	C11	TF-Mix	At3g21270	p35S-HA-GW
3	C12	TF-Mix	At1g75390	p35S-HA-GW
3	D1	TF-Mix	At3g14230	p35S-HA-GW
3	D2	TF-Mix	At2g39250	p35S-HA-GW
3	D3	TF-Mix	At2g47700	p35S-HA-GW
3	D4	TF-Mix	At2g03710	p35S-HA-GW
3	D5	TF-Mix	At3g61890	p35S-HA-GW
3	D6	TF-Mix	At5g60850	p35S-HA-GW
3	D7	TF-Mix	At1g12630	p35S-HA-GW
3	D8	TF-Mix	At1g63030	p35S-HA-GW
3	D9	TF-Mix	At2g40350	p35S-HA-GW
3	D10	TF-Mix	At4g25470	p35S-HA-GW
3	D11	TF-Mix	At4g38140	p35S-HA-GW

3	D12	TF-Mix	At3g47620	p35S-HA-GW
3	E1	TF-Mix	At2g43220	p35S-HA-GW
3	E2	TF-Mix	At5g66940	p35S-HA-GW
3	E3	TF-Mix	At1g59530	p35S-HA-GW
3	E4	TF-Mix	At1g74930	p35S-HA-GW
3	E5	TF-Mix	At3g25730	p35S-HA-GW
3	E6	TF-Mix	At3g50260	p35S-HA-GW
3	E7	TF-Mix	At4g18020	p35S-HA-GW
3	E8	TF-Mix	At3g58120	p35S-HA-GW
3	E9	TF-Mix	At2g21230	p35S-HA-GW
3	E10	TF-Mix	At5g29000	p35S-HA-GW
3	E11	TF-Mix	At2g30580	p35S-HA-GW
3	E12	TF-Mix	At1g69780	p35S-HA-GW
3	F1	TF-Mix	At2g31370	p35S-HA-GW
3	F2	TF-Mix	At4g38900	p35S-HA-GW
4	A1	DOF	At1g07640	p35S-cHA-GW
4	A2	DOF	At1g21340	p35S-cHA-GW
4	A3	DOF	At1g28310	p35S-cHA-GW
4	A4	DOF	At1g29160	p35S-cHA-GW
4	A5	DOF	At1g51700	p35S-cHA-GW
4	A6	DOF	At1g69570	p35S-cHA-GW
4	A7	DOF	At2g34140	p35S-cHA-GW
4	A8	DOF	At2g37590	p35S-cHA-GW
4	A9	DOF	At3g21270	p35S-cHA-GW
4	A10	DOF	At3g45610	p35S-cHA-GW
4	A11	DOF	At3g50410	p35S-cHA-GW
4	A12	DOF	At3g55370	p35S-cHA-GW
4	B1	DOF	At4g00940	p35S-cHA-GW
4	B2	DOF	At4g21030	p35S-cHA-GW
4	B3	DOF	At4g21040	p35S-cHA-GW
4	B4	DOF	At4g21050	p35S-cHA-GW
4	B5	DOF	At4g21080	p35S-cHA-GW
4	B6	DOF	At4g24060	p35S-cHA-GW
4	B7	DOF	At4g38000	p35S-cHA-GW
4	B8	DOF	At5g60200	p35S-cHA-GW
4	B9	DOF	At5g60850	p35S-cHA-GW
4	B10	DOF	At5g62940	p35S-cHA-GW
4	B11	DOF	At5g65590	p35S-cHA-GW
4	B12	DOF	At1g64620	p35S-cHA-GW
4	C1	DOF	At3g52440	p35S-cHA-GW
4	C2	DOF	At5g66940	p35S-cHA-GW
4	C3	DOF	At2G46590	p35S-cHA-GW
4	C4	DOF	At3g61850	p35S-cHA-GW
5	A1	WRKY	At1g18860	p35S-cHA-GW
5	A2	WRKY	At1g29280	p35S-cHA-GW
5	A3	WRKY	At1g55600	p35S-cHA-GW
5	A4	WRKY	At1g62300	p35S-cHA-GW
5	A5	WRKY	At1g64000	p35S-cHA-GW
5	A6	WRKY	At1g66550	p35S-cHA-GW
5	A7	WRKY	At1g68150	p35S-cHA-GW
5	A8	WRKY	At1g80840	p35S-cHA-GW
5	A9	WRKY	At2g04880	p35S-cHA-GW
5	A10	WRKY	At2g23320	p35S-cHA-GW
5	A11	WRKY	At2g24570	p35S-cHA-GW
5	A12	WRKY	At2g25000	p35S-cHA-GW
5	B1	WRKY	At2g30250	p35S-cHA-GW
5	B2	WRKY	At2g30590	p35S-cHA-GW
5	B3	WRKY	At2g34830	p35S-cHA-GW
5	B4	WRKY	At2g37260	p35S-cHA-GW
5	B5	WRKY	At2g38470	p35S-cHA-GW
5	B6	WRKY	At2g40740	p35S-cHA-GW

5	B7	WRKY	At2g44745	p35S-cHA-GW
5	B8	WRKY	At2g46130	p35S-cHA-GW
5	B9	WRKY	At2g46400	p35S-cHA-GW
5	B10	WRKY	At2g47260	p35S-cHA-GW
5	B11	WRKY	At3g01970	p35S-cHA-GW
5	B12	WRKY	At3g56400	p35S-cHA-GW
5	C1	WRKY	At3g58710	p35S-cHA-GW
5	C2	WRKY	At4g01250	p35S-cHA-GW
5	C3	WRKY	At4g01720	p35S-cHA-GW
5	C4	WRKY	At4g04450	p35S-cHA-GW
5	C5	WRKY	At4g11070	p35S-cHA-GW
5	C6	WRKY	At4g18170	p35S-cHA-GW
5	C7	WRKY	At4g23550	p35S-cHA-GW
5	C8	WRKY	At4g23810	p35S-cHA-GW
5	C9	WRKY	At4g24240	p35S-cHA-GW
5	C10	WRKY	At4g26640	p35S-cHA-GW
5	C11	WRKY	At4g39410	p35S-cHA-GW
5	C12	WRKY	At5g01900	p35S-cHA-GW
5	D1	WRKY	At5g07100	p35S-cHA-GW
5	D2	WRKY	At5g13080	p35S-cHA-GW
5	D3	WRKY	At5g15130	p35S-cHA-GW
5	D4	WRKY	At5g22570	p35S-cHA-GW
5	D5	WRKY	At5g26170	p35S-cHA-GW
6	A1	ERF	At2g20880	p35S-HA-GW
6	A2	ERF	At4g28140	p35S-HA-GW
6	A3	ERF	At1g36060	p35S-HA-GW
6	A4	ERF	At2g22200	p35S-HA-GW
6	A5	ERF	At5g65130	p35S-HA-GW
6	A6	ERF	At1g22190	p35S-HA-GW
6	A7	ERF	At1g78080	p35S-cHA-GW
6	A8	ERF	At4g39780	p35S-HA-GW
6	A9	ERF	At1g64380	p35S-cHA-GW
6	A10	ERF	At4g13620	p35S-HA-GW
6	A11	ERF	At1g46768	p35S-cHA-GW
6	A12	ERF	At4g06746	p35S-HA-GW
6	B1	ERF	At2g23340	p35S-HA-GW
6	B2	ERF	At4g36900	p35S-HA-GW
6	B3	ERF	At5g67190	p35S-HA-GW
6	B4	ERF	At3g50260	p35S-cHA-GW
6	B5	ERF	At1g21910	p35S-HA-GW
6	B6	ERF	At1g77640	p35S-HA-GW
6	B7	ERF	At1g44830	p35S-HA-GW
6	B8	ERF	At4g31060	p35S-HA-GW
6	B9	ERF	At5g21960	p35S-HA-GW
6	B10	ERF	At1g19210	p35S-HA-GW
6	B11	ERF	At1g74930	p35S-HA-GW
6	B12	ERF	At1g22810	p35S-HA-GW
6	C1	ERF	At1g71520	p35S-HA-GW
6	C2	ERF	At1g71450	p35S-HA-GW
6	C3	ERF	At1g33760	p35S-HA-GW
6	C4	ERF	At1g01250	p35S-HA-GW
6	C5	ERF	At2g36450	p35S-HA-GW
6	C6	ERF	At5g52020	p35S-HA-GW
6	C7	ERF	At1g63040	p35S-HA-GW
6	C8	ERF	At1g12630	p35S-HA-GW
6	C9	ERF	At5g51990	p35S-cHA-GW
6	C10	ERF	At4g25490	p35S-HA-GW
6	C11	ERF	At4g25470	p35S-HA-GW
6	C12	ERF	At4g25480	p35S-HA-GW
6	D1	ERF	At1g63030	p35S-HA-GW
6	D2	ERF	At1g12610	p35S-HA-GW

6	D3	ERF	At2g44940	p35S-HA-GW
6	D4	ERF	At3g60490	p35S-HA-GW
6	D5	ERF	At3g16280	p35S-HA-GW
6	D6	ERF	At1g77200	p35S-HA-GW
6	D7	ERF	At2g35700	p35S-cHA-GW
6	D8	ERF	At4g16750	p35S-cHA-GW
6	D9	ERF	At5g25810	p35S-HA-GW
6	D10	ERF	At5g11590	p35S-HA-GW
6	D11	ERF	At4g32800	p35S-HA-GW
6	D12	ERF	At3g11020	p35S-cHA-GW
6	E1	ERF	At5g05410	p35S-HA-GW
6	E2	ERF	At2g38340	p35S-cHA-GW
6	E3	ERF	At2g40350	p35S-HA-GW
6	E4	ERF	At2g40340	p35S-cHA-GW
6	E5	ERF	At1g75490	p35S-HA-GW
6	E6	ERF	At5g18450	p35S-HA-GW
6	E7	ERF	At3g57600	p35S-HA-GW
6	E8	ERF	At2g40220	p35S-cHA-GW
6	E9	ERF	At5g19790	p35S-cHA-GW
6	E10	ERF	At5g25390	p35S-HA-GW
6	E11	ERF	At4g11140	p35S-HA-GW
6	E12	ERF	At4g23750	p35S-cHA-GW
6	F1	ERF	At5g53290	p35S-HA-GW
6	F2	ERF	At4g27950	p35S-HA-GW
6	F3	ERF	At2g46310	p35S-HA-GW
6	F4	ERF	At1g22985	p35S-cHA-GW
6	F5	ERF	At1g71130	p35S-HA-GW
6	F6	ERF	At1g25470	p35S-HA-GW
6	F7	ERF	At1g49120	p35S-HA-GW
6	F8	ERF	At1g68550	p35S-HA-GW
6	F9	ERF	At3g25890	p35S-HA-GW
6	F10	ERF	At2g47520	p35S-HA-GW
6	F11	ERF	At3g16770	p35S-HA-GW
6	F12	ERF	At1g72360	p35S-HA-GW
6	G1	ERF	At1g53910	p35S-HA-GW
6	G2	ERF	At3g14230	p35S-HA-GW
6	G3	ERF	At1g28370	p35S-HA-GW
6	G4	ERF	At1g03800	p35S-HA-GW
6	G5	ERF	At3g15210	p35S-HA-GW
6	G6	ERF	At1g53170	p35S-HA-GW
6	G7	ERF	At5g44210	p35S-HA-GW
6	G8	ERF	At1g28360	p35S-HA-GW
6	G9	ERF	At1g50640	p35S-HA-GW
6	G10	ERF	At3g20310	p35S-HA-GW
6	G11	ERF	At5g13910	p35S-cHA-GW
6	G12	ERF	At5g18560	p35S-HA-GW
6	H1	ERF	At1g28160	p35S-HA-GW
6	H2	ERF	At1g12890	p35S-HA-GW
6	H3	ERF	At1g12980	p35S-HA-GW
6	H4	ERF	At1g24590	p35S-cHA-GW
6	H5	ERF	At4g18450	p35S-HA-GW
6	H6	ERF	At3g23240	p35S-HA-GW
6	H7	ERF	At2g31230	p35S-HA-GW
6	H8	ERF	At1g06160	p35S-HA-GW
6	H9	ERF	At3g23220	p35S-HA-GW
6	H10	ERF	At5g43410	p35S-HA-GW
6	H11	ERF	At1g04370	p35S-HA-GW
6	H12	ERF	At3g23230	p35S-HA-GW
7	A1	ERF	At4g17500	p35S-cHA-GW
7	A2	ERF	At5g47220	p35S-HA-GW
7	A3	ERF	At5g47230	p35S-HA-GW

7	A4	ERF	At5g61600	p35S-HA-GW
7	A5	ERF	At5g51190	p35S-HA-GW
7	A6	ERF	At5g07580	p35S-cHA-GW
7	A7	ERF	At5g61590	p35S-HA-GW
7	A8	ERF	At1g43160	p35S-cHA-GW
7	A9	ERF	At4g34410	p35S-HA-GW
7	A10	ERF	At5g50080	p35S-cHA-GW
7	A11	ERF	At5g64750	p35S-HA-GW
7	A12	ERF	At2g33710	p35S-cHA-GW
7	B1	ERF	At5g13330	p35S-HA-GW
7	B2	ERF	At5g61890	p35S-cHA-GW
7	B3	ERF	At5g07310	p35S-cHA-GW
7	B4	ERF	At2g20350	p35S-cHA-GW
7	B5	ERF	At5g67000	p35S-cHA-GW
8	A1	bZIP	At4g02640	p35S-cHA-GW
8	A2	bZIP	At4g34590	p35S-cHA-GW
8	A3	bZIP	At5g06950	p35S-cHA-GW
8	A4	bZIP	At1g22070	p35S-cHA-GW
8	A5	bZIP	At3g51960	p35S-cHA-GW
8	A6	bZIP	At3g54620	p35S-cHA-GW
8	A7	bZIP	At5g06960	p35S-cHA-GW
8	A8	bZIP	At1g49720	p35S-cHA-GW
8	A9	bZIP	At4g34000	p35S-cHA-GW
8	A10	bZIP	At3g19290	p35S-cHA-GW
8	A11	bZIP	At1g59530	p35S-cHA-GW
8	A12	bZIP	At4g36730	p35S-cHA-GW
8	B1	bZIP	At3g30530	p35S-cHA-GW
8	B2	bZIP	At1g75390	p35S-cHA-GW
8	B3	bZIP	At3g12250	p35S-cHA-GW
8	B4	bZIP	At3g49760	p35S-cHA-GW
8	B5	bZIP	At1g43700	p35S-cHA-GW
8	B6	bZIP	At4g01120	p35S-cHA-GW
8	B7	bZIP	At1g42990	p35S-cHA-GW
8	B8	bZIP	At3g17609	p35S-cHA-GW
8	B9	bZIP	At3g56850	p35S-cHA-GW
8	B10	bZIP	At1g68880	p35S-cHA-GW
8	B11	bZIP	At4g35900	p35S-cHA-GW
8	B12	bZIP	At2g35530	p35S-cHA-GW
8	C1	bZIP	At2g18160	p35S-cHA-GW
8	C2	bZIP	At2g16770	p35S-cHA-GW
8	C3	bZIP	At2g21230	p35S-cHA-GW
8	C4	bZIP	At2g42380	p35S-cHA-GW
8	C5	bZIP	At2g36270	p35S-cHA-GW
8	C6	bZIP	At2g04038	p35S-cHA-GW
8	C7	bZIP	At3g62420	p35S-cHA-GW
8	C8	bZIP	At5g10030	p35S-cHA-GW
8	C9	bZIP	At2g31370	p35S-cHA-GW
8	C10	bZIP	At2g22850	p35S-cHA-GW
8	C11	bZIP	At3g58120	p35S-cHA-GW
8	C12	bZIP	At5g08141	p35S-cHA-GW
8	D1	bZIP	At5g49450	p35S-cHA-GW
8	D2	bZIP	At5g44080	p35S-cHA-GW
8	D3	bZIP	At1g08320	p35S-cHA-GW
8	D4	bZIP	At5g15830	p35S-cHA-GW
8	D5	bZIP	At1g03970	p35S-cHA-GW
8	D6	bZIP	At5g38800	p35S-cHA-GW
8	D7	bZIP	At5g65210	p35S-cHA-GW
8	D8	bZIP	At1g06850	p35S-cHA-GW
8	D9	bZIP	At5g28770	p35S-cHA-GW
8	D10	bZIP	At1g06070	p35S-cHA-GW
8	D11	bZIP	At5g60830	p35S-cHA-GW

8	D12	bZIP	At5g24800	p35S-cHA-GW
8	E1	bZIP	At4g37730	p35S-cHA-GW
8	E2	bZIP	At3g44460	p35S-cHA-GW
8	E3	bZIP	At1g68640	p35S-cHA-GW
8	E4	bZIP	At1g77920	p35S-cHA-GW
8	E5	bZIP	At5g06839	p35S-cHA-GW
9	A1	MYB	At1G06180	p35S-cHA-GW
9	A2	MYB	At1G08810	p35S-cHA-GW
9	A3	MYB	At1G09540	p35S-cHA-GW
9	A4	MYB	At1G09770	p35S-cHA-GW
9	A5	MYB	At1G17950	p35S-cHA-GW
9	A6	MYB	At1G18570	p35S-cHA-GW
9	A7	MYB	At1G18710	p35S-cHA-GW
9	A8	MYB	At1G22640	p35S-cHA-GW
9	A9	MYB	At1G25340	p35S-cHA-GW
9	A10	MYB	At1G26780	p35S-cHA-GW
9	A11	MYB	At1G34670	p35S-cHA-GW
9	A12	MYB	At1G48000	p35S-cHA-GW
9	B1	MYB	At1G49010	p35S-cHA-GW
9	B2	MYB	At1G56650	p35S-cHA-GW
9	B3	MYB	At1G63910	p35S-cHA-GW
9	B4	MYB	At1G66230	p35S-cHA-GW
9	B5	MYB	At1G66370	p35S-cHA-GW
9	B6	MYB	At1G66380	p35S-cHA-GW
9	B7	MYB	At1G68320	p35S-cHA-GW
9	B8	MYB	At1G73410	p35S-cHA-GW
9	B9	MYB	At1G74430	p35S-cHA-GW
9	B10	MYB	At1G74650	p35S-cHA-GW
9	B11	MYB	At1G79180	p35S-cHA-GW
9	B12	MYB	At2G16720	p35S-cHA-GW
9	C1	MYB	At2G23290	p35S-cHA-GW
9	C2	MYB	At2G31180	p35S-cHA-GW
9	C3	MYB	At2G32460	p35S-cHA-GW
9	C4	MYB	At2G36890	p35S-cHA-GW
9	C5	MYB	At2G37630	p35S-cHA-GW
9	C6	MYB	At2G38090	p35S-cHA-GW
9	C7	MYB	At3G09230	p35S-cHA-GW
9	C8	MYB	At3G09370	p35S-cHA-GW
9	C9	MYB	At3G10590	p35S-cHA-GW
9	C10	MYB	At3G11280	p35S-cHA-GW
9	C11	MYB	At3G11440	p35S-cHA-GW
9	C12	MYB	At3G12720	p35S-cHA-GW
9	D1	MYB	At3G12820	p35S-cHA-GW
9	D2	MYB	At3G13540	p35S-cHA-GW
9	D3	MYB	At3G23250	p35S-cHA-GW
9	D4	MYB	At3G24310	p35S-cHA-GW
9	D5	MYB	At3G27785	p35S-cHA-GW
9	D6	MYB	At3G27810	p35S-cHA-GW
9	D7	MYB	At3G27920	p35S-cHA-GW
9	D8	MYB	At3G28470	p35S-cHA-GW
9	D9	MYB	At3G28910	p35S-cHA-GW
9	D10	MYB	At3G30210	p35S-cHA-GW
9	D11	MYB	At3G46130	p35S-cHA-GW
9	D12	MYB	At3G47600	p35S-cHA-GW
9	E1	MYB	At3G48920	p35S-cHA-GW
9	E2	MYB	At3G49690	p35S-cHA-GW
9	E3	MYB	At3G50060	p35S-cHA-GW
9	E4	MYB	At3G53200	p35S-cHA-GW
9	E5	MYB	At3G55730	p35S-cHA-GW
9	E6	MYB	At3G61250	p35S-cHA-GW
9	E7	MYB	At3G62610	p35S-cHA-GW

9	E8	MYB	At4G05100	p35S-cHA-GW
9	E9	MYB	At4G09460	p35S-cHA-GW
9	E10	MYB	At4G13480	p35S-cHA-GW
9	E11	MYB	At4G21440	p35S-cHA-GW
9	E12	MYB	At4G22680	p35S-cHA-GW
9	F1	MYB	At4G25560	p35S-cHA-GW
9	F2	MYB	At4G28110	p35S-cHA-GW
9	F3	MYB	At4G33450	p35S-cHA-GW
9	F4	MYB	At4G34990	p35S-cHA-GW
9	F5	MYB	At4G37260	p35S-cHA-GW
9	F6	MYB	At4G37780	p35S-cHA-GW
9	F7	MYB	At2G47460	p35S-cHA-GW
9	F8	MYB	At3G01140	p35S-cHA-GW
9	F9	MYB	At3G01530	p35S-cHA-GW
9	F10	MYB	At3G06490	p35S-cHA-GW
9	F11	MYB	At3G08500	p35S-cHA-GW
9	F12	MYB	At5G02320	p35S-cHA-GW
9	G1	MYB	At5G05790	p35S-cHA-GW
9	G2	MYB	At5G06110	p35S-cHA-GW
9	G3	MYB	At5G07690	p35S-cHA-GW
9	G4	MYB	At5G07700	p35S-cHA-GW
9	G5	MYB	At5G10280	p35S-cHA-GW
9	G6	MYB	At5G11050	p35S-cHA-GW
9	G7	MYB	At5G11510	p35S-cHA-GW
9	G8	MYB	At5G12870	p35S-cHA-GW
9	G9	MYB	At5G14340	p35S-cHA-GW
9	G10	MYB	At5G14750	p35S-cHA-GW
9	G11	MYB	At5G15310	p35S-cHA-GW
9	G12	MYB	At5G16600	p35S-cHA-GW
9	H1	MYB	At5G16770	p35S-cHA-GW
9	H2	MYB	At5G17800	p35S-cHA-GW
9	H3	MYB	At5G23000	p35S-cHA-GW
9	H4	MYB	At5G26660	p35S-cHA-GW
9	H5	MYB	At5G35550	p35S-cHA-GW
9	H6	MYB	At5G40330	p35S-cHA-GW
9	H7	MYB	At5G40350	p35S-cHA-GW
9	H8	MYB	At5G40360	p35S-cHA-GW
9	H9	MYB	At5G45420	p35S-cHA-GW
9	H10	MYB	At5G49330	p35S-cHA-GW
9	H11	MYB	At5G52260	p35S-cHA-GW
9	H12	MYB	At5G52600	p35S-cHA-GW
10	A1	MYB	At5G54230	p35S-cHA-GW
10	A2	MYB	At5G56110	p35S-cHA-GW
10	A3	MYB	At5G57620	p35S-cHA-GW
10	A4	MYB	At5G58900	p35S-cHA-GW
10	A5	MYB	At5G59780	p35S-cHA-GW
10	A6	MYB	At5G60890	p35S-cHA-GW
10	A7	MYB	At5G61420	p35S-cHA-GW
10	A8	MYB	At5G62470	p35S-cHA-GW
10	A9	MYB	At5G65230	p35S-cHA-GW
10	A10	MYB	At4G01680	p35S-cHA-GW
10	A11	MYB	At2G26960	p35S-cHA-GW
10	A12	MYB	At5G62320	p35S-cHA-GW
10	B1	MYB-related	At1g01380	p35S-cHA-GW
10	B2	MYB-related	At1g01520	p35S-cHA-GW
10	B3	MYB-related	At1g06910	p35S-cHA-GW
10	B4	MYB-related	At1g09710	p35S-cHA-GW
10	B5	MYB-related	At1g15720	p35S-cHA-GW
10	B6	MYB-related	At1g17460	p35S-cHA-GW
10	B7	MYB-related	At1g18330	p35S-cHA-GW
10	B8	MYB-related	At1g58220	p35S-cHA-GW

10	B9	MYB-related	At1g71030	p35S-cHA-GW
10	B10	MYB-related	At1g72650	p35S-cHA-GW
10	B11	MYB-related	At1g74840	p35S-cHA-GW
10	B12	MYB-related	At2g13960	p35S-cHA-GW
10	C1	MYB-related	At2g30420	p35S-cHA-GW
10	C2	MYB-related	At2g36960	p35S-cHA-GW
10	C3	MYB-related	At2g46410	p35S-cHA-GW
10	C4	MYB-related	At2g46830	p35S-cHA-GW
10	C5	MYB-related	At3g16350	p35S-cHA-GW
10	C6	MYB-related	At3g21440	p35S-cHA-GW
10	C7	MYB-related	At3g49850	p35S-cHA-GW
10	C8	MYB-related	At4g01060	p35S-cHA-GW
10	C9	MYB-related	At4g01280	p35S-cHA-GW
10	C10	MYB-related	At4g39160	p35S-cHA-GW
10	C11	MYB-related	At4g39250	p35S-cHA-GW
10	C12	MYB-related	At5g02840	p35S-cHA-GW
10	D1	MYB-related	At5g37260	p35S-cHA-GW
10	D2	MYB-related	At5g47390	p35S-cHA-GW
10	D3	MYB-related	At5g52660	p35S-cHA-GW
10	D4	MYB-related	At5g53200	p35S-cHA-GW
10	D5	MYB-related	At5g56840	p35S-cHA-GW
10	D6	MYB-related	At5g67580	p35S-cHA-GW
11	A1	C2H2	At1g66140	p35S-cHA-GW
11	A2	C2H3	At1g67030	p35S-cHA-GW
11	A3	C2H4	At1g72050	p35S-cHA-GW
11	A4	C2H5	At1g75710	p35S-cHA-GW
11	A5	C2H6	At1g80730	p35S-cHA-GW
11	A6	C2H7	At2g02070	p35S-cHA-GW
11	A7	C2H8	At2g02080	p35S-cHA-GW
11	A8	C2H9	At3g23140	p35S-cHA-GW
11	A9	C2H10	At1g02030	p35S-cHA-GW
11	A10	C2H11	At1g02040	p35S-cHA-GW
11	A11	C2H12	At1g03840	p35S-cHA-GW
11	A12	C2H13	At1g11490	p35S-cHA-GW
11	B1	C2H14	At1g24625	p35S-cHA-GW
11	B2	C2H15	At1g26590	p35S-cHA-GW
11	B3	C2H16	At1g26610	p35S-cHA-GW
11	B4	C2H17	At1g27730	p35S-cHA-GW
11	B5	C2H18	At1g30970	p35S-cHA-GW
11	B6	C2H19	At1g34370	p35S-cHA-GW
11	B7	C2H20	At1g68130	p35S-cHA-GW
11	B8	C2H21	At2g01940	p35S-cHA-GW
11	B9	C2H22	At2g26940	p35S-cHA-GW
11	B10	C2H23	At2g28200	p35S-cHA-GW
11	B11	C2H24	At2g28710	p35S-cHA-GW
11	B12	C2H25	At3g01030	p35S-cHA-GW
11	C1	C2H26	At3g13810	p35S-cHA-GW
11	C2	C2H27	At3g27970	p35S-cHA-GW
11	C3	C2C2-GATA	At3g06740	p35S-cHA-GW
11	C4	C2C2-GATA	At3g16870	p35S-cHA-GW
11	C5	C2C2-GATA	At3g24050	p35S-cHA-GW
11	C6	C2C2-GATA	At3g45170	p35S-cHA-GW
11	C7	C2C2-GATA	At3g51080	p35S-cHA-GW
11	C8	C2C2-GATA	At3g54810	p35S-cHA-GW
11	C9	C2C2-GATA	At3g60530	p35S-cHA-GW
11	C10	C2C2-GATA	At4g36240	p35S-cHA-GW
11	C11	C2C2-GATA	At4g36620	p35S-cHA-GW
11	C12	C2C2-GATA	At5g26930	p35S-cHA-GW
11	D1	C2C2-GATA	At5g49300	p35S-cHA-GW
11	D2	C2C2-GATA	At5g56860	p35S-cHA-GW
11	D3	C2C2-GATA	At1g08000	p35S-cHA-GW

11	D4	C2C2-GATA	At1g08010	p35S-cHA-GW
11	D5	C2C2-GATA	At4g32890	p35S-cHA-GW
11	D6	C2C2-GATA	At4g26150	p35S-cHA-GW
11	D7	C2C2-GATA	At5g25830	p35S-cHA-GW
11	D8	C2C2-GATA	At5g66320	p35S-cHA-GW
11	D9	C2C2-GATA	At4g34680	p35S-cHA-GW
11	D10	C2C2-CO-like	At5g15840	p35S-cHA-GW
11	D11	C2C2-CO-like	At3g02380	p35S-cHA-GW
11	D12	C2C2-CO-like	At5g24930	p35S-cHA-GW
11	E1	C2C2-CO-like	At2g24790	p35S-cHA-GW
11	E2	C2C2-CO-like	At5g57660	p35S-cHA-GW
11	E3	C2C2-CO-like	At1g68520	p35S-cHA-GW
11	E4	C2C2-CO-like	At1g73870	p35S-cHA-GW
11	E5	C2C2-CO-like	At1g25440	p35S-cHA-GW
11	E6	C2C2-CO-like	At2g33500	p35S-cHA-GW
11	E7	ZIM	At1G51600	p35S-cHA-GW
11	E8	ZF-HD 1	At3g50890	p35S-cHA-GW
12	A1	MADS	At3g04100	p35S-cHA-GW
12	A2	MADS	At3g30260	p35S-cHA-GW
12	A3	MADS	At3g57230	p35S-cHA-GW
12	A4	MADS	At3g58780	p35S-cHA-GW
12	A5	MADS	At3g66656	p35S-cHA-GW
12	A6	MADS	At4g37940	p35S-cHA-GW
12	A7	MADS	At5g10140	p35S-cHA-GW
12	A8	MADS	At5g13790	p35S-cHA-GW
12	A9	MADS	At5g15800	p35S-cHA-GW
12	A10	MADS	At5g23260	p35S-cHA-GW
12	A11	MADS	At5g26630	p35S-cHA-GW
12	A12	MADS	At5g26870	p35S-cHA-GW
12	B1	MADS	At5g27050	p35S-cHA-GW
12	B2	MADS	At5g27070	p35S-cHA-GW
12	B3	MADS	At5g27090	p35S-cHA-GW
12	B4	MADS	At5g27130	p35S-cHA-GW
12	B5	MADS	At5g38620	p35S-cHA-GW
12	B6	MADS	At5g38740	p35S-cHA-GW
12	B7	MADS	At5g39750	p35S-cHA-GW
12	B8	MADS	At5g39810	p35S-cHA-GW
12	B9	MADS	At5g49420	p35S-cHA-GW
12	B10	MADS	At5g49490	p35S-cHA-GW
12	B11	MADS	At5g51870	p35S-cHA-GW
12	B12	MADS	At5g60910	p35S-cHA-GW
12	C1	MADS	At5g65070	p35S-cHA-GW
12	C2	MADS	At5g65330	p35S-cHA-GW
12	C3	MADS	At1g22590	p35S-cHA-GW
12	C4	MADS	At1g48150	p35S-cHA-GW
12	C5	MADS	At1g59810	p35S-cHA-GW
12	C6	MADS	At1g60040	p35S-cHA-GW
12	C7	MADS	At1g65300	p35S-cHA-GW
12	C8	MADS	At1g65330	p35S-cHA-GW
12	C9	MADS	At1g65360	p35S-cHA-GW
12	C10	MADS	At1g69120	p35S-cHA-GW
12	C11	MADS	At2g34440	p35S-cHA-GW
12	C12	MADS	At1g31640	p35S-cHA-GW
12	D1	MADS	At5g65080	p35S-cHA-GW
13	A1	TF-Mix	At3g15170	p35S-cHA-GW
13	A2	TF-Mix	At3g29035	p35S-cHA-GW
13	A3	TF-Mix	At5g46590	p35S-cHA-GW
13	A4	TF-Mix	At1g13450	p35S-cHA-GW
13	A5	TF-Mix	At1g49560	p35S-cHA-GW
13	A6	TF-Mix	At1g55050	p35S-cHA-GW
13	A7	TF-Mix	At1g63850	p35S-cHA-GW

13	A8	TF-Mix	At1g65580	p35S-cHA-GW
13	A9	TF-Mix	At1g76880	p35S-cHA-GW
13	A10	TF-Mix	At1g76890	p35S-cHA-GW
13	A11	TF-Mix	At2g03500	p35S-cHA-GW
13	A12	TF-Mix	At2g13690	p35S-cHA-GW
13	B1	TF-Mix	At2g20400	p35S-cHA-GW
13	B2	TF-Mix	At2g33550	p35S-cHA-GW
13	B3	TF-Mix	At2g38250	p35S-cHA-GW
13	B4	TF-Mix	At2g42660	p35S-cHA-GW
13	B5	TF-Mix	At3g10000	p35S-cHA-GW
13	B6	TF-Mix	At3g12730	p35S-cHA-GW
13	B7	TF-Mix	At3g19670	p35S-cHA-GW
13	B8	TF-Mix	At3g25990	p35S-cHA-GW
13	B9	TF-Mix	At3g27220	p35S-cHA-GW
13	B10	TF-Mix	At3g46640	p35S-cHA-GW
13	B11	TF-Mix	At3g47680	p35S-cHA-GW
13	B12	TF-Mix	At3g53440	p35S-cHA-GW
13	C1	TF-Mix	At3g56920	p35S-cHA-GW
13	C2	TF-Mix	At4g01130	p35S-cHA-GW
13	C3	TF-Mix	At4g11400	p35S-cHA-GW
13	C4	TF-Mix	At4g16420	p35S-cHA-GW
13	C5	TF-Mix	At4g17695	p35S-cHA-GW
13	C6	TF-Mix	At4g26650	p35S-cHA-GW
13	C7	TF-Mix	At4g28610	p35S-cHA-GW
13	C8	TF-Mix	At4g31270	p35S-cHA-GW
13	C9	TF-Mix	At4g33540	p35S-cHA-GW
13	C10	TF-Mix	At4g35610	p35S-cHA-GW
13	C11	TF-Mix	At4g36250	p35S-cHA-GW
13	C12	TF-Mix	At4g37240	p35S-cHA-GW
13	D1	TF-Mix	At5g01380	p35S-cHA-GW
13	D2	TF-Mix	At3g01770	p35S-cHA-GW
13	D3	TF-Mix	At3g05380	p35S-cHA-GW
13	D4	TF-Mix	At3g06400	p35S-cHA-GW
13	D5	TF-Mix	At3g07565	p35S-cHA-GW
13	D6	TF-Mix	At3g07740	p35S-cHA-GW
13	D7	TF-Mix	At3g09030	p35S-cHA-GW
13	D8	TF-Mix	At5g03680	p35S-cHA-GW
13	D9	TF-Mix	At5g05090	p35S-cHA-GW
13	D10	TF-Mix	At5g07670	p35S-cHA-GW
13	D11	TF-Mix	At5g10940	p35S-cHA-GW
13	D12	TF-Mix	At5g16560	p35S-cHA-GW
13	E1	TF-Mix	At5g17780	p35S-cHA-GW
13	E2	TF-Mix	At5g28300	p35S-cHA-GW
13	E3	TF-Mix	At5g37260	p35S-cHA-GW
13	E4	TF-Mix	At5g42630	p35S-cHA-GW
13	E5	TF-Mix	At5g44190	p35S-cHA-GW
13	E6	TF-Mix	At5g47660	p35S-cHA-GW
13	E7	TF-Mix	At5g59430	p35S-cHA-GW
13	E8	TF-Mix	At5g59570	p35S-cHA-GW
13	E9	TF-Mix	At5g60050	p35S-cHA-GW
13	E10	TF-Mix	At1g43950	p35S-cHA-GW
13	E11	TF-Mix	At2g33860	p35S-cHA-GW
13	E12	TF-Mix	At5g20730	p35S-cHA-GW
13	F1	TF-Mix	At1g19850	p35S-cHA-GW
13	F2	TF-Mix	At3g61830	p35S-cHA-GW
13	F3	TF-Mix	At3g42790	p35S-cHA-GW
13	F4	TF-Mix	At3g11200	p35S-cHA-GW
13	F5	TF-Mix	At5g05610	p35S-cHA-GW
13	F6	TF-Mix	At3g23030	p35S-cHA-GW
13	F7	TF-Mix	At1g15580	p35S-cHA-GW
13	F8	TF-Mix	At2g33310	p35S-cHA-GW

13	F9	TF-Mix	At1g80390	p35S-cHA-GW
13	F10	TF-Mix	At3g17600	p35S-cHA-GW
13	F11	TF-Mix	At4g28640	p35S-cHA-GW
13	F12	TF-Mix	At5g43700	p35S-cHA-GW
13	G1	TF-Mix	At1g73730	p35S-cHA-GW
13	G2	TF-Mix	At5g10120	p35S-cHA-GW
13	G3	TF-Mix	At5g66700	p35S-cHA-GW
13	G4	TF-Mix	At2g28610	p35S-cHA-GW
13	G5	TF-Mix	At2g33880	p35S-cHA-GW
13	G6	TF-Mix	At3g01220	p35S-cHA-GW
13	G7	TF-Mix	At4g37790	p35S-cHA-GW
13	G8	TF-Mix	At1g20700	p35S-cHA-GW
13	G9	TF-Mix	At2g01500	p35S-cHA-GW
13	G10	TF-Mix	At2g22430	p35S-cHA-GW
13	G11	TF-Mix	At3g18010	p35S-cHA-GW
13	G12	TF-Mix	At4g34610	p35S-cHA-GW
13	H1	TF-Mix	At4g36870	p35S-cHA-GW
13	H2	TF-Mix	At3g57670	p35S-cHA-GW
13	H3	TF-Mix	At3g58070	p35S-cHA-GW
13	H4	TF-Mix	At4g39920	p35S-cHA-GW
13	H5	TF-Mix	At5g04340	p35S-cHA-GW
13	H6	TF-Mix	At5g15480	p35S-cHA-GW
13	H7	TF-Mix	At5g25160	p35S-cHA-GW
13	H8	TF-Mix	At5g40710	p35S-cHA-GW
14	A1	TF-Mix	At5g57520	p35S-cHA-GW
14	A2	TF-Mix	At5g59820	p35S-cHA-GW
14	A3	TF-Mix	At5g53040	p35S-cHA-GW
14	A4	TF-Mix	At5g66990	p35S-cHA-GW
14	A5	TF-Mix	At4g29110	p35S-cHA-GW
14	A6	TF-Mix	At4g29680	p35S-cHA-GW
14	A7	TF-Mix	At5g09750	p35S-cHA-GW
14	A8	TF-Mix	At4g38660	p35S-cHA-GW
14	A9	TF-Mix	At4g29470	p35S-cHA-GW
14	A10	TF-Mix	At2g43010	p35S-cHA-GW
14	A11	TF-Mix	At1g30210	p35S-cHA-GW
14	A12	TF-Mix	At1g67260	p35S-cHA-GW
14	B1	TF-Mix	At1g68800	p35S-cHA-GW
14	B2	TF-Mix	At1g69690	p35S-cHA-GW
14	B3	TF-Mix	At1g72010	p35S-cHA-GW
14	B4	TF-Mix	At2g31070	p35S-cHA-GW
14	B5	TF-Mix	At2g45680	p35S-cHA-GW
14	B6	TF-Mix	At3g02150	p35S-cHA-GW
14	B7	TF-Mix	At3g15030	p35S-cHA-GW
14	B8	TF-Mix	At3g27010	p35S-cHA-GW
14	B9	TF-Mix	At3g47620	p35S-cHA-GW
14	B10	TF-Mix	At4g18390	p35S-cHA-GW
14	B11	TF-Mix	At5g08070	p35S-cHA-GW
14	B12	TF-Mix	At5g08330	p35S-cHA-GW
14	C1	TF-Mix	At5g41030	p35S-cHA-GW
14	C2	TF-Mix	At1g77570	p35S-cHA-GW
14	C3	TF-Mix	At1g32330	p35S-cHA-GW
14	C4	TF-Mix	At2g41690	p35S-cHA-GW
14	C5	TF-Mix	At3g02990	p35S-cHA-GW
14	C6	TF-Mix	At3g22830	p35S-cHA-GW
14	C7	TF-Mix	At3g24520	p35S-cHA-GW
14	C8	TF-Mix	At3g51910	p35S-cHA-GW
14	C9	TF-Mix	At5g43840	p35S-cHA-GW
14	C10	TF-Mix	At5g45710	p35S-cHA-GW
14	C11	TF-Mix	At5g62020	p35S-cHA-GW
14	C12	TF-Mix	At1g27360	p35S-cHA-GW
14	D1	TF-Mix	At1g27370	p35S-cHA-GW

14	D2	TF-Mix	At1g53160	p35S-cHA-GW
14	D3	TF-Mix	At2g33810	p35S-cHA-GW
14	D4	TF-Mix	At2g42200	p35S-cHA-GW
14	D5	TF-Mix	At3g57920	p35S-cHA-GW
14	D6	TF-Mix	At5g18830	p35S-cHA-GW
14	D7	TF-Mix	At5g50570	p35S-cHA-GW
14	D8	TF-Mix	At5g50670	p35S-cHA-GW
14	D9	TF-Mix	At1g16070	p35S-cHA-GW
14	D10	TF-Mix	At1g25280	p35S-cHA-GW
14	D11	TF-Mix	At1g43640	p35S-cHA-GW
14	D12	TF-Mix	At1g53320	p35S-cHA-GW
14	E1	TF-Mix	At2g47900	p35S-cHA-GW
14	E2	TF-Mix	At3g06380	p35S-cHA-GW
14	E3	TF-Mix	At5g18680	p35S-cHA-GW
14	E4	TF-Mix	At1g13260	p35S-cHA-GW
14	E5	TF-Mix	At1g50680	p35S-cHA-GW
14	E6	TF-Mix	At1g51120	p35S-cHA-GW
14	E7	TF-Mix	At1g68840	p35S-cHA-GW
14	E8	TF-Mix	At3g25730	p35S-cHA-GW
14	E9	TF-Mix	At1g15360	p35S-cHA-GW
14	E10	TF-Mix	At5g11190	p35S-cHA-GW
14	E11	TF-Mix	At5g25190	p35S-cHA-GW
14	E12	TF-Mix	At1g51190	p35S-cHA-GW
14	F1	TF-Mix	At1g79700	p35S-cHA-GW
14	F2	TF-Mix	At2g28550	p35S-cHA-GW
14	F3	TF-Mix	At3g20840	p35S-cHA-GW
14	F4	TF-Mix	At5g17430	p35S-cHA-GW
14	F5	TF-Mix	At5g65510	p35S-cHA-GW
14	F6	TF-Mix	At5g67180	p35S-cHA-GW
14	F7	TF-Mix	At1g47870	p35S-cHA-GW
14	F8	TF-Mix	At4g36920	p35S-cHA-GW
14	F9	TF-Mix	At2g44840	p35S-cHA-GW
14	F10	TF-Mix	At3g54990	p35S-cHA-GW
14	F11	TF-Mix	At2g41710	p35S-cHA-GW
14	F12	TF-Mix	At4g37750	p35S-cHA-GW
14	G1	TF-Mix	At5g10510	p35S-cHA-GW
14	G2	TF-Mix	At1g25550	p35S-cHA-GW
14	G3	TF-Mix	At1g67710	p35S-cHA-GW
14	G4	TF-Mix	At1g68670	p35S-cHA-GW
14	G5	TF-Mix	At1g69580	p35S-cHA-GW
14	G6	TF-Mix	At2g01760	p35S-cHA-GW
14	G7	TF-Mix	At2g20570	p35S-cHA-GW
14	G8	TF-Mix	At2g38300	p35S-cHA-GW
14	G9	TF-Mix	At3g16857	p35S-cHA-GW
14	G10	TF-Mix	At3g24120	p35S-cHA-GW
14	G11	TF-Mix	At3g25790	p35S-cHA-GW
14	G12	TF-Mix	At4g04580	p35S-cHA-GW
14	H1	TF-Mix	At4g13640	p35S-cHA-GW
14	H2	TF-Mix	At4g18020	p35S-cHA-GW
14	H3	TF-Mix	At4g31920	p35S-cHA-GW
14	H4	TF-Mix	At4g37180	p35S-cHA-GW
14	H5	TF-Mix	At5g18240	p35S-cHA-GW
14	H6	TF-Mix	At5g29000	p35S-cHA-GW
14	H7	TF-Mix	At5g58080	p35S-cHA-GW
14	H8	TF-Mix	At1g03790	p35S-cHA-GW
14	H9	TF-Mix	At1g04990	p35S-cHA-GW
14	H10	TF-Mix	At1g07360	p35S-cHA-GW
14	H11	TF-Mix	At1g27650	p35S-cHA-GW
14	H12	TF-Mix	At1g68200	p35S-cHA-GW
15	A1	TF-Mix	At2g02160	p35S-cHA-GW
15	A2	TF-Mix	At2g05160	p35S-cHA-GW

15	A3	TF-Mix	At2g25900	p35S-cHA-GW
15	A4	TF-Mix	At3g06410	p35S-cHA-GW
15	A5	TF-Mix	At3g27700	p35S-cHA-GW
15	A6	TF-Mix	At3g47120	p35S-cHA-GW
15	A7	TF-Mix	At3g48440	p35S-cHA-GW
15	A8	TF-Mix	At3g51950	p35S-cHA-GW
15	A9	TF-Mix	At3g55980	p35S-cHA-GW
15	A10	TF-Mix	At4g29190	p35S-cHA-GW
15	A11	TF-Mix	At5g06420	p35S-cHA-GW
15	A12	TF-Mix	At5g06770	p35S-cHA-GW
15	B1	TF-Mix	At5g07500	p35S-cHA-GW
15	B2	TF-Mix	At5g16540	p35S-cHA-GW
15	B3	TF-Mix	At5g44260	p35S-cHA-GW
15	B4	TF-Mix	At5g63260	p35S-cHA-GW
15	B5	TF-Mix	At3g50650	p35S-cHA-GW
15	B6	TF-Mix	At3g60630	p35S-cHA-GW
15	B7	TF-Mix	At4g36710	p35S-cHA-GW
15	B8	TF-Mix	At3g13840	p35S-cHA-GW
15	B9	TF-Mix	At4g37650	p35S-cHA-GW
15	B10	TF-Mix	At4g00150	p35S-cHA-GW
15	B11	TF-Mix	At3g49950	p35S-cHA-GW
15	B12	TF-Mix	At3g20910	p35S-cHA-GW
15	C1	TF-Mix	At1g54830	p35S-cHA-GW
15	C2	TF-Mix	At2g34720	p35S-cHA-GW
15	C3	TF-Mix	At2g37060	p35S-cHA-GW
15	C4	TF-Mix	At1g07520	p35S-cHA-GW
15	C5	TF-Mix	At5g17490	p35S-cHA-GW
15	C6	TF-Mix	At2g27220	p35S-cHA-GW
15	C7	TF-Mix	At2g37120	p35S-cHA-GW
15	C8	TF-Mix	At5g42820	p35S-cHA-GW
15	C9	TF-Mix	At5g46730	p35S-cHA-GW
15	C10	TF-Mix	At4g31060	p35S-cHA-GW
15	C11	TF-Mix	At5g23280	p35S-cHA-GW
15	C12	TF-Mix	At5g51910	p35S-cHA-GW
15	D1	TF-Mix	At2g37000	p35S-cHA-GW
15	D2	TF-Mix	At5g23090	p35S-cHA-GW
15	D3	TF-Mix	At3g12130	p35S-cHA-GW
15	D4	TF-Mix	At2g41900	p35S-cHA-GW
15	D5	TF-Mix	At2g15660	p35S-cHA-GW
15	D6	TF-Mix	At1g46408	p35S-cHA-GW
15	D7	TF-Mix	At1g69120	p35S-cHA-GW
15	D8	TF-Mix	At1g26870	p35S-cHA-GW
15	D9	TF-Mix	At2g47620	p35S-cHA-GW
15	D10	TF-Mix	At5g04110	p35S-cHA-GW
15	D11	TF-Mix	At4g30080	p35S-cHA-GW
15	D12	TF-Mix	At2g28350	p35S-cHA-GW
15	E1	TF-Mix	At4g23980	p35S-cHA-GW
15	E2	TF-Mix	At5g37020	p35S-cHA-GW
15	E3	TF-Mix	At3g62100	p35S-cHA-GW
15	E4	TF-Mix	At4g14550	p35S-cHA-GW
15	E5	TF-Mix	At1g04100	p35S-cHA-GW
15	E6	TF-Mix	At1g04250	p35S-cHA-GW
15	E7	TF-Mix	At3g23050	p35S-cHA-GW
15	E8	TF-Mix	At3g04730	p35S-cHA-GW
15	E9	TF-Mix	At4g29080	p35S-cHA-GW
15	E11	TF-Mix	At3g16500	p35S-cHA-GW
15	E12	TF-Mix	At1g51950	p35S-cHA-GW
15	F1	TF-Mix	At4g32280	p35S-cHA-GW
15	F2	TF-Mix	At3g20770	p35S-cHA-GW
15	F3	TF-Mix	At2g27050	p35S-cHA-GW
15	F4	TF-Mix	At5g21120	p35S-cHA-GW

15	F5	TF-Mix	At3g11260	p35S-cHA-GW
15	F6	TF-Mix	At3g61890	p35S-cHA-GW
15	F7	TF-Mix	At1g26960	p35S-cHA-GW
15	F8	TF-Mix	At4g35550	p35S-cHA-GW
15	F9	TF-Mix	At4g36660	p35S-cHA-GW
15	F10	TF-Mix	At4g36740	p35S-cHA-GW
15	F11	TF-Mix	At4g40060	p35S-cHA-GW
15	F12	TF-Mix	At5g03790	p35S-cHA-GW
15	G1	TF-Mix	At5g65310	p35S-cHA-GW
15	G2	TF-Mix	At1g69780	p35S-cHA-GW
15	G3	TF-Mix	At2g01430	p35S-cHA-GW
15	G4	TF-Mix	At3g01470	p35S-cHA-GW
15	G5	TF-Mix	At3g60390	p35S-cHA-GW
15	G6	TF-Mix	At1g04850	p35S-cHA-GW
15	G7	TF-Mix	At1g43860	p35S-cHA-GW
15	G8	TF-Mix	At5g43620	p35S-cHA-GW
15	G9	TF-Mix	At1g55460	p35S-cHA-GW
15	G10	TF-Mix	At1g55700	p35S-cHA-GW
15	G11	TF-Mix	At1g66500	p35S-cHA-GW
15	G12	TF-Mix	At2g01530	p35S-cHA-GW
15	H1	TF-Mix	At5g44160	p35S-cHA-GW
15	H2	TF-Mix	At3g05760	p35S-cHA-GW
15	H3	TF-Mix	At3g46070	p35S-cHA-GW
15	H4	TF-Mix	At3g46080	p35S-cHA-GW
15	H5	TF-Mix	At3g46090	p35S-cHA-GW
15	H6	TF-Mix	At3g49930	p35S-cHA-GW
15	H7	TF-Mix	At3g53600	p35S-cHA-GW
15	H8	TF-Mix	At3g53820	p35S-cHA-GW
15	H9	TF-Mix	At3g57480	p35S-cHA-GW
15	H10	TF-Mix	At3g62240	p35S-cHA-GW
15	H11	TF-Mix	At2g22670	p35S-cHA-GW
16	A1	bHLH	At1g01260	p35S-cHA-GW
16	A2	bHLH	At1g32640	p35S-cHA-GW
16	A3	bHLH	At3g06590	p35S-cHA-GW
16	A4	bHLH	At3g21330	p35S-cHA-GW
16	A5	bHLH	At3g50330	p35S-cHA-GW
16	A6	bHLH	At4g00120	p35S-cHA-GW
16	A7	bHLH	At5g67060	p35S-cHA-GW
16	A8	bHLH	At1g68810	p35S-cHA-GW
16	A9	bHLH	At1g74500	p35S-cHA-GW
16	A10	bHLH	At2g31210	p35S-cHA-GW
16	A11	bHLH	At2g41130	p35S-cHA-GW
16	A12	bHLH	At3g25710	p35S-cHA-GW
16	B1	bHLH	At3g56770	p35S-cHA-GW
16	B2	bHLH	At3g56970	p35S-cHA-GW
16	B3	bHLH	At3g56980	p35S-cHA-GW
16	B4	bHLH	At4g37850	p35S-cHA-GW
16	B5	bHLH	At1g06170	p35S-cHA-GW
16	B6	bHLH	At1g12540	p35S-cHA-GW
16	B7	bHLH	At1g22490	p35S-cHA-GW
16	B8	bHLH	At1g72210	p35S-cHA-GW
16	B9	bHLH	At2g28160	p35S-cHA-GW
16	B10	bHLH	At3g06120	p35S-cHA-GW
16	B11	bHLH	At3g24140	p35S-cHA-GW
16	B12	bHLH	At4g01460	p35S-cHA-GW
16	C1	bHLH	At5g04150	p35S-cHA-GW
16	C2	bHLH	At5g43650	p35S-cHA-GW
16	C3	bHLH	At5g51780	p35S-cHA-GW
16	C4	bHLH	At5g65320	p35S-cHA-GW
16	C5	bHLH	At1g02340	p35S-cHA-GW
16	C6	bHLH	At3g19860	p35S-cHA-GW

16	C7	bHLH	At3g23210	p35S-cHA-GW
16	C8	bHLH	At3g47640	p35S-cHA-GW
16	C9	bHLH	At3g61950	p35S-cHA-GW
16	C10	bHLH	At4g29930	p35S-cHA-GW
16	C11	bHLH	At5g10570	p35S-cHA-GW
16	C12	bHLH	At5g53210	p35S-cHA-GW
16	D1	bHLH	At5g62610	p35S-cHA-GW
16	D2	bHLH	At1g03040	p35S-cHA-GW
16	D3	bHLH	At1g09530	p35S-cHA-GW
16	D4	bHLH	At1g25330	p35S-cHA-GW
16	D5	bHLH	At1g26260	p35S-cHA-GW
16	D6	bHLH	At1g51140	p35S-cHA-GW
16	D7	bHLH	At1g59640	p35S-cHA-GW
16	D8	bHLH	At1g61660	p35S-cHA-GW
16	D9	bHLH	At1g66470	p35S-cHA-GW
16	D10	bHLH	At1g68920	p35S-cHA-GW
16	D11	bHLH	At1g69010	p35S-cHA-GW
16	D12	bHLH	At3g07340	p35S-cHA-GW
16	E1	bHLH	At3g23690	p35S-cHA-GW
16	E2	bHLH	At3g57800	p35S-cHA-GW
16	E3	bHLH	At4g00050	p35S-cHA-GW
16	E4	bHLH	At4g00480	p35S-cHA-GW
16	E5	bHLH	At4g02590	p35S-cHA-GW
16	E6	bHLH	At4g09180	p35S-cHA-GW
16	E7	bHLH	At4g09820	p35S-cHA-GW
16	E8	bHLH	At5g08130	p35S-cHA-GW
16	E9	bHLH	At5g37800	p35S-cHA-GW
16	E10	bHLH	At5g38860	p35S-cHA-GW
16	E8	bHLH	At5g48560	p35S-cHA-GW
16	E9	bHLH	At5g54680	p35S-cHA-GW
16	F1	bHLH	At5g58010	p35S-cHA-GW
16	F2	bHLH	At5g61270	p35S-cHA-GW
17	A1	TF-Mix	At1g04880	p35S-cHA-GW
17	A2	TF-Mix	At4g11080	p35S-cHA-GW
17	A3	TF-Mix	At4g35570	p35S-cHA-GW
17	A4	TF-Mix	At5g47370	p35S-cHA-GW
17	A5	TF-Mix	At5g41410	p35S-cHA-GW
17	A7	TF-Mix	At5g05770	p35S-cHA-GW
17	A8	TF-Mix	At4g20400	p35S-cHA-GW
17	A9	TF-Mix	At5g66350	p35S-cHA-GW
17	A10	TF-Mix	At3g51060	p35S-cHA-GW
17	A11	TF-Mix	At4g36260	p35S-cHA-GW
17	A12	TF-Mix	At2g21400	p35S-cHA-GW
17	B1	TF-Mix	At4g27330	p35S-cHA-GW
17	B2	TF-Mix	At1g32730	p35S-cHA-GW
17	B3	TF-Mix	At1g71260	p35S-cHA-GW
17	B4	TF-Mix	At5g63280	p35S-cHA-GW
17	B5	TF-Mix	At2g41630	p35S-cHA-GW
17	B6	TF-Mix	At5g66870	p35S-cHA-GW
17	B7	TF-Mix	At5g63090	p35S-cHA-GW
17	B8	TF-Mix	At3g27650	p35S-cHA-GW
17	B9	TF-Mix	At3g58190	p35S-cHA-GW
17	B10	TF-Mix	At4g00210	p35S-cHA-GW
17	B11	TF-Mix	At5g35900	p35S-cHA-GW
17	B12	TF-Mix	At4g22700	p35S-cHA-GW
17	C1	TF-Mix	At5g67420	p35S-cHA-GW
17	C2	TF-Mix	At2g47810	p35S-cHA-GW
17	C3	TF-Mix	At1g30500	p35S-cHA-GW
17	C4	TF-Mix	At3g14020	p35S-cHA-GW
17	C5	TF-Mix	At5g08190	p35S-cHA-GW
17	C6	TF-Mix	At3g12480	p35S-cHA-GW

17	C7	TF-Mix	At1g07980	p35S-cHA-GW
17	C8	TF-Mix	At5g12840	p35S-cHA-GW
17	C9	TF-Mix	At1g72830	p35S-cHA-GW
17	C10	TF-Mix	At3g05690	p35S-cHA-GW

7.6 Kollektion AD- und BD-fusionierter Transkriptionsfaktoren

Tab. 7.7: PTA-Kollektion AD- und BD-fusionierter bZIP-Transkriptionsfaktoren

At-Nr.	bZIPe-TF	AD-Expressionsvektor	BD-Expressionsvektor
At2g41070	bZIP12	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g44080	bZIP13	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g17770	bZIP27	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g49720	bZIP35	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
-	bZIP36	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g36270	bZIP39	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g03970	bZIP40	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g44460	bZIP67	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g10800	bZIP28	-	p35S-GBD-GW
At5g24800	bZIP9	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g02640	bZIP10	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g54620	bZIP25	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g28770	bZIP63	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g06950	bZIP20	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g08320	bZIP21	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g22070	bZIP22	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g06960	bZIP26	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g12250	bZIP45	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g68640	bZIP46	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g65210	bZIP47	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g77920	bZIP50	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g10030	bZIP57	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g06839	bZIP65	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g58120	bZIP61	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g35040	bZIP19	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g35530	bZIP16	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g36730	bZIP41	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g32150	bZIP68	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g11260	bZIP56	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g17609	bZIP64	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g40620	bZIP18	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g38900	bZIP29	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g21230	bZIP30	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g12900	bZIP33	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g43700	bZIP51	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g06850	bZIP52	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g31370	bZIP59	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g13130	bZIP73	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g49450	bZIP1	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g18160	bZIP2	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g15830	bZIP3	-	p35S-GBD-GW
At1g59530	bZIP4	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g49760	bZIP5	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g22850	bZIP6	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g37730	bZIP7	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At4g34590	bZIP11	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At3g30530	bZIP42	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g75390	bZIP44	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At2g04038	bZIP48	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW

At3g62420	bZIP53	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g13600	bZIP58	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At5g60830	bZIP70	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW
At1g42990	bZIP60	p35S-GAD-GW	p35S-GBD-GW

7.7 Weitere Ergebnisse aus dem Screening der AtTORF-EX-Bank

Tab.7.8: Auflistung der während des Paraquat-Screenings identifizierten TF

At-Nr.	Beschreibung	Häufigkeit im Screen
At5g49450	bZIP1	5x
At1G75390	bZIP44	5x
AT4G02200	<i>Drought-responsive family protein</i>	4x
At3G50410	DOF (OBP1)	4x
At2g31380	<i>Salt tolerance holomologue, Zink Finger</i>	3x
AT1G21340	DOF	3x
At1g16060	(ADAP)	2x
AT1G35460	<i>basic helix-loop-helix (bHLH)</i>	2x
AT1G74500	BRI1	2x
At1G08010	GATA11	2x
AT2G46960	CYP709B1/ cytochrome P450	2x
AT5G25390	AtERF#005	2x
At1g17950	MYB52	1x
At2g38340	DREB19	1x
At3g11020	DREB2b	1x
At5g43410	AtERF#096	1x
AT3G06760	<i>Drought-responsive family protein</i>	1x
AT3G47640	<i>basic helix-loop-helix (bHLH)</i>	1x
AT4G39780	AtERF#087	1x
AT5G05090	<i>Homeodomain-like superfamily protein</i>	1x
AT1G51140	<i>basic helix-loop-helix (bHLH)</i>	1x
AT1G22190	AtERF#058	1x
AT1G06070	bZIP69	1x
AT3G57800	<i>basic helix-loop-helix</i>	1x
AT3G56400	WRKY70	1x
AT5G09460	<i>sequence-specific DNA binding transcription factors</i>	1x
AT5G50010	<i>sequence-specific DNA binding transcription factors</i>	1x
AT3G24520	AT-HSFC1	1x
At5G02460	DOF	1x
At3G57980	<i>bromodomain-containing protein</i>	1x
At1G71520	AtERF#020	1x
At1G02220	ANAC003	1x
At5G47220	AtERF#101/ATERF2	1x
AT4G11660	<i>Heat Stress Transcription Factor</i>	1x
AT5G05550	<i>sequence-specific DNA binding transcription</i>	1x
AT2G25820	AtERF#042/TINY	1x
AT3G16870	GATA17	1x
AT3G29035	ANAC059	1x
AT1G44830	AtERF#014	1x

8 Abkürzungsverzeichnis

8.1 Allgemeine Abkürzungen

<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin (resistent)
AMPK	<i>AMP-activated proteine kinases</i>
ARF	<i>Auxin response factor</i>
ASN1	Asparagine Synthetase
ATP	Adenosintriphosphat
<i>AtTORF-EX</i>	<i>Arabidopsis thaliana Transcription factor ORF Over-Expression</i>
AuxRE	<i>Auxin responsive element</i>
BD	Bindedomäne
bHLH	<i>basic Helix Loop Helix</i>
bp	Basenpaare
bZIP	basischer Leucinzipper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
Col-0	Columbia-0 (<i>Arabidopsis</i> Ökotyp)
CRES-T	Chimeric repressor silencing technology
d.h.	das heißt
ddNTPs	Didesoxyribonucleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DOF	<i>DNA-binding-with-one-zinc-finger</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAR	<i>ERF-associated amphiphilic repression</i>
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERF	<i>Ethylene responsive factor</i>
et al.	und andere (et alia)
EtOH	Ethanol
GCN5	<i>General Control Nondepressible 5</i>
GRE	<i>G-box related element</i>
H ₂ O	Wasser
HA	Human influenza hemagglutinin peptid
HAT	Histone acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histone deacetylase
IAA	Indole-3-acetic acid
JA	Jasmonsäure
kb	kilo Basen(paare)
kDa	Kilodalton
KIN10	SnRK1-Kinase10
ko	<i>Knock out</i>
LB	Luria-Bertani Broth
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
LUC	Luciferase

M	Molar
MAPK	Mitogen-activating protein kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
NAA	<i>1-Naphthaleneacetic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAC	NAM, ATAF1/2 und CUC2
o.g.	oben genannten
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
PAD3	<i>Phytoalexin Deficient 3</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDF1.2	<i>Plant Defensin 1.2</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ProDH	Prolin Dehydrogenase
Prom	Promotor
PTA	<i>Protoplast Trans Activation</i>
PVDF	Polyvinylendifluorid
qRT-PCR	Quantitative <i>realtime</i> PCR
RLU	<i>relative luminescence unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SD	Standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-Sulphat – Polyacrylamid- Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase aus <i>T. aquaticus</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
TGA	<i>TGACG-Motif Binding Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
Wt	Wildtyp
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8.2 Einheiten

Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Ampère
D	Dalton
E	Einstein (1E = 1 Mol Photonen)
F	Farad
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
s, sek	Sekunde
U	definierte Einheit der Enzymaktivität (unit)
V	Volt
W	Watt

8.3 Präfixe

k	kilo	(10^3)
m	milli	(10^{-3})
μ	mikro	(10^{-6})
n	nano	(10^{-9})
p	pico	(10^{-12})

8.4 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

8.5 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin
U	Uracil

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser dafür bedanken, dass ich diese Arbeit bei ihm schreiben durfte. Ich danke ihm für die zuverlässige Betreuung und für das stets „offene Ohr“ bezüglich aller Vorschläge und Probleme. Ein weiterer Dank geht an PD Dr. Dirk Becker für die Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank geht an meine lieben Kollegen und Freunde im Labor. Ich bedanke mich bei Katrin und Christoph für die nette Hilfe bei den Korrekturen. Ein großes Dankeschön geht an Laura für all die unterhaltsamen Kaffeepausen und dafür, dass sie mir stets die Zeit in Würzburg versüßt hat. Nicht zuletzt danke ich auch meinen weiteren Kollegen Elisabeth, Lorenzo und Christian für die Hilfe bei all den kleinen und großen Problemen des Laboralltags.

Bei meinen liebsten technischen Assistentinnen Jasmin und Jenny möchte ich mich für die grausame Fließbandarbeit bedanken, die ich ihnen all die Jahre zugemutet habe und über die sie sich nie beschwert haben.

Ein weiterer Dank geht an meinen Bachelor-Studenten Jasper. Die Arbeit mit ihm hat viel Freude bereitet.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die immer für mich da ist und mich in allen Lebenslagen unterstützt. Ich danke auch Peters Eltern dafür, dass sie mich stets mit offenen Armen empfangen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Peter, der mir schon über so manche Krise hinweg geholfen hat, der mich ohne jeden Vorwurf nach Würzburg gehen lassen hat und mich in jeder Lebenslage liebt.

Bisherige Publikationen:

Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Böttner, S., Oñate-Sánchez, L., Dröge-Laser, W. (2011a) High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function. *Plant J.*, **68**, 560-569.

Wehner, N., Weiste, C. and Dröge-Laser, W. (2011b) Molecular screening tools to study Arabidopsis transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, **2**.

Erklärungen

gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Darüber hinaus habe ich bisher keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, den 19. April 2012

Nora Wehner