

Institut
für Botanik und Mikrobiologie
Lehrstuhl für Botanik
Technische Universität München

Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*:
Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem

Thomas Hoffmann

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. R. Matyssek
3. Priv.-Doz. Dr. K. Lenzian

Die Dissertation wurde am 15.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 11.12.2001 angenommen.

Dank

Herrn Prof. Erwin Grill danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit anzufertigen und für zahlreiche Diskussionen und die wohlwollende Unterstützung während der letzten Jahre.

Axel Himmelbach und Gregor Benning standen mir im Laboralltag zur Seite und gaben in zahlreichen Diskussionen Anregungen für diese Arbeit.

Allen Kollegen am Lehrstuhl für Botanik, insbesondere Astrid Cannich, Alexander Christmann, Claudia Eltschig, Caroline Klaus, Karin Münch, Michael Meinhard, Yulin Tang, Ingrid Temming, Irina Teplova, Ying Wang und Yi Yang danke ich für die freundschaftliche Unterstützung und Teilnahme an dieser Arbeit.

Prof. Julian Schroeder und Peter Buschmann danke ich für die Einführung in die Elektrophysiologie und die Möglichkeit Membranpotentialmessungen am *Dept. of Biology, Univ. of California, San Diego* durchzuführen.

PD Leo Eberl ermöglichte Lumineszenzaufnahmen mit einer hochsensitiven Kamera.

Inhalt

Abkürzungen	4
Zusammenfassung / Summary	6
1. Einleitung	8
1.1. Pflanzenhormone und Signaltransduktion	8
1.2. Signaltransduktion von Abscisinsäure	10
1.2.1. Genetische Analyse	11
1.2.2. Genregulation	14
1.2.3. Stomataregulation	15
1.2.4. Transiente Expression	17
1.3. Ziele der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Materialien	20
2.1.1. Pflanzen	20
2.1.2. Mikroorganismen	20
2.1.3. Plasmid Vektoren	21
2.1.4. Enzyme	22
2.1.5. Chemikalien	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.2. Klonierungstechniken	23
2.2.3. Southern	24
2.2.3.1. DNA-Transfer auf Nylon-Membranen	24
2.2.3.2. Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	24
2.2.3.3. DNA-DNA-Hybridisierung	24
2.2.4. Northern und RT-PCR	25
2.2.4.1. RNA-Isolation	25
2.2.4.2. Northern Blot	25
2.2.4.3. DIG-markierte DNA-Sonde	26
2.2.4.4. Hybridisierung	26
2.2.4.5. Immundetektion	27
2.2.4.6. Reverse Transkription von RNA und RT-PCR	27
2.2.5. <i>In planta</i> Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> / Screening	28

2.2.5.1.	Analyse von transgenen Pflanzen	29
2.2.6.	Kreuzungen	30
2.2.7.	Transiente Expression in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten	30
2.2.7.1.	DNA-Isolation für Transiente Expression	30
2.2.7.2.	Protoplastierung	31
2.2.7.3.	Transfektion und Kultivierung der Protoplasten	32
2.2.7.4.	Extraktion	33
2.2.8.	Aktivitätsnachweis von Reportergenen	34
2.2.8.1.	β -D-Glucuronidase	34
2.2.8.2.	<i>Photinus pyralis</i> Luciferase	35
2.2.8.3.	Aequorin	36
2.2.8.4.	<i>Green Fluorescent Protein</i>	36
2.2.9.	Membranpotentialmessung an Wurzelzellen	36
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Etablierung eines transienten Expressionssystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion	39
3.1.1.	Protoplastierung und Kultivierung der Protoplasten	39
3.1.2.	Expression von Reportergenen in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten	41
3.1.3.	Interne Standards für die transiente Expression	42
3.1.4.	Zeitabhängige Expression der Standards	46
3.1.5.	Reproduzierbarkeit des Systems	47
3.2.	ABA vermittelte Genregulation	49
3.2.1.	Beispiele für transkriptionelle Regulation durch ABA	49
3.2.2.	ABA-regulierte Promotor-Reportergenfusionen für die transiente Expression	53
3.2.3.	Zeit- und ABA- abhängige Expression	58
3.3.	Modellsystem zum Vergleich von Mutanten und Wildtyp	63
3.3.1.	ABA-abhängige Expression von Reportergenen in Mutanten und Wildtypprotoplasten	63
3.4.	Ektopische Expression von Effektoren	82
3.4.1.	Cotransfektion von ABI1 und Derivaten	82
3.4.2.	Einfluß auf die ABA Regulation	84
3.4.3.	Expression von ABI1 und abi1 in <i>ahr1</i> - und <i>gca2</i> -Protoplasten	86
3.4.4.	Überexpression von ABI2 und Derivaten	89
3.4.5.	AtHB-6, ein ABA regulierter HD-Zip Transkriptionsfaktor	92
3.4.6.	Transkriptionelle Regulation eines künstlichen Promotors durch AtHB-6	95
3.4.7.	ABI1 als Effektor der durch AtHB-6 vermittelten transkriptionellen Regulation	100

3.5. Lokalisation von Fusionsproteinen in Protoplasten	102
3.6. Cotransfektion von Cosmiden im transienten Expressionssystem	108
3.7. Transgene Reporterlinien	110
3.7.1. Vergleich der Genregulation im transienten System und in stabilen Reporterlinien	111
3.7.2. Kreuzungen der Reporterlinien mit ABA hypersensitiven bzw. insensitiven Mutanten und Transgenen	114
3.8. Membranpotentialmessungen	116
4. Diskussion	119
4.1. Transiente Expressionsstudien ein Modellsystem?	119
4.2. ABA-Signaltransduktion	131
5. Literatur	142
6. Anhang	154

Curriculum Vitae

Publikationen

Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
abi	Abscisinsäure insensitiv
ABRC	<i>ABA response complex</i>
ABRE	<i>ABA response element</i>
AEQ	Aequorin
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BAP	6-Benzylamino-9-methylpurin
CAT	Chloramphenikol-Acetyl-Transferase
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CE	<i>coupling element</i>
CIP	<i>calf intestine Phosphatase, alkaline</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid / Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (N = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FG	Frischgewicht
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gca	<i>growth control exerted by ABA</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β -D-Glucuronidase
HD	Homöodomän
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
InsP ₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
Kan	Kanamycin
LTI	<i>low temperature induced</i>
lu	<i>light units</i>
LUC	Luciferase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase

MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferon- β -D-glucuronid
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NOS	<i>nopaline synthase</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pp	Protoplasten
PP	Proteinphosphatase
PSL	<i>photostimulated luminescence</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAB	<i>regulated by abscisic acid</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTPCR	Reverse Transkription PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris, Borat, EDTA
Tet	Tetracyclin
TE	Tris, EDTA
Ter	Terminator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Umdrehungen
WPI	<i>World Precision Instruments</i>
ZIP	Leucin-Zipper

Alle benutzen Dimensionen entsprechen den SI-Einheiten

Zusammenfassung

Das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) spielt eine entscheidende Rolle bei der Anpassung an Streßsituationen, wie Kälte-, Salz- oder Wasserstreß. Durch genetische Analysen, Untersuchungen der Stomataregulation oder über Proteininteraktionen wurden an der ABA-Signaltransduktion beteiligte Komponenten identifiziert und Einblicke in die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung ermöglicht. Über das genaue Zusammenspiel des komplexen und verzweigten Netzwerkes der Signalkaskade ist jedoch noch wenig bekannt.

Die Etablierung eines Modellsystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* bietet in Ergänzung zu Transgenen die Möglichkeit in kurzer Zeit Aussagen über an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten zu machen. Durch die transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten wurden über die Analyse der Genregulation ABA-regulierter Reporter-genkonstrukte (*RD29BLUC* und *RAB18LUC*) Effekte auf die ABA-Signalkaskade untersucht. Verschiedene Parameter, wie das Pflanzenmaterial, die Behandlung der Protoplastierungslösung, die Protoplastierungsdauer, die Reinheit der eingesetzten DNA, die Menge der DNA und die Inkubationszeit der Protoplasten beeinflussen die Reporterexpression und -regulation.

ABI1 und ABI2, zwei Proteinphosphatasen 2C, sind als negative Regulatoren an der ABA-Signaltransduktion beteiligt. Die Überexpression der Proteinphosphatasen im transienten Expressionssystem führte zu einer Inhibierung der ABA-vermittelten Reporterinduktion. Dagegen ergab sich in Protoplasten der *abi1* beziehungsweise *abi2*-Mutante eine unterschiedliche Reporterregulation. In *abi1*-Protoplasten zeigte sich entsprechend dem Überexpressionsexperiment eine negative Regulation der Reporterinduktion, in *abi2*-Protoplasten jedoch entsprach die Reporterregulation der in Wildtypprotoplasten. Eine mögliche Erklärung ist eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von ABI1 und ABI2.

Der Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor AtHB-6 wurde durch die Interaktion mit ABI1 als weitere Komponente der ABA-Signaltransduktion identifiziert (Himmelbach et al., 2001). Im transienten Expressionssystem wurde nachgewiesen, daß AtHB-6 ein im Promotor von *AtHB-6* vorhandenes *cis*-Element erkennt und daß durch dieses *cis*-Element eine AtHB-6- und ABA-abhängige Genexpression vermittelt wird. ABI1 als Interaktionspartner könnte dabei die Aktivität des Transkriptionsfaktors regulieren.

Ergänzend zu Untersuchungen an Stomata sind Membranpotentialmessungen an Wurzelzellen geeignet zur Analyse der Auswirkung von ABA auf Ionenflüsse. Die Kombination von Membranpotentialmessungen und Analysen im transienten Expressionssystem bietet die Möglichkeit sowohl schnelle ABA-Antworten wie auch ABA-vermittelte Genregulation zu untersuchen und zur Charakterisierung von Mutanten wie etwa *gca2* einzusetzen.

Summary

The plant hormone abscisic acid is involved in adaptation to environmental stresses such as cold, drought or salinity. Genetic analysis, studies of guard cell signalling processes or protein interactions lead to identification of ABA signalling components and molecular mechanisms of ABA action. However, the complex signalling network is not clearly established yet.

Cellular systems for analysing ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana* in addition to stably transformed plants are powerful tools to investigate components of the signal transduction pathway. By transient expression experiments in *Arabidopsis* protoplasts effects on the ABA signalling cascade were studied using ABA-regulated reporter gene constructs (*RD29BLUC* and *RAB18LUC*). Different parameters like plant material, protoplasting solution, protoplasting period, DNA purity, DNA amount and incubation time of protoplasts influence reporter expression and regulation.

ABI1 and ABI2 two protein phosphatases 2C are negativ regulators of abscisic acid signalling. In transient studies overexpression of these protein phosphatases inhibited the activation of reporters by ABA. On the other hand in mutant protoplasts there were a different reporter regulation by ABA in *abi1* or *abi2* respectively. In *abi1* protoplasts the ABA mediated reporter induction was inhibited, in *abi2* protoplasts the reporter regulation was the same as in wildtype protoplasts. One explanation is a different subcellular localisation of ABI1 and ABI2.

The homeodomain leucine zipper protein AtHB-6 as a regulator of the ABA signal pathway has been identified by analysing proteins capable of interacting with ABI1 (Himmelbach et al., 2001). In transient expression experiments AtHB-6 recognised a *cis*-element present in its own promotor region that mediated AtHB-6- and ABA-dependent gene expression in protoplasts. It is possible that ABI1 as interaction partner of AtHB-6 could regulate the transcription factor.

In addition to studies of guard cell signalling processes ABA induced changes in ion fluxes can be analysed by membrane potential measurements in roots. The combination of membrane potential measurements and transient expression studies allows to investigate both fast responses to ABA as well as ABA mediated gene regulation. In this way mutants like *gca2* can be characterized.

1. Einleitung

1.1. Pflanzenhormone und Signaltransduktion

Pflanzen sind in der Regel ortsgebundene Organismen und müssen daher flexibel auf lokale Umweltbedingungen wie Licht, Wasser, Nährstoffe, Pathogene, Berührung oder Schwerkraft mit Änderungen in der Physiologie oder des Wachstums reagieren. Endogene und exogene Signale werden durch Botenstoffe integriert. Als Botenstoffe können etwa Pflanzenhormone wirken. Pflanzenhormone sind natürlich vorkommende, organische Substanzen, die physiologische Prozesse in niedriger Konzentration beeinflussen. Im Gegensatz zu tierischen Hormonen kann die Synthese auf einen Ort beschränkt sein, kann aber auch in einer Vielzahl von Geweben erfolgen. Der Wirk- und Bildungsort muß nicht getrennt sein (Davies, 1995).

Pflanzenhormone sind wesentlich für die Steuerung der Entwicklung und der Adaption an Umweltbedingungen von Pflanzen.

Neben den fünf klassischen Pflanzenhormonen Abscisinsäure, Auxin, Cytokinin, Ethylen und Gibberellinsäure werden noch eine Reihe weiterer Verbindungen als Pflanzenhormone diskutiert.

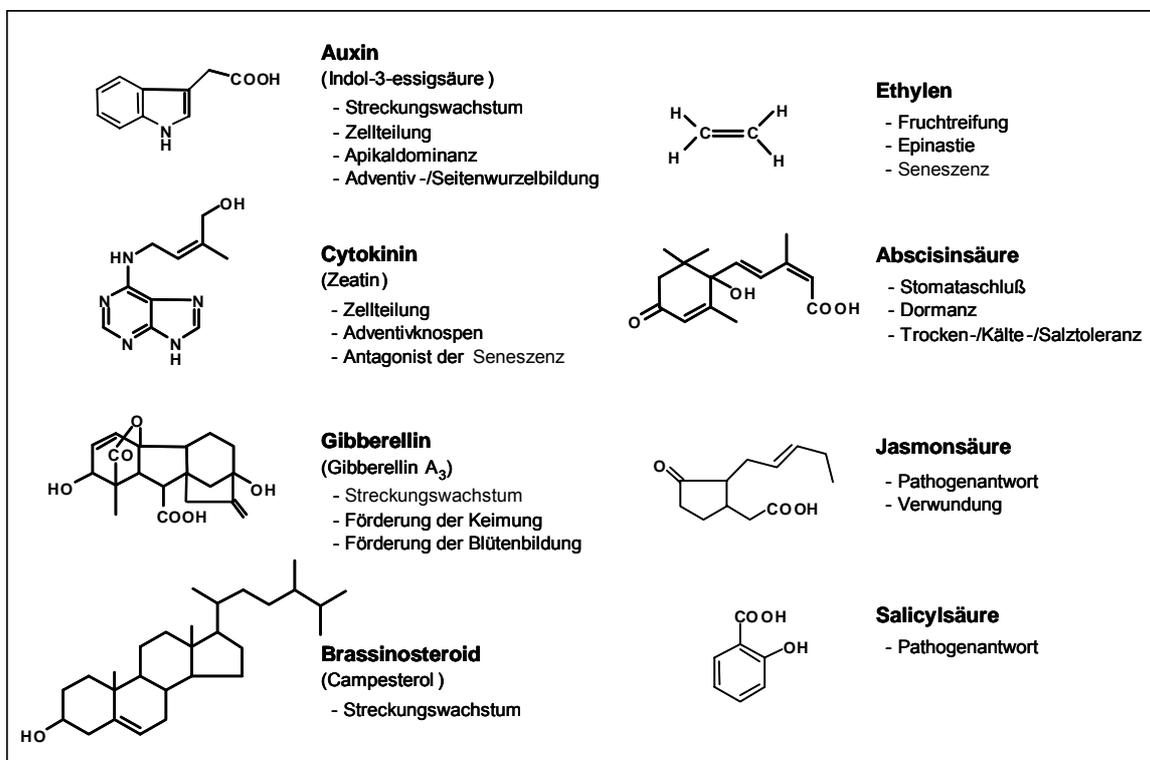


Abb. 1: Struktur und Funktion von Pflanzenhormonen (verändert nach Iten et al. 1999)

Pflanzenhormone werden oft eingeteilt in fördernde oder hemmende Substanzen. Sie wirken allerdings nicht alleine, sondern sind beteiligt an einem komplexen Netzwerk, das für die Steuerung verschiedenster Prozesse verantwortlich ist (Davies, 1995). Ethylen und Abscisinsäure etwa interagieren bei der Regulation der Samendormanz und des Wurzelwachstums (Beaudoin et al., 2000, Ghassemian et al., 2000).

Um die genauen Zusammenhänge der von Pflanzenhormonen gesteuerten Prozesse verstehen zu können, hat man damit begonnen, die einzelnen Signaltransduktionswege der Pflanzenhormone zu untersuchen.

Signaltransduktion bezeichnet das Feld biochemischer Mechanismen, die die zelluläre Physiologie regulieren. Es ist eines der am meisten untersuchten Gebiete in der Zellbiologie (Chory und Wu, 2001).

Elemente der Signaltransduktionswege können zwischen Pflanzen, Tieren und Pilzen konserviert sein. Diese grundlegenden Elemente wurden zu spezifischen Signalwegen erweitert. Vergleichend betrachtet findet man konservierte und neue Elemente auf allen Ebenen, wie z. B. der biologischen Funktion, der Signalmoleküle oder der Proteindomänen (McCarty und Chory, 2000).

Ein Beispiel ist die Signaltransduktion des Pflanzenhormons Ethylen. Ethylen wirkt als Regulator bei Stressantworten und Entwicklungsprozessen, wie Seneszenz oder Fruchtreifung (Abeles et al., 1992). Es wird erkannt von einer Rezeptorgenfamilie, die verwandt ist mit bakteriellen zwei Komponenten Histidin-Kinasen (Chang et al., 1993).

Das Signal wird durch Phosphatübertragung, einer Autophosphorylierung des Rezeptors weitergeleitet. Dabei wird die Phosphatgruppe von einem Histidin- zu einem Aspartatrest übertragen. Das Binden des Ethylens führt damit zur Inaktivierung von zum Beispiel ETR1 einem Mitglied der Rezeptorgenfamilie. Das inaktivierte ETR1 führt zur Inaktivierung von CTR1, einer mit Raf verwandten Proteinkinase. Raf ist in Tieren an einer

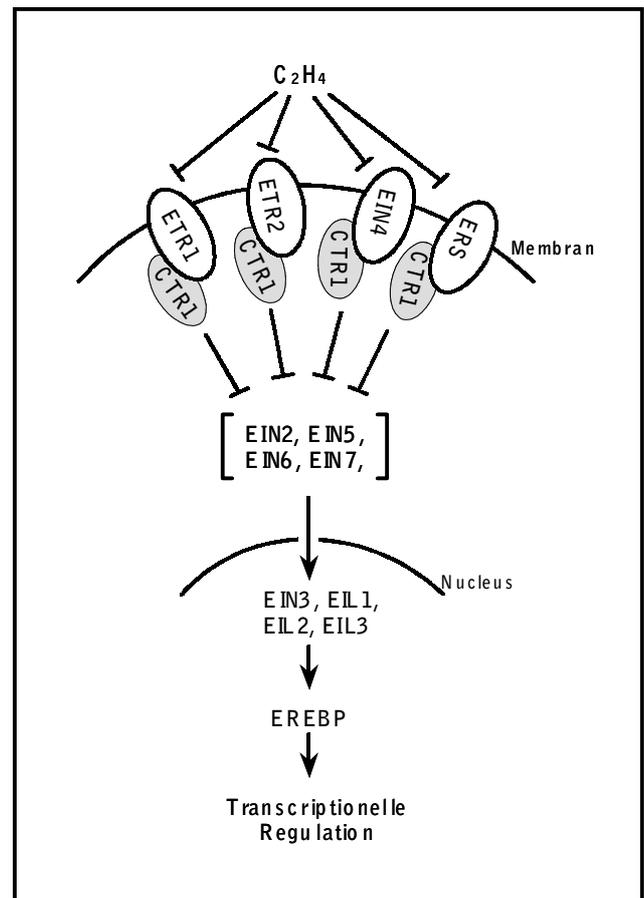


Abb. 2: Modell der Ethylensignaltransduktion (nach Iten et al., 1999)

Wachstumsfaktor abhängigen Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade beteiligt. Derartige Kaskaden sind aus drei Proteinkinasen zusammengesetzt, der MAPK, MAPK-Kinase (MAPKK) und der MAPKK-Kinase, wobei die MAPK über Phosphorylierung durch die MAPKK und die MAPKK über Phosphorylierung durch die MAPKKK aktiviert werden. Mit CTR1 als MAPKKK ergeben sich Parallelen zu MAPK Kaskaden in Tieren oder Hefen, wie dem Osmoregulations-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae* (Mizoguchi et al., 1997).

CTR1 ist ein negativer Regulator der Ethylenantwort, es inaktiviert die in der Signalkaskade unterhalb liegenden transkriptionellen Regulatoren. Die Inaktivierung von CTR1 führt damit zur Ethylenantwort (Chao et al., 1997).

Ein weiteres Beispiel für eine Histidin-Kinase ist CRE1 (Inoue et al., 2001), ein Cytokininrezeptor, von dem gezeigt wurde, daß Mutationen im *CRE1* Gen in *Arabidopsis* einen Cytokinin-insensitiven Phänotyp verursachen. Durch Expression von *CRE1* in einem für *SLN1* defizienten Hefestamm konnte ein Cytokinin abhängiger Phänotyp generiert werden. *SLN1* codiert in Hefe für eine Histidinkinase, die als Osmosensor dient. Unter normalen osmotischen Bedingungen autophosphoryliert *SLN1* den konservierten Histidinrest, der Histidinkinase. Die Phosphatgruppe wird weiter übertragen auf den konservierten Aspartatrest des gleichen Proteins und schließlich über *YPD1* zu *SSK1*, welches damit inhibiert wird. Dephosphoryliert würde *SSK1* den unterhalb in der Signalkaskade liegenden MAPK Signalweg aktivieren. Das Fehlen von Cytokinin führt damit in den transformierten Hefen zu einer lethalen Überaktivierung des unterhalb von *SSK1* liegenden MAPK Signalwegs.

1.2. Signaltransduktion von Abscisinsäure

Abscisinsäure beeinflusst viele physiologische Vorgänge in Pflanzen. Zuerst, nach Entdeckung der Abscisinsäure, wurden die wachstumshemmenden Eigenschaften von ABA erkannt (Adicott, 1983). ABA kann jedoch nicht nur wachstumshemmende Wirkung haben, sondern in geringer Konzentration beispielsweise das Wurzelwachstum fördern (Zeevaart und Creelman, 1988). Das Pflanzenhormon ist beteiligt an der Anpassung an Streßbedingungen, wie Kälte-, Salz- oder Wasserstreß (Chandler und Robertson, 1994). Unter anderem führt ABA bei Streß zu einer Reduktion des Wasserverlustes durch Transpiration indem die Öffnungsbewegung der Spaltöffnungen gehemmt und die Schließbewegung gefördert wird (Schroeder et al., 2001). Darüberhinaus inhibiert Abscisinsäure eine frühzeitige Keimung und fördert die Samendormanz (Leung und Giraudat, 1998).

Über die an der ABA-Signaltransduktion beteiligten molekularen Mechanismen ist wenig bekannt. Beteiligte Proteinphosphatasen könnten etwa negative Regulatoren von MAPK-Kaskaden sein (Himmelbach et al., 1998), womit sich möglicherweise Parallelen zu den angesprochenen Signalkaskaden von Ethylen oder Cytokinin ergeben.

1.2.1. Genetische Analyse

Durch die Konzentrationsbestimmung von Abscisinsäure in Geweben, beziehungsweise durch exogene Applikation können Zusammenhänge zwischen physiologischen Reaktionen und dem Pflanzenhormon hergestellt werden. Es ist aber nicht möglich, damit einen genauen Einblick in den mechanistischen Verlauf der ABA-Wirkung zu bekommen.

Eine Möglichkeit um Komponenten einer Signalkaskade zu identifizieren ist die genetische Analyse des Signaltransduktionsweges. Daraus ergeben sich zwei wesentliche Gruppen von Mutanten, von welchen die eine in der Biosynthese des Signals gestört ist, während die andere bei den auf das Signal folgenden Antworten betroffen ist (Bonetta und McCourt, 1998).

Es sind eine Reihe von ABA-Biosynthese Mutanten bekannt, beispielsweise *aba1*, *aba2* und *aba3* in *Arabidopsis thaliana* (Duckham et al., 1991, Rock und Zeevaart, 1991, Leon-Kloosterziel et al., 1996) oder *vp14* in Mais (Schwartz et al., 1997b). Die *aba*-Mutanten zeigen einen typischen ABA-defizienten Phänotyp, eine kaum ausgeprägte Samendormanz und durch die gestörte Stomataregulation Welkerscheinungen. Die ABA-Biosynthese geht aus von Carotinioid-Vorstufen. In Plastiden wird ausgehend von Zeaxanthin schließlich Xanthoxin gebildet. Die *aba1* Mutante ist in der Epoxidierung des Zeaxanthins betroffen (Duckham et al., 1991, Rock und Zeevaart, 1991). VP14 ist eine Dioxygenase, die die 9-*cis*-Isomere von Violaxanthin und Neoxanthin zu *cis*-Xanthoxin und einem C₂₅-Derivat spaltet (Schwartz et al., 1997b). Bei *aba2* und *aba3* ist die im Cytosol ablaufende weitere Oxidation von Xanthoxin bis schließlich zur Abscisinsäure gestört (Schwartz et al., 1997a).

Durch exogene Applikation von Abscisinsäure kann der Phänotyp der Biosynthese-Mutanten revertiert werden.

Im Gegensatz dazu können ABA insensitive Mutanten einen ähnlichen pleiotropen Phänotyp aufweisen, der jedoch nicht durch exogenes ABA wiederhergestellt werden kann. Der endogene Abscisinsäuregehalt ist im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Der Phänotyp wird verursacht durch einen Defekt in der Signalerkennung oder –weiterleitung.

Die Mutanten, *abi1* bis *abi5* (Koorneef et al., 1984; Finkelstein, 1994), die insensitive gegenüber der keimungsinhibierenden Wirkung von Abscisinsäure sind, wurden bereits näher charakterisiert.

Die *ABI3*, *ABI4* und *ABI5* Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen (Giraudat et al., 1992; Finkelstein et al., 1998; Finkelstein und Lynch, 2000; Lopez-Molina

und Chua, 2000) und haben ihren größten Einfluß auf die Genregulation während der Samenreifung werden aber auch in geringem Maß in vegetativem Gewebe exprimiert (Finkelstein et al., 1998; Rohde et al., 1999; Finkelstein und Lynch, 2000). Ektopische Expression von *ABI3* in *Arabidopsis* führt zu einer erhöhten Kältetoleranz (Tamminen et al., 2001), *ABI5* überexprimierende Pflanzen zeigen hypersensitives Verhalten gegenüber ABA (Lopez-Molina et al., 2001). Diese Transkriptionsfaktoren sind nicht an einer einfachen linearen Signalkaskade beteiligt, sondern scheinen über Interaktion untereinander und mit anderen Transkriptionsfaktoren an einem Netzwerk beteiligt zu sein, über welches die Expression einzelner Gene reguliert wird (Söderman et al., 2000).

ABI1 und *ABI2* sind zwei homologe Proteinphosphatasen 2C (Meyer et al., 1994; Leung et al., 1997; Rodriguez et al., 1998). Die entsprechenden Mutanten zeigen im Gegensatz zu *abi3*, *abi4* und *abi5* einen dominanten und pleiotropen ABA-insensitiven Phänotyp, ähnlich den *aba*-Mutanten, was den Schluß nahelegt, daß die Proteine zu Beginn der ABA-Signalkaskade, vor eventuellen Verzweigungen, die zu spezifischen Signalkaskaden führen, liegen könnten. Neben der Samenkeimung und -dormanz ist zum Beispiel auch das vegetative Wachstum und die Stomataregulation betroffen. In den mutierten Proteinen ist die Phosphataseaktivität durch den Austausch von Glycin gegen Asparaginsäure innerhalb der katalytischen Domäne stark reduziert. *ABI1* und *ABI2* werden durch den pH und die Ionenstärke des Cytosols reguliert. Eine Alkalisierung des Cytosols, wie sie bei einem durch ABA-vermittelten Stomataschluß auftritt, würde ausreichen, um die Phosphataseaktivität von *ABI1* und *ABI2* zu verdoppeln (Leube et al., 1998).

Weitere Mutanten, *gca1* bis *gca8* wurden auf Grund ihres gegenüber ABA insensitiven Primärwurzelwachstums identifiziert (Himmelbach et al., 1998). Zwei der isolierten Mutanten, *gca1* und *gca2* zeigen vergleichbar mit *abi1* und *abi2* einen pleiotropen ABA insensitiven Phänotyp. Alle anderen zeigen nur eine Störung des Wachstums und sind außerdem zum Teil bei der physiologischen Antwort auf Ethylen gestört, was für eine Vernetzung der Signaltransduktionswege der beiden Pflanzenhormone spricht.

Neben Abscisinsäure insensitiven wurden auch ABA hypersensitive Mutanten isoliert. Durch den Verlust der Keimfähigkeit in Gegenwart von geringen ABA-Konzentrationen, die bei Wildtypsamen normalerweise nicht keimungshemmend wirken, wurde die rezessive *era1* Mutante identifiziert (Cutler et al., 1996). Die *era1* Mutanten zeigen sowohl bei der Keimung als auch in vegetativem Gewebe hypersensitive Reaktionen gegenüber Abscisinsäure. In Doppelmutanten *era1/abi1* bzw. *era1/abi2* wird der insensitive Phänotyp der *abi1* und *abi2* Mutanten unterdrückt. *ERA1* codiert für die β -Untereinheit einer Protein-Farnesyltransferase. Damit könnte Farnesylierung wesentlich für eine negative Regulation der ABA-Signaltransduktion sein und das Zielprotein der *ERA1* Farnesyltransferase unterhalb oder

parallel zu den Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 in der Signalkaskade liegen (Pei et al., 1998).

Die rezessive *abh1*-Mutante weist ABA hypersensitives Verhalten etwa bezüglich des Stomataschlusses oder der Keimung auf (Hugouvieux et al., 2001). ABH1 als mRNA-Cap Bindeprotein ist beteiligt an einem heterodimeren Komplex der die mRNA-Cap-Struktur bindet. Damit könnte ein direkter Zusammenhang bestehen zwischen mRNA-Prozessierung und der ABA-Signaltransduktion.

Eine weitere ABA-hypersensitive Mutante, *ahr1*, wurde auf Grund des verringerten Primärwurzelwachstums in Gegenwart von ABA im Vergleich zum Wildtyp identifiziert (Wang und Grill, unveröffentlicht).

Bei einem Suppressor-Screen mit der insensitiven *abi1* Mutante wurden verschiedene Mutanten isoliert, die im Vergleich zur *abi1* Mutante nicht mehr in Gegenwart von Abscisinsäure keimen konnten. Ein Großteil der isolierten Mutanten war in der Gibberellinsynthese bzw. Signalweiterleitung betroffen (Steber et al., 1998), was die antagonistische Wirkung von Abscisinsäure und Gibberellin bei der Keimung widerspiegelt. In einem entsprechendem Experiment konnten aber auch intragene Revertanten von *abi1* (*abi1-1R1* bis *abi1-1R7*) gefunden werden (Gosti et al., 1999). Diese rezessiven Allele von *ABI1* führten zu einer erhöhten Sensitivität der Revertanten im Vergleich zum Wildtyp bezüglich der Keimung oder des Wurzelwachstums in Gegenwart von Abscisinsäure. Die Revertanten reagierten auch hypersensitiv auf endogene ABA-Gehalte etwa bei der Samendormanz. Die entsprechenden Mutationen liegen im aktiven Zentrum der Proteinphosphatase 2C und führen zu einem Verlust der Phosphataseaktivität. Der Verlust der Phosphataseaktivität bedingt damit eine erhöhte Sensitivität gegenüber ABA. Dies deutet darauf hin, daß die Wildtyp-ABI1-phosphatase ein negativer Regulator der ABA Signaltransduktion ist.

Eine intragene Revertante von *abi2*, *abi2-1R1*, wurde durch Veränderungen in der Stomataregulation identifiziert (Merlot et al., 2001). Die Revertante ist im Gegensatz zu den *abi2* Pflanzen durch Schließen der Stomata in der Lage, die Transpiration zu kontrollieren. Die Verringerung der Transpiration führt zu einer Erwärmung der Blattoberfläche, die über Infrarotthermographie gemessen werden kann. Die Suppressor-Mutation in *abi2-1R1* entspricht keiner der Suppressor-Mutationen in *abi1-1R1* bis *abi1-1R7*. Die PP2C Aktivität im Enzymassay mit rekombinanten Proteinen war bei *abi2-1R1* etwa 100-mal geringer, bei *abi1-1R1* bis *abi1-1R7* etwa 1000-mal geringer als die PP2C Aktivität des entsprechenden Wildtypproteins. Dementsprechend zeigen die *abi2-1R1* Pflanzen eine mit dem Wildtyp vergleichbare ABA Sensitivität, die *abi1-R1* bis *abi1-R7* Mutanten ein gegenüber ABA hypersensitives Verhalten. Die Doppelmutante *abi1-1R4 abi2-1R1* ist ABA-sensitiver als die *abi1-1R4* Mutante alleine.

Damit könnte sowohl ABI2 wie auch ABI1 ein negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion sein und beide könnten überlappende Funktionen in der Kaskade besitzen.

Alternativ zu ABA vermittelten physiologischen Reaktionen wie Keimung, Stomataschluß oder Wurzelwachstum wurde die durch ABA vermittelte Genregulation ausgenutzt, um Mutanten mit Veränderungen in der ABA Signaltransduktion zu identifizieren. Eine transgene *Arabidopsis*-Linie mit einem ABA-reguliertem Reportergenkonstrukt bestehend aus dem *Arabidopsis KIN2*-Promotor fusioniert mit der für die Glühwürmchen-Luciferase codierenden Sequenz wurde mutagenisiert und das Muster der ABA-abhängigen Luciferaseexpression untersucht. Die dadurch identifizierte Mutante, *ade1*, zeigt erhöhte und länger anhaltende Luciferaseaktivität (Foster und Chua, 1999).

1.2.2. Genregulation

Abscisinsäure ist neben der Regulation der Samenreifung und Samendormanz auch an der Anpassung an Streßsituationen wie Kälte-, Trocken- oder Salzstreß beteiligt. Pflanzen reagieren mit einer Reihe von Veränderungen auf derartige Umweltbedingungen. Verschiedene Proteine und niedermolekulare Verbindungen wie Zucker, Prolin oder Glycinbetain werden akkumuliert (Savoure et al., 1997; Yancey et al., 1982). Die Regulation der Genexpression bei diesen Streßsituationen verläuft sowohl über ABA-abhängige wie unabhängige Signalwege. Viele Gene werden durch verschiedene Streßsituationen, wie Kälte-, oder Trockenstreß induziert, einige aber auch nur durch bestimmte wie etwa nur durch Kälte oder nur durch Trockenheit (Shinozaki et al., 2000).

Viele durch ABA induzierte Gene enthalten in ihrem Promotor ein konserviertes *cis*-Element ABRE (*ABA-responsive element*, PyACGTGGC). Diese ABRE's wurden zuerst im *Em* Gen aus Weizen (Marcotte et al., 1988) und im *rab16* Gen aus Reis (Mundy et al., 1990) identifiziert. Ein ABRE ist jedoch nicht ausreichend für die ABA vermittelte Induktion des Gens. Ähnliche Elemente mit dem ACGT Motiv sind an der Genregulation durch andere Umweltfaktoren wie etwa Licht beteiligt. Für die Spezifität des ABRE sind die flankierenden Sequenzen wesentlich. Darüberhinaus ist für die Funktion als ABRE ein weiteres Element, *coupling element* (CE), nötig. Zusammen bildet das ABRE mit dem CE einen Abscisinsäure Respons Komplex (ABRC) der ausreichend ist eine ABA Induktion eines Minimalpromotors zu vermitteln (Shen und Ho, 1995a; Shen und Ho, 1995b; Shen et al., 1996; Uno et al., 2000). Dabei kann das *coupling element* auch durch ein weiteres ABRE ersetzt werden (Hobo et al., 1999).

Daneben sind ABA-regulierte Gene bekannt, die kein ABRE enthalten, wie etwa *rd22*, welches Bindungsstellen für MYC oder MYB Homologe aufweist (Abe et al., 1997; Iwasaki et al., 1995). Verschiedene durch ABA regulierte oder an der ABA Signalkaskade beteiligte

Transkriptionsfaktoren, wie die Homöodomän-Leucin-Zipper AtHB-6, AtHB-7 und AtHB-12 oder ABI3, ABI4, ABI5, TRAB1, AREB1, AREB2, AtMYB2 sind charakterisiert worden. Der genaue Zusammenhang zwischen der ABA Signaltransduktion und der Genregulation über diese Transkriptionsfaktoren beziehungsweise die kombinatorische Wirkung der Faktoren untereinander ist noch nicht bekannt.

Bei der durch ABA vermittelten Genregulation scheinen Proteinphosphorylierungen eine wichtige Rolle zu spielen. Mehrere ABA-induzierte Proteinkinasen wurden identifiziert (Holappa und Walker-Simmons, 1995; Hong et al., 1997; Hwang und Goodman, 1995). PKABA1 etwa ist an der ABA abhängigen Repression Gibberellin induzierter Gene beteiligt (Gomez Cadenas et al., 1999), die erwähnten Proteinphosphatasen 2C wirken als negative Regulatoren (Sheen, 1998; Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Von konstitutiv aktiven, mutierten Formen zweier calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPK1 und CDPK1a) konnte gezeigt werden, daß sie zur Aktivierung eines ABA-induzierbaren Promotors führen (Sheen, 1996).

Eine weitere Komponente der zur ABA-abhängigen Genexpression führenden Kaskade ist die cyclische ADP-Ribose (cADPR) (Wu et al., 1997). In tierischen Zellen wird cADPR ausgehend von Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD^+) mittels cyclischer ADP-ribosyl Cyclase gebildet und kann intrazellulär über den Ryanodinrezeptor Calciumionen freisetzen. Coinjektion von cADPR und einem Reportergenkonstrukt mit dem *KIN2* beziehungsweise dem *RD29A* Promotor aus *Arabidopsis*, beide sind durch ABA induzierbar, in Tomatenhypokotylzellen zeigte eine Aktivierung des Reporters. Ein inaktiver Antagonist (8-Amino-cADPR) konnte die ABA-abhängige Induktion blockieren. Durch EGTA konnte die durch cADPR vermittelte Reporterexpression unterbunden werden, was auf einen Ca^{2+} -Anstieg unterhalb von cADPR in der Signalkaskade hinweist.

1.2.3. Stomataregulation

Neben den Effekten auf die Genregulation führt Abscisinsäure zu sehr schnellen Antworten, die nicht auf differenzierter Genexpression beruhen, sondern auf Änderungen von Ionenflüssen zurückzuführen sind. Der durch Abscisinsäure hervorgerufene Stomataschluß eignet sich zur Untersuchung dieser schnellen Änderungen. Schließzellen regulieren die CO_2 -Aufnahme und die Wasserabgabe über Transpiration an die Atmosphäre. Durch ein Netzwerk von Ionenkanälen im Plasmalemma und im Tonoplasten wird die Stomatabewegung kontrolliert. Zum Schluß der Stomata ist ein Efflux von Kaliumionen und Anionen, eine Zuckerabnahme und die Umwandlung von Malat in osmotisch inaktive Stärke nötig (MacRobbie, 1998). Wesentlich für die ABA-Signalkaskade in Schließzellen ist ein Calciumeinstrom und eine Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentration (McAinsh et al., 1990; Ward et al., 1995; McAinsh et al., 1997). Diese erfolgt sowohl durch extrazellulären

Calciuminflux wie auch durch Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern. Ein Aktivator von an der ABA Signalkaskade beteiligten, im Plasmalemma lokalisierten Calciumkanälen sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Pei et al., 2000). In tierischen Zellen können durch Aktivierung von Inosit-1,4,5-trisphosphat-(InsP₃)-Rezeptoren beziehungsweise von Ryanodinrezeptoren intrazellulär Calciumionen freigesetzt werden (Berridge, 1993). In Stomata führt vergleichbar sowohl InsP₃ wie auch cADPR zur Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (Gilroy et al., 1990; Leckie et al., 1998). Beide Calciumfreisetzungsmechanismen scheinen parallel an der ABA-Antwort beteiligt zu sein, da eine kombinierte Inhibierung beider Wege den ABA induzierten Stomataschluß unterbindet, während ein Inhibitor alleine nur zu einer schwachen Inhibierung führt (Jacob et al., 1999; Staxen et al., 1999; MacRobbie, 2000). Als eine weitere calciummobilisierende Komponente ist Sphingosin-1-phosphat an der zum Stomataschluß führenden ABA-Signalkaskade beteiligt (Ng et al., 2001).

Abscisinsäure löst wie andere zum Stomataschluß führende Stimuli, wie ROS, Kälte und externe Calciumionen, in Schließzellen Calciumoszillationen aus (Staxen et al., 1999; Allen et al., 2000). An Mutanten (*det3*, *gca2*), die bei entsprechenden Stimuli nicht mehr in der Lage sind, die Stomata zu schließen, konnte durch extern induzierte Calciumoszillationen ein

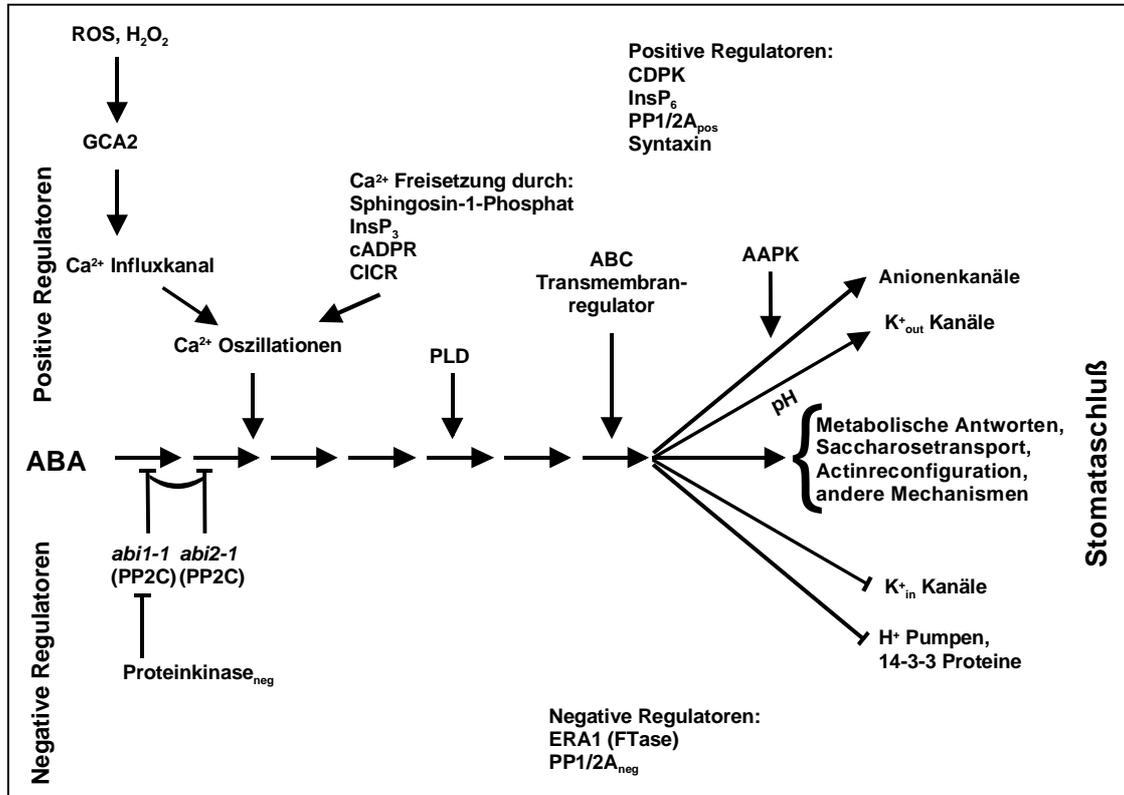


Abb. 3: Positive und negative Regulatoren der ABA-Signalkaskade in Schließzellen in einem vereinfachten Modell (verändert nach Schroeder et al., 2001)

Stomataschluß erreicht werden (Allen et al., 2000; Allen et al., 2001). Im Vergleich dazu kann in Wildtypschließzellen durch Unterbinden der Calciumoszillation ein Stomataschluß verhindert werden. Wesentlich für den Schließvorgang sind die Parameter der Oszillation, Frequenz, Anzahl der Perioden und Amplitude.

Die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration führt zur Aktivierung zweier Typen von Anionenkanälen. Sowohl langsam und länger anhaltend aktivierte, S-Typ, wie auch schnell aber transient aktive, R-Typ, Anionenkanäle setzen Anionen frei (Schroeder und Hedrich, 1989; Ward et al., 1995). Der Anionenausstrom verursacht eine Depolarisation und damit die Aktivierung von auswärts gerichteten Kaliumkanälen (MacRobbie, 1998; Schroeder und Hedrich, 1989). Die von Abscisinsäure ausgelöste Alkalisierung des Cytosols verstärkt die Aktivität der auswärts gerichteten Kaliumkanäle (Grabov und Blatt, 1998). Der Ausstrom an Ionen führt schließlich zu einer Verringerung des Turgors und damit zum Schluß der Stomata. Der größte Teil der beteiligten Ionen wird zuerst über entsprechende Kanäle aus der Vakuole freigesetzt. Zusätzlich wird durch Abscisinsäure die Ionenaufnahme, die für das Öffnen der Stomata nötig wäre, inhibiert.

1.2.4. Transiente Expression

Durch verschiedene Methoden können Komponenten eines Signalweges mittels Analyse charakteristischer Signalantworten oder über spezifische Interaktionen identifiziert werden. Bei Abscisinsäure etwa über Mutanten und deren verändertem Verhalten gegenüber ABA (Himmelbach et al., 1998; Finkelstein, 1994; Koornneef et al., 1984; Cutler et al., 1996). Die Interaktion der einzelnen Komponenten der Signalkaskade bestimmt die Signalweiterleitung. Zum Verständnis der Funktion des Signalweges ist die Anordnung der identifizierten Komponenten in der Kaskade wesentlich. Eine Möglichkeit bietet die physiologische Charakterisierung von Mutanten, wie bei Abscisinsäure die elektrophysiologischen Untersuchungen an Schließzellen (Pei et al., 2000) oder die Analyse von Revertanten aus Suppressorscreenings (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Die signalabhängige Genregulation kann genutzt werden biochemische Mechanismen, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind zu analysieren. Neben Expressionsstudien auf RNA-Ebene werden signalabhängig regulierte Reportergenkonstrukte verwendet. Derartige Konstrukte können in unterschiedlichen Systemen angewendet werden. In transgenen Linien kann über Kreuzungen ein Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten beziehungsweise anderen transgenen Linien erfolgen.

Daneben können in transienten Expressionssystemen Effekte auf die Genregulation untersucht werden. Es gibt verschiedene Methoden für einen direkten Gentransfer in Pflanzenzellen, der zu einer transienten Expression eingebrachter Gene führt. Durch Mikroinjektion von Reportergenkonstrukten konnte die oben erwähnte cADPR-Abhängigkeit

der ABA regulierten Genexpression gezeigt werden (Wu et al., 1997). Partikelbeschuß ist eine weitere Möglichkeit zum direkten Gentransfer in Pflanzenzellen, bei dem über Mikroprojekte DNA in Zellen eingeschossen wird (Klein et al., 1987). Die freie Zugänglichkeit des Plasmalemmas bei Protoplasten ermöglicht es Genen jede Zelle in definierter Konzentration zu erreichen. Damit eignen sich Protoplasten besonders für den direkten Gentransfer. Die DNA-Aufnahme in Protoplasten wird durch verschiedene Verfahren wie Elektroporation oder Behandlung mit Polyethylenglycol gefördert (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984).

Der größte Vorteil von transienten Expressionsanalysen ist der Zeitaufwand. Stabil transgene Linien zu erhalten kann mehrere Monate in Anspruch nehmen während transiente Expressionsexperimente in mehreren Tagen durchgeführt werden können. Limitierungen ergeben sich durch die Behandlung des Pflanzenmaterials und die in die Zelle aufgenommene DNA-Menge. Protoplasten etwa entsprechen nicht normalen Pflanzenzellen. Die Kontrolle transientser Expressionsexperimente in stabil transgenen Linien, wenn möglich, ist wichtig um getroffene Aussagen auf ganze Pflanzen übertragen zu können. Verschiedene Beispiele zeigen die Anwendung transientser Expression unterschiedlicher Genkonstrukte zur Untersuchung von Hormonsignaltransduktionswegen (Ezcurra et al., 2000; Gomez-Cadenas et al., 2001; Gubler et al., 1995; Kovtun et al., 1998; Kovtun et al., 2000; Penson et al., 1996; Skriver et al., 1991). Häufig werden an der Induktion von Genen beteiligte regulatorische Sequenzen in transienten Assays charakterisiert. Zum erstenmal angewendet wurde ein Pflanzenhormon abhängiges transientes Expressionssystem zur Analyse des *Em*-Promotors in Reisprotoplasten (Marcotte 1988). In Partikelbeschußexperimenten mit Gerste wurde die durch einen ABRC vermittelte ABA-Induktion eines Reportergens gezeigt (Shen und Ho, 1995b; Shen und Ho, 1996; Straub et al., 1994). Coexpression von regulierten Reportergenkonstrukten und Komponenten, die den entsprechenden Signalweg beeinflussen ist neben dem klassischen genetischen Ansatz eine weitere Möglichkeit Signaltransduktionswege in Pflanzen zu analysieren. In Maisprotoplasten konnte damit gezeigt werden, daß mutierte, konstitutiv aktive Formen zweier calciumabhängiger Proteinkinasen einen streßinduzierbaren Promotor aktivieren (Sheen, 1996) oder daß Proteinphosphatasen 2C als negative Regulatoren der ABA-Signaltransduktion wirken können (Sheen, 1998). Die Coexpression von Transkriptionsfaktoren und Reportergenkonstrukten, deren Promotor die entsprechende Bindungssequenz enthält kann Hinweise auf die durch den Transkriptionsfaktor bedingte transkriptionellen Regulation geben. Ein Beispiel ist die Untersuchung der basischen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren AREB1 und AREB2. In *Arabidopsis* Protoplasten können beide in Abhängigkeit von Abscisinsäure die Transkription eines Reportergens fusioniert an einen Minimalpromotor, der zwei ABRE's enthält aktivieren (Uno et al., 2000). Von Abe et al. (1997) wurde die

Aktivierung des ABA-regulierten *RD22*-Promotors mit *RD22BP1* oder *AtMYB2* durch Coexpression des jeweiligen transaktivierenden Proteins und einer *RD22*-Promotor- β -D-Glucuronidase-Fusion in *Arabidopsis*-Protoplasten nachgewiesen. Hoeren et al. (1998) konnten in *Arabidopsis* und *Nicotiana plumbaginifolia* Protoplasten die Aktivierung des *ADH1*-Promotors durch *AtMYB2* zeigen.

Durch die konstitutive Expression von Proteinen fusioniert mit zum Beispiel GFP, GUS oder anderen leicht nachweisbaren Markern kann in transienten Expressionsexperimenten eine Lokalisation der Fusionsproteine in den transfizierten Zellen erfolgen (Grebek et al., 1997).

1.3. Ziele der Arbeit

Abscisinsäure ist beteiligt an der Anpassung von Pflanzen an Umwelteinflüssen wie Kälte, Trockenheit oder Salzstreß. Die Kenntnis der Streßsituation von Pflanzen und deren mögliche Beeinflussung kann etwa für landwirtschaftlich genutzte Pflanzen von Bedeutung sein. Durch verschiedene Ansätze wurden an der ABA-Signaltransduktion beteiligte Komponenten identifiziert und Einblicke in die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung gegeben. Viele Bestandteile des komplexen und verzweigten Netzwerkes sind jedoch noch nicht identifiziert. Darüberhinaus muß die Positionierung der beteiligten Mechanismen zueinander bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*. Als Ergänzung zu Transgenen sollten in möglichst kurzer Zeit Aussagen über an der Signalkaskade beteiligte Komponenten gemacht werden können. Als mögliches System eignet sich die transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten. An Hand ABA vermittelter Genregulation können Effekte auf die ABA Signalkaskade untersucht werden. Ein Vergleich der Expression in Wildtyp- und Mutantenprotoplasten ist möglich. An der Transduktion beteiligte Komponenten können als Effektoren genutzt werden.

Vorhandene in der ABA-Antwort gestörte Mutanten sollten mit diesem System charakterisiert werden. Die transkriptionelle Regulation von *AtHB-6* einem durch ABA induzierten Transkriptionsfaktor wurde untersucht. Durch die Fusion an GFP ergeben sich Möglichkeiten für eine zelluläre Lokalisation von an der ABA-Signaltransduktion beteiligten Proteinen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Pflanzen

Ökotypen

In dieser Arbeit wurde mit *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze gearbeitet. Verwendet wurden die Ökotypen Reschiev (RLD), Columbia (Col) und der die *erecta*-Mutation tragende Ökotyp Landsberg *erecta* (La-er).

Alle Ökotypen sind über das *Arabidopsis Biological Resource Center*, Ohio, USA erhältlich.

Mutanten

Die untersuchten *gca*-Mutanten wurden von Dr. M. Iten im Labor von Prof. Dr. E. Grill isoliert (Iten 1992) und von Dr. T. Ehrler (1997) und Dr. G. Benning (1999) weiter bearbeitet. Die gegenüber ABA hypersensitive Mutante *ahr1* wurde von Dr. Y. Wang identifiziert und charakterisiert. Die ABA-insensitiven Mutanten *abi1* und *abi2* (Koornneef et al., 1984) sind über das *Arabidopsis Biological Resource Center* erhältlich.

Transgene

Für Kreuzungen wurden von Dr. A. Himmelbach (1999) generierte transgene Linien verwendet. Diese Linien entstanden durch Transformation mit Konstrukten zur konstitutiven Expression verschiedener *AtHB-6* Versionen (Söderman et al., 1999). Von *AtHB-6*, einem Homöodomän-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor (Ruberti et al., 1991), wurde die Volllänge cDNA in *sense* sowie *antisense* Orientierung und eine Form, bei welcher die DNA-bindende Domäne von *AtHB-6*, Helix 3, deletiert ist (vgl. Abb. 42), jeweils unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors, für die Transformation der Pflanzen eingesetzt.

2.1.2. Mikroorganismen

Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 mit dem Ti-Plasmid pGV3850 (Zambrisky et al., 1983) beziehungsweise mit pGV3101 (Koncz und Schell, 1986) wurde für die *in Planta* Transformation verwendet. Die *E. coli* Stämme DH5 α und JM110 (Stratagene GmbH, Heidelberg) wurden bei Klonierungen eingesetzt.

2.1.3. Plasmid Vektoren

In **Tab. 1** sind die für Klonierungen, Transformation und Transfektion genutzten Vektoren dargestellt.

Vektor	Referenz	Kurzbeschreibung	Verwendung
pBI121	Jefferson 1987	Binärer Vektor für Agrobakterien	Konstruktion von pBIAscl (vgl. Abb. 60)
pBI221	Jefferson 1987	GUS-Kassette unter Kontrolle des 35S Promotors in pUC18	Reportergenkonstrukte/interner Standard für Transfektionen
pSK	Stratagene, Heidelberg	Vektor für Klonierungen	Reportergenkonstrukte
PSMGFP	Davis 1996	<i>Soluble modified GFP</i>	Reportergenkonstrukte
PSMRSGFP	Davis 1996	<i>Soluble modified red shifted GFP</i>	Reportergenkonstrukte
PAEQ	Prasher 1985	Aequorin-cDNA	Interner Standard für Transfektionen
pGEM-luc	Promega, USA	Luciferase-cDNA	Reportergenkonstrukte
pJD301	Luehrsen 1992	Luciferasegen unter Kontrolle des 35S Promotors	Standard für Transfektionen
pBIC20-abi1	Meyer 1994	Cosmid (genomisches Fragment mit <i>abi1</i> Gen)	Cosmidtransfektion/ <i>abi1</i> – Expressionsvektor
pBIC20-abi2	Rodriguez 1998	Cosmid (genomisches Fragment mit <i>abi2</i> Gen)	Cosmidtransfektion/ <i>abi2</i> – Expressionsvektor
San2	Fütterer 1990	35SS1Promotor	GFP-Expressionsvektoren
p35SAtHB-6	Himmelbach 2001	<i>AtHB-6</i> -Expressionsvektor	Transfektion
pAntiAtHB-6	Himmelbach 2001	<i>Antisense AtHB-6</i> -Expressionsvektor	Transfektion
pΔAtHB-6	Himmelbach 2001	ΔH3 <i>AtHB-6</i> -Expressionsvektor	Transfektion

Tab. 1: Vektoren

Für transiente Expressionsexperimente zur Untersuchung der *AtHB-6* Regulation fanden verschiedene von Dr. A. Himmelbach zur Verfügung gestellte Vektoren Verwendung. Diese pBI221 Derivate dienten zur Überexpression verschiedener *AtHB-6* Versionen, analog zu den für Kreuzungen verwendeten transgenen Pflanzen. *AtHB-6* in *sense* (p35SAtHB-6) und *antisense* (pAntiAtHB-6) Orientierung sowie die für die DNA-Bindedomäne deletierte Version (pΔAtHB-6) wurde eingesetzt.

2.1.4. Enzyme

Die zur Protoplastierung benutzten Enzymfraktionen Macerozym R-10 und Cellulase R-10 wurden aus Japan von Yakult Honshia Co. Ltd. importiert.

DNA-modifizierende Enzyme, Restriktionsenzyme, Nukleasen und Proteasen sowie deren Puffer sind von verschiedenen Firmen bezogen worden. In **Tab. 2** sind die Bezugsquellen zusammengefaßt.

Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-Ligase / -Kinase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH
TAQ-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Pwo-Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vent-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
M-MuLV RT	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Klenow-Fragment Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Endonukleasen (Mung Bean)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
Ribonuklease A	Serva GmbH, Heidelberg
Desoxyribonuklease (RNase-frei)	Boehringer Mannheim GmbH
Lysozym	Fluka Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Tab. 2: Enzyme

2.1.5. Chemikalien

Alle Feinchemikalien und Lösungsmittel sind, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka/Sigma und Serva bezogen worden. Das Detergens Silvet L-77 stammte von Lehle Seeds (Round Rock, Texas, USA). Das Antibiotikum Betabactyl (Timenthen) ist ein Gemisch aus Ticarcillin (500 mg Dinatriumsalz) und Clavulansäure (20 mg Kaliumsalz). Beide Komponenten sind bei SmithKlineBeecham GmbH & Co KG, Herrenberg erhältlich.

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis Pflanzen sind in Erde und steril auf Agar-Platten oder in Schüttelkulturen angezogen worden. Die Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen erfolgte auf einem kombinierten Pflanzenwachstumsmedium, das die Makrosalze aus dem MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962), die Mikrosalze und Vitamine nach dem B5-Medium (Gamborg et al., 1968), 1 % Saccharose und 0,1 % 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Puffer, pH=5,8, enthält. Für Anwendung in Petrischalen wurde das Medium mit 0,9 % Agar verfestigt. Hormonzusätze erfolgten nach dem Autoklavieren.

In Erde erfolgte die Anzucht in Phytokammern (Convion, Kanada) unter Langtagbedingungen von 16 h Licht ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 17 °C, 65 % Luftfeuchtigkeit) und 8 h Dunkelheit (22 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit) in einer Perlit-Einheitserde (Typ T) Mischung (15-20 Pflanzen pro 9 x 9 cm Topf). Die Generationszeit unter diesen Bedingungen lag bei 6-8 Wochen.

Für die Anzucht auf Agar-Platten oder in Schüttelkulturen wurden *Arabidopsis*-Samen zunächst in einer Lösung aus 80 % Ethanol und 0,1 % Triton-X 100 für 30 min sterilisiert, anschließend einmal mit sterilem Wasser gewaschen und mit 3 % Natriumhypochlorit-Lösung für 5 min ein zweites Mal sterilisiert. Die abschließend mindestens fünf Mal mit sterilem Wasser gewaschenen Samen wurden entweder auf verfestigtem Wachstumsmedium einzeln ausplattiert oder in flüssigem Wachstumsmedium (30 ml Medium mit 20 Samen pro 100 ml Erlenmeyerkolben) in Schüttelkulturen bei 105 Umdrehungen pro Minute weiterkultiviert. Die Anzucht der sterilen Kulturen erfolgte unter Dauerlicht ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei 22 °C. Um die eventuell noch vorhandene Dormanz zu brechen, wurden die hydratisierten Samen vor der Kultivierung zwei Tage bei 4 °C gelagert.

2.2.2. Klonierungstechniken

Standardklonierungstechniken, wie Restriktionsverdau, Ligation, *E.coli* Transformation, Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Agarosegelelektrophorese, wurden den Standardprotokollen entsprechend durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Für PCR wurde Pwo- oder Vent-Polymerase zur Verringerung der Fehlerrate verwendet. Oligonukleotide für PCR oder Ligationen wurden von MWG-Biotech AG bezogen (siehe Anhang für die entsprechenden Sequenzen).

2.2.3. Southern

2.2.3.1. DNA-Transfer auf Nylon-Membranen

Über Gelelektrophorese getrennte DNA wurde mittels eines Kapillarstromes auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B, Pall) unter alkalischer Denaturierung in 0,4 M NaOH transferiert (Reed und Mann, 1985). Nach dem über Nacht durchgeführten Kapillartransfer ist die Membran mit 2 x SSC neutralisiert und getrocknet worden. Zur Fixierung der DNA wurden die Filter zusätzlich 30 min bei 80 °C gebacken.

2 x SSC: 300 mM NaCl
 30 mM Natriumcitrat, pH 7.0

2.2.3.2. Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Sonden für Southern-Experimente sind mit Hilfe von [α -³²P]-dATP und spezifischen Oligonukleotiden (Sequenzen siehe Anhang) nach dem Protokoll von Feinberg und Vogelstein (1983) hergestellt worden. Für alle Markierungen wurde dabei der halbe Ansatz mit 25 μ Ci [α -³²P]-dATP verwendet. Die Synthese erfolgte bei 37 °C für 2 h. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 10 mM EDTA abgestoppt. Die DNA wurde zur Denaturierung 10 min bei 95 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Die radioaktiv markierte DNA wurde ohne Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide für Hybridisierungen verwendet.

2.2.3.3. DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung wurde nach Church und Gilbert (1984) in einem SDS-Phosphat-Puffer bei 65 °C durchgeführt worden. Die Filter sind vor Zugabe der denaturierten Sonde bei 65 °C in Hybridisierungspuffer für mindestens 30 min vorhybridisiert worden, um unspezifische Bindung der Hybridisierungsprobe zu unterdrücken. Anschließend wurden die Filter nach Zusatz der Sonde über Nacht in Röhren in einem Hybridisierungsofen (Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung sind die Filter mit einem SDS-Phosphat-Waschpuffer I höherer Stringenz für 30 min unter mehrmaligen Wechsel der Lösung gewaschen worden, bis nur noch ein leichtes Hintergrundsignal mit einem Handmonitor zu detektieren war. Bei hohem Hintergrundsignal wurde mit einem zweitem SDS-Phosphat-Puffer II stringenter gewaschen.

Die Analyse der markierten Filter erfolgt mit einem *Phosphorimager* (BAS 1800) der Firma Fuji und der entsprechenden Software TINA der Firma Raytest (Straubenhardt, Deutschland).

Hybridisierungspuffer:	400 mM Na-Phosphat (pH=7,2) 7 % SDS 1 mM EDTA
Waschpuffer I:	40 mM Na-Phosphat (pH=7,2) 5 % SDS 1 mM EDTA
Waschpuffer II:	40 mM Na-Phosphat (pH=7,2) 1 % SDS 1 mM EDTA

2.2.4. Northern und RTPCR

2.2.4.1. RNA-Isolation

RNA wurde aus 14 Tage alten, in Schüttelkulturen angezogenen Keimlingen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg gefrorenes Pulver wurde mit 0,5 ml Lösung D versetzt und homogenisiert. Zu der erhaltenen Suspension wurden 50 µl Natriumacetatlösung gegeben. Nach Mischen wurde mit wassergesättigtem Phenol und Chloroform/Isopentanol extrahiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (12000 rpm; 20 min; 4°C) wurde der wäßrige Überstand zur RNA-Fällung mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Nach 1-2 h bei -20°C wurde wie oben zentrifugiert, der Rückstand in 300 µl Lösung D resuspendiert und erneut mit gleichem Volumen Isopropanol präzipitiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC behandeltem Wasser gelöst.

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

Lösung D:	4 M Guanidinium-Thiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH=7,0 0,5 % Natriumlaurylsarcosin 0,75 % β-Mercaptoethanol
Natriumacetat:	2 M, pH=4,0
Phenol:	wassergesättigt
Chloroform/Isopentanol:	49 :1
DEPC behandeltes H ₂ O :	H ₂ O mit 0,001 Volumen DEPC versetzt bei RT 24 h inkubiert, autoklaviert

2.2.4.2. Northern Blot

Zu den RNA-Proben (10-20 µg Gesamt-RNA) wurden 2 µl 5 x MOPS, 3,5 µl 37,5%iger Formaldehyd und 10 µl deionisiertes Formamid gegeben. Nach 15-minütiger Denaturierung

bei 55°C und Mischen mit 1 µl RNA-Auftragspuffer wurde das Probengemisch auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 50 V in 1 x MOPS-Laufpuffer. Vor dem Kapillartransfer wurde das Gel 10 min mit H₂O und 10 min mit 20 x SSC gewaschen. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20 x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran. Der Blot wurde anschließend mit 2 x SSC (siehe 2.2.3.1.) gewaschen und eine Stunde bei 80°C gebacken.

5 x MOPS:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH=8,0
RNA-Gel:	1,2 g Agarose in 62,2 ml H ₂ O, 20 ml 5 x MOPS, 17,8 ml 37%iges Formaldehyd
Laufpuffer:	1x MOPS mit 30 µl EtBr Stammlösung
Deionisiertes Formamid:	100 ml Formamid inkubiert mit 10 g Ionenaustauscher für 30 min bei RT und neutralem pH und anschließend filtriert
RNA-Auftragspuffer:	50 % Ficoll, 1mM EDTA mit Bromphenolblau gefärbt

2.2.4.3. DIG-markierte DNA-Sonde

Die für Northern verwendeten Sonden wurden über eine PCR markiert. Der Reaktionsansatz entsprach dem einer Standard-PCR, wobei ein Teil des dTTP durch DIG-markiertes dUTP ersetzt wurde. Durch das veränderte Laufverhalten wurde der Einbau auf einem Agarosegel überprüft.

DIG-dNTP-Mix:	2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1,3 mM dTTP, 0,7 mM DIG-dUTP
---------------	------------------------------------------------------------------

2.2.4.4. Hybridisierung

Der gebackene Northernblot wurde mit 2 x SSC befeuchtet und bei 68°C im Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) mit Prähybridisierungslösung äquilibriert. Währenddessen wurde die DIG-markierte Sonde denaturiert und zu einer abgemessenen Menge auf 68°C temperierten Prähybridisierungspuffer gegeben. Nach einer Stunde Prähybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und der Blot über Nacht bei 68°C inkubiert.

Prähybridisierungslösung:	0,25 M Na ₂ HPO ₄ , pH=7,2 1 mM EDTA 20 % SDS 0,5 % Blocking Reagenz
Hybridisierungslösung:	wie Prähybridisierungslösung mit 10 ng/ml DIG-markierter denaturierter Sonde

2.2.4.5. Immundetektion

Durch stringentes Waschen mit Waschpuffer bei 65°C wurde die unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Nachfolgende Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler ausgeführt. Der Blot wurde zunächst mit Waschpuffer I gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen eine Stunde mit Blockierungspuffer inkubiert. Darauf folgte die Zugabe des 1:20.000 mit Waschpuffer I verdünnten, DIG-gerichteten und AP-gekoppelten Antikörperkonjugats (37,5 mU/ml entsprechend den Angaben des Herstellers, Boehringer Mannheim GmbH). Nach 30 min wurde überschüssiges Konjugat durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer I entfernt. Zur Einstellung des pH-Werts und der Salzkonzentration für die alkalische Phosphatase wurde der Blot vor Zugabe des Substrats 5 min in Substratpuffer äquilibriert. Das Substrat CDP* wurde 1:100 in Substratpuffer verdünnt, auf der Membran verteilt und dort für 5 min belassen. Die anschließend in Plastikfolie eingeschweißte Membran wurde mit der RNA-Seite zum Röntgenfilm weisend exponiert. Die Expositionszeit lag bei 3 h. Verwendete Antikörper sowie Substrat und DIG-markiertes dUTP stammten von Boehringer Mannheim.

Waschpuffer (65°C):	20 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM EDTA 1 % SDS
Waschpuffer I:	0,1 M Maleinsäure 3 M NaCl 0,3 % Tween 20
Blockierungspuffer:	0,5 % Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim GmbH) in Waschpuffer I
Konjugatpuffer:	anti DIG-Fab-Fragment 1:20.000 in Blockierungspuffer
Substratpuffer:	0,1 M Tris-HCl, pH=9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Substrat:	CDP* (25 mM) 1:100 in Substratpuffer

2.2.4.6. Reverse Transkription von RNA und RT-PCR

Die verwendete RNA wurde mit RNase-freier DNase behandelt, die DNase anschließend hitzeinaktiviert und die RNA mit Ammoniumacetat und Ethanol präzipitiert (Sambrook und Russell, 2001). Für die cDNA-Synthese wurde M-MuLV-Reverse Transkriptase von Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen verwendet. Die einzelnen Reaktionsschritte erfolgten im Robocycler von Stratagene. Im ersten Schritt wurde 1 µg RNA bei 65°C für 10 min denaturiert. Nach dem Zusatz von DTT, RNasin, Oligonukleotiden und dNTP`s wurde für weitere 10 min bei 45°C und anschließend nach der Zugabe des Reaktionspuffers und der Reversen Transkriptase 1 h bei 37°C in einem Endvolumen von 10 µl inkubiert.

Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch:

RNA:	0,1 g/l
DTT:	10 mM
RNAsin:	1 u/μl
Oligonukleotide:	2 μM
dNTPS:	1 mM
Reaktionspuffer:	50 mM Tris-HCl (pH=8,3), 6 mM MgCl ₂ , 40 mM KCl, 50 μg/ml BSA
RT:	5 u/μl

Die RT-PCR wurde analog zur PCR durchgeführt. Als Matrize wurde ein Aliquot des mit Natriumacetat (pH=5,2; Endkonzentration: 0,3 M) und Ethanol (100 %; 2 Volumen) gefällten und in H₂O gelösten RT-Ansatzes verwendet. Die erhaltenen Produkte wurden über ein Agarosegel (1 %) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Zum Teil wurden die Produkte für einen empfindlicheren Nachweis in einem Southern (2.2.3.) mit radioaktiv markierten Sonden detektiert.

2.2.5. In planta Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Stabile Transformationen von *Arabidopsis thaliana* wurden mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transfers und der Vakuuminfiltrationsmethode nach Bent et al. (1994) durchgeführt. Als binärer Ausgangsvektor für Konstrukte wurde pBI121 (Jefferson, 1987) verwendet. Zunächst sind für die Transformation die *Agrobacterium*-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten angezogen worden. Dafür wurden 3 ml Vorkulturen mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht in LB-Medium mit Kanamycin (50 μg/ml) und Rifampicin (10 μg/ml) bei 30 °C inkubiert. Ausgehend von diesen frischen Vorkulturen wurde eine Hauptkultur von 200 ml LB-Medium ohne Selektion für 24 h bei 30 °C angezogen. Die im Anschluß abzentrifugierten Zellen (3000 g, 4 °C, 10 min) wurden in dem Infiltrationsmedium resuspendiert. Die eigentliche *in planta* Transformation ist mit 5-6 Wochen alten, gerade blühenden Pflanzen (9 x 9 cm Töpfe mit 15-20 Pflanzen) durchgeführt worden. Die Infloreszenzen wurden kopfüber in die *Agrobacterium*-Zellen-Suspension gehalten und für 5 min durch Anlegen eines Vakuums (100 mbar) mit den Zellen infiltriert. Dabei sind alle Blüten und die Rosetten der Pflanzen von der Zell-Suspension benetzt worden. Bei Zugabe des Detergens Silvet L-77 konnte auf das Anlegen des Vakuums verzichtet werden, die Pflanzen wurden nur komplett in die *Agrobacterium*-Suspension eingetaucht. Die infiltrierten Pflanzen sind für 2 bis 4 Wochen bis zur Samenreife kultiviert worden. Die gesetzten Samen (T₀) wurden mit Hilfe von Kanamycin nach Transgenen selektioniert. Für das Einbringen von Konstrukten wurden die Ökotypen Columbia, RLD oder La-er verwendet. Die Transformationseffizienzen bei Columbia und RLD betragen 0,1-1 %, bei La-er lag die Transformationsrate unter 0,1 %.

Infiltrationsmedium: 0,5x MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit
50 g/l Saccharose
10 µg/l BAP
50 µl/l Silvet L-77

2.2.5.1. Analyse von transgenen Pflanzen

Selektion

Arabidopsis Samen aus der T₀-Generation wurden mittels Kanamycin auf Transgene selektiert. Die sterilisierten Samen sind auf Wachstumsmedium mit Kanamycinsulfat (50 µg/ml) und Betabactyl (30 µg/ml) ausplattiert worden. Die Wachstumsbedingungen entsprachen den Bedingungen, unter denen *Arabidopsis*-Keimlinge auf Agarplatten angezogen wurden. Nach 10 Tagen Wachstum auf kanamycinhaltigem Medium konnten die antibiotikumresistenten, transgenen Keimlinge an ihrem kontinuierlichen Wachstum identifiziert werden. Nicht transgene Keimlinge wurden im Wachstum gehemmt und bleichten schließlich aus.

Isolation von genomischer DNA

Genomische Pflanzen-DNA wurde nach der CTAB-Methode von Rogers und Bendich (1994) isoliert. Verwendet wurde Blattmaterial von in Erde angezogenen Pflanzen wie auch steril angezogene Keimlinge (Agar-Platten oder Schüttelkulturen). Um die Zellwände aufzubrechen und das Pflanzenmaterial zu homogenisieren wurde dieses zunächst in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Anschließend ist das feine Pulver in bei 65 °C vorgewärmtes 2 x CTAB aufgenommen (1 ml / g Frischgewicht Pflanzenmaterial) und resuspendiert worden. Die CTAB-Phase wurde zur Entfernung von Proteinen und Chlorophyllen zweimal mit Chloroform extrahiert. Vor der zweiten Extraktion wurde die Lösung mit 1/10 Volumen vorgewärmtem (65 °C) 10 x CTAB versetzt. Nach der Fällung des CTAB-DNA-Komplexes unter Niedrigsalz Bedingungen mit 1,3 Volumen CTAB-Präzipitationspuffer ist die DNA wieder in Hochsalz-TE aufgenommen worden. Die schließlich mit Ethanol präzipitierte DNA wurde phenolisiert und in 0,1 x TE gelöst. Zur Isolation von DNA aus Einzelpflanzen sind 300-400 mg Blatt- oder Keimlingsmaterial aufgearbeitet worden. Aus dieser Materialmenge wurden etwa 5 µg DNA isoliert. Die DNA wurde für PCR-Analysen eingesetzt.

2 x CTAB: 2 % CTAB
100 mM Tris-HCl (pH=8,0)
20 mM EDTA
1,4 M NaCl
1 % PVP

10 x CTAB: 10 % CTAB
700 mM NaCl

CTAB-Präzipitationspuffer:	1 % CTAB 50 mM Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM EDTA
Hochsalz-TE :	10 mM Tris-HCl (pH=8,0) 1 mM EDTA 1 M NaCl
0,1 x TE:	1 mM Tris-HCl (pH=8,0) 0,1 mM EDTA

2.2.6. Kreuzungen

Die für Kreuzungen verwendeten, etwa 3-4 Wochen alten, blühenden Pflanzen waren in Phytokammern in Erde angezogen worden. Kurz vor der Blütenentfaltung wurden beim Pollenrezeptor zwei bis drei geschlossene Blüten emaskuliert. Kelch-, Blüten- und Staubblätter der Blüten wurden mit einer Pinzette entfernt und damit die Gynoeceen freigelegt. Die restlichen Blüten des Blütenstandes wurden ebenfalls entfernt.

Mehrere reife Staubblätter einer frisch geöffneten Blüte des Pollendonors wurden zur Bestäubung der freigelegten Narbe des Pollenrezeptors verwendet. Um eine weitere unkontrollierte Bestäubung zu verhindern wurden die künstlich bestäubten Fruchtknoten in Frischhaltefolie eingepackt. Die reifen F1-Samen der Kreuzungen wurden zwei bis drei Wochen nach der Bestäubung geerntet.

Gekreuzt wurden homozygote, kanamycinresistente Reporterlinien mit Mutanten beziehungsweise mit anderen homozygoten transgenen Linien. Pollendonator war jeweils die Reporterlinie. Die erfolgreiche Kreuzung mit Mutanten wurde über Kanamycinselektion der F1-Samen getestet. Bei Kreuzungen mit anderen ebenfalls kanamycinresistenten Transgenen wurden die Kreuzungen mittels des entsprechenden Reporterassays überprüft. Für weitere Experimente wurden segregierende F2-Samen der erfolgreichen Kreuzungen eingesetzt.

2.2.7. Transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten

2.2.7.1. DNA-Isolation für Transiente Expression

Für transiente Expressionsexperimente wurden relativ große Mengen an Plasmid-DNA, etwa 100 µg pro Transfektion, benötigt. Gereinigt wurde die DNA aus *E. coli*-Kulturen über alkalische Lyse der Zellen und mehrere Fällungs- und Extraktionsschritte (Sambrook und Russell, 2001).

Mit einer Vorkultur wurden 400 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 4 °C abzentrifugiert (4.000 U/min; 25 min), der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Durch den Zusatz von Lösung 2 erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min die Lyse der Bakterien. Mit der

Zugabe von 15 ml der Lösung 3 wurde SDS mit Proteinen und genomischer DNA gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation (4 °C; 8.000 U/min) wurde der Überstand durch Faltenfilter filtriert und mit 100 µl RNase (10 mg/ml) versetzt. Zum RNA-Verdau wurde die klare Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Zusatz von 60 ml 2-Propanol ist die Plasmid-DNA gefällt worden. Das nach der Zentrifugation bei 4 °C (8.000 U/min; 30 min) erhaltene Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in H₂O gelöst. Zur weiteren Reinigung ist die Lösung mehrmals, bis keine Interphase mehr erkennbar war, mit Phenol/Chloroform/Isopentanol und Chloroform/Isopentanol extrahiert worden. Noch vorhandene Chloroform/Isopentanol-Reste wurden durch eine Fällung mit Natriumacetat (3 M, pH=5,6) und Ethanol entfernt. Im Anschluß wurde die in H₂O gelöste DNA mit einem Volumen PEG-Lösung versetzt und bei 4 °C zentrifugiert (12.000 U/min; 20 min). Das mit 80%igem Ethanol gewaschene Pellet ist bei Raumtemperatur getrocknet und in H₂O gelöst worden. Abschließend wurde nochmals mit Chloroform/Isopentanol extrahiert und die Plasmid-DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Nach dem Waschen mit 80%igem Ethanol wurde die DNA in möglichst kleinem Volumen H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm.

Lösung 1:	50 mM Glucose 10 mM EDTA (pH=8,0) 10 mM Tris-HCl (pH=8,0)
Lösung 2 :	0,2 M NaOH 1 % SDS
Lösung 3 :	3 M CH ₃ COO ⁻ K ⁺ -CH ₃ COOH (pH=5,0)
PEG-Lösung:	13 % PEG-6000 1,6 M NaCl
Phenol/Chloroform/Isopentanol:	49:48:1
Chloroform/Isopentanol:	48:1

2.2.7.2. Protoplastierung

Die Protoplastenpräparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Abel und Theologis (1994). Zur Protoplastierung wurden etwa 4 Wochen alte, in Erde angezogene Pflanzen verwendet. Von diesen Pflanzen sind 3-4 g Blätter abgeschnitten und mit 0,5 M Mannitlösung gewaschen worden. Das Blattmaterial wurde anschließend in 20 ml Enzymlösung überführt und bei 23 °C für 3 h geschüttelt (50 U/min). Die entstandene Protoplasten-Suspension wurde durch ein Netz mit 150 µm Maschenweite zur Abtrennung unverdaulichem Materials filtriert. Nach einer Zentrifugation bei 60 g für 2 min ist der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig in Waschlösung 1 resuspendiert worden. Der Waschvorgang wurde mit gleichen Zentrifugationsbedingungen und Waschlösung 2 beziehungsweise WI wiederholt bis die Protoplasten schließlich nach nochmaliger

Zentrifugation in MaMg aufgenommen wurden. Die Anzahl der Protoplasten wurde vor dem letzten Zentrifugationsschritt bestimmt. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit der Zellen ist mit Fluoresceindiacetat angefärbt worden (Nunberg und Thomas, 1993). Mittels eines Hematocytometers wurde die Anzahl der fluoreszierenden Protoplasten pro Volumeneinheit mit einem Zeiss Axioskop und einem FITC Filtersatz (480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter) ermittelt. FDA gelöst in Aceton wurde auf das Hematocytometer aufgebracht. Nachdem der Aceton verdampft war wurde die Protoplastensuspension aufgetragen, mit Deckglas versehen und ausgezählt. Mit MaMg ist der Zählung entsprechend eine Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Protoplasten pro ml eingestellt worden.

Enzymlösung:	1 % Cellulase R-10 0,25 % Macerozyme R-10 400 mM Mannit 8 mM CaCl ₂ 1 % BSA 5 mM MES-KOH (pH=5,6)
FDA-Lösung:	1 g/l in Aceton

Bei der Herstellung der Enzymlösung wurde eine Stammlösung mit 2 % Cellulase, 0,5 % Macerozyme und 10 mM MES-KOH (pH=5,6) gegen 10 mM MES-KOH (pH=5,6) zweimal für je 2 h dialysiert und mit PMSF (0,5 mM) behandelt. Anschließend wurde Mannit und CaCl₂ zugesetzt und die Lösung bei 55 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Zusatz von BSA und der Kontrolle des pH-Wertes wurde die fertige Lösung durch 0,22 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Waschlösung 1:	167 mM Mannit 133 mM CaCl ₂
Waschlösung 2:	333 mM Mannit 67 mM CaCl ₂
WI:	0,5 M Mannit 20 mM KCl 1 % BSA 4 mM MES-KOH (pH=5,8)
MaMg:	400 mM Mannit 15 mM MgCl ₂ 5 mM MES-KOH (pH=5,6)

2.2.7.3. Transfektion und Kultivierung der Protoplasten

Zur Förderung der DNA-Aufnahme in die Protoplasten wurde Polyethylenglycol verwendet. Die zu transfizierende DNA wurde in gleichem Volumen 1M Mannit vorgelegt. Zu dieser

Lösung wurden $2 \cdot 10^6$ Protoplasten in MaMg gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Nach dem Zusatz von einem Volumen PEG-Lösung wurde wieder vorsichtig gemischt und die Suspension für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 Volumen WI (2.2.6.2.) zugegeben. Die erhaltene Suspension ist bei 60 g für 2 min zentrifugiert worden und wurde in WI resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet wieder in WI aufgenommen. Je nach Experiment wurde die Protoplastensuspension gesplittet und mit Zusätzen wie Abscisinsäure versehen. Die verschiedenen Proben wurden schließlich im Dunkeln bei 23 °C und Schütteln mit 30 U/min bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

PEG-Lösung: 300 mM CaCl_2
 40 % PEG-4000
 0,5 % MES-KOH (pH=5,8)

Alternativ zur PEG-vermittelten DNA-Aufnahme wurden Protoplasten elektroporiert (Nunberg und Thomas, 1993). Die gewaschenen Protoplasten wurden in Elektroporationspuffer aufgenommen. Etwa 10^6 Zellen wurden in Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überführt, für 10 min auf Eis gekühlt und schließlich elektroporiert (EasyJet Plus Elektroporator, Equibio; $U = 200 \text{ V}$, $t = 8 \text{ ms}$, $C = 600 \text{ } \mu\text{F}$, $R = 89 \text{ k}\Omega$). Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Zellen mit Elektroporationspuffer auf 2,5 ml Endvolumen verdünnt und bei 23 °C im Dunkeln mit 30 U/min bis zur Extraktion inkubiert.

Elektroporationspuffer: 30 mM HEPES-NaOH (pH=7,2)
 150 mM NaCl
 5 mM CaCl_2
 427 mM Mannit

2.2.7.4. Extraktion

Für verschiedene Reporter-genassays wurden Proteinextrakte ausgehend von transfizierten Protoplasten hergestellt. Je nach Reporter-gen wurden unterschiedliche Extraktionspuffer verwendet. Zuerst wurden die Protoplasten bei 60 g 2 min zentrifugiert und mit 0,5 M Mannit gewaschen. Bei gleichen Zentrifugationsbedingungen wurde die Protoplastensuspension möglichst weit eingeeengt und schließlich in 100 μl Extraktionspuffer aufgenommen. Zum Aufschluß der Protoplasten wurden diese resuspendiert und schockgefroren. Der nach Zentrifugation (14.000 U/min; 5 min) erhaltene Überstand wurde bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und für die unterschiedlichen Reporter-genassays eingesetzt.

2.2.8. Aktivitätsnachweis von Reporter genen

2.2.8.1. β -D-Glucuronidase

Die β -D-Glucuronidaseaktivität wurde nach den Angaben von Jefferson (1987) bestimmt. In transienten Expressionsexperimenten wurde, wenn ausschließlich Glucuronidase-Aktivität untersucht werden sollte, mit GUS-Extraktionspuffer nach oben beschriebener Vorgehensweise (2.2.7.4.) extrahiert. Für die Bestimmung von Luciferase- und GUS-Aktivität nebeneinander wurde zur Extraktion CCLR benutzt (Luehrsen et al., 1992). Für die Extraktion aus ganzen Pflanzen wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren, gemörsert und in GUS-Extraktionspuffer aufgenommen (etwa 50 mg Pflanzenmaterial pro 200 μ l Extraktionspuffer). Der nach Zentrifugation (10 min, 14.000 U/min) erhaltene klare Überstand wurde für den GUS-Nachweis eingesetzt. Die im Extrakt vorhandene Glucuronidaseaktivität wurde fluorimetrisch erfaßt. Als Substrat ist 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid verwendet worden. Die β -D-Glucuronidase katalysiert die Esterhydrolyse und damit die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon. 4-Methylumbelliferon kann fluorimetrisch (365 nm Anregung; 460 nm Emission) quantifiziert werden. Die Messung wurde in schwarzen Mikrotiterplatten (Nunc GmbH & Co. KG) im HTS 7000 Plus Bioassay Reader von Perkin Elmer durchgeführt. Zu 50 μ l Extrakt wurden 100 μ l Assaypuffer gegeben. Nach 10 s Schütteln im Bioassayreader wurde über 30 min alle 2 min die Fluoreszenz gemessen. Die gemessene Zunahme der relativen Fluoreszenz pro Zeiteinheit ist direkt proportional zur Enzymaktivität. Zur Standardisierung wurde 4-Methylumbelliferon verwendet.

Bei histochemischen Färbungen in Keimlingen wurde als Substrat für die Glucuronidase 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronid (X-Gluc) eingesetzt. Die Keimlinge wurden kurz mit Färbelösung vakuumfiltriert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend ist aus dem Gewebe mit 80%igem Ethanol bei 80 °C das Chlorophyll extrahiert worden, um auch schwächere Blaufärbung sichtbar zu machen.

GUS-Extraktionspuffer: 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH=7,0)
10 mM β -Mercaptoethanol
10 mM Na₂EDTA
0,1 % Natrium-Lauryl-Sarcosin
0,1 % Triton X-100

CCLR: 25 mM Tris-Phosphatpuffer (pH=7,8)
2 mM DTT
2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
10 % Glycerin
1 % Triton X-100

Assaypuffer: 1 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
50 mM Na-Phosphatpuffer (pH=7,0)
10 mM β -Mercaptoethanol
10 mM Na₂EDTA
0,1 % Natrium-Lauryl-Sarcosin

	0,1 % Triton X-100
Färbelösung:	50 mM Na-Phosphatpuffer (pH=7,0) 1 mM X-Gluc 0,5 % Dimethylformamid

2.2.8.2. *Photinus pyralis* Luciferase

Luciferasebestimmungen aus Extrakten wurden nach Luehrsen et al. (1992) durchgeführt. Die von Luehrsen et al. (1992) beschriebene Methode führt zu einer über einen längeren Zeitraum stabilen Lichtemission beim Luciferasenachweis im Gegensatz zu sehr kurzer Emission (0,3 s) bei Verwendung von Substratlösungen ohne Coenzym A. Für den Luciferasenachweis alleine oder neben β -D-Glucuronidase wurde mit CCLR (2.2.8.1.) extrahiert. Ausgehend von Protoplasten sind Extrakte wie oben beschrieben (2.2.7.4.) hergestellt worden. Ganze Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, gemörsert und in Extraktionspuffer (etwa 50 mg Pflanzenmaterial in 200 μ l CCLR) aufgenommen. Luciferase ist im, durch Zentrifugation (10 min, 14.000 U/min) erhaltenen, klaren Überstand bestimmt worden. Für den Nachweis neben Aequorin wurde als Extraktionspuffer CCLR-TX100 verwendet. Die Luciferaseaktivität der gewonnenen Extrakte ist im *flash`n glow* Luminometer von Berhold in *lightunits* (lu) pro 90 s gemessen worden. 50 μ l des jeweiligen Extraktes wurden vorgelegt. Über 20 s ist die Hintergrundstrahlung gemessen worden und für 90 s wurde, das direkt nach der Injektion des Substratpuffers emittierte Licht erfaßt. Injiziert wurden 100 μ l des Substratpuffers. Beim Luciferasenachweis neben Aequorin wurde 1 % Triton X-100 zum Substratpuffer zugesetzt. *In vivo* in Keimlingen wurde Luciferaseaktivität mit einer hochsensitiven Kamera (ARGUS-50 System mit einer C2400-47 Kamera; Hamamatsu Photonics, Herrsching) nach Millar et al. (1992) nachgewiesen. Auf Agarplatten angezogene Keimlinge wurden mit Luciferinlösung besprüht. Anschließend ist über 30 min die Biolumineszenz aufgenommen worden.

Substratpuffer:	20 mM Tricin (pH=7,8) 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 2,67 mM MgSO_4 0,1 mM Na_2EDTA 33,3 mM DTT 0,27 mM Coenzym A 0,47 mM D-Luciferin (PJK GmbH, Kleinblittersdorf) 0,53 mM ATP
Luciferinlösung:	5 mM D-Luciferin (PJK GmbH, Kleinblittersdorf) 0,01 % Triton X-100
CCLR-TX100	CCLR (2.2.8.1.) ohne Triton X-100

2.2.8.3. Aequorin

Aequorin wurde in transienten Expressionsexperimenten als interner Standard eingesetzt. Transfizierte Protoplasten sind wie beschrieben (2.2.6.4.) mit CCLR-TX100 extrahiert worden. Die Biolumineszenzmessung erfolgte im *flash`n glow* Luminometer von Berthold. Vorgelegt wurden 50 µl des Extraktes. Über 20 s wurde die Hintergrundemission gemessen. Direkt nach der Injektion von 50 µl Substratlösung wurde für 90 s die Lichtemission bestimmt.

Substratlösung: 200 mM CaCl₂
 2 µM Coelenterazin (PJK GmbH, Kleinblittersdorf)

2.2.8.4. Green Fluorescent Protein (GFP)

Zur zellulären Lokalisation wurden GFP-Fusionsproteine transient in Protoplasten exprimiert. Nach zweifachem Waschen mit 0,5 M Mannit sind die Protoplasten mit 1 Volumen Einbettlösung auf einem Objektträger eingebettet worden. Anschließend wurden sie mit einem Zeiss Axioskop untersucht. Zum GFP-Fluoreszenznachweis wurde ein FITC-Filtersatz mit 480 (40) nm Anregungs-, 505 nm Sperr- und 535 (50) nm Emissionsfilter eingesetzt. Die Dapi-Fluoreszenz wurde mit einem 365 (40) nm Anregungs-, 395 nm Sperr- und 420 nm Langpassmissionsfilter erfaßt. Aufnahmen wurden mit einer Nikon Coolpix 990 Camera angefertigt.

Einbettlösung: 324 mM Mannit
 0,2 mg/l DAPI
 gelöst in Hydro-Matrix (Micro Tech Lab; Graz, Österreich)

2.2.8.5. Proteinbestimmung

Die in Extrakten aus transgenen Pflanzen gemessene Reporteraktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt des Extraktes bezogen. Der Proteingehalt wurde über einen modifizierten Bradfordnachweis nach Ramagli und Rodriguez (1985) bestimmt. Die Messung erfolgte im HTS 7000 Plus Bioassay Reader von Perkin Elmer bei 590 nm in durchsichtigen Mikrotiterplatten (Nunc GmbH & Co. KG). Zu 1 µl des 1:4 verdünnten Extraktes wurde 1 µl 0,1 M HCl, 8 µl H₂O und 340 µl des 1:3 verdünnten Bradford-Reagenz (Bio-Rad) gegeben. Zur Standardisierung wurde in der gleichen Mikrotiterplatte eine BSA-Eichkurve unter Verwendung des entsprechenden Extraktionspuffers gemessen.

2.2.9. Membranpotentialmessung an Wurzeln

Membranpotentialmessungen an intakten Wurzeln wurden nach Maathuis und Sanders (1994) ausgeführt. Die verwendeten Pflanzen wurden einzeln in Erde angezogen. Nach zwei Wochen sind sie aus der Erde genommen und für 36 h in 0,25 x Pflanzenwachstumsmedium ohne Saccharose weiter inkubiert worden. Dabei tauchten die Wurzeln in das belüftete Medium ein. Ansonsten blieben die Wachstumsbedingungen (2.2.1.) unverändert. So behandelte Pflanzen wurden mit Ton auf einer mit D1 durchspülten Glaskammer befestigt. Im Bereich der Wurzelhaarzone ist mit einer Mikroelektrode gemessen worden. Die aus Borosilikatglas gezogene Pipette wurde mit 1 M KCl gefüllt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (kombiniert hydraulisch und mechanisch) und eines inversen Mikroskops wurde die sehr dünn gezogene Mikroelektrode injiziert. Der Vorgang des Injizierens wurde so lange wiederholt bis ein Membranpotential erfaßt werden konnte. Nach dem Einstechen der Elektrode nahm das Membranpotential ab bis nach einiger Zeit (30 min bis zu mehreren Stunden) ein stabiler Wert erreicht wurde. Die Potentialdifferenzen lagen bei etwa - 200 mV bis - 250 mV. Die Membranpotentialmessungen wurden im Labor von Prof. Dr. J. I. Schröder an der *University of California San Diego* durchgeführt.

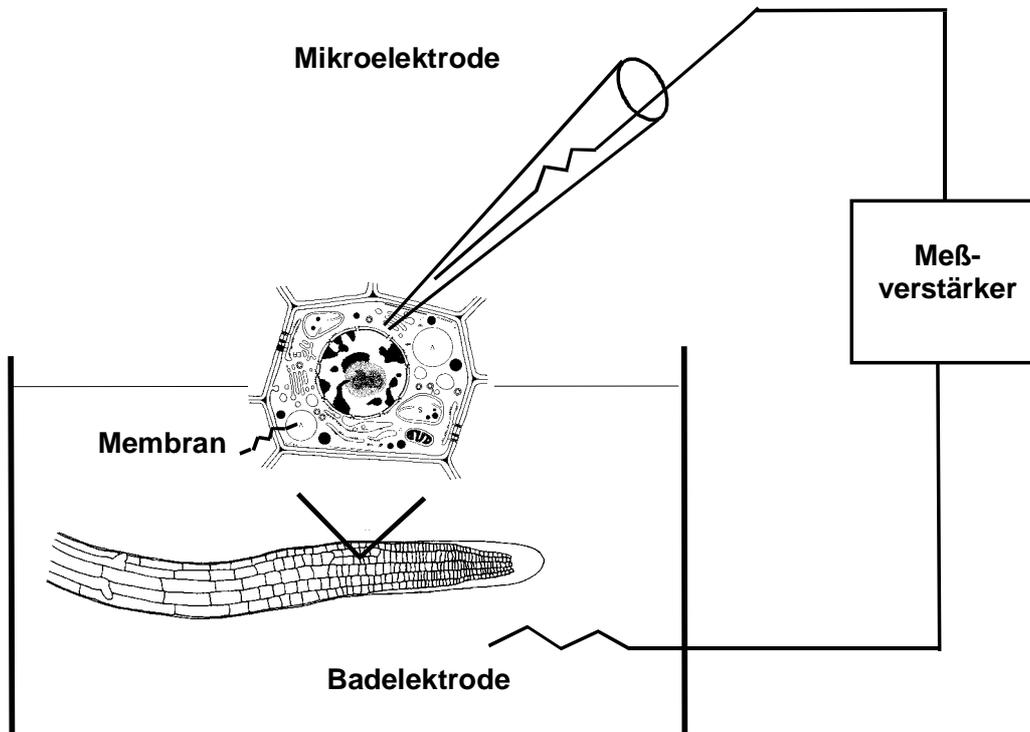


Abb. 4: Schematischer Versuchsaufbau der Membranpotentialmessung in Wurzelzellen. Injektion der Mikroelektrode in einer Wurzelzelle ist dargestellt.

D1:	1,8 mM CaCl ₂ 6 mM MgCl ₂ 10 mM MES-Tris (pH=5,8)
Inverses Mikroskop :	Nikon Diaphot 300
Mikromanipulator:	hydraulisch, Newport Corporation, Irvine, USA
Spannungsmeßgerät:	Duo 773 Electrometer WPI, Sarasota, USA
A/D-Wandler:	Axon Instruments Inc., Union City, USA (Axotape)
Puller:	Sutter Instrument Co. Model P-87
Glas:	Borosilicate glas 1B100F-4, WPI, Sarasota, USA
Elektrodenhalter:	WPI, Sarasota, USA

Ergebnisse

3.1. Etablierung eines transienten Expressionssystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion

Pflanzenhormone sind an der Steuerung verschiedenster Vorgänge in Pflanzen beteiligt, wie etwa der Anpassung an Umweltbedingungen oder der Entwicklung und Differenzierung von Pflanzen (Davies, 1995). Es ergibt sich ein komplexes Netzwerk regulatorischer Prozesse. Abscisinsäure, wichtig bei Streßsituationen von Pflanzen, führt zu charakteristischen physiologischen Reaktionen, welche zur Analyse der ABA-Signaltransduktion genutzt werden können. Die Auswirkungen auf Ionenflüsse, die zu einer Membrandepolarisation führen (MacRobbie, 1998) oder die durch ABA vermittelte Genregulation könnte zur Untersuchung der Signalkaskade verwendet werden (Sheen, 1998). Transiente Expressionssysteme bieten dabei den Vorteil in relativ kurzer Zeit, in Vergleich zu transgenen Pflanzen Ergebnisse zu liefern. Bei einem direkten Gentransfer in Protoplasten kann sowohl die DNA-Konzentration wie auch die Protoplastenzahl genau definiert werden. Mögliche Zusätze, wie Hormone oder andere aktive Substanzen können in bestimmter Konzentration allen Zellen zugänglich gemacht werden. Damit ist die transiente Expression insbesondere in Protoplasten als ein Modellsystem zur Untersuchung ABA-vermittelter Genregulation besonders geeignet. Für die Etablierung des transienten Expressionssystems zur Analyse der ABA-Signaltransduktion wurde zunächst die Transfektion und Expression konstitutiv exprimierter Reporter untersucht.

3.1.1. Protoplastierung und Kultivierung der Protoplasten

Der erste Schritt des transienten Expressionsexperimentes, die Protoplastierung, hat sich neben anderen Parametern als kritisch für den weiteren Versuchsverlauf erwiesen. Bei längerer Verdauzeit, ohne Zusatz von BSA und weiterer Aufreinigung (2.2.6.2. Herstellung der Enzymlösung) können die zum Verdau verwendeten Enzymfraktionen zu einer starken Schädigung der Protoplasten führen. Nachweisbar etwa durch Färbung der überlebenden Protoplasten mit FDA. Damit sinkt die Expressionsrate, zum Teil so stark, daß keine Expression eines Reporters mehr nachgewiesen werden konnte. **Abb. 5** zeigt die Abnahme der GUS-Aktivität nach unterschiedlicher Protoplastierungszeit. Blattmaterial (RLD) wurde unterschiedlich lang verdaut und ansonsten gleich behandelt. Für die anschließende Transfektion mit PEG wurden jeweils 10^6 RLD-Protoplasten eingesetzt und mit 100 µg pBI221 (Jefferson, 1987) transfiziert. Nach 40 h Inkubation wurde in den entsprechenden

Extrakten die GUS-Aktivität bestimmt. Nach 2 h Verdauzeit wurde die höchste GUS-Aktivität erreicht, jedoch ist die Protoplastenausbeute bei kurzer Verdauzeit sehr gering (**Abb. 5**).

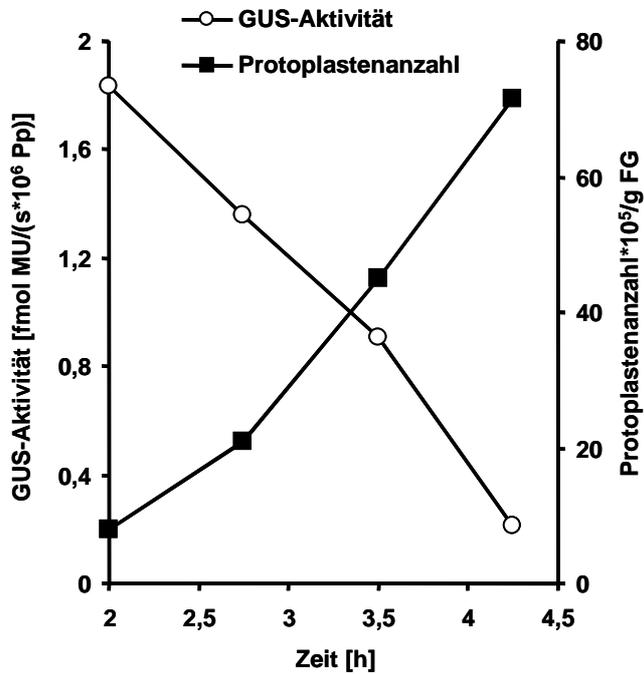


Abb. 5: Abhängigkeit der Reporteraktivität und Protoplastenzahl von der Verdauzeit (Enzymlösung ohne BSA- und PMSF-Zusatz, nicht dialysiert)

Der Zusatz von BSA, die PMSF-Behandlung und Dialyse der Enzymlösung wirkte sich positiv auf die Reporterexpressionsrate aus. **Abb. 6** zeigt die Reporteraktivität nach unterschiedlich langer Protoplastierung mit entsprechend behandelter Enzymlösung (2.2.6.2.). Als Reporter ist Luciferase verwendet worden. Für die einzelnen Transfektionen wurden 10 µg pJD301 (Luehrsen et al., 1992) eingesetzt. Ansonsten sind gleiche Bedingungen, wie für das Experiment mit nicht behandelter Enzymlösung eingehalten worden.

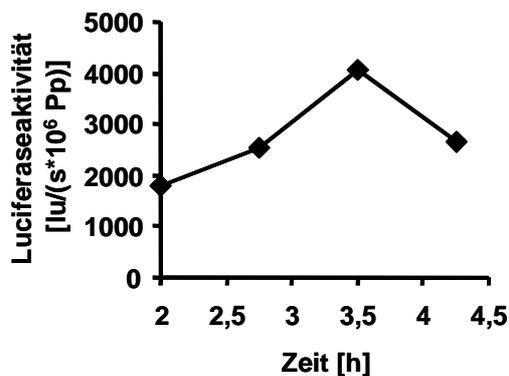


Abb. 6: Reporteraktivität nach unterschiedlich langem Verdau mit behandelter Enzymlösung (BSA- und PMSF-Zusatz, dialysiert)

Die Protoplastenausbeute ist bei behandelter und unbehandelter Protoplastierungslösung vergleichbar.

Damit zeigt sich bei der unbehandelten Lösung bei längerem Verdau eine zunehmende Verringerung der Reporteraktivität bis auf ein Neuntel des Ausgangswertes (**Abb. 5**) während durch die Behandlung der Enzymlösung bei 3,5 stündigem Verdau sogar eine Verdopplung der Aktivität erreicht wird. Bei weiteren Experimenten wurde dementsprechend das Pflanzenmaterial für 3 h mit behandelter Protoplastierungslösung verdaut.

Kultiviert wurden die Protoplasten in einem möglichst einfachem Medium (Kovtun et al., 2000; 2.2.6.3.) unter BSA-Zusatz. Der Einsatz von BSA führte zu einer etwa dreifach höheren Expressionsrate (**Tab. 3**). Durch Verwendung komplexerer Medien konnte zwar die Überlebensrate, wenn zum Beispiel lange verdaut worden war, gesteigert werden, die Expressionsrate von eingebrachten Reportergenen wurde aber dadurch nicht wesentlich verbessert.

BSA	0%	1%	Faktor
lu/(s*10 ⁶ Pp)	103,7	323,9	3,1

Tab. 3: RLD-Protoplasten transfiziert mit 5 µg pJD301 und kultiviert in WI mit und ohne BSA

3.1.2. Expression von Reportergenen in *Arabidopsis* Protoplasten

DNA wurde in Protoplasten mit Hilfe von PEG oder über Elektroporation eingebracht. Die mit Elektroporation erzielten Reporterogenaktivitäten variierten stark (**Tab. 4**), weshalb für weitere Experimente PEG für den direkten Gentransfer verwendet wurde.

Experiment	1	2	3
lu/(s*10 ⁶ Pp)	1518	791	274

Tab. 4: Elektroporation von RLD-Protoplasten mit je 10 µg pJD301 zur Luciferaseexpression

Für Transfektionen wurden nach Abel und Theologis (1994) 20% PEG-4000 eingesetzt. Höhere PEG-Anteile führten zu einer höheren Expression pro Protoplast, jedoch auch zu einer stärkeren Schädigung der Protoplasten. In **Tab. 5** sind Transfektionen mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen, die Anzahl der überlebenden Protoplasten und die resultierenden Luciferaseaktivitäten dargestellt. Transfiziert wurden jeweils 10⁶ RLD-Protoplasten mit 50 µg pJD301 zur Luciferaseexpression.

PEG	20%	25%	30%
Pp nach Transfektion	$5 \cdot 10^5$	10^5	10^4
Iu/(s* 10^6 Pp)	53794	94077	5254
relative Expression der Ansätze	1	0,4	0,002

Tab. 5: Ermittlung der optimalen PEG-Konzentration zur Reporterexpression

Damit bestätigte sich die von Abel und Theologis (1994) angegebene PEG-Konzentration bei welcher ein sehr hoher Anteil an überlebenden Protoplasten und eine gute Expressionsrate erreicht werden konnte.

3.1.3. Interne Standards für die transiente Expression

Um einzelne transiente Expressionsexperimente untereinander vergleichen zu können und quantitative Auswertung der Reporteraktivitäten zu erzielen wurde in der Regel bei Transfektionen mit internem Standard gearbeitet.

Für verschiedene Reportergene ist die Anwendung in Expressionsstudien bei Pflanzen gezeigt worden. Darunter sind etwa die β -D-Glucuronidase (Jefferson, 1987), die *Photinus pyralis* Luciferase (Luehrsen et al., 1992), die *Renilla* Luciferase (Mayerhofer et al., 1995), Aequorin (Knight et al., 1992) oder das *Green Fluorescent Protein* (Niedz et al., 1995).

Abgesehen von *Green Fluorescent Protein* (GFP) können die genannten Reporter sehr empfindlich durch entsprechende Nachweisreaktionen erfaßt werden. GFP-moleküle dagegen können direkt über ihre Fluoreszenzeigenschaften nachgewiesen werden und eignen sich damit besonders für Lokalisationsexperimente.

Als sehr empfindlich nachweisbare Reporter wurden für transiente Expressionsstudien die β -D-Glucuronidase (GUS), die *Photinus pyralis* Luciferase (LUC) und Aequorin (AEQ) verwendet. Ziel war es bei einem transienten Expressionsexperiment die Aktivität eines regulierten Reporters neben der eines konstitutiv, als Standard exprimierten Proteins, nachzuweisen. Für eine exakte Quantifizierung sollten beide Aktivitätsbestimmungen im gleichen Extraktionspuffer ausgeführt werden können.

Luciferase neben β -D-Glucuronidase in transfizierten Protoplasten wurde nach Luehrsen et al. (1992) bestimmt. In verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* zeigte sich dabei eine unterschiedlich starke endogene Glucuronidaseaktivität. In **Tab. 6** sind endogene GUS-Aktivitäten in den für transiente Expressionsexperimente verwendeten Ökotypen RLD und La-er dargestellt. In La-er wurde eine etwa vier mal höhere Aktivität gefunden. Eine Verwendung von GUS in regulierten Reportergenkonstrukten in diesem Ökotyp war damit ausgeschlossen und die Anwendung als interner Standard bei ausreichend hoher Expression nur bedingt möglich.

Ökotyp	RLD	La-er
fmol MU/(s*10 ⁶ Pp)	0,05 +/- 0,01	0,20 +/- 0,01

Tab. 6: Endogene Glucuronidase-Aktivitäten in Protoplasten verschiedener Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*. Mittelwerte aus fünf Bestimmungen und entsprechende Standardabweichungen sind dargestellt.

Als Alternative zu GUS wurde bei Untersuchungen in RLD und La-er Apoaequorin exprimiert. Aequorin ist ein calcium-sensitives Photoprotein, das ursprünglich aus *Aequorea aequorea* isoliert worden war (Shimomura et al., 1962). Apoaequorin bildet mit Coelenterazin einen Komplex, der bei Zusatz von Calcium unter Freisetzung von CO₂, Coelenteramid, Apoaequorin und Licht zerfällt (Shimomura und Johnson, 1973). Als interner Standard sollte Aequorin neben Luciferase in Extrakten aus transfizierten Protoplasten bestimmt werden. Ein Reportergenkonstrukt (pBI221Aequorin) bestehend aus dem CaMV 35S Promotor, der Apoaequorin-cDNA-Sequenz und dem Nos-Terminator wurde zur Expression in Protoplasten eingesetzt. Zur Konstruktion von pBI221Aequorin wurde das Xba I – Sac I GUS-Fragment aus pBI221 (Jefferson, 1987) durch ein Apoaequorin codierendes PCR-Produkt ersetzt (**Abb. 7**). Für das Vent-Polymerase-Amplifikat wurde pAEQ (Prasher et al. 1985) als Matrize verwendet. Die benutzten Schnittstellen wurden durch entsprechende Überhänge der Oligonukleotide eingeführt (Oligonukleotidsequenzen siehe Anhang).

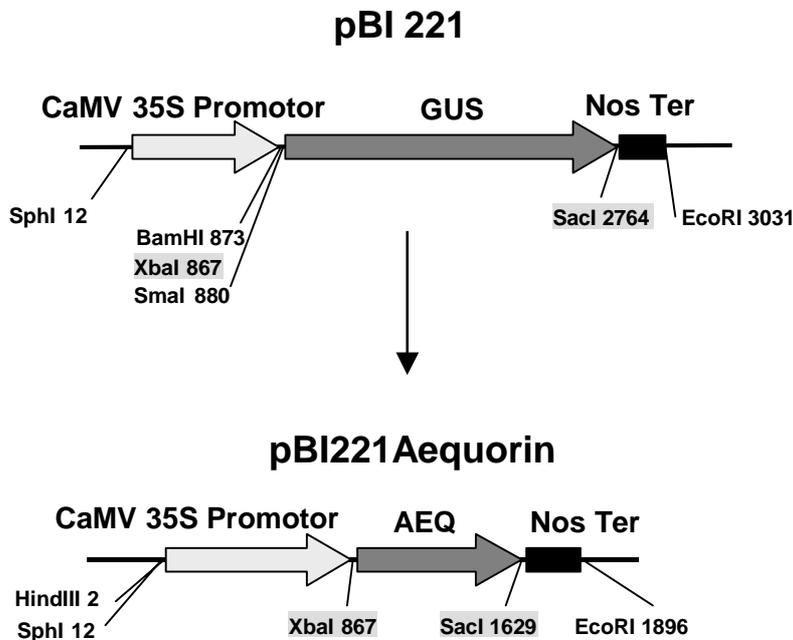


Abb. 7: Klonierung von pBI221Aequorin (Details siehe Text).

Die Aequorin- und Luciferaseaktivität sollte für eine Quantifizierung im gleichem Puffer nachweisbar sein. Damit darf das Luciferasesubstrat nicht von Apoaequorin umgesetzt werden und umgekehrt. **Abb. 8** zeigt die Lichtemission in Extrakten aus mit 50 µg pBI221Aequorin beziehungsweise mit 10 µg pJD301 transfizierten RLD-Protoplasten nach Injektion von Luciferasesubstrat. Extrahiert wurde mit einem modifizierten Extraktionspuffer nach Luehrsen et al. (1992) ohne Triton X-100. Der Standardsubstratpuffer für Luciferase (Luehrsen et al. 1992) führte dabei zu einer im Vergleich relativ hohen Lichtemission in Extrakten mit Apoaequorin. Durch den Zusatz von Triton X-100 zum Substratpuffer konnte die unerwünschte Nebenreaktion eingeschränkt werden.

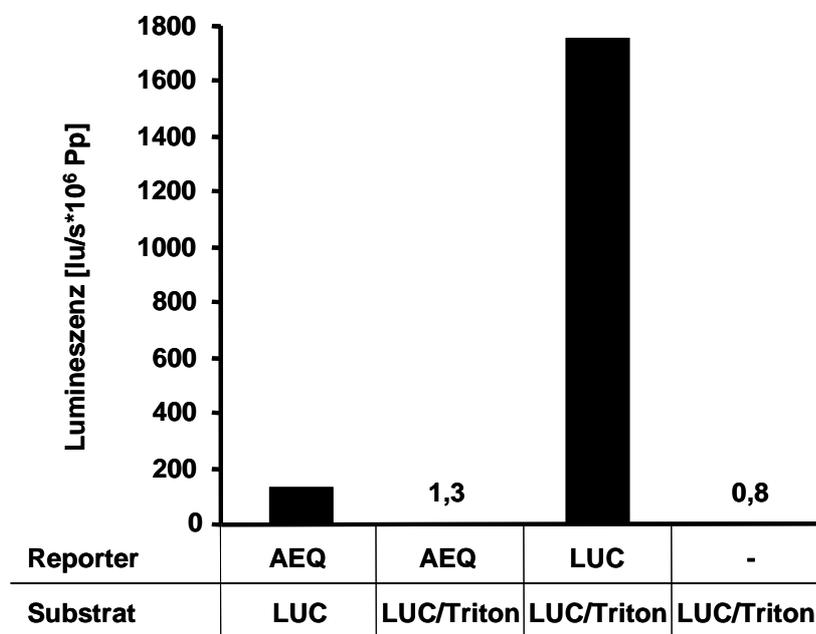


Abb. 8: Lumineszenz von Apoaequorin (AEQ) und Luciferase (LUC) nach Injektion von Luciferasesubstrat ohne (LUC) bzw. mit Zusatz von Triton X-100 (LUC/Triton)

Die Injektion von Apoaequorinsubstrat zu Luciferaseextrakten ergab keine wesentliche Lichtemission (**Abb. 9**). Verglichen wurden Extrakte aus mit 10 µg pJD301 beziehungsweise mit 50 µg pBI221Aequorin transfizierten RLD-Protoplasten.

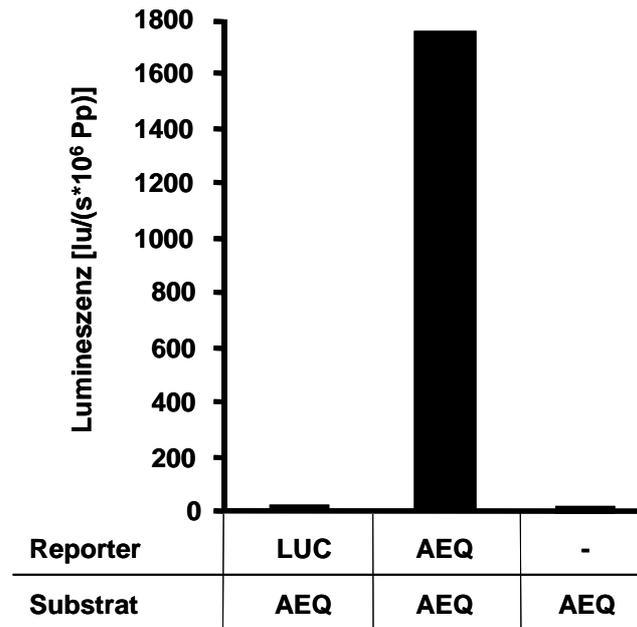


Abb. 9: Lumineszenz von Aequorin (AEQ) und Luciferase (LUC) nach Injektion von Apoaequorinsubstrat (AEQ).

Damit ließ sich durch den Zusatz von Triton X-100 zum Luciferasesubstratpuffer und durch Extraktion ohne Triton X-100 eine Methode zur Bestimmung der Luciferase- und Aequorinaktivität nebeneinander in transfizierten Protoplasten entwickeln. Zur Kontrolle der Abhängigkeit der von Apoaequorin bedingten Lichtemission von der Apoaequorinexpression wurden RLD-Protoplasten mit unterschiedlicher Menge an pBI221Aequorin transfiziert (**Abb. 10**).

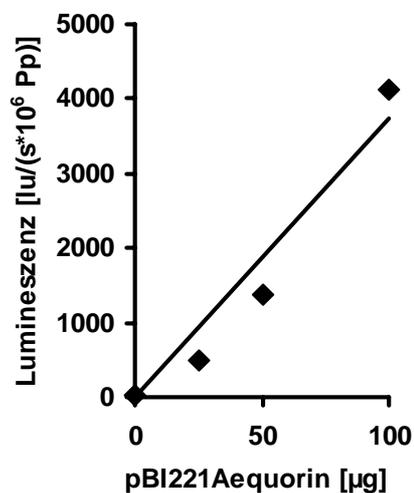


Abb. 10: Zusammenhang zwischen Aequorinaktivität und eingesetzter Menge Plasmid-DNA

Es ergab sich ein etwa linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter DNA-Menge und der Lichtemission.

3.1.4. Zeitabhängige Expression der Standards

Die Aktivitäten der in transienten Expressionsexperimenten eingesetzten Reporter nach unterschiedlich langer Inkubation transfizierter Protoplasten wurde untersucht. Zur Transfektion sind Reportergernekonstrukte mit CaMV 35S Promotor verwendet worden, für GUS pBI221 (Jefferson, 1987), für Luciferase pJD301 (Luehrsen et al., 1992) und für Apoaequorin pBI221Aequorin (3.1.3.). In **Abb. 11** ist der zeitabhängige Verlauf der GUS-Aktivität dargestellt. Die Aktivität nimmt zu bis sie nach 48 h ein Maximum erreicht und anschließend wieder abnimmt.

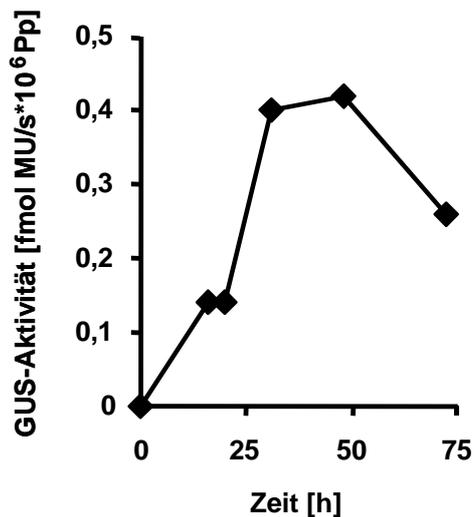


Abb. 11: RLD-Protoplasten transfiziert mit 100 µg pBI221 wurden gesplittet und nach unterschiedlicher Inkubationszeit im Extrakt die GUS-Aktivität bestimmt

Der zeitabhängige Aktivitätsverlauf für Aequorin und Luciferase wurde zwischen 0 und 48 h bestimmt (**Abb. 12**). In beiden Fällen ergab sich über 48 h, dem Verlauf der GUS-Aktivität entsprechend, eine Aktivitätszunahme. Bei Aequorin ist der Kurvenverlauf weniger steil als bei Luciferase, was durch die unterschiedlichen Proteinhalbwertszeiten in der Zelle bedingt sein könnte. Für Luciferase wurde eine Halbwertszeit von 3 h bestimmt (Thompson et al., 1991), während die Halbwertszeit von Apoaequorin bei 20 min liegt (Badminton et al., 1995). Für Expressionsexperimente in Protoplasten wurden in der Regel Inkubationszeiten zwischen 16 und 48 h eingehalten. Jedes der getesteten Konstrukte, pBI221, pJD301, und pBI221Aequorin wäre unter derartigen Inkubationszeiten zur Standardisierung der Expression geeignet.

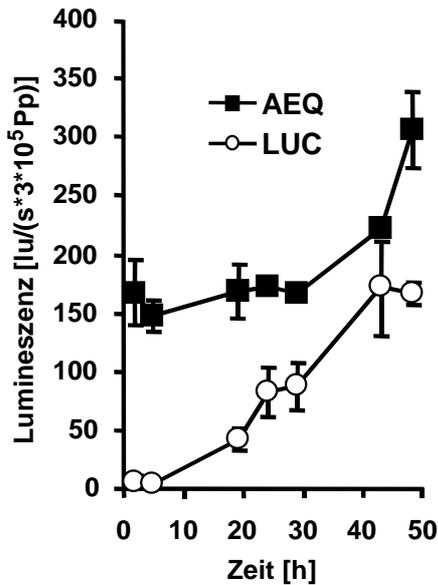


Abb. 12: Mit je 50 µg pJD301 und pBI221Aequorin transfizierte RLD-Protoplasten wurden gesplittet und unterschiedlich lange inkubiert. Pro Zeitpunkt wurde jeweils in Triplets die Aequorin- (■) und Luciferaseaktivität (○) bestimmt.

3.1.5. Reproduzierbarkeit des Systems

Zur Überprüfung der Abweichung bei einzelnen Messungen wurden Bestimmungen zur Präzision und Linearität der Aktivitätsmessungen durchgeführt. Zur Erfassung der Linearität wurde die Aktivität in verschiedenen Verdünnungen von Extrakten aus transfizierten Protoplasten gemessen. RLD-Protoplasten wurden mit 100 µg pBI221Aequorin beziehungsweise mit 50 µg pJD301 transfiziert. Nach 40 h Inkubation wurde extrahiert und unterschiedliche Mengen des Extraktes mit Extraktionspuffer auf 50 µl aufgefüllt und zur Bestimmung eingesetzt.

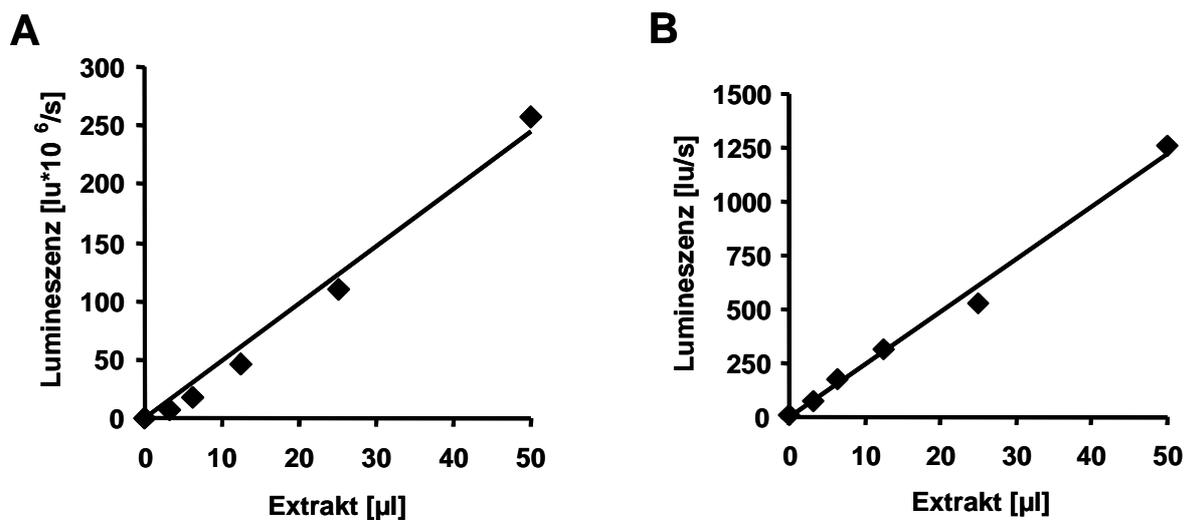


Abb. 13: Linearität der Luciferase (A)- bzw. Aequorinaktivitätsbestimmung (B). Unterschiedliche Mengen Extrakt (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 µl) wurden zur Lumineszenzmessung eingesetzt.

In **Abb. 13** ist die Lumineszenz in Abhängigkeit der eingesetzten Extraktvolumina dargestellt. Sowohl für Apoaequorin wie auch für Luciferase ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Lumineszenz. Zur Präzisionsbestimmung der Aktivitätsmessung im transienten Expressionssystem wurden acht verschiedene pBI221Aequorin-DNA-Präparationen in acht Transfektionsexperimenten eingesetzt und die resultierende Aequorinaktivität ermittelt (**Abb. 14**).

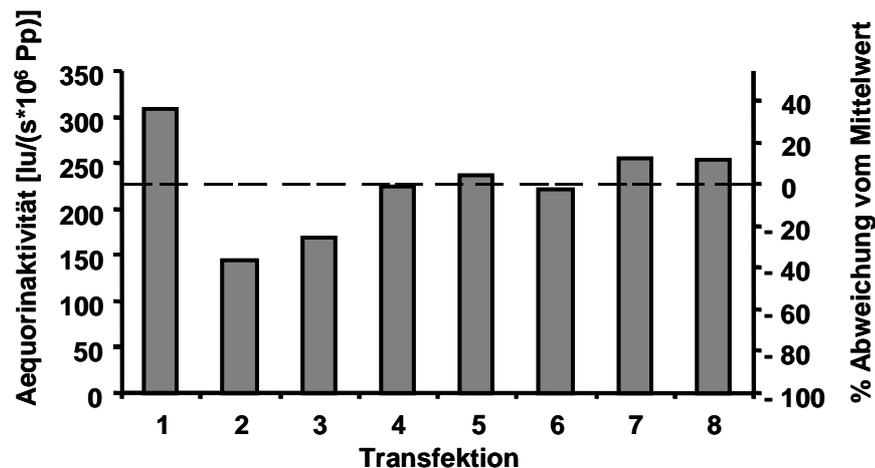


Abb. 14: Präzision der Aequorinaktivität bei Transfektion von acht verschiedenen DNA-Präparationen. Es wurden jeweils 10^6 RLD-Protoplasten mit $50 \mu\text{g}$ pBI221Aequorin transfiziert, 40 h inkubiert und im Extrakt die Aequorinaktivität bestimmt.

Für die acht Werte ergibt sich ein Mittelwert der Aequorinaktivität von $226,5 \text{ lu}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ Pp})$ mit einer Standardabweichung von $51,3 \text{ lu}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ Pp})$, das heißt unabhängige Transfektionen weichen im Mittel um 20 % ab. Die maximale Schwankung liegt bei etwa einem Faktor 2. An Hand der durchgeführten Bestimmungen zur Expression von konstitutiv exprimierten Reportergenen in *Arabidopsis*-Protoplasten zeigt sich die Möglichkeit zur quantitativen Erfassung verschiedener eingebrachter Reporter.

3.2. ABA vermittelte Genregulation

Zur Untersuchung der ABA-Signaltransduktion können in transienten Expressionssystemen ABA-regulierte Reporter-genkonstrukte verwendet werden (Sheen, 1996; Sheen, 1998; Wu et al., 1997). Der Vergleich verschiedener Abscisinsäure-abhängiger Promotoren erhöht die ABA-Spezifität des Modellsystems indem die Beeinflussung durch andere, ABA-unabhängige Faktoren erkannt und verringert werden kann.

3.2.1. Beispiele für transkriptionelle Regulation durch ABA

Für die Wahl der in Reporter-genkonstrukten benutzten Promotoren wurde die Expression verschiedener durch ABA regulierter Gene, *RD29B* (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994), entspricht *LT165* (Nordin et al., 1993), *AtHB-6* (Söderman et al., 1999), *RAB18* (Lang und Palva, 1992) und *CDC2A* (Hemerly et al., 1993) untersucht. *RD29B*, *RAB18* und *AtHB-6* werden durch ABA induziert, *CDC2A* wurde als durch ABA reprimiert beschrieben. Promotoranalysen von *RD29B* haben gezeigt, daß für die ABA-Antwort zwei ABRE's entscheidend sind. Zwei durch ABA aktivierte Transkriptionsfaktoren wurden isoliert, die an diese ABRE's binden und die Transkription von *RD29B* aktivieren können (Uno et al., 2000). *RAB18* ein glycinreiches, hydrophiles Protein wird durch Kälte, Trockenheit oder exogen applizierte Abscisinsäure induziert (Lang und Palva, 1992). Trockenheit, Osmostreß und Abscisinsäure führen wie bei *RD29B* auch bei dem Homöodomän-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor *AtHB-6* zu einer hohen Expression (Söderman et al, 1999). Für *CDC2A*, einer Cyclin abhängigen Kinase zeigten Hemerly et al. (1993) eine verringerte Expression in Gegenwart von Abscisinsäure.

In Northernexperimenten wurde die ABA-abhängige Expression von *RD29B*, *RAB18* und *AtHB-6* bestätigt (**Abb. 15**). 14 Tage lang wurden Wildtyppflanzen (RLD) in Schüttelkulturen steril angezogen und anschließend ohne und mit ABA (30 µM) für 24 h inkubiert. Die aus diesen Pflanzen isolierte RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit für *RD29B*, *RAB18* und *AtHB-6* spezifischen Sonden hybridisiert (verwendete Oligonukleotide, siehe Anhang).

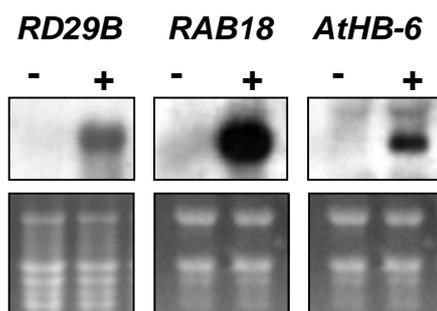


Abb. 15: Northern Blot Analyse. Gesamt-RNA (20 µg) wurde isoliert aus für 24 h mit (+) und ohne (-) ABA (30 µM) behandelten RLD-Schüttelkulturen.

Ethidiumbromidfärbung der RNA diente als Kontrolle.

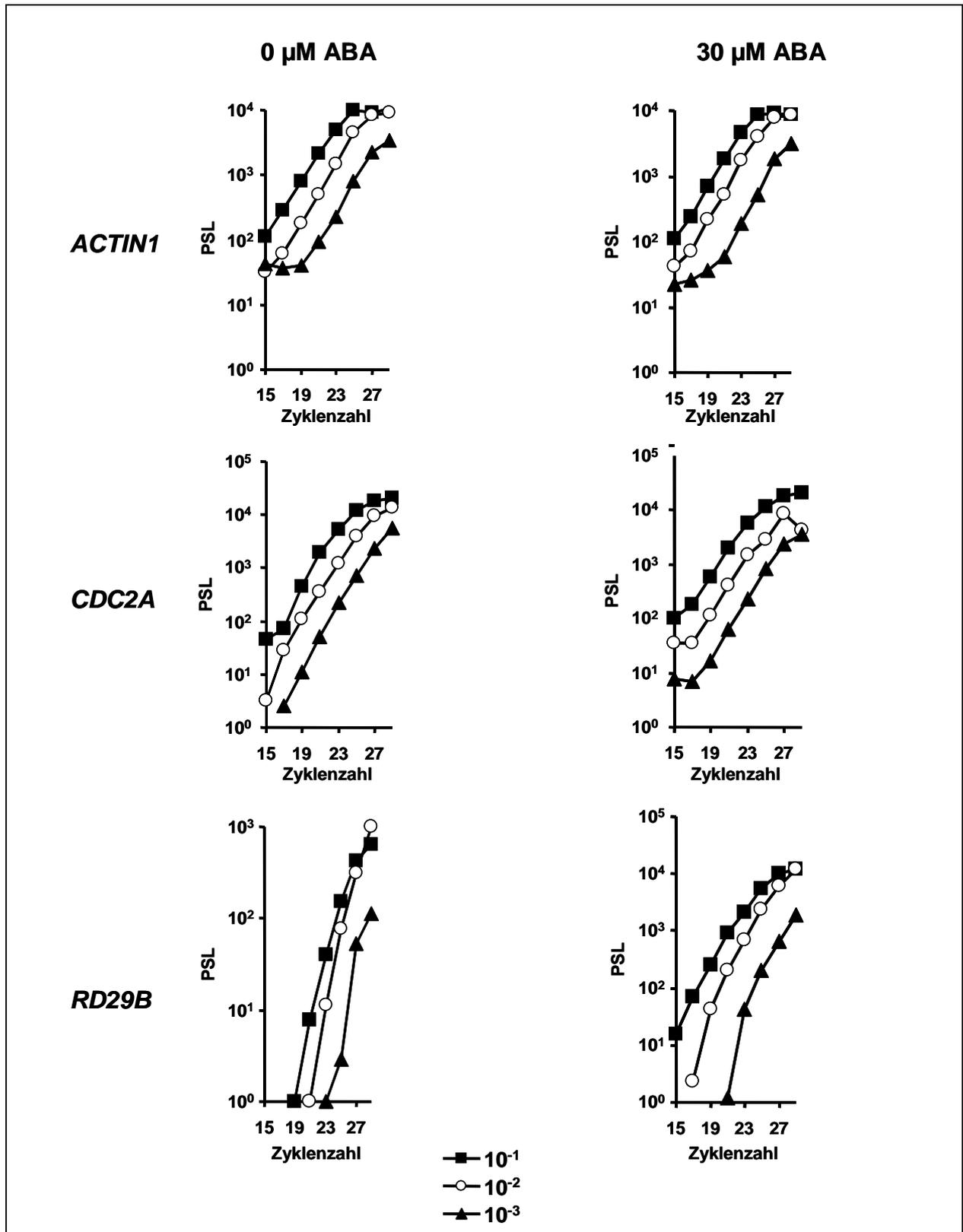


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und RT-PCR-Produkt. 1 μg RNA aus mit und ohne ABA (30 μM) behandelten Pflanzen wurde revers transkribiert und die resultierende cDNA in verschiedenen Verdünnungen (\blacksquare 10^{-1} ; \circ 10^{-2} ; \blacktriangle 10^{-3}) als Matrize für die PCR verwendet. Nach unterschiedlicher Zyklenzahl wurden die Produkte in Southernexperimenten nachgewiesen und mit einem Phosphorimager die *photostimulated luminescence* (PSL) der entsprechenden Banden bestimmt.

Die ABA-abhängige Expression von *RD29B* und *CDC2A* wurde in RT-PCR-Experimenten untersucht. Zunächst wurde die Zyklenzahl der PCR bestimmt für die eine lineare Amplifikation bei gegebener Matrizenmenge möglich ist (**Abb. 16**). Nur während der exponentiellen Phase der Amplifikation ist ohne internen PCR-Standard eine quantitative Aussage möglich (Murphy et al., 1990). Als Standard für die reverse Transkription wurde *ACTIN1*-mRNA (An et al., 1996) neben *RD29B*-mRNA und *CDC2A*-mRNA nachgewiesen. Ausgehend von Gesamt-RNA wurde mit für die entsprechenden mRNAs spezifischen Oligonukleotiden (Sequenzen siehe Anhang) revers transkribiert. Gesamt-RNA war wie für Northern-Experimente aus für 24 h mit und ohne ABA (30 μ M) behandelten RLD-Schüttelkulturen isoliert worden. Die aus 1 μ g Gesamt-RNA resultierende cDNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für eine PCR verwendet. Ein Zehntel, ein Hundertstel und ein Tausendstel des cDNA-Gemisches wurde als Matrize zur Amplifikation mit unterschiedlicher Zyklenzahl eingesetzt. Die PCR-Amplifikate wurden über Agarosegele aufgetrennt und in Southernexperimenten mit spezifischen Sonden nachgewiesen und mittels eines Phosphorimagers quantifiziert. In **Abb. 16** ist die Menge des gebildeten Produktes als *photostimulated luminescence* (PSL) in Bezug zur Zyklenzahl der Amplifikation dargestellt. Durch die logarithmische Darstellung der PSL-Werte ergibt sich in der exponentiellen Phase der Amplifikation ein linearer Kurvenverlauf. Bis zu 25 Zyklen zeigt sich bei den untersuchten Reaktionen ein etwa exponentieller Zusammenhang. Ab 25 Zyklen nimmt die Amplifikationsrate ab und die dargestellten Kurven erreichen ein Plateau.

Eine weitere Einschränkung zur Quantifizierung mit RT-PCR ergibt sich bei schwacher Expression der untersuchten Gene. Ohne Zusatz von ABA ist die *RD29B* Expression sehr gering und die Nachweisgrenze der entsprechenden RT-PCR liegt nahe bei einer Zyklenzahl für die kein exponentieller Zusammenhang zwischen Produkt und Matrize gegeben ist. Erst ab 23 Zyklen ergaben sich für die nicht induzierte *RD29B* Expression Werte, die sich vom Hintergrundsignal deutlich unterscheiden. Für den Vergleich der Expression zwischen mit ABA induzierten und nicht induzierten Pflanzen wurde die *ACTIN1*-Expression zur Standardisierung verwendet. Das Verhältnis von standardisierten Expressionswerten für ABA behandelte Pflanzen zu standardisierten Werten für unbehandelte Pflanzen ergibt die relative Induktion der untersuchten Gene durch ABA. In **Abb. 17** sind die relativen Induktionswerte für *CDC2A* und *RD29B* in Abhängigkeit der Zyklenzahl dargestellt. Die relativen Induktionswerte für die unterschiedlichen eingesetzten cDNA-Konzentrationen wurden gemittelt, die Fehlerbalken entsprechen den daraus resultierenden Standardabweichungen. Die relativen Induktionswerte für *CDC2A* liegen zwischen 0,7 und 1,4. Der durch eine nicht exponentiell verlaufende PCR verursachte Fehler wirkt sich bei einem geringen Expressionsunterschied zwischen mit ABA behandelten Pflanzen und unbehandelten Pflanzen nur wenig aus. Die Werte zeigen, daß die *CDC2A*-Expression durch

ABA unter den getesteten Bedingungen nicht oder sehr wenig beeinflusst wird. Bei *RD29B* nimmt mit zunehmender Zyklenzahl durch den nicht mehr exponentiellen Amplifikationsverlauf der PCR (**Abb. 16**) die relative Induktion ab. Die Induktionswerte liegen zwischen 18 und 55. Eine exakte Quantifizierung ist durch die hohe nötige Zyklenzahl zum Produktnachweis im Falle der nicht induzierten Pflanzen und der Abnahme der Amplifikationsrate der PCR bei höheren Zyklenzahlen nicht möglich. Die relativen Induktionswerte zeigen jedoch, wie das Northernexperiment, daß *RD29B* relativ stark durch ABA induziert wird.

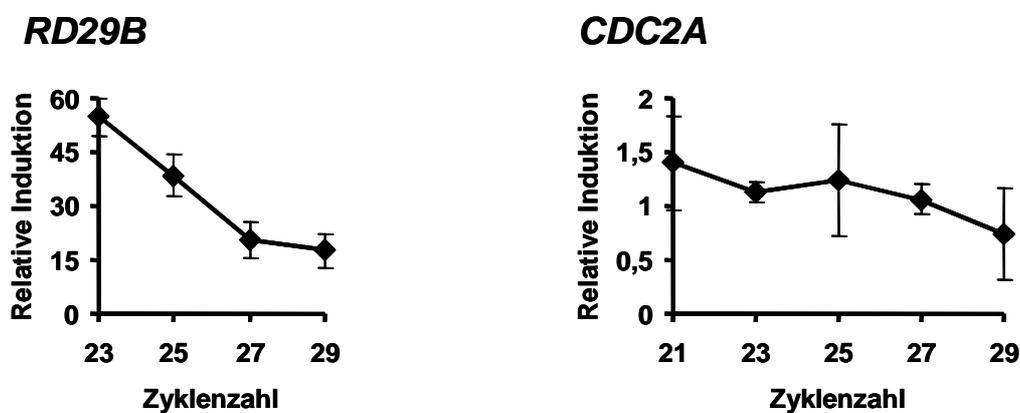


Abb. 17: Relative Induktion von *RD29B* und *CDC2A* durch ABA (30 μ M) in RLD-Schüttelkulturen. *ACTIN1* wurde zur Standardisierung verwendet. RT-PCR mit unterschiedlicher Zyklenzahl und unterschiedlicher cDNA-Konzentration als Matrize für die PCR sind dargestellt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten, der für die unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen bei einer bestimmten Zyklenzahl erhaltenen Daten, die Fehlerbalken den daraus resultierenden Standardabweichungen.

Alternativ zur oben dargestellten Kontrolle des Amplifikationsverlaufs der PCR kann die Effizienz der PCR in verschiedenen Ansätzen durch Zusatz eines internen Standards überprüft werden (Gilliland et al., 1990). **Abb. 18** zeigt eine RT-PCR mit *ACTIN1* als interne Kontrolle der reversen Transkription und den Zusatz von genomischen PCR-Produkten zur RT-PCR als interner Standard für die Amplifikation. Die als Standard verwendeten genomischen PCR-Produkte sind durch enthaltene Introns etwa 100 bp (*RD29B* und *ACTIN1*) beziehungsweise 250 bp (*CDC2A*) größer als die entsprechenden cDNAs. Für die reverse Transkription wurde je 1 μ g Gesamt-RNA aus mit und ohne ABA (30 μ M; 24 h) behandelten RLD-Schüttelkulturen eingesetzt. Als Matrize für die nachfolgende PCR ist

jeweils ein Zehntel des cDNA-Gemisches versetzt mit 1 pg des genomischen Standards verwendet worden. Bei *ACTIN1*, als nicht von ABA reguliertem Gen (An et al., 1996), zeigt sich (**Abb. 18**) bei vergleichbarer Amplifikation des genomischen Standards wenig oder kein Produkt bei der RT-PCR mit Gesamt-RNA aus ABA-behandelten Pflanzen. Dementsprechend war die eingesetzte Menge an cDNA-Matrize geringer als bei der RT-PCR ausgehend von unbehandelter RNA. Ein gleiches Verhältnis zeigt sich bei *CDC2A*, was wie obige RT-PCR-Daten gegen eine ABA-Regulation unter den gegebenen Bedingungen spricht. Bei *RD29B* wurde mit induzierter RNA mehr RT-PCR-Produkt gebildet. Der interne PCR-Standard wurde schwächer amplifiziert als bei der Reaktion mit nicht induzierter RNA. Zudem ist bei Vergleich mit *ACTIN1* relativ weniger cDNA als Matrize für die RT-PCR ausgehend von induzierter RNA vorhanden. Damit ergibt sich, entsprechend den oben gezeigten Daten, eine starke ABA vermittelte Induktion von *RD29B*.

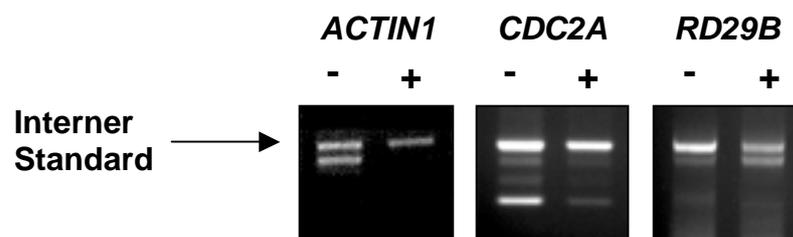


Abb. 18: RT-PCR mit Zusatz von genomischen PCR-Produkten als interner PCR-Standard (35 Zyklen zur Amplifikation). Gesamt-RNA wurde aus mit (+) und ohne (-) ABA (30 μ M; 48 h) behandelten RLD-Schüttelkulturen isoliert.

Auf eine exaktere Quantifizierung der Induktion, etwa durch kompetitive PCR (Gilliland et al., 1990) oder mit *Realtime*-PCR, bei welcher die Amplifikation während der Reaktion etwa mit Hilfe markierter Oligonukleotide verfolgt wird wurde verzichtet.

3.2.2. ABA-regulierte Promotor-Reportergenfusionen für die transiente Expression

Entsprechend den Daten aus RT-PCR- und Northernexperimenten wurden die Promotoren von *RAB18*, *RD29B* und *AtHB-6* für die Klonierung ABA induzierbarer Reportergenkonstrukte verwendet; Ausgangsvektor war pSK⁻ (Stratagene). Um einen leichten Transfer fertiger Konstrukte in einen binären Vektor für Pflanzentransformationen zu ermöglichen wurden die in der *multiple cloning site* (MCS) des pSK⁻ außen liegenden

Schnittstellen (KpnI und SacI) durch AscI-Restriktionsstellen ersetzt. In den resultierenden Vektor wurde als BamHI-EcoRI-Fragment eine Reporteragen-Nos-Terminator-Fusion eingesetzt. Im letzten Klonierungsschritt schließlich folgte die Ligation des Promotors. **Abb. 19** zeigt als Übersicht die Klonierungsschritte zur Promotor-Reporteragenfusion.

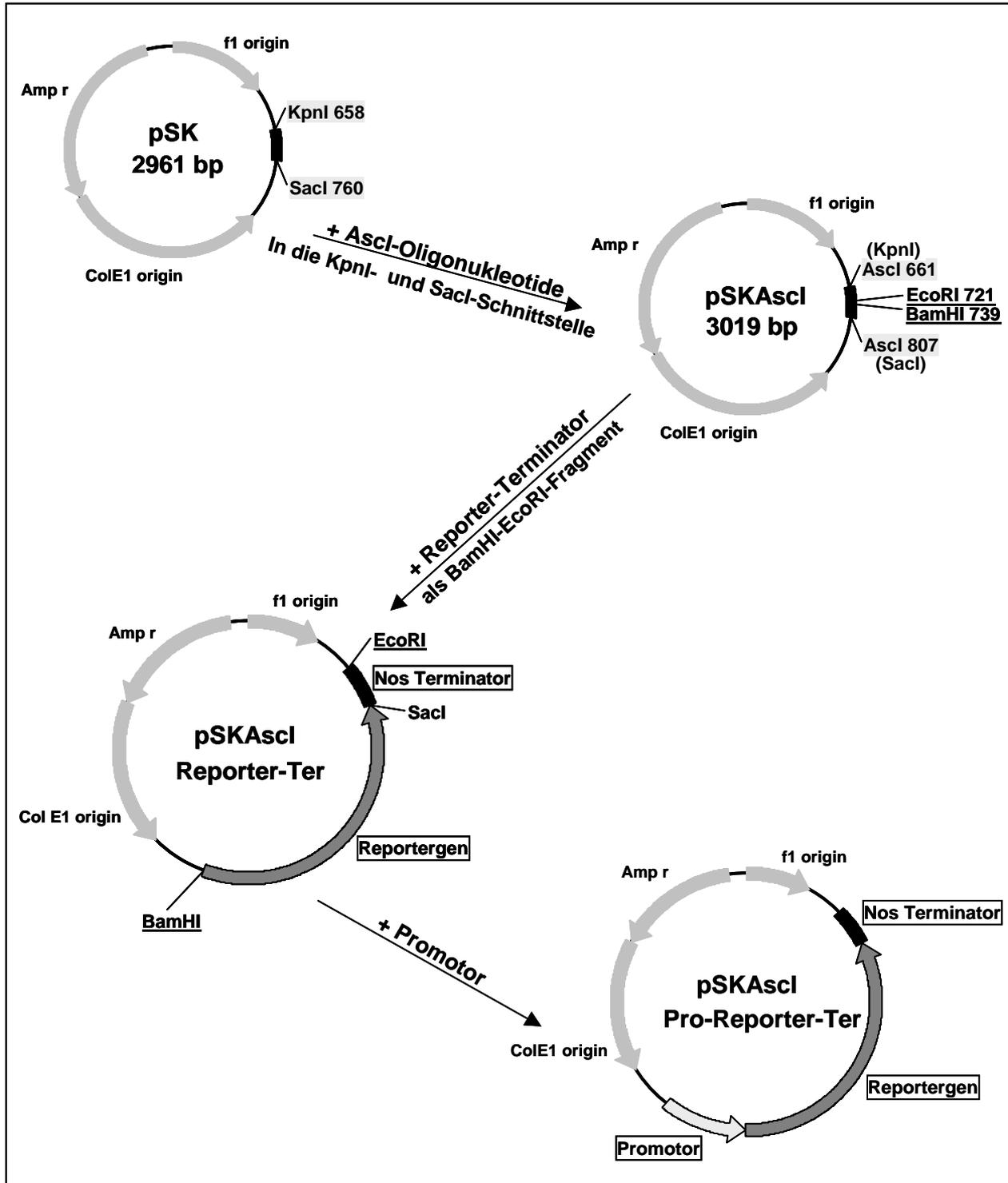


Abb.19: Klonierungsschema der ABA-regulierten Reporteragenkonstrukte (Details siehe Text).

Im folgenden werden die Klonierungen der einzelnen Reporterengenkonstrukte detaillierter beschrieben. In die *blunt* geschnittene Ecl136II-Stelle des pSK⁻ wurden mit Klenow aufgefüllte Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang), die eine Ascl- und Fsel-Schnittstelle beinhalten ligiert. Oligonukleotide mit zu KpnI kompatiblen Enden und einer Ascl- und einer ScaI-Restriktionsstelle wurden in die KpnI-Stelle gesetzt. Sowohl die Ecl136II, wie auch die KpnI-Schnittstelle des pSK⁻ wurden durch die Ligationen zerstört (**Abb. 20**). Als Reporter für ABA regulierte Konstrukte wurden β -D-Glucuronidase (Jefferson, 1987) und Luciferase (Luehrsen et al., 1992) verwendet.

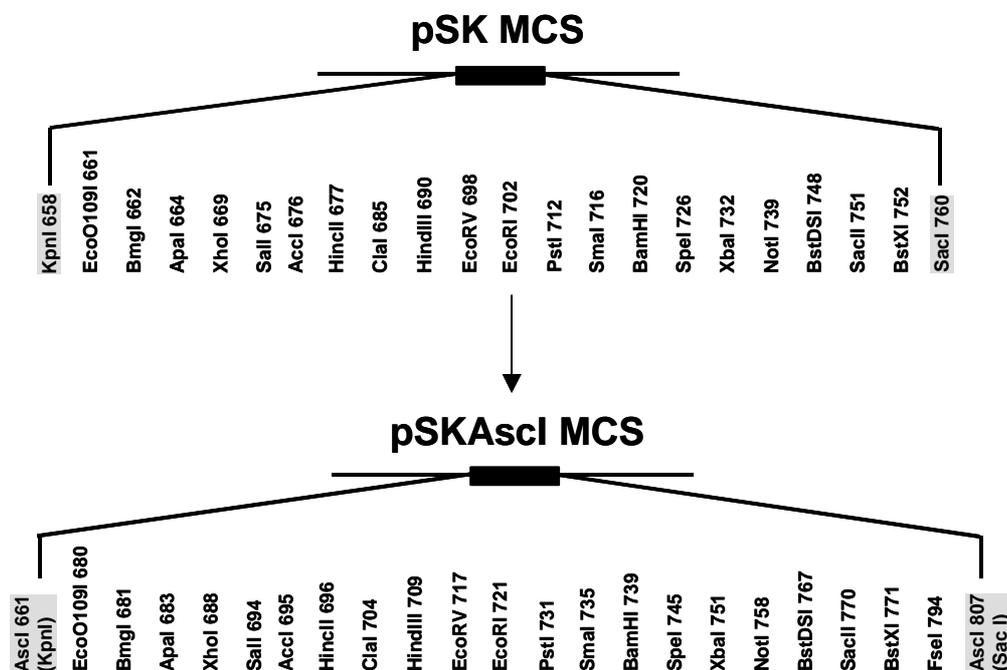


Abb. 20: Ersatz der KpnI- und SacI-Restriktionsstelle durch Ascl in der pSK *multiple cloning site*.

Im nächsten Klonierungsschritt wurde in den pSK mit den beiden Ascl-Schnittstellen (pSKAscl) die für β -D-Glucuronidase codierende Sequenz (GUS) und der Nopalinsynthase-Terminator (Nos Ter) ligiert. Mit BamHI und EcoRI wurde aus pBI221 (Jefferson, 1987) das GUS-Nos-Ter-Fragment ausgeschnitten und in den mit BamHI und EcoRI verdauten pSKAscl eingesetzt (**Abb. 21**).

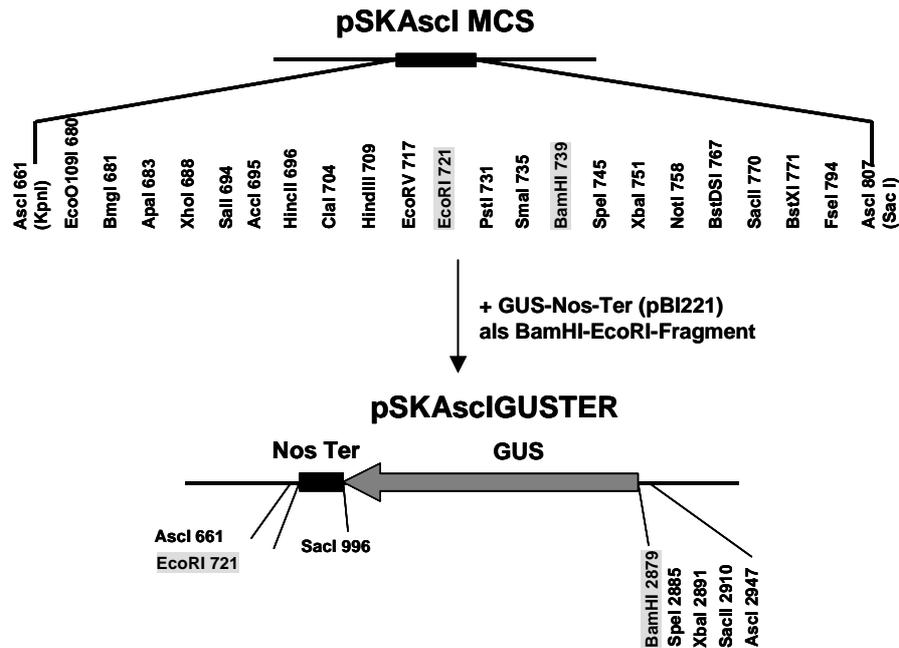


Abb. 21: Klonierung von GUS und Nos-Terminator in pSKAscI (Details siehe Text).

Der resultierende pSKAscIGUSTER diente als Ausgangsvektor für regulierte GUS-Konstrukte. Für Luciferasekonstrukte wurde GUS aus pSKAscIGUSTER gegen Luciferase (LUC) aus pGEM-luc (Promega) ausgetauscht. Das BamHI-SacI LUC-Fragment wurde in die entsprechenden Stellen des pSKAscIGUSTER ligiert (**Abb. 22**).

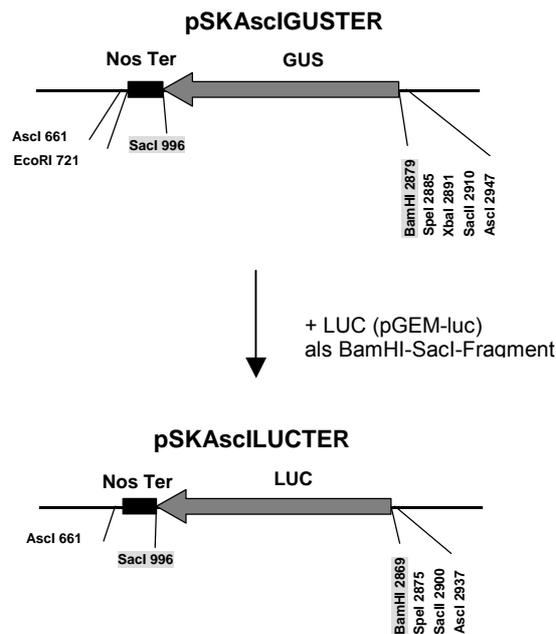


Abb. 22: Klonierung von LUC in pSKAscIGUSTER (Details siehe Text).

In den daraus hervorgegangenen pSKAscILUCTER und in pSKAscIGUSTER wurden die Promotoren von *RAB18*, *RD29B* und *AtHB-6* kloniert. Die Promotoren wurden mit *proof reading* Polymerase (Vent-Polymerase, New England Biolabs) in einer PCR mit Columbia-DNA als Matrize amplifiziert (Sequenzen der Oligonukleotide siehe Anhang). Die SacII- und BamHI-Restriktionsstellen für die Klonierungen wurden als Überhänge der Oligonukleotide eingeführt. Die entsprechend verdauten PCR-Produkte wurden jeweils in den mit SacII und BamHI geöffneten pSKAscIGUSTER beziehungsweise in pSKAscILUCTER ligiert (**Abb. 23**).

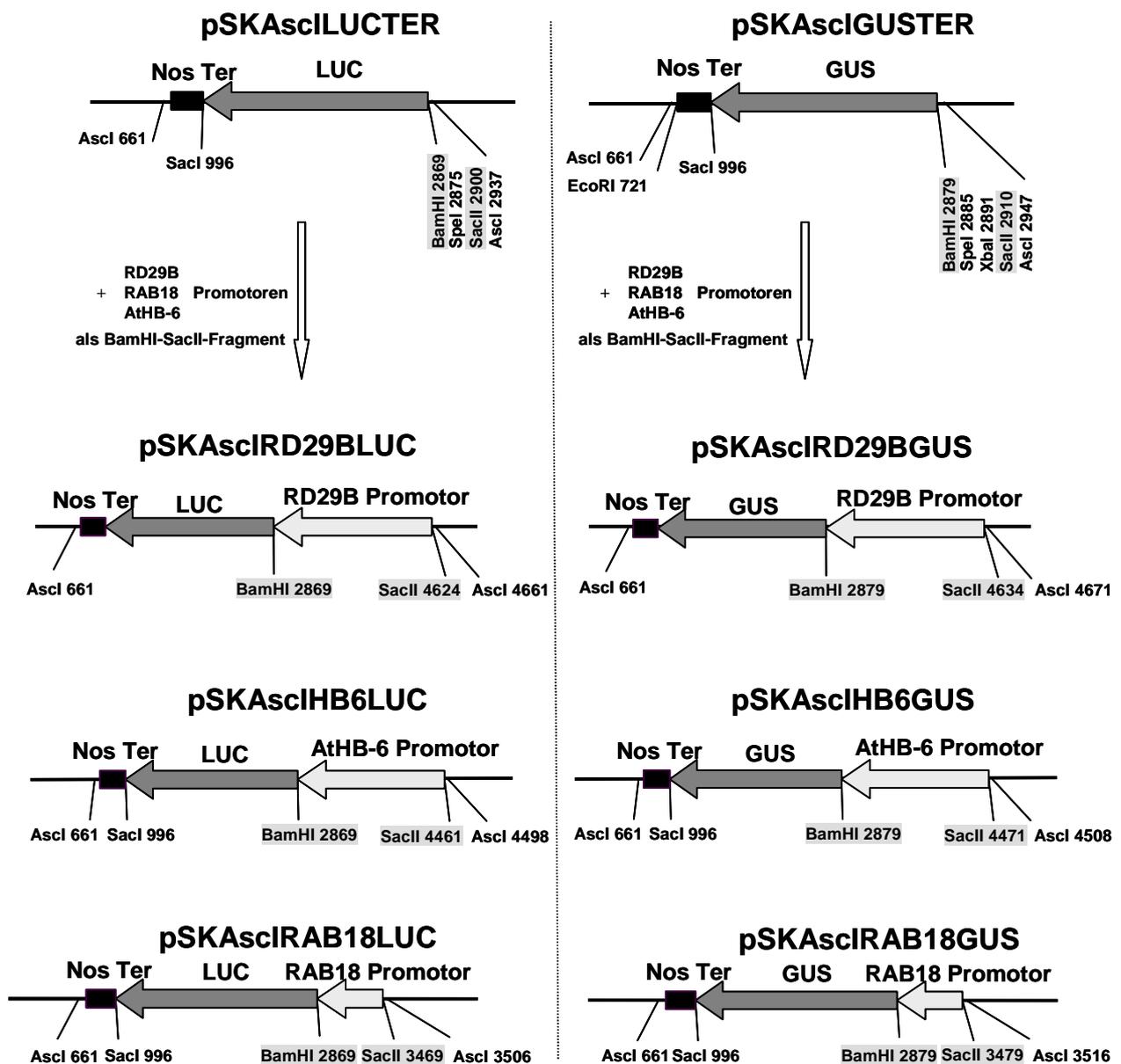


Abb. 23: GUS- und LUC-Reportergenkonstrukte mit *RD29B*-, *Rab18*- und *AtHB-6*- Promotoren (Details siehe Text).

Die Luciferasekonstrukte, pSKAscIHB6LUC, pSKAscIRAB18LUC und pSKAscIRD29BLUC wurden in transienten Expressionsversuchen getestet. Jeweils 50 µg Plasmid-DNA wurde mit 100 µg pBI221 in RLD-Protoplasten cotransfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden die Protoplasten aufgeteilt und mit 30 µM ABA beziehungsweise ohne ABA 18 h inkubiert. In **Abb. 24** sind die auf die β -D-Glucuronidaseaktivität bezogenen Luciferaseaktivitäten dargestellt. Sowohl für *RD29BLUC*, wie auch für *RAB18LUC* ergab sich eine starke Induktion der Aktivität durch ABA, entsprechend den Ergebnissen aus Northern- und RT-PCR-Experimenten. Für *RD29BLUC* war die relative Aktivität mit 30 µM ABA 22-fach höher, für *RAB18LUC* lag der Induktionsfaktor bei 10. Im Gegensatz zu den Expressionsdaten aus Northernanalysen fand sich bei *AtHB-6LUC* eine geringe Repression durch ABA, was eine unterschiedliche Regulation in Protoplasten im Vergleich zu ganzen Pflanzen vermuten läßt.

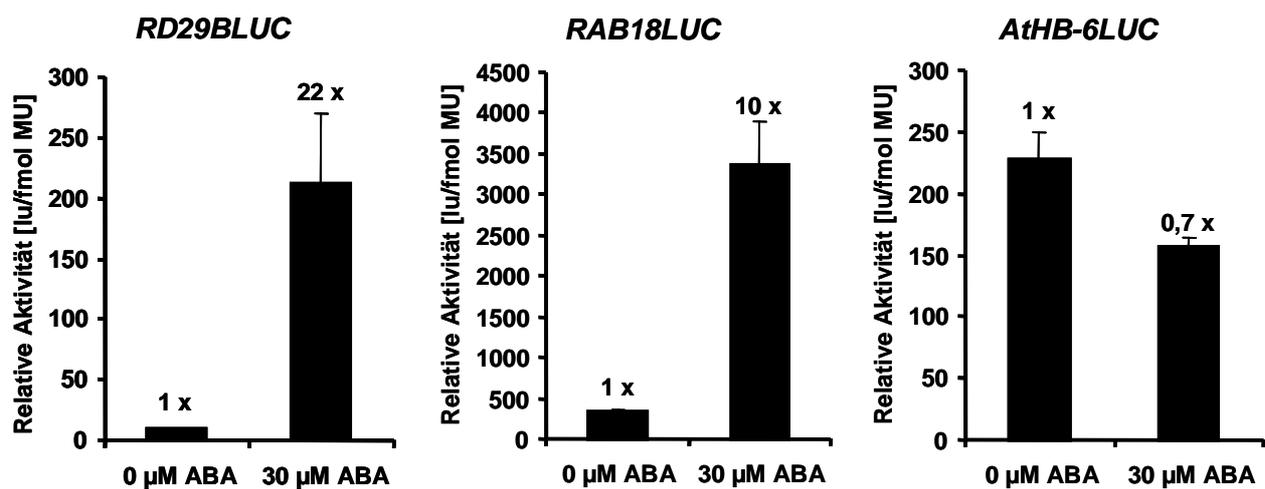


Abb. 24: Transiente Expression in RLD-Protoplasten. Jeweils 50 µg LUC-Reportergenkonstrukte mit *RD29B*-, *RAB18*- und *AtHB-6*- Promotoren wurden mit je 100 µg pBI221 cotransfiziert. Nach 18 h Inkubation mit bzw. ohne ABA wurde Luciferase und β -D-Glucuronidaseaktivität von jeweils zwei unabhängigen Transfektionen bestimmt.

3.2.3. Zeit- und ABA- abhängige Expression

Die Expression der durch ABA induzierbaren Luciferase-Konstrukte, *RD29BLUC* und *RAB18LUC* wurde im transienten Expressionssystem weiter charakterisiert. Die Zeit-, ABA- und Plasmidmengenabhängigkeit der Expression wurde untersucht. Die Luciferasekonstrukte pSKAscIRD29BLUC beziehungsweise pSKAscIRAB18LUC wurden

jeweils cotransfiziert mit pBI221Aequorin als internem Standard. Für den zeitlichen Verlauf wurde nach bestimmten Inkubationszeiten mit und ohne ABA die Luciferase- und Aequorinaktivität gemessen (**Abb. 25**).

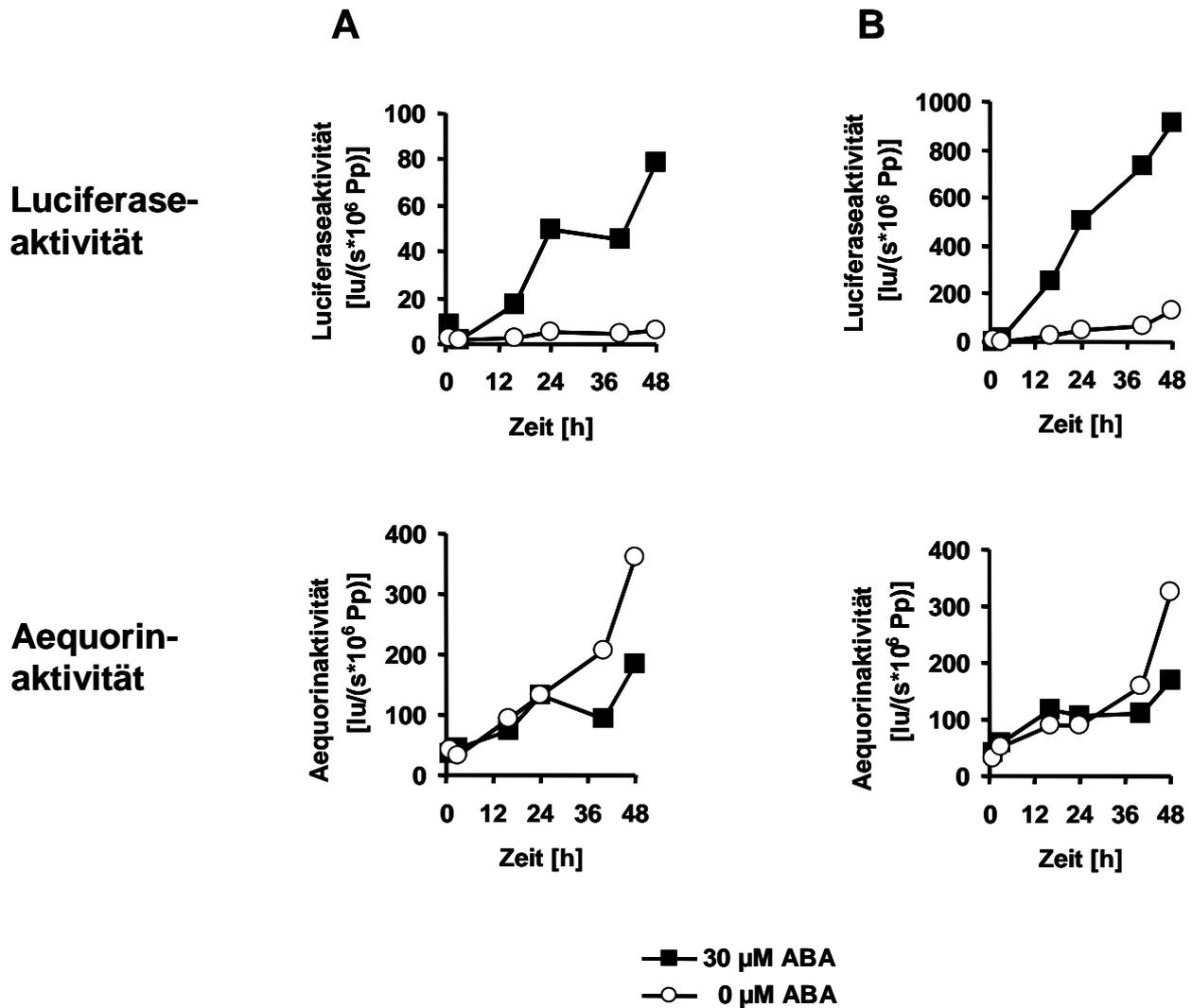


Abb. 25: Cotransfektion von 50 μg pSKAscIRD29BLUC (A) bzw. pSKAscIRAB18LUC (B) mit 100 μg pBI221Aequorin in RLD-Protoplasten. Die Ansätze wurden nach der Transfektion gesplittet, die Hälfte mit 30 μM ABA versetzt und je mit und ohne ABA für 1, 3, 16, 24, 40 und 48 h vor Analyse der Reporteraktivitäten inkubiert.

In jedem Fall zeigt sich über die Zeit eine Aktivitätszunahme. Ab 16 h Inkubation ist deutlich die ABA vermittelte Induktion von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* zu erkennen. Für Apoaequorin ergab sich nach 40 h ein durch ABA verursachter Aktivitätsrückgang auf etwa die Hälfte im Vergleich zu den nicht mit ABA behandelten Protoplasten. Für nachfolgende

Experimente wurde je nach Zeitpunkt der ABA-Zugabe zwischen 16 und 40 h nach der Transfektion inkubiert. Bei ABA-Zugabe direkt nach der Transfektion wurde nach 16 h extrahiert, bei 40-stündiger Inkubation erfolgte die ABA- Zugabe nach 16 h und nach weiteren 24 h wurde extrahiert. Entsprechend dem gezeigten zeitlichen Expressionsverlauf ist für diese Inkubationszeiten die ABA-Induktion von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* nachweisbar. Der Einfluß von ABA auf die Expression des internen Standards bei Inkubationszeiten über 40 h führt bei der Standardisierung zu einer höheren Induktion als dies alleine durch Verwendung der Luciferaseaktivitäten der Fall wäre, was einen Vergleich der standardisierten und nicht-standardisierten Aktivitätswerte sinnvoll macht.

Neben dem zeitlichen Verlauf wurde die Abhängigkeit der Expression der ABA regulierten Reporterkonstrukte von der ABA-Konzentration und von der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge untersucht. Mit zunehmender ABA-Konzentration sollte die Expression der Reportergene zunehmen vergleichbar etwa mit der Zunahme der *RAB18*-mRNA in Abhängigkeit der ABA-Konzentration in *Arabidopsis* Pflanzen (Jeannette et al., 1999; Leung et al., 1997). Sowohl die ABA-Konzentration, wie auch die Menge an für die Transfektion eingesetztem reguliertem Reporterkonstrukt wurde variiert (**Abb. 26**).

Mit steigender ABA-Konzentration zeigte sich für beide Luciferasekonstrukte eine stetige Zunahme der Expression. In semilogarithmischer Darstellung ergeben sich je nach eingesetzter Plasmidmenge unterschiedlich steile Geraden. In **Abb. 26** sind relative für die Aequorinaktivität standardisierte und absolute auf die Protoplastenanzahl bezogene Luciferaseaktivitäten dargestellt. Durch die Standardisierung wird der prinzipielle Kurvenverlauf nicht beeinflusst. In jedem Fall führt eine Erhöhung der ABA-Konzentration sowie eine Erhöhung der Plasmidmenge zu einer verstärkten Luciferaseexpression. Damit ergibt sich für Veränderung beider Parameter keine Sättigung im untersuchten Bereich von 0 bis 30 μM für die ABA-Konzentration und 5 bis 80 μg für die eingesetzte Plasmidmenge. Keine der Veränderungen führt bei den Maximalwerten zu einer Verringerung der Expression. Durch Erhöhung der Anzahl vorhandener Promotoren durch Einsatz größerer Plasmidmengen etwa zeigt sich keine negative Interferenz durch Titration eines DNA-bindenden Faktors im untersuchten Konzentrationsbereich. Dementsprechend führt eine größere Anzahl an Promotoren zu einer stärkeren Induktion durch ABA. Die Steigung der in der semilogarithmischen Darstellung durchgelegten Regressionsgeraden reflektiert die ABA-Konzentrationsabhängigkeit, die ABA-abhängige Signaländerung der jeweiligen Transfektion. Je mehr Plasmid-DNA des Reporters eingesetzt wurde um so größer ist die Steigung der Geraden.

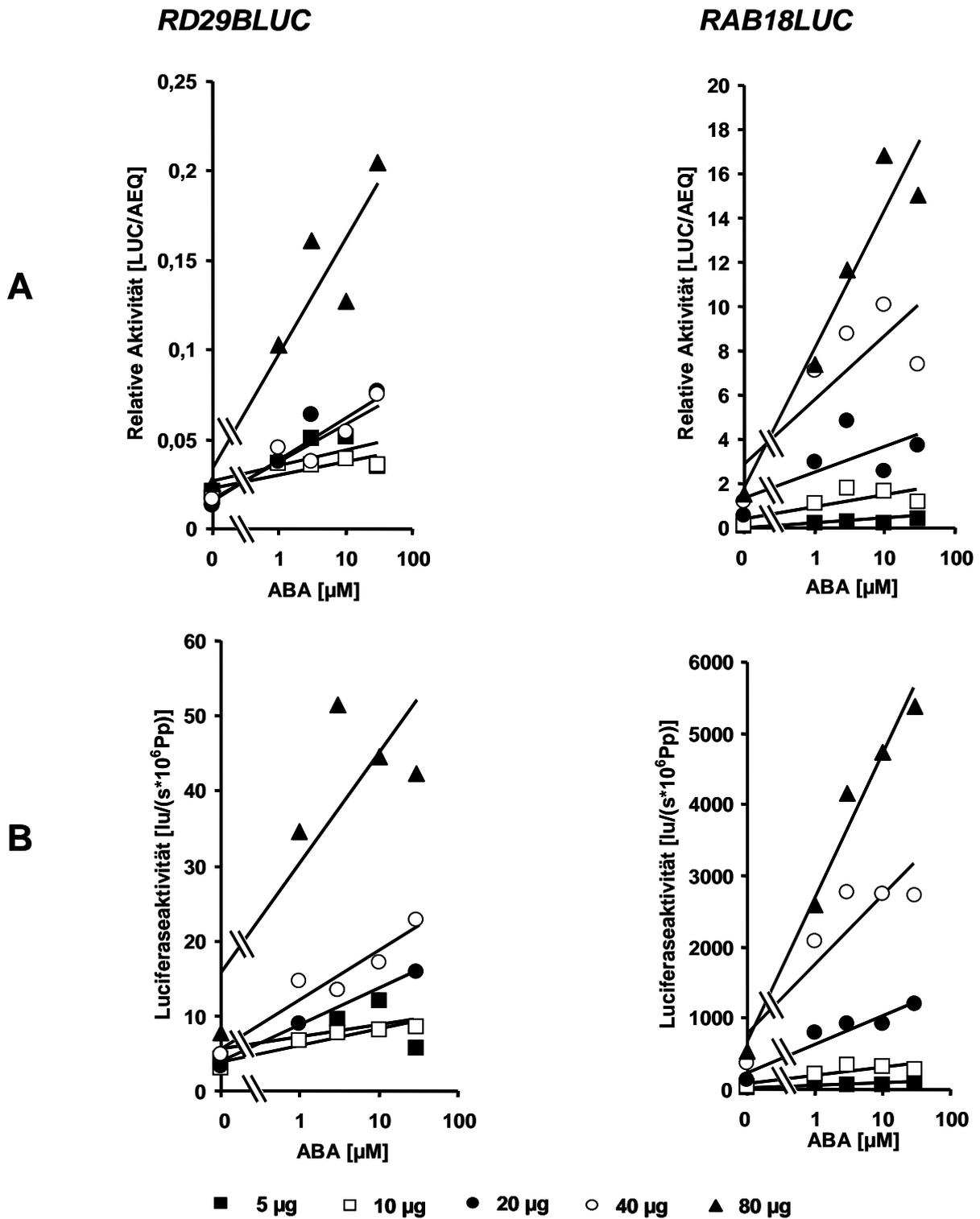


Abb. 26: Cotransfektion von pSKAscIRD29BLUC (*RD29BLUC*) bzw. pSKAscIRAB18LUC (*RAB18LUC*) mit 100 µg pBI221Aequorin in RLD-Protoplasten. Verschiedene Mengen Luciferase-Reporter-DNA (5, 10, 20, 40, 80 µg) und ABA-Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 30 µM) wurden eingesetzt. Die ABA-Konzentrationsabhängigkeit wurde für jede eingesetzte Plasmid-Masse als Regressionsgerade durch die entsprechenden Werte dargestellt. Sowohl gegen die Aequorinaktivität standardisierte Werte (**A**) wie auch nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (**B**) werden gezeigt.

In **Abb. 27** ist der Zusammenhang zwischen den Steigungen der Regressionsgeraden und der eingesetzten Plasmidmenge zusammengefasst. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der ABA-abhängigen Signaländerung und der Plasmidmenge. Mit steigender Plasmidmenge nimmt die durch Abscisinsäure-abhängige Signaländerung zu.

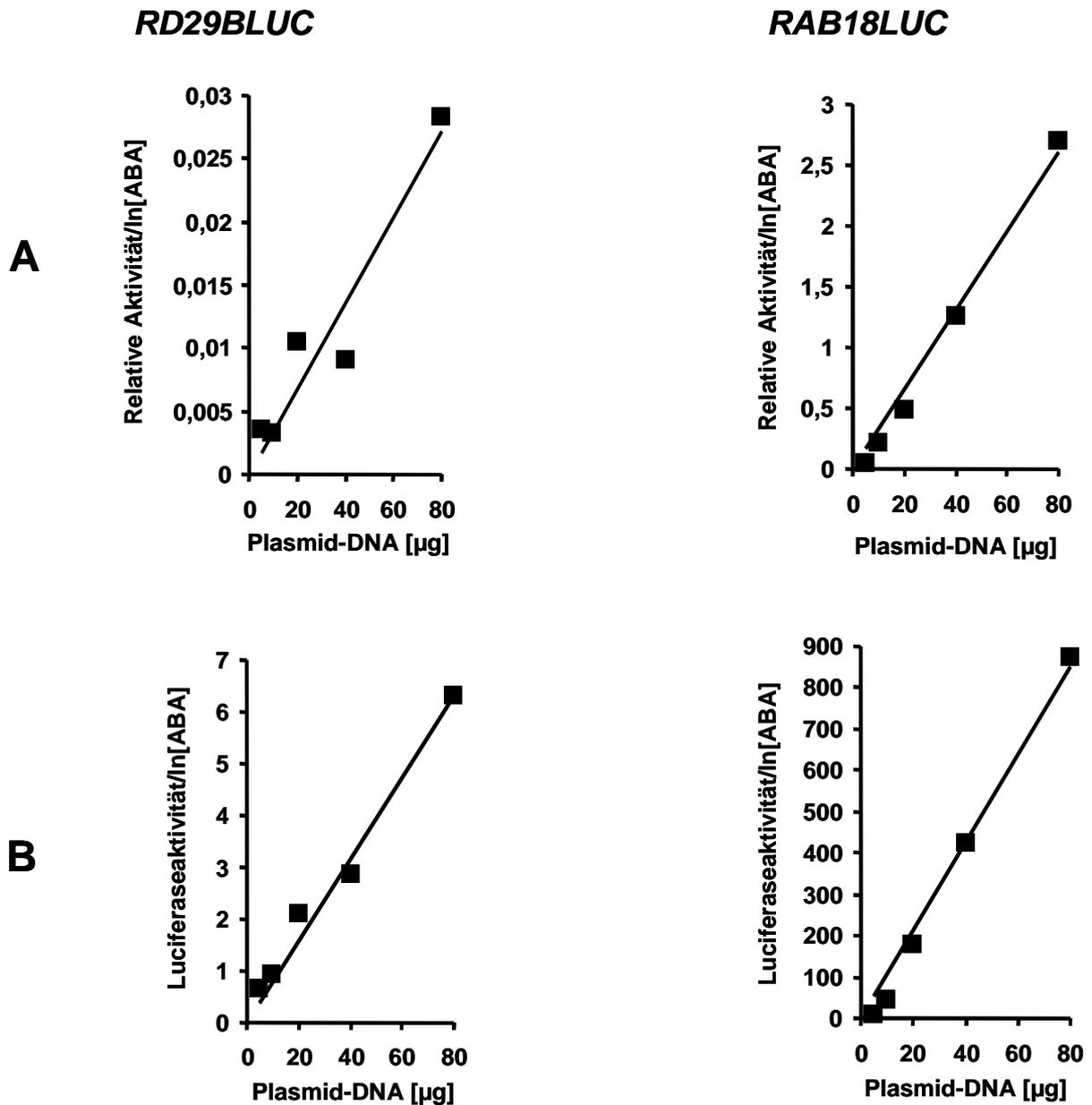


Abb. 27: Zusammenhang zwischen der ABA-abhängigen Signaländerung und der Menge an eingesetztem Luciferasekonstrukt (5, 10, 20, 40, 80 µg). Die ABA-abhängige Signaländerung wird beschrieben durch die Steigung der in **Abb. 26** gezeigten Regressionsgeraden. Gegen die Aequorinaktivität standardisierte Werte (**A**) wie auch nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (**B**) wurden für die Näherung verwendet.

3.3. Modellsystem zum Vergleich von Mutanten und Wildtyp

Eine Möglichkeit Mutanten auf Genregulationsebene zu charakterisieren ist die transiente Expression regulierter Reportergenkonstrukte in Protoplasten aus Mutanten- sowie Wildtyppflanzen. Unterschiede in der Genregulation zwischen Mutante und Wildtyp ermöglichen eine Analyse des durch die Mutation betroffenen Signaltransduktionsweges.

3.3.1. ABA-abhängige Expression von Reportergenen in Mutanten- und Wildtypprotoplasten

Die Auswirkungen von Abscisinsäure auf die Genregulation kann zum Vergleich von Mutanten- und Wildtyppflanzen genutzt werden. In transienten Expressionsexperimenten wurde die ABA-vermittelte Induktion von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* untersucht. Die Luciferaseexpression bei unterschiedlicher ABA-Konzentration wurde in zwei parallel behandelten Transfektionen analysiert. Protoplasten wurden aus verschiedenen abscisinsäureinsensitiven (*abi1*, *abi2*, *gca2-8*), wie einer abscisinsäurehypersensitiven Mutante (*ahr1*) und den entsprechenden Wildtyppflanzen (La-er, RLD) isoliert. Jeweils $5 \cdot 10^6$ Protoplasten wurden mit 40 µg pSKAscIRAB18LUC beziehungsweise mit 80 µg pSKAscIRD29BLUC und 100 µg pBI221Aequorin transfiziert. Die Protoplasten wurden nach dem DNA-Transfer aufgeteilt und Abscisinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 30 µM) zugesetzt. Nach 16 h Inkubation wurde im Extrakt die Aequorin- und Luciferaseaktivität bestimmt. In **Abb. 28a-q** sind sowohl gegen die Aequorinaktivität standardisierte Werte (**A**) wie nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (**B**) dargestellt. Die Graphen zeigen jeweils den ABA-abhängigen Expressionsverlauf in Wildtyp- und Mutantenprotoplasten in jeweils zwei mit dem gleichen Reporterkonstrukt durchgeführten Transfektionen.

In Protoplasten von *ahr1*, einer für ABA hypersensitiven Mutante (Wang und Grill, unveröffentlicht) entspricht die ABA-vermittelte Regulation von *RAB18LUC* und *RD29BLUC* dem hypersensitiven Phänotyp (**Abb. 28a** und **b**). Für beide Reporter ergibt sich in den Mutantenprotoplasten eine stärkere Induktion der Expression durch Abscisinsäure als beim Wildtyp.

Im Vergleich zur Expression in Wildtypprotoplasten ist in *abi1*-Protoplasten die Induktion von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* durch ABA stark reduziert (**Abb. 28c** und **d**), was dem pleiotropen insensitiven Verhalten von *abi1* gegenüber ABA entspricht (Meyer et al., 1994). Ein für Abscisinsäure ähnlich insensitives Verhalten bezüglich etwa der Stomataregulation, der Keimung oder des Wurzelwachstums zeigt *abi2* (Leung et al., 1997, Rodriguez et al., 1998). Die Regulation von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* in *abi2*-Protoplasten (**Abb. 28e** und **f**) allerdings unterscheidet sich wesentlich von der in *abi1*-Protoplasten. Es zeigt sich für die

abi2-Protoplasten im Vergleich zur Regulation in *La-er*-Protoplasten kein signifikanter Unterschied in der ABA-Induktion der verwendeten Reporter. Die Mutation führt zu keinen im transienten Expressionssystem meßbaren Veränderungen.

RD29BLUC

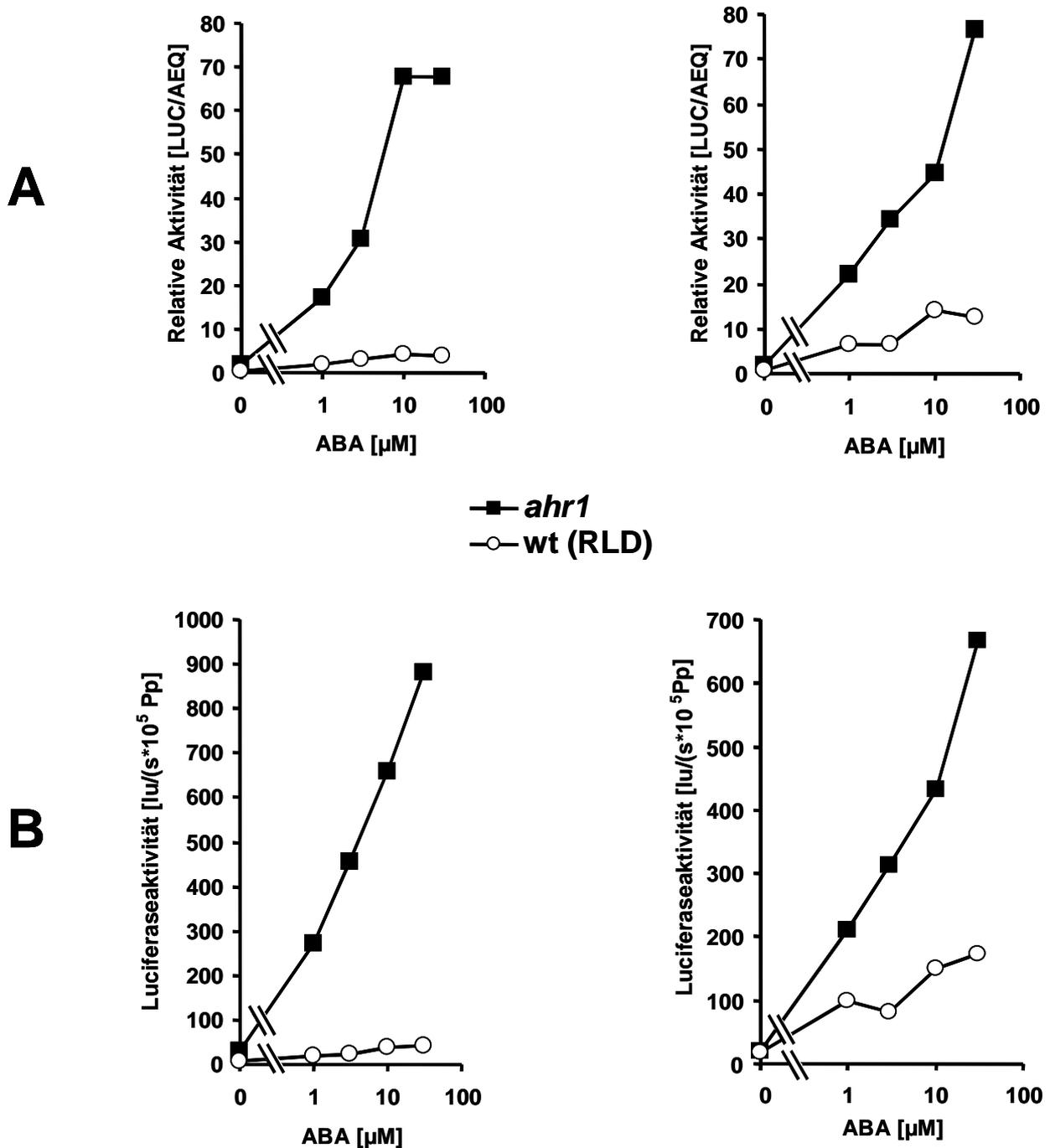


Abb. 28a: *RD29BLUC*-Regulation in Protoplasten aus *ahr1*, einer für ABA hypersensitiven Mutante (Wang und Grill, unveröffentlicht), und RLD als entsprechendem Wildtyp. Die ABA-abhängige Expression (0, 1, 3, 10, 30 μM) von zwei Transfektionen als standardisierte (A) wie auch nicht standardisierte (B) Aktivitätswerte werden gezeigt.

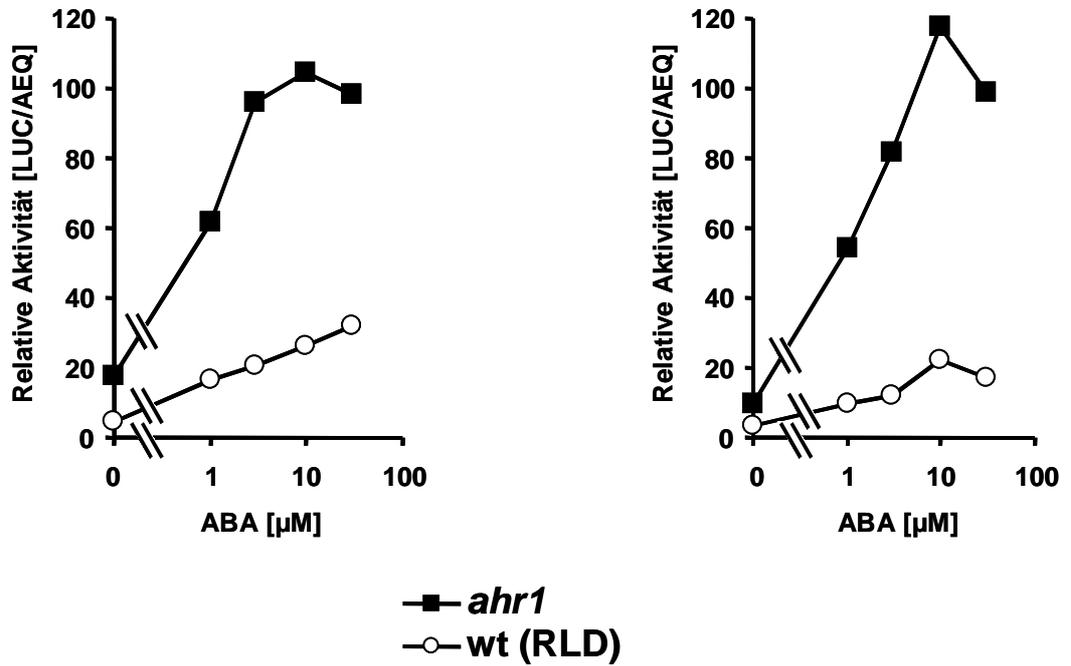
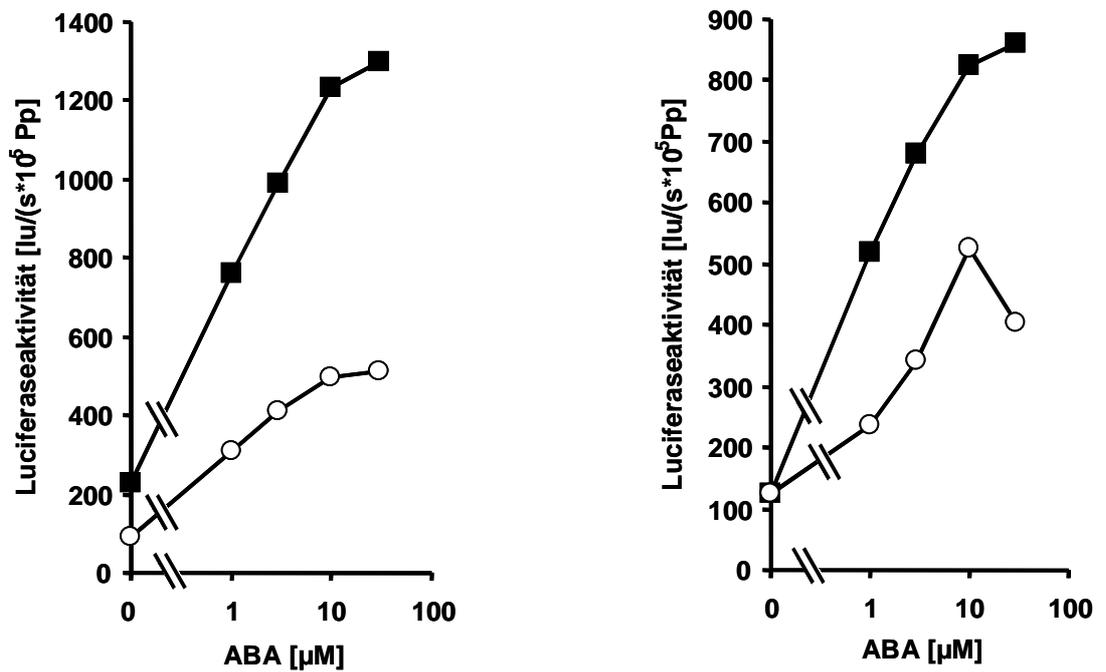
RAB18LUC**A****B**

Abb. 28b: Vergleich der RAB18LUC-Induktion durch ABA (0, 1, 3, 10, 30 μM) in Protoplasten aus *ahr1* und RLD. Standardisierte Werte (A) wie nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B) sind dargestellt.

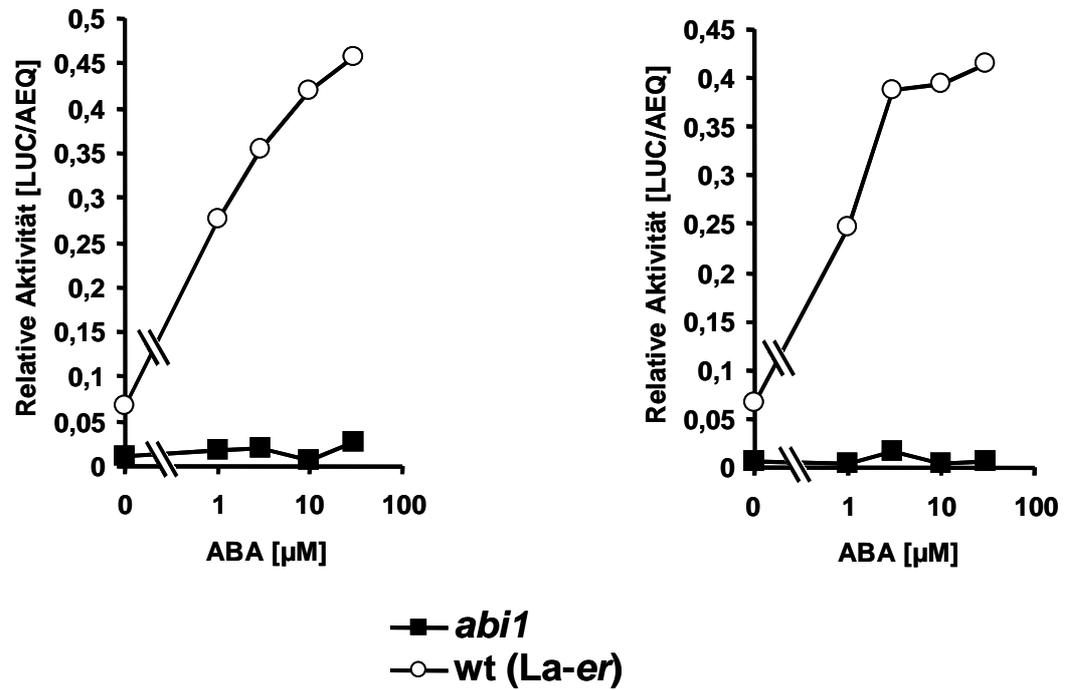
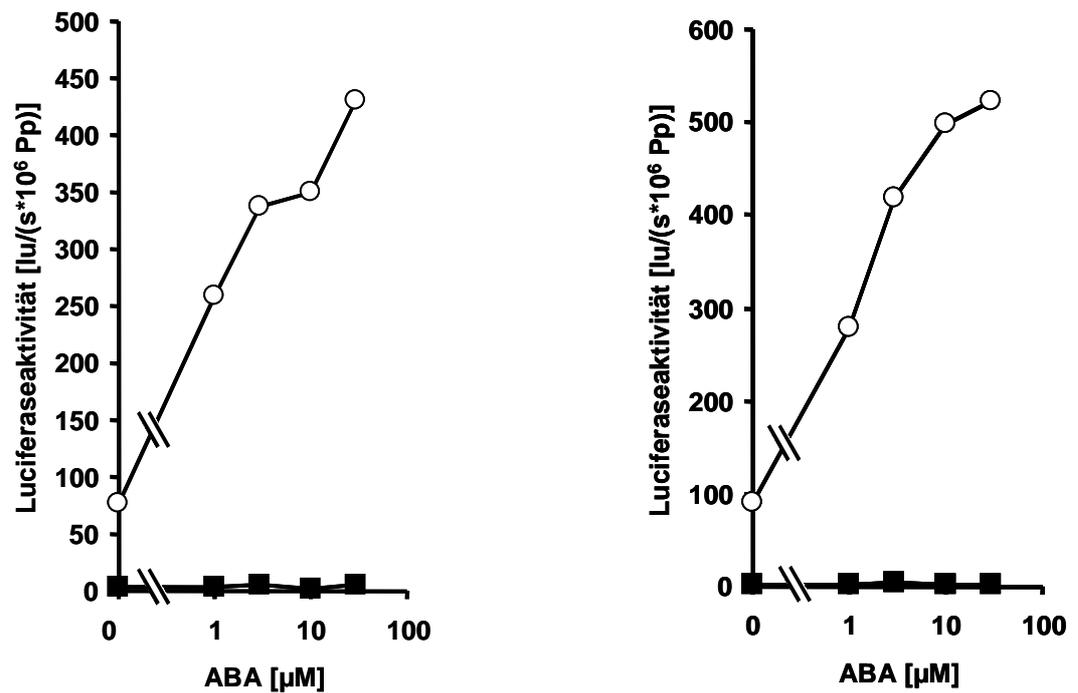
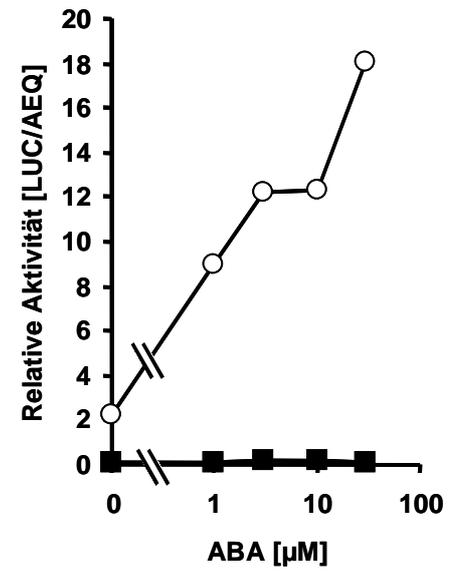
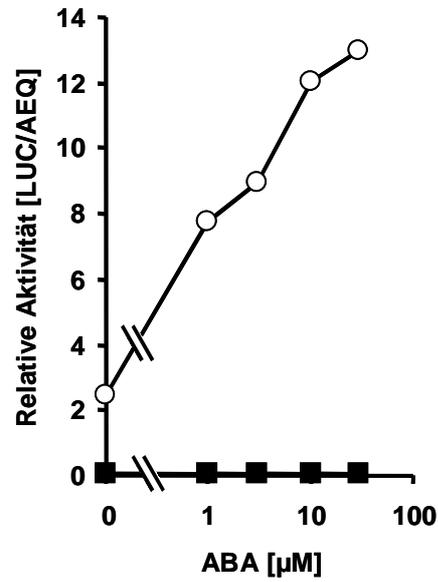
RD29BLUC**A****B**

Abb. 28c: *RD29BLUC*-Expression in *abi1*, einer ABA-insensitiven Mutante (Koornneef et al., 1984) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

RAB18LUC**A**

■ *abi1*
 ○ wt (La-er)

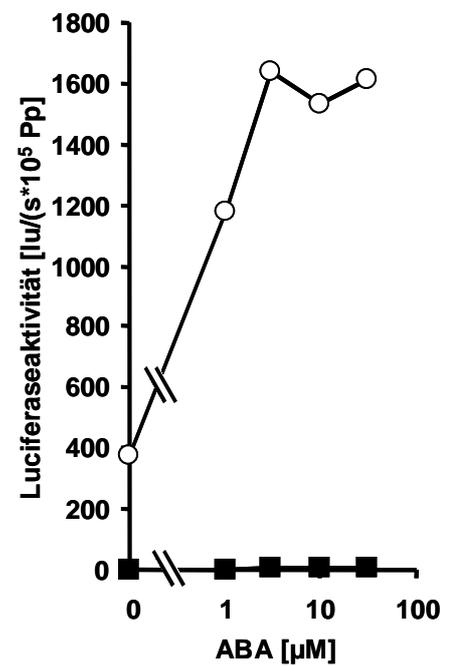
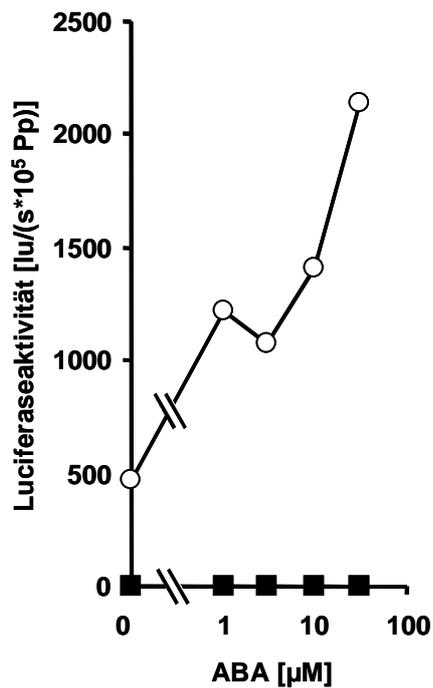
B

Abb. 28d: *RAB18LUC*-Expression in *abi1* (Koorneef et al., 1984) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

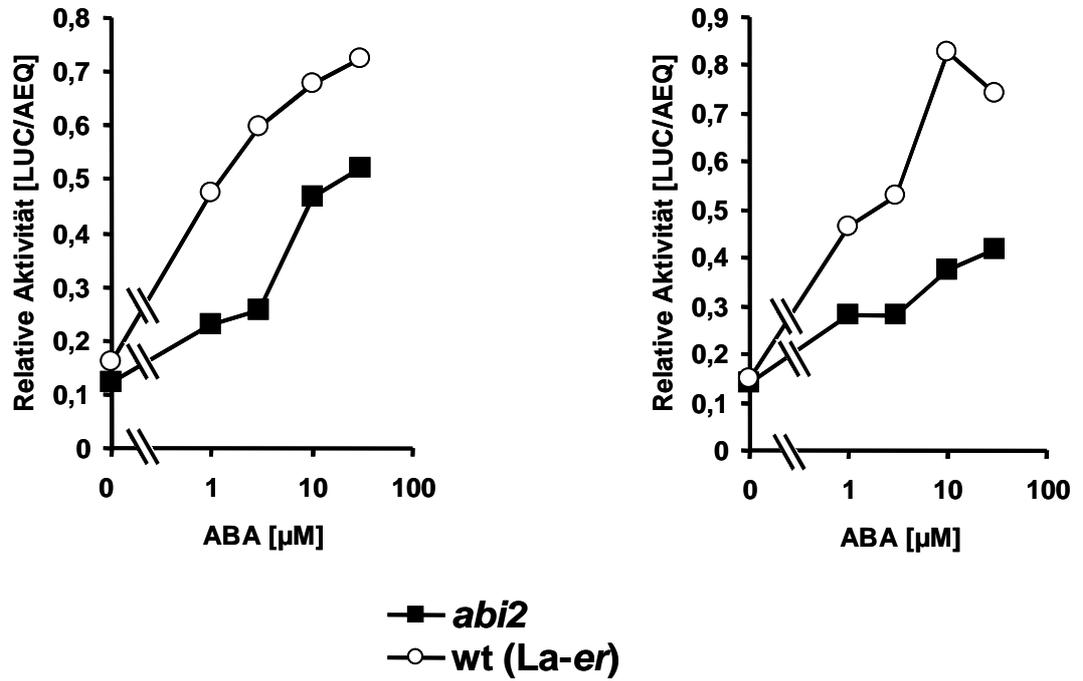
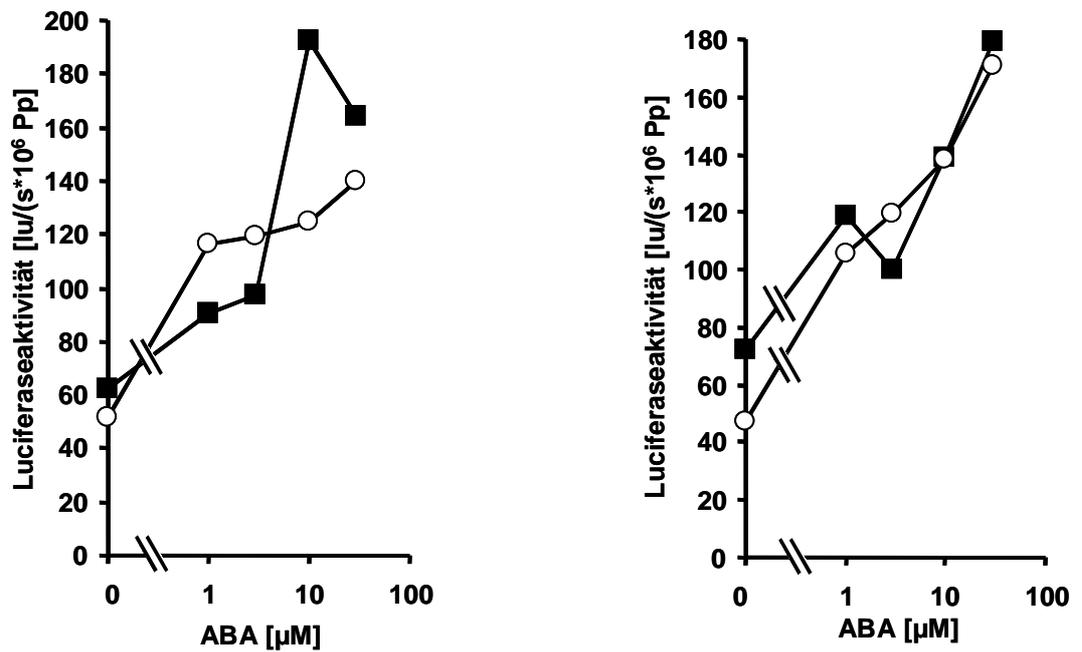
RD29BLUC**A****B**

Abb. 28e: Induktion von *RD29BLUC* in *abi2*, einer ABA-insensitiven Mutante (Koornneef et al., 1984) im Vergleich zum Wildtyp *La-er* (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

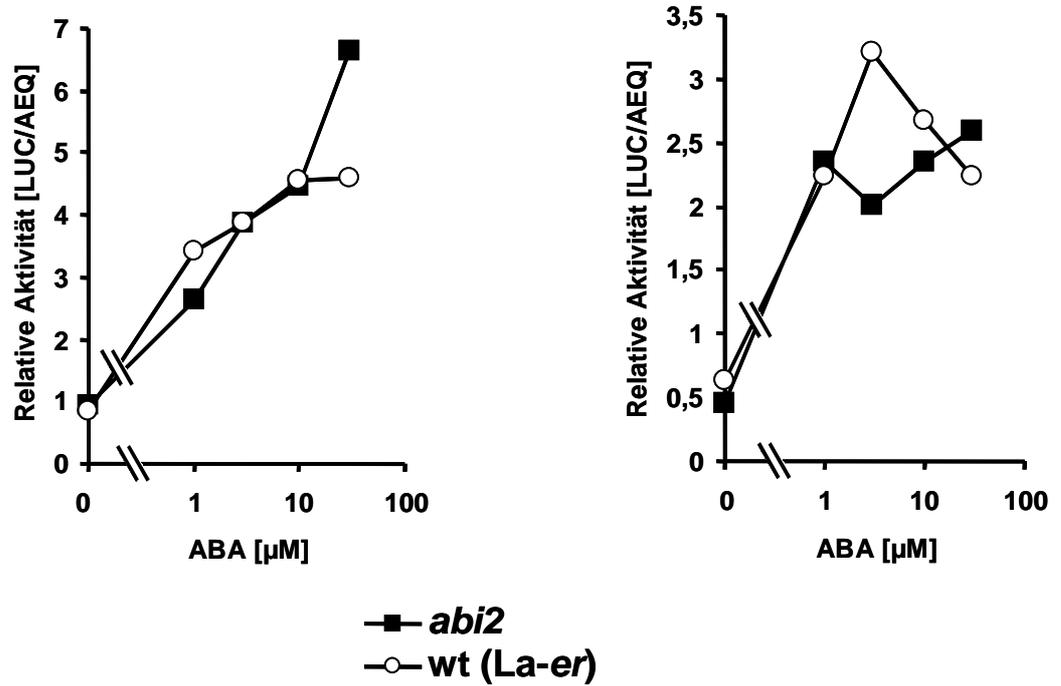
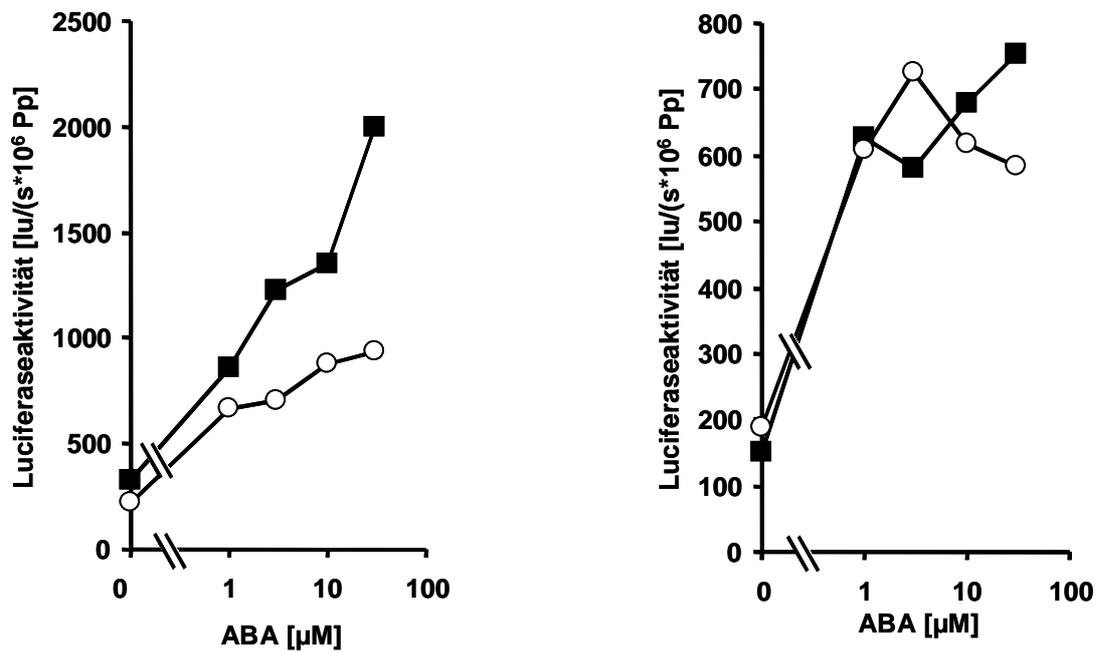
RAB18LUC**A****B**

Abb. 28f: Vergleich der *RAB18LUC*-Expression in *abi2* (Koornneef et al., 1984) und La-er (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

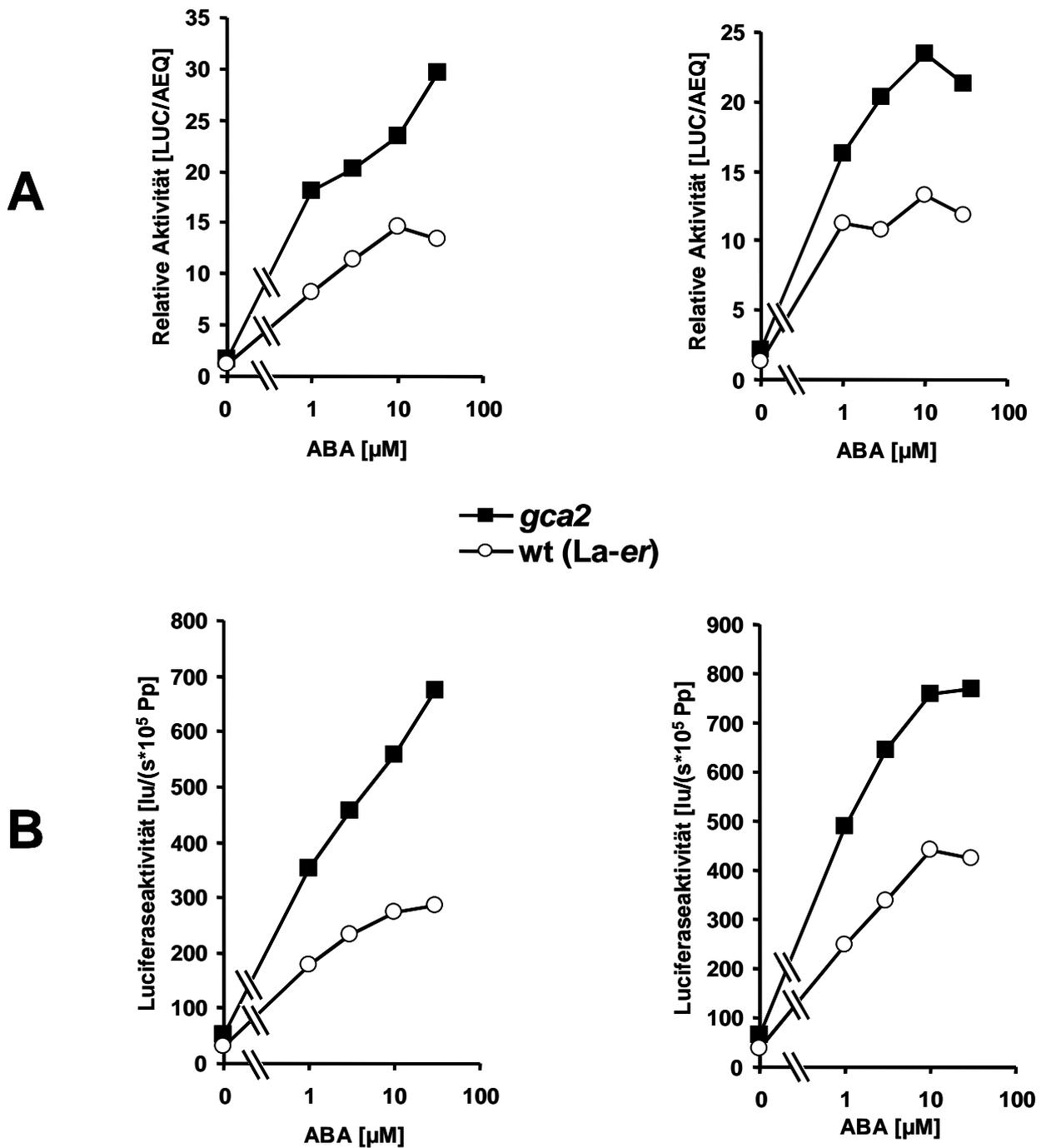
RD29BLUC

Abb. 28g: Unterschiede in der *RD29BLUC*-Expression in *gca2*, einer ABA-insensitiven Mutante (Iten, 1992) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

Die untersuchten *gca*-Mutanten wurden ursprünglich aus EMS (Ethylmethansulfonsäure)-mutagenisiertem Samenmaterial auf Grund ihres ABA-insensitiven Primärwurzelwachstums isoliert (Iten, 1992). Die *gca2* Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp mit Veränderungen in der Samendormanz, der Regulation der Spaltöffnungen und des Primärwurzelwachstums

(Ehrler, 1997). Untersuchungen an Stomata ergaben im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede im ABA-vermittelten Calciumeinstrom (Pei et al., 2000, Allen et al., 2001). Die transiente Expression von *RD29LUC* und *RAB18LUC* in *gca2*-Protoplasten führte im Vergleich zu *La-er* im Gegensatz zum insensitiven Verhalten für verschiedene ABA-vermittelte physiologische Reaktionen wie dem Primärwurzelwachstum zu einer hypersensitiven Reaktion der Mutante gegenüber Abscisinsäure (**Abb. 28g und h**).

RAB18LUC

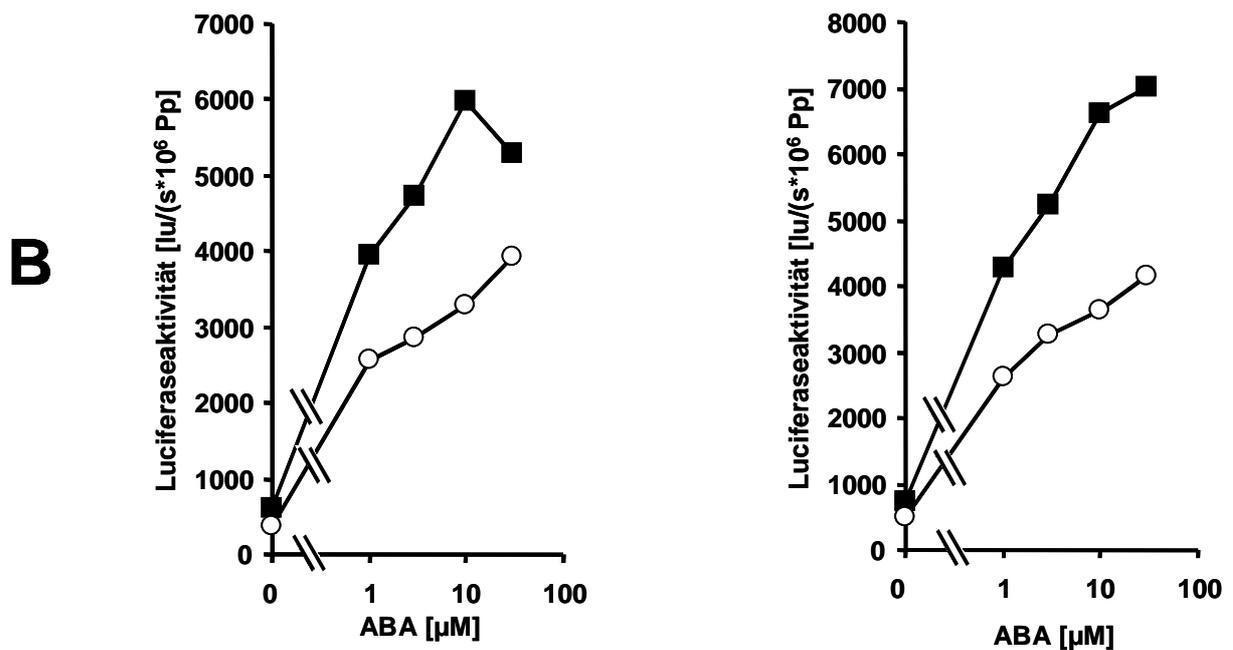
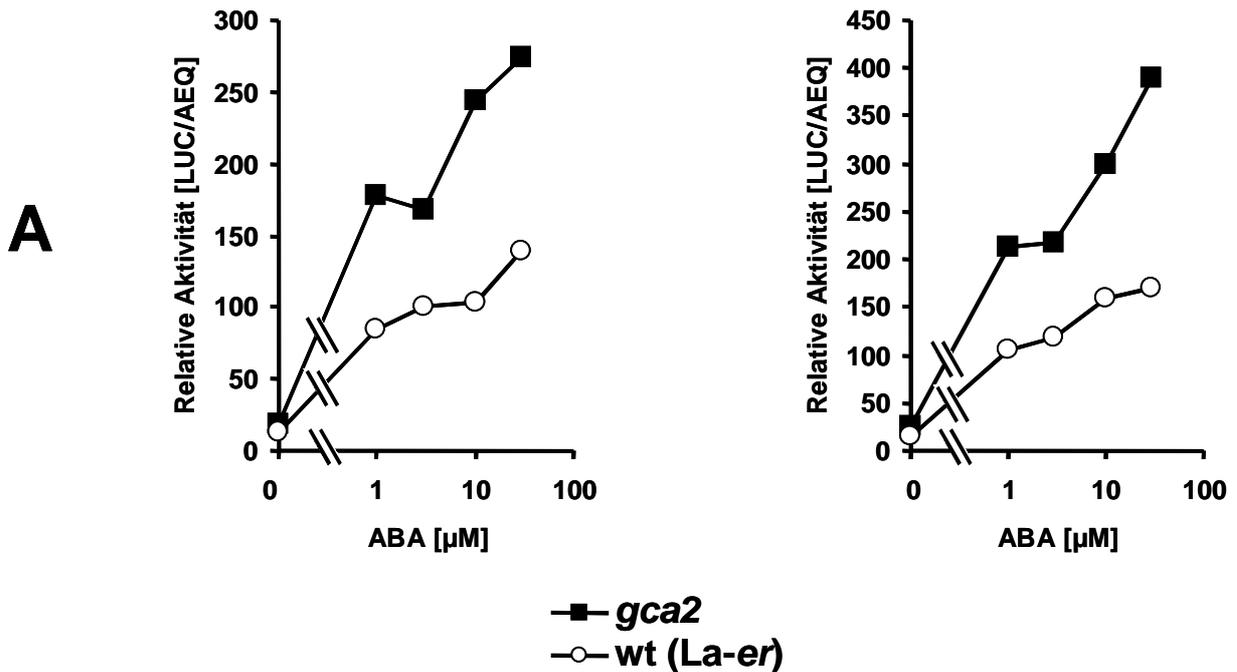


Abb. 28h: *RAB18LUC*-Induktion in *gca2* (Iten, 1992) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

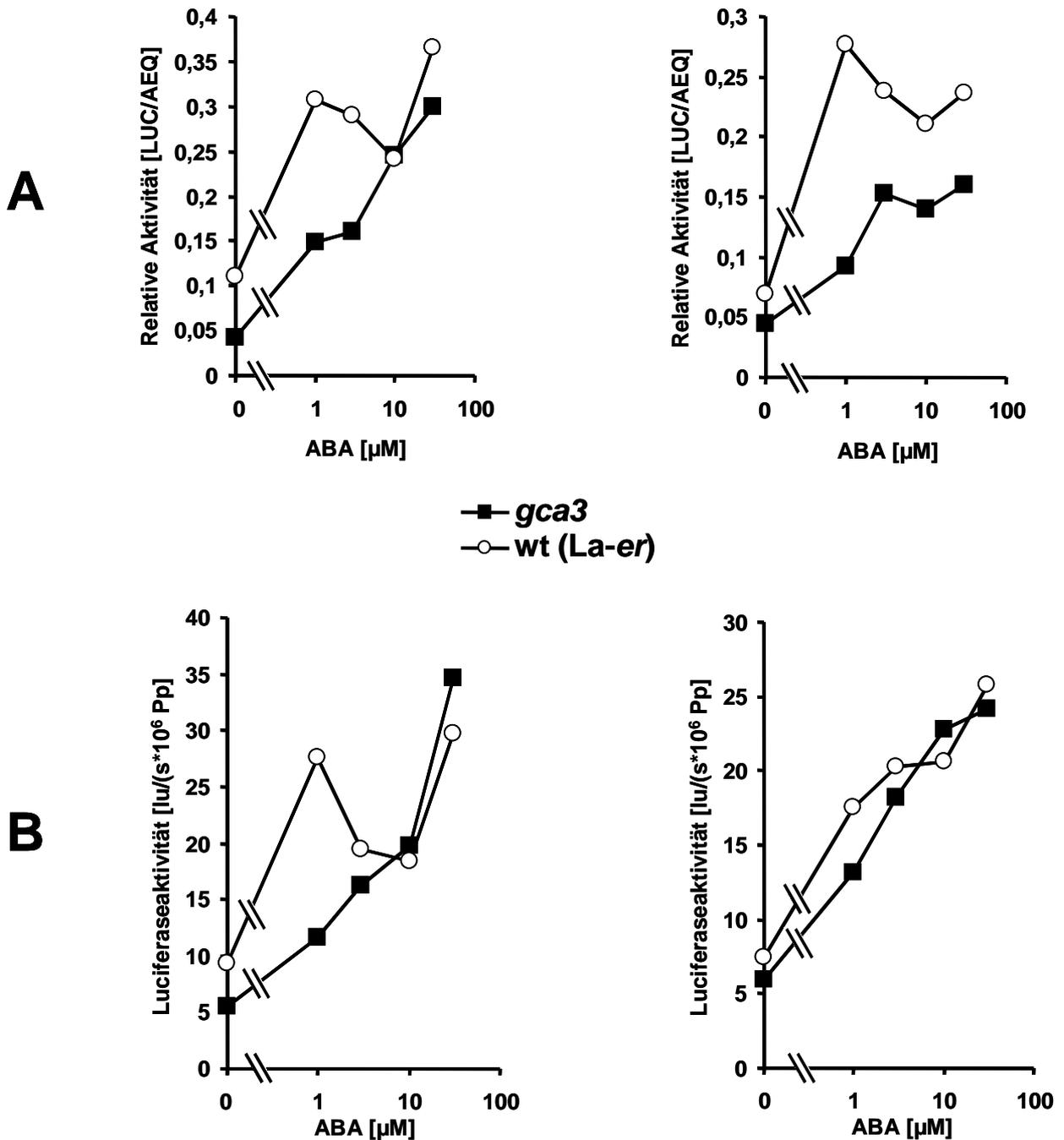
RD29BLUC

Abb. 28i: Vergleich der *RD29BLUC*-Expression in *gca3* (Iten, 1992) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

Mit Ausnahme von *gca2* zeigen die verwendeten *gca*-Mutanten keinen pleiotropen ABA insensitiven Phänotyp, sie verhalten sich insensitiv bezüglich ihres Primärwurzelwachstums (Ehrler, 1997). Daneben sind *gca3*, *gca5*, *gca7* und *gca8* in der physiologischen Antwort auf die exogene Applikation von ACC (1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure) oder Ethephon

gestört (Ehrler, 1997). Die transiente Expression und ABA-Induktion von *RD29LUC* und *RAB18LUC* in Protoplasten von *gca3*, *gca4* und *gca5* zeigte keinen wesentlichen Unterschied zur Expression in Wildtypprotoplasten (**Abb. 28i-m**). Der Einfluß von ABA auf die Expression der Reporter ist in den Mutanten nicht oder nicht mehr erfaßbar gestört.

RAB18LUC

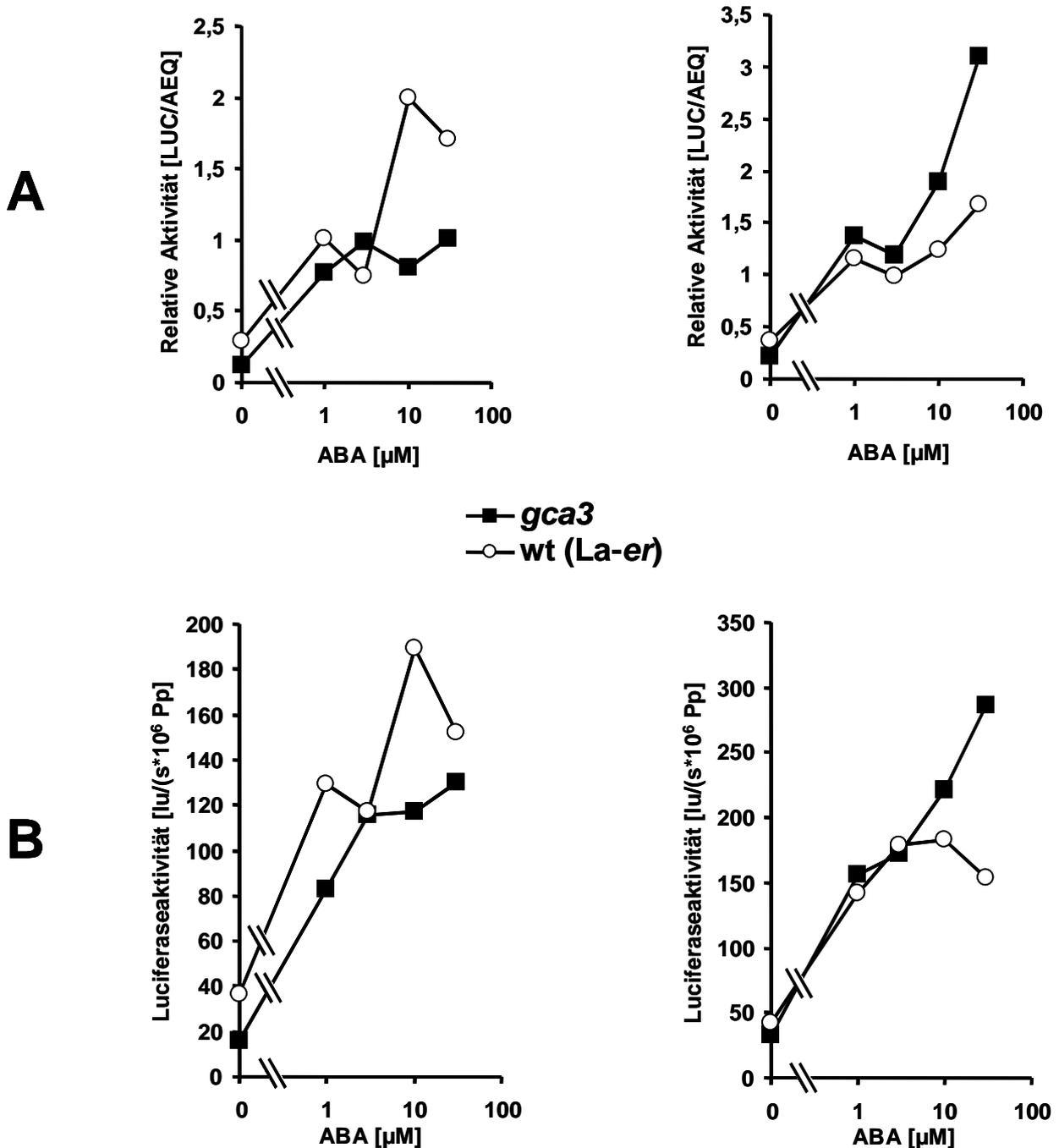


Abb. 28j: ABA-abhängige *RAB18LUC*-Expression in *gca3* (Iten, 1992) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

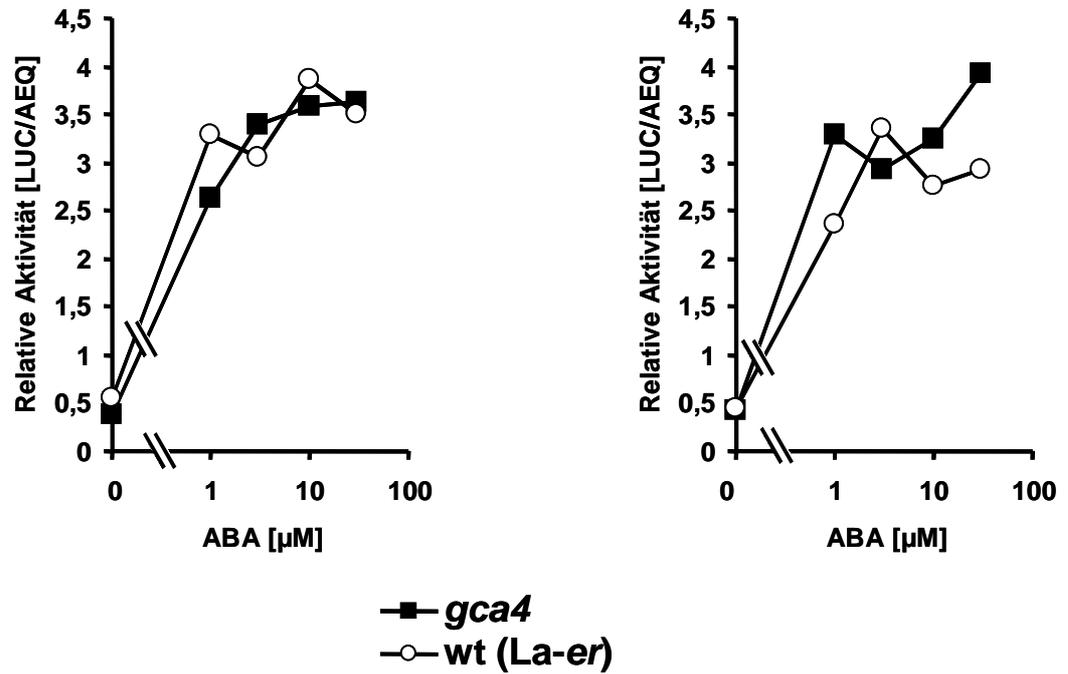
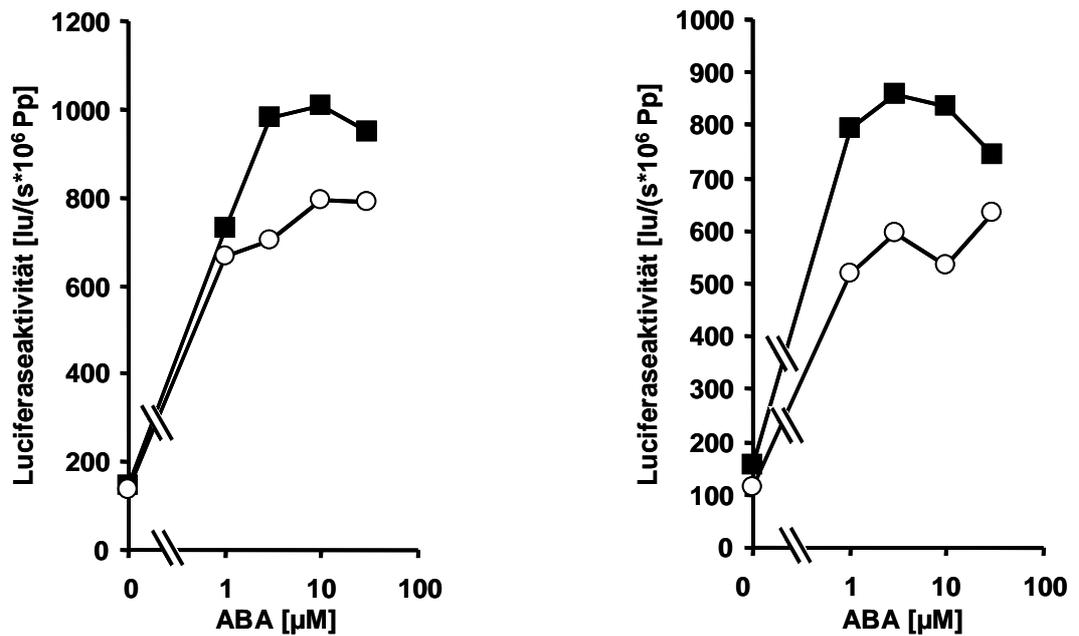
RAB18LUC**A****B**

Abb. 28k: Induktion der *RAB18LUC*-Expression in *gca4* (Iten, 1992) und La-er, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A)), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

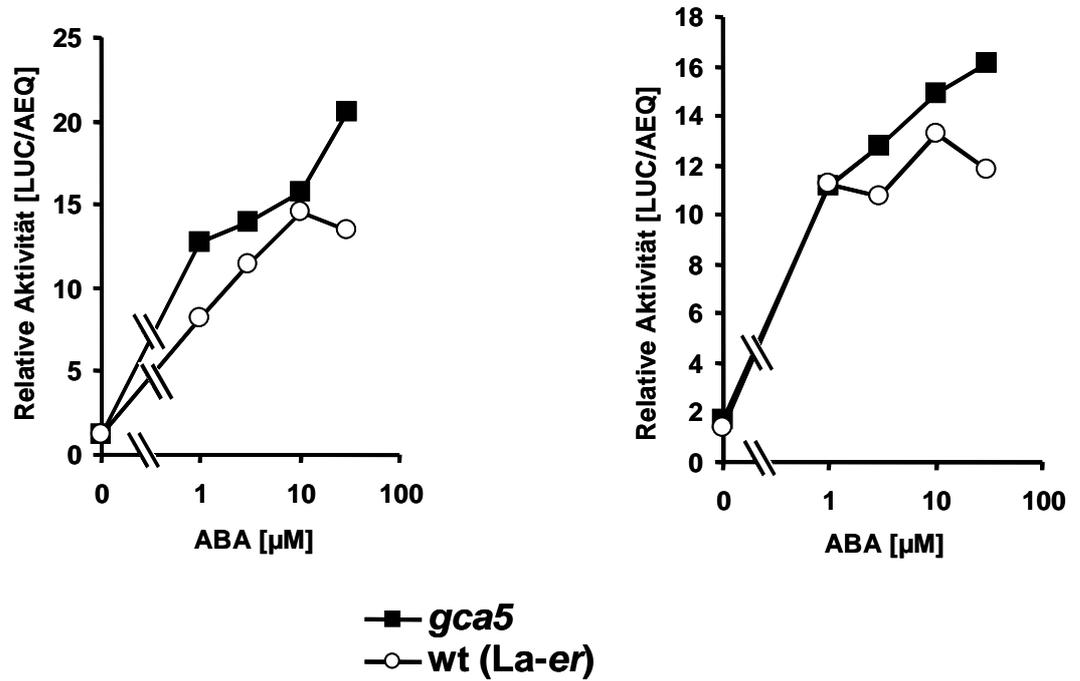
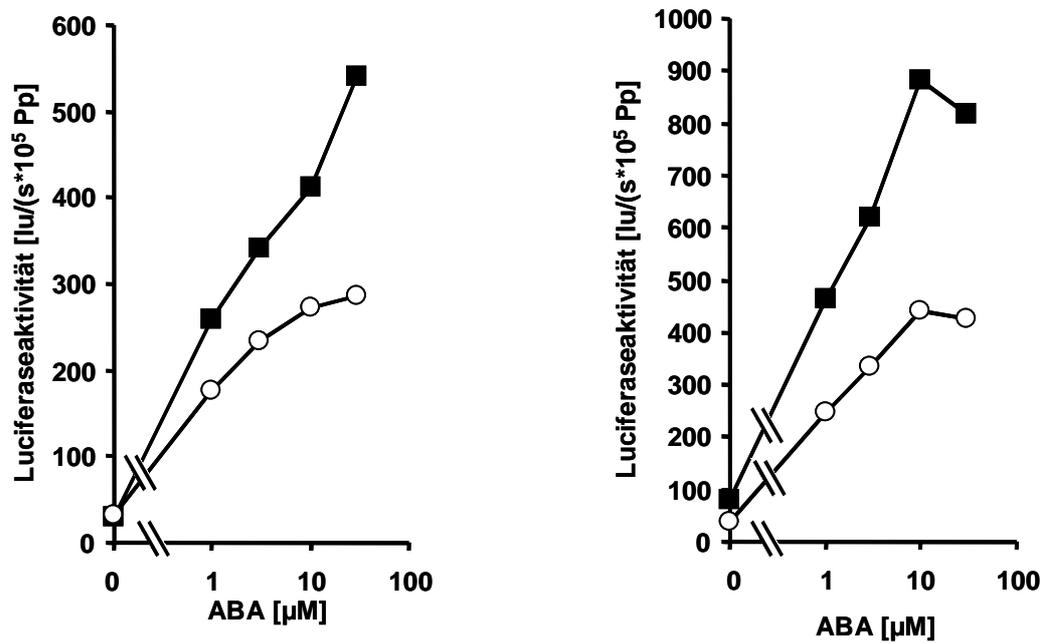
RD29BLUC**A****B**

Abb. 28I: *RD29BLUC*-Induktion in *gca5* (Iten, 1992) und La-er, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

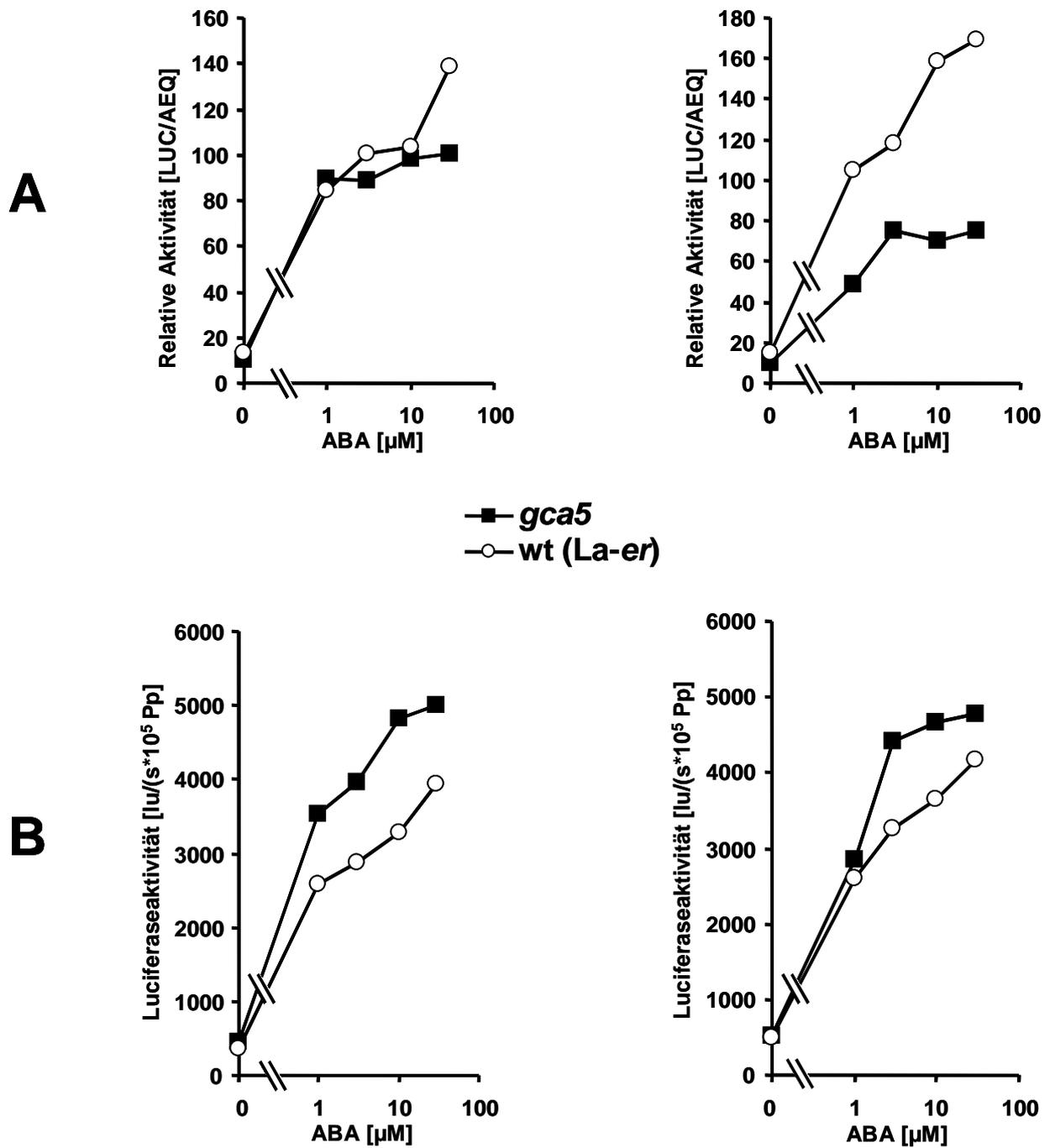
RAB18LUC

Abb. 28m: *RAB18LUC*-Expression in *gca5* (Iten, 1992) und *La-er* (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

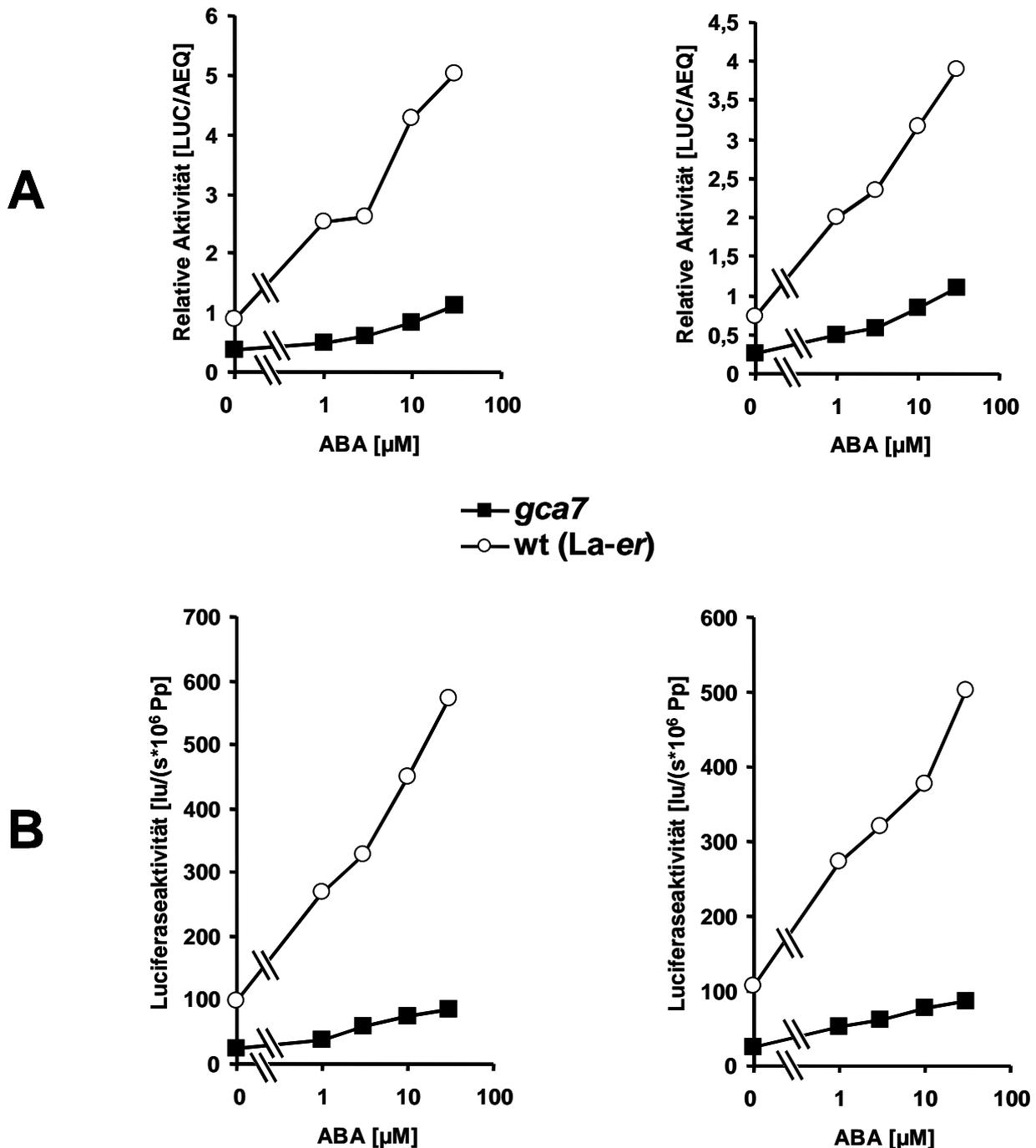
RD29BLUC

Abb. 28n: Induktion der *RD29BLUC*-Expression in *gca7* (Iten, 1992) und *La-er*, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

In Protoplasten von *gca7* und *gca8* wurden die transfizierten Reporter weniger stark durch ABA induziert als im Wildtyp, was dem insensitiven Verhalten bezüglich des Primärwurzelwachstums entspricht (Abb. 28n-q). Damit verhält sich *gca7* (Abb. 28n-o) im transienten Expressionssystem anders als *gca3* (Abb. 28i-j), die Mutationen sind jedoch

allelisch (Grill, unveröffentlicht). Die *gca3*-Mutation hatte keinen erfaßbaren Effekt auf die Reporterinduktion im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise beeinflußt nur die Mutation von *gca7* die ABA-Signaltransduktion, nicht aber die von *gca3*.

RAB18LUC

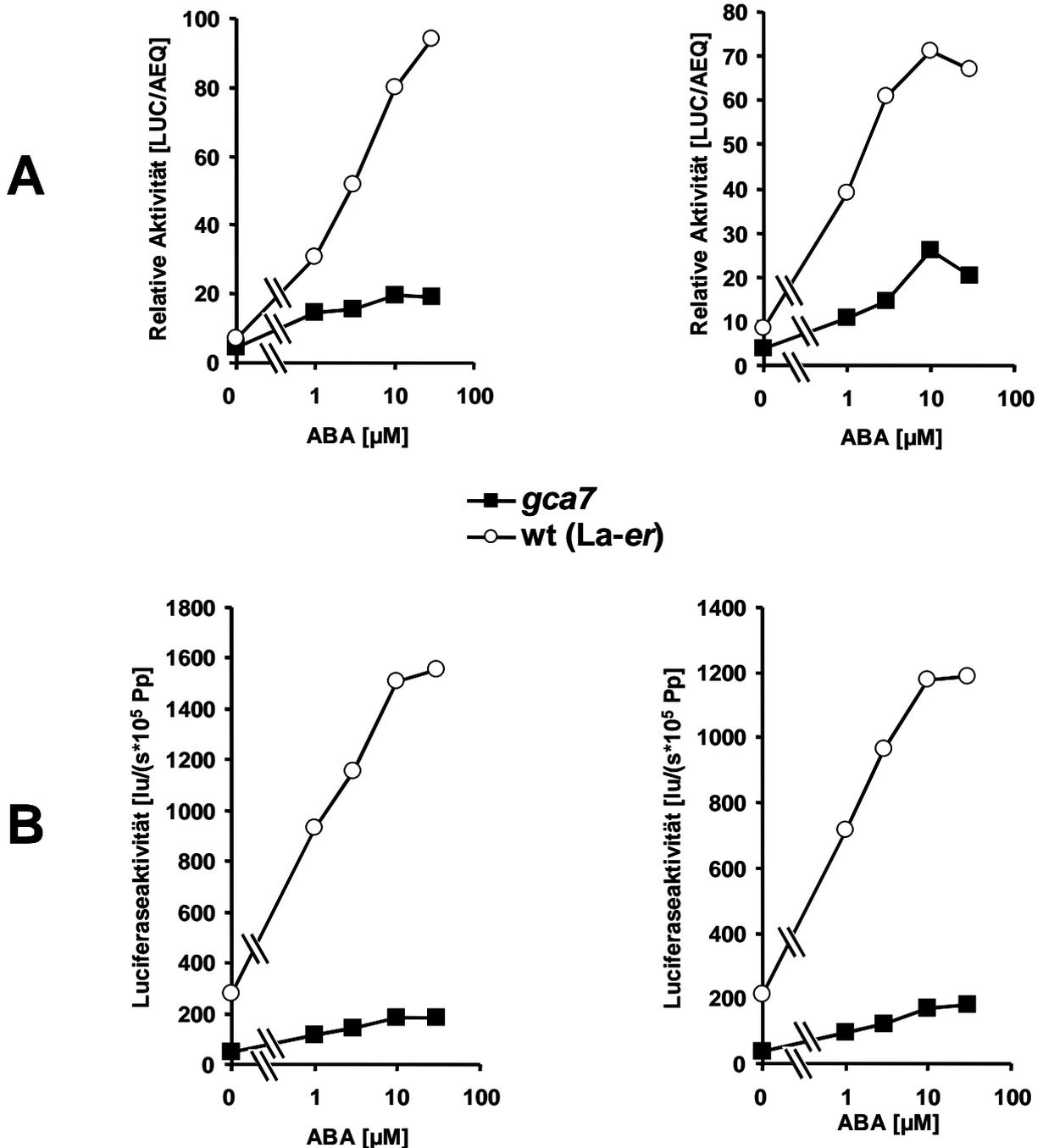


Abb. 28o: Vergleich der *RAB18LUC*-Expression in *gca7* (Iten, 1992) und La-er (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

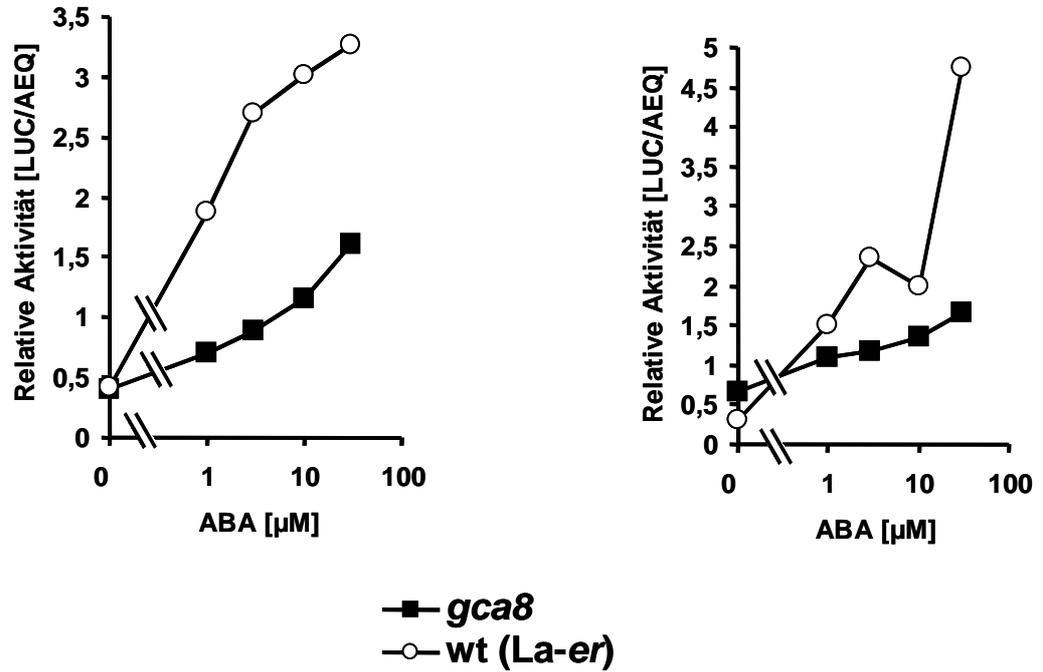
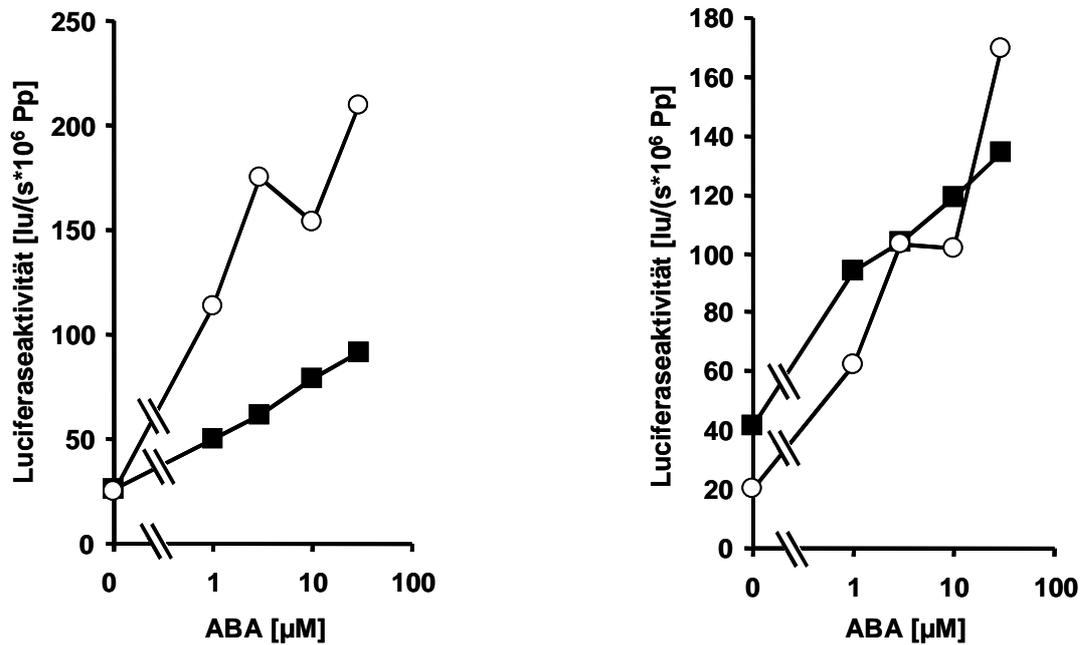
RD29BLUC**A****B**

Abb. 28p: Induktion der RD29BLUC-Expression in *gca8* (Iten, 1992) und La-er, dem entsprechenden Wildtyp (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

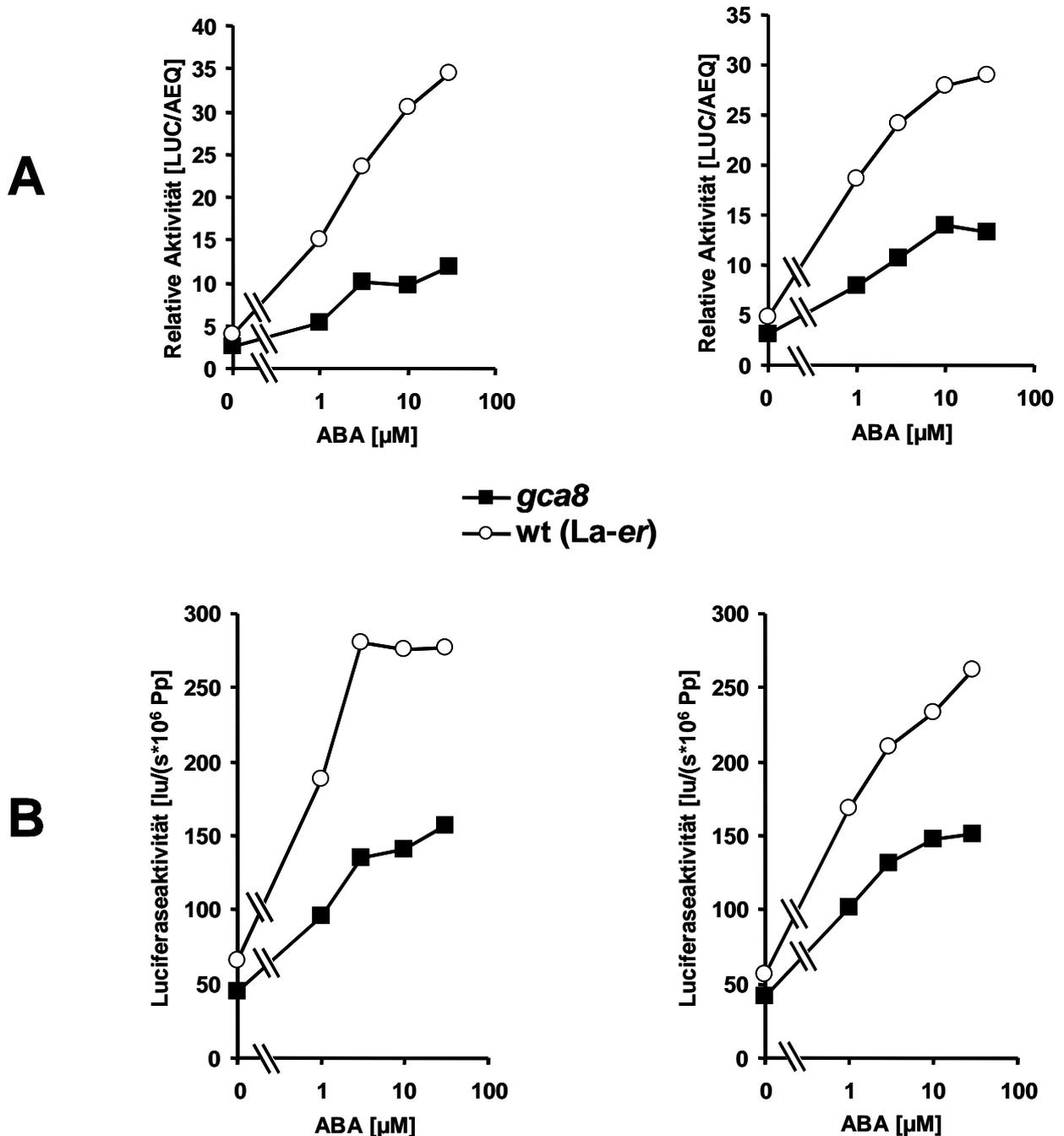
RAB18LUC

Abb. 28q: Unterschiede in der *RAB18LUC*-Expression in *gca8* (Iten, 1992) und La-er (Standardisierte Werte (A), nicht standardisierte Luciferaseaktivitäten (B)).

Die **Abb. 28a-q** zeigen eine Möglichkeit, Mutanten mit Hilfe transienter Expression in Protoplasten zu charakterisieren. Dabei führt die Verwendung eines internen Standards zu keiner wesentlichen Veränderung der Ergebnisse. Der prinzipielle Kurvenverlauf, die unterschiedliche Induktion durch ABA in Mutanten- im Vergleich zu Wildtypprotoplasten wird durch eine Standardisierung nicht verändert.

Besonders deutlich ist der Unterschied der Reporterregulation zwischen Wildtyp und Mutante bei *ahr1* und *abi1*. Daneben entspricht die verminderte Induktion der Reporter in *gca7* und *gca8* dem insensitiven Phänotyp der Mutanten. Für *abi2* ergab sich nicht wie bei *abi1* eine dem pleiotropen insensitiven Phänotyp entsprechende Regulation, sondern keine auffällige Veränderung im Vergleich zum Wildtyp. In *gca2*-Protoplasten zeigte sich schließlich eine hypersensitive Reaktion auf ABA bezüglich der Reporterexpression, entgegen des ansonsten insensitiven Phänotyps etwa für das Primärwurzelwachstum oder den Stomataschluß.

Abb. 29 zeigt eine Zusammenfassung der in **Abb. 28a-q** dargestellten Ergebnisse. Die Aktivitätszunahme bei steigender Abscisinsäurekonzentration, die ABA-abhängige Signaländerung wurde angenähert durch die Steigung der sich in semilogarithmischer Darstellung ergebenden Regressionsgeraden (vgl. Abb. 26). Die ABA-Sensitivität der Mutanten schließlich wird durch das Verhältnis der ABA-abhängigen Signaländerung zwischen Mutante zu Wildtyp beschrieben. Für die Berechnung wurden die Mittelwerte der aus den Doppelbestimmungen (**Abb. 28a-q**) erhaltenen ABA-abhängigen Signaländerungen verwendet.

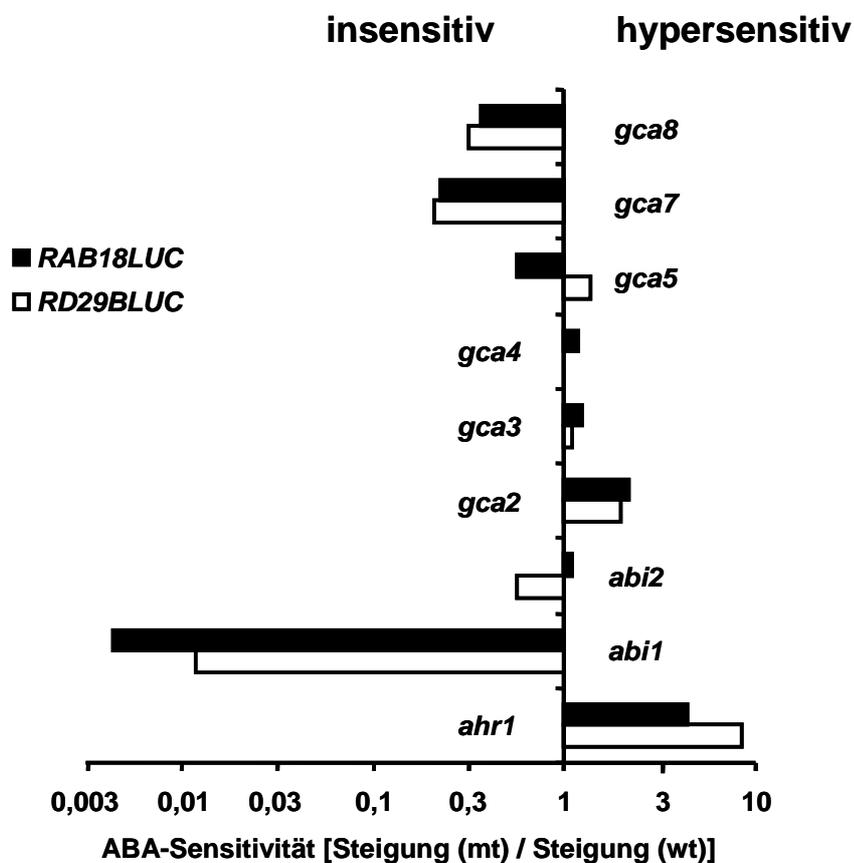


Abb. 29: ABA-Sensitivität in *Arabidopsis* Protoplasten: Vergleich zwischen Mutanten- und Wildtypprotoplasten.

Für eine dem Wildtyp vergleichbare ABA-Sensitivität der Reporter ergibt sich in **Abb. 29** ein Wert von etwa 1, für eine geringere ABA-Sensitivität in der Mutante und damit insensitivem Verhalten liegen die Werte unter 1 und für Hypersensitivität über 1. Die Mutante *ahr1* mit einem Wert von etwa 6 zeigt eine 6-fach höhere ABA-abhängige Signaländerung im Vergleich zum Wildtyp, *abi1* mit einem Wert von etwa 0,01 weist eine 100-fach geringere durch Abscisinsäure bedingte Aktivitätsänderung als der Wildtyp auf.

3.4. Ektopische Expression von Effektoren

Eine häufig angewandte Technik zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen ist die Überexpression von mutierten und nicht mutierten Proteinen und die Analyse der Effekte auf die Zelle (Downward, 2001). Im transienten Expressionssystem wurden verschiedene an der ABA-Signaltransduktion beteiligte Proteine und durch Mutation, Deletion oder Fusion veränderte Proteine unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert und die Auswirkungen auf die cotransfizierten ABA-regulierten Reporterkonstrukte untersucht.

Als Ausgangsvektor für die Effektorstrukturen wurde pBI221 (Jefferson, 1987) verwendet. Die für β -D-Glucuronidase codierende Sequenz wurde durch die Effektorgensequenz ersetzt (**Abb. 30**).

3.4.1. Cotransfektion von ABI1 und Derivaten

Die Auswirkung von ABI1 einer Proteinphosphatase 2C (Meyer et al., 1994) als möglicher negativer Regulator (Gosti et al., 1999) der ABA-Signaltransduktion und von ABI1-Derivaten auf die Genregulation im transienten Expressionssystem wurde analysiert. Für die Überexpression von ABI1, *abi1* und einer N-terminal deletierten Version von ABI1, *dABI1* in Maisprotoplasten fand J. Sheen (1998) eine Blockade der ABA-Antwort. Der verwendete *HVA1*-Promotor wurde bei Cotransfektion der genannten ABI1-Versionen nicht mehr durch ABA induziert. Ein inaktives ABI1-Derivat, welches keine Phosphataseaktivität mehr aufwies, zeigte dagegen keine negative Interferenz mit der ABA-Signaltransduktion (Sheen, 1998). Zur Überexpression von ABI1 und verschiedenen ABI1-Derivaten und Analyse der Effekte auf die *RD29BLUC*- und *RAB18LUC*-Regulation in *Arabidopsis*-Protoplasten wurden in pBI221 (Jefferson, 1987) die entsprechenden Genkonstrukte unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors generiert. Die *ABI1*-, *abi1*- und nicht aktive *ABI1* (*iaABI1*)-Sequenz stammte aus von Dr. A. Himmelbach bereitgestellten Klonen. Ein BamHI-Eco147I Fragment, welches die *ABI1*- beziehungsweise die *abi1*-Sequenz enthielt, wurde in den mit BamHI und Eco136II verdauten pBI221 ligiert (**Abb. 31**). Für die inaktive *ABI1*-Form wurde im resultierenden pBI221ABI1 ein BsaAI-BglIII-Fragment aus ABI1 ausgetauscht gegen das entsprechende

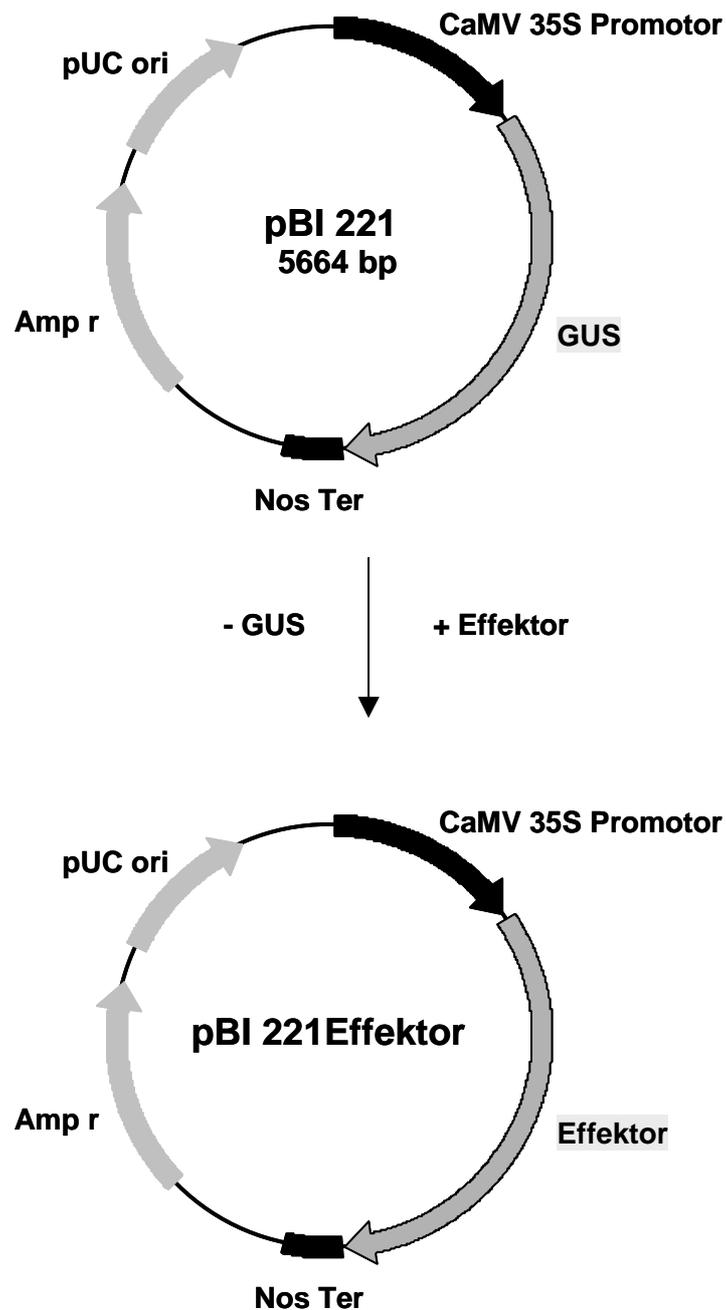


Abb. 30: Klonierungsschema der Effektorstrukture für die transiente Expression (Details siehe Text).

Fragment aus dem Klon von Dr. A. Himmelbach, der für die nicht aktive *ABI1*-Sequenz codiert (**Abb. 31**). Daneben wurde zur Expression des N-Terminus von *ABI1*, die für die ersten 109 Aminosäuren codierende Sequenz mit Vent-Polymerase amplifiziert (Oligonukleotide siehe Anhang) und als BamHI-Ecl136II-Fragment in den pBI221 gesetzt (**Abb. 31**). Die generierten Effektorplasmide, pBI221ABI1, pBI221abi1, pBI221NterABI1 und pBI221iaABI1 wurden in transienten Expressionsexperimenten eingesetzt und der Effekt auf die ABA-Regulation von Reporterkonstrukten untersucht.

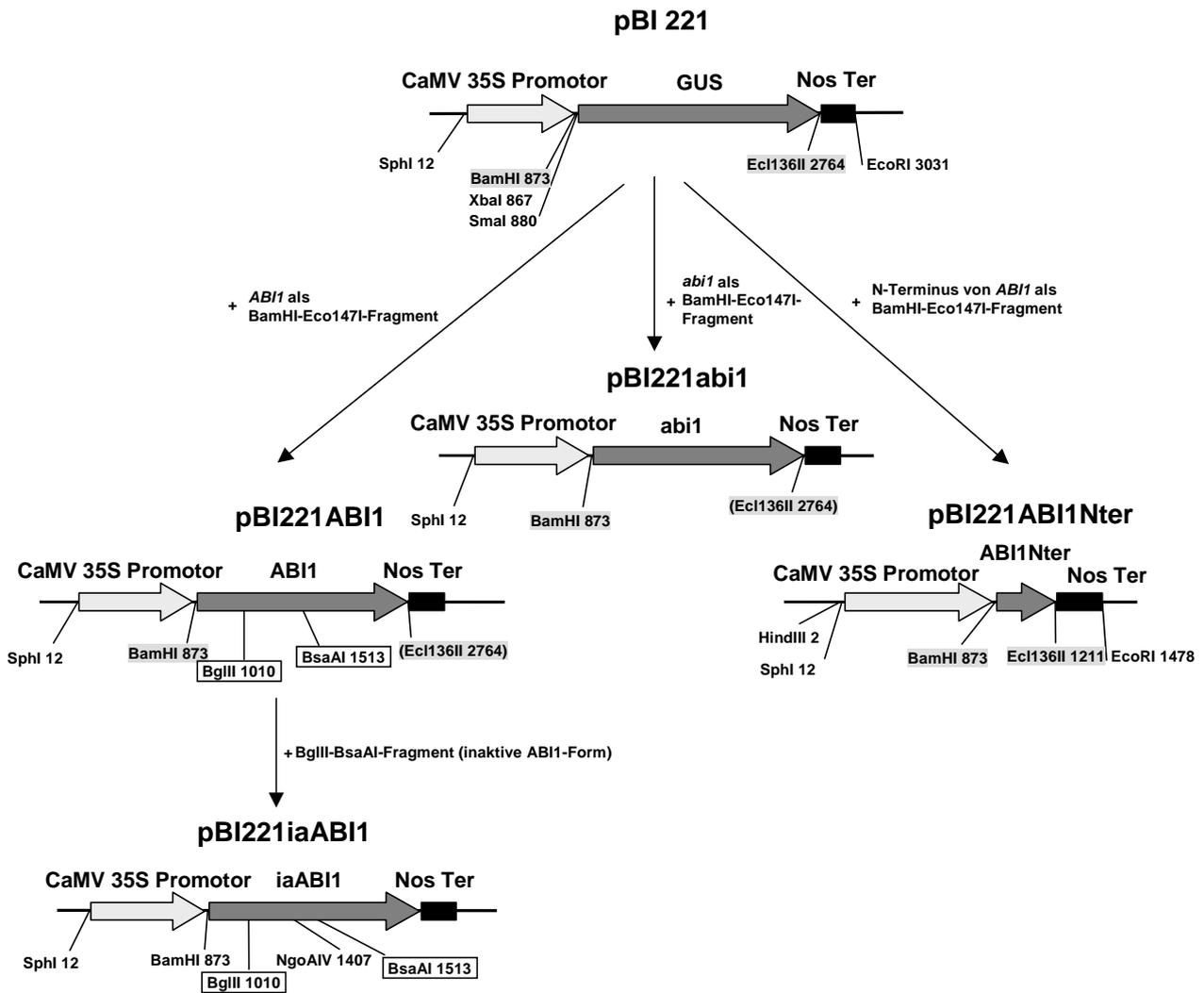


Abb. 31: Klonierungen zur Überexpression verschiedener ABI1-Formen: ABI1, *abi1*, inaktive ABI1-Form (D¹⁷⁷ → A) und N-Terminus von ABI1 (1-109 aa). Details siehe Text.

3.4.2. Einfluß auf die ABA Regulation

Für die Analyse der Auswirkungen von ABI1 und *abi1* auf die *RD29BLUC*-Regulation wurden RLD-Protoplasten mit 50 µg pSKAscIRD29BLUC, 50 µg pBI221, als internem Standard und unterschiedlichen Mengen pBI221ABI1 beziehungsweise pBI221abi1 als Effektor cotransfiziert. Zur Expression des Effektors wurde zunächst nach der Transfektion für 16 h ohne Abscisinsäure inkubiert. Anschließend zur Induktion des Reporters wurde mit und ohne ABA (30 µM) für weitere 24 h inkubiert. In **Abb. 32** sind für β-D-Glucuronidase standardisierte Luciferaseaktivitäten in Abhängigkeit der Menge an eingesetztem Effektor dargestellt. Sowohl für steigende Mengen von *35SABI1* wie auch für *35Sabi1* zeigt sich eine Abnahme der ABA-vermittelten Reporterinduktion. Zusätzlich sinkt mit zunehmender Effektorkonzentration die nicht induzierte Basisexpression des Reporters, was auf endogen

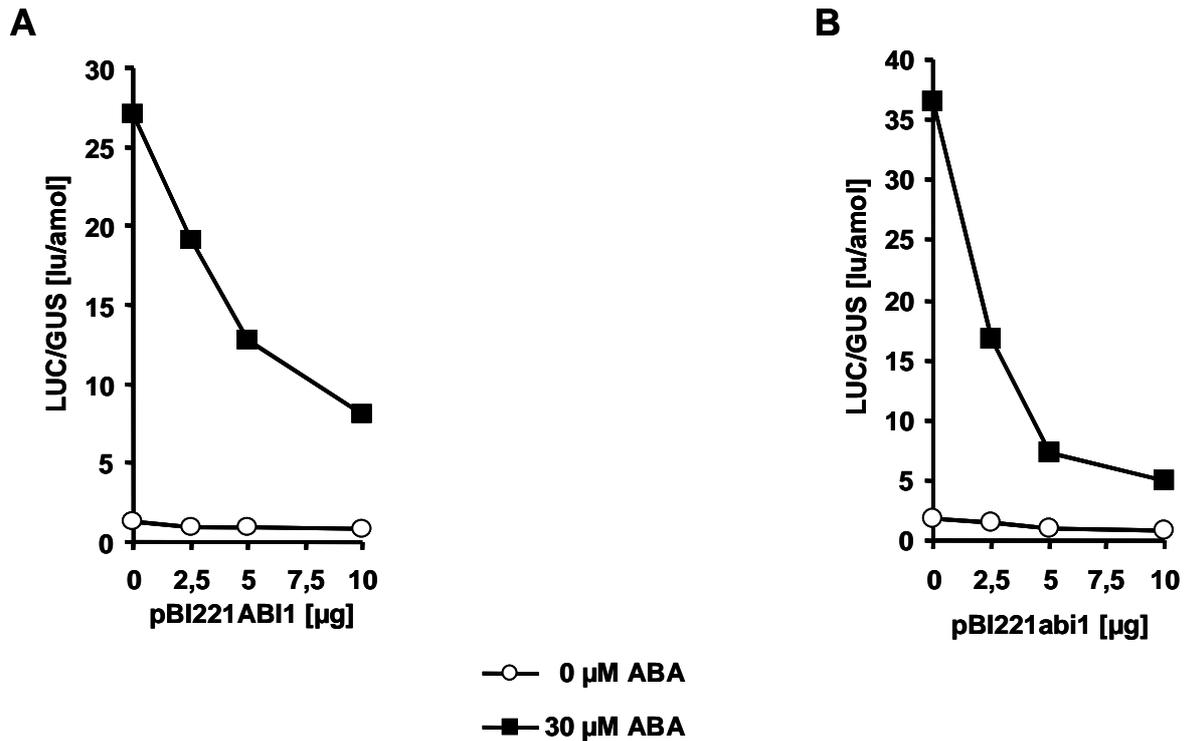


Abb. 32: *35SABI1* (A) bzw. *35Sabi1* (B) als Effektor der RD29BLUC-Regulation in RLD-Protoplasten. Für GUS standardisierte Aktivitäten in Abhängigkeit der eingesetzten Effektormenge aus mit (30 µM) und ohne ABA inkubierten Protoplasten ist dargestellt.

vorhandene Abscisinsäure und der daraus resultierenden Induktion des Reporters zurückzuführen sein könnte.

Zusammengefaßt ergibt sich für die Mutantenform *abi1* ein stärkerer negativer Effekt auf die Induktion als bei Überexpression der Wildtypform *ABI1* (Abb. 33). Das Verhältnis zwischen induzierter und nicht induzierter Expression nimmt bei Cotransfektion von *35Sabi1* stärker ab als bei *35SABI1*.

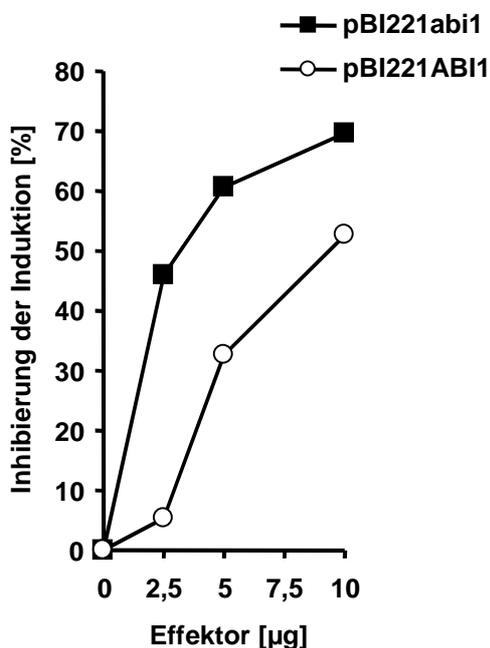


Abb. 33: Effekt von *35SABI1* (■) bzw. *35Sabi1* (○) auf die RD29BLUC-Regulation durch ABA. Dargestellt ist die Inhibierung der Induktion in Prozent.

Die Überexpression der inaktiven ABI1-Form (D¹⁷⁷→A) sowie des N-Terminus von ABI1 (1-109 aa) führt zu keiner im transienten Expressionssystem erfaßbaren Veränderung im Vergleich zur Kontrolle ohne Effektor (**Abb. 34**). Die Abweichungen liegen im Schwankungsbereich, der sich beim Vergleich verschiedener Transfektionen ergibt (vgl. Abb. 14).

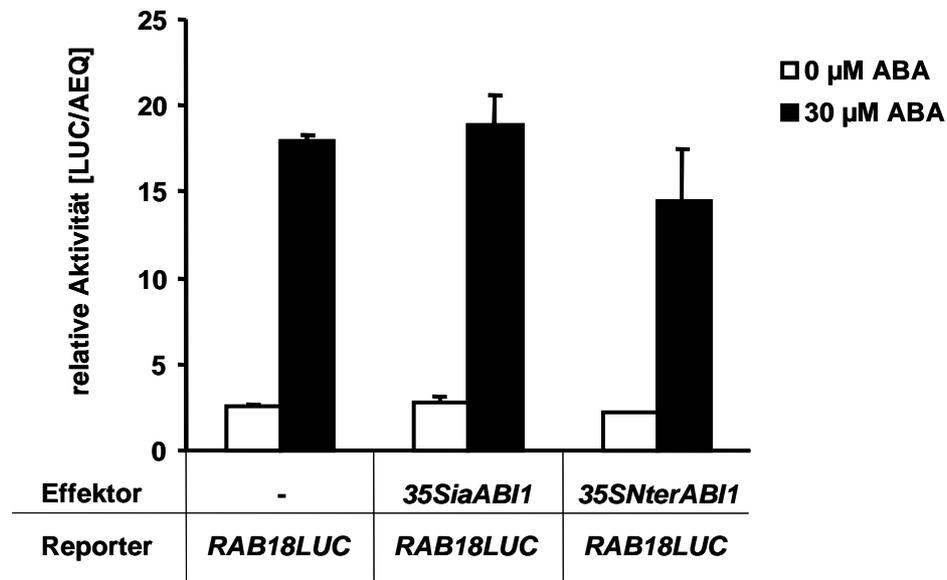


Abb. 34: Überexpression der inaktiven ABI1-Form und des N-Terminus von ABI1 in RLD-Protoplasten und Auswirkung auf die *RAB18LUC*-Regulation. 10 μg des Effektorplasmids wurden cotransfiziert mit 20 μg pSKAscIRAB18LUC und 50 μg pBI221AEQ. Nach der Transfektion wurden die Protoplasten zur Expression des Effektors 16 h ohne ABA inkubiert. Anschließend sind sie aufgeteilt worden. Je ein Teil wurde mit ABA (30 μM) versetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden im Extrakt die Luciferase- und Aequorinaktivität bestimmt.

Entsprechend den Ergebnissen von J. Sheen (1998) wirkt bei Überexpression ABI1 und *abi1* als negativer Regulator der ABA-Antwort und die inaktive, keine Phosphataseaktivität aufweisende Form zeigt keine negative Beeinflussung der Reporterinduktion. Wie für die inaktive Form ergibt sich auch für den N-Terminus von ABI1 keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.3. Expression von ABI1 und *abi1* in *ahr1*- und *gca2*-Protoplasten

Wie im Wildtyp zeigt sich für Protoplasten der *ahr1*- und *gca2*-Mutante bei Überexpression von ABI1 beziehungsweise *abi1* eine negative Regulation der ABA-Antwort. Protoplasten aus Blättern der für ABA hypersensitiven Mutante *ahr1* wurden transfiziert mit verschiedenen Mengen an pBI221ABI1 beziehungsweise pBI221*abi1* (0; 0,3; 1; 3; 10 μg), 100 μg pBI221Aequorin und 20 μg pSKAscIRAB18LUC. In **Abb. 35** ist der von der Effektormenge abhängige Aktivitätsverlauf dargestellt. Vergleichbar zum Wildtyp (**Abb. 32**) ergibt sich für die

Mutantenform der Proteinphosphatase eine stärkere Inhibierung der Reporterinduktion als für die Wildtypform.

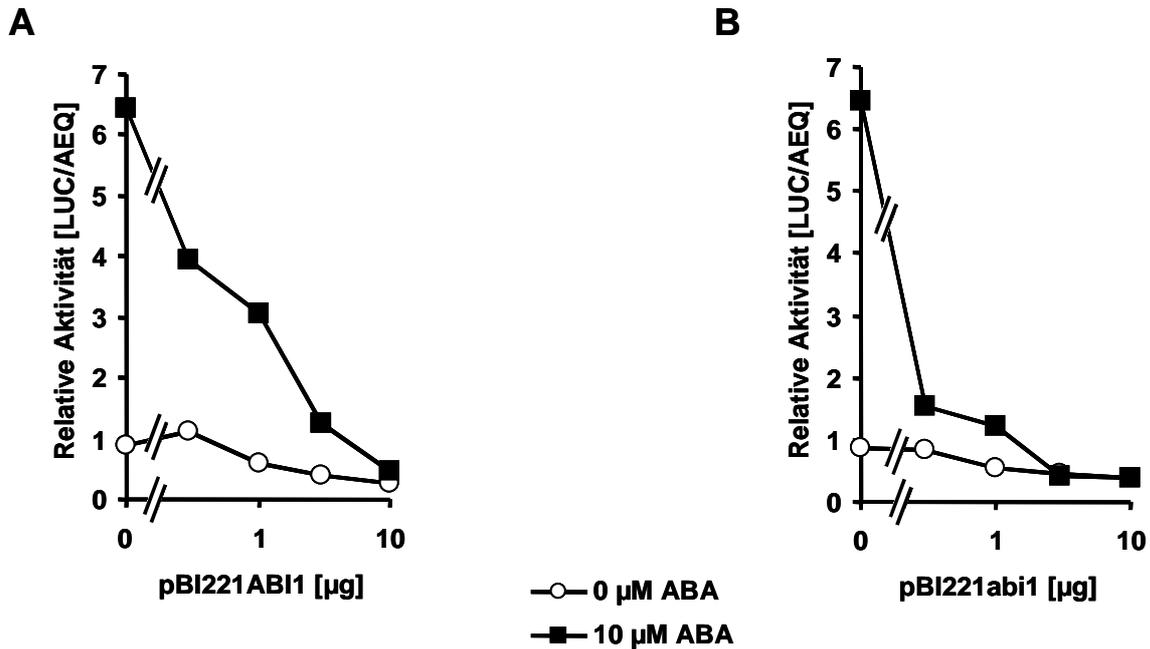


Abb. 35: Cotransfektion von *ahr1*-Protoplasten mit unterschiedlichen Mengen an pBI221ABI1 (A) bzw. pBI221abi1 (B) (0; 0,3; 1; 3; 10 µg) als Effektor, 20 µg pSKAscIRAB18LUC als Reporter und 100 µg pBI221Aequorin als internem Standard. Die Graphen zeigen Aktivitäten nach Inkubation mit (10 µM) und ohne ABA.

Abb. 36 zeigt zusammenfassend den Effekt der Überexpression der Proteinphosphataseformen in *ahr1*-Protoplasten als Inhibierung der Induktion des Reporters. Das Verhältnis der Aktivitätswerte mit und ohne Abscisinsäure inkubierter Protoplasten entspricht

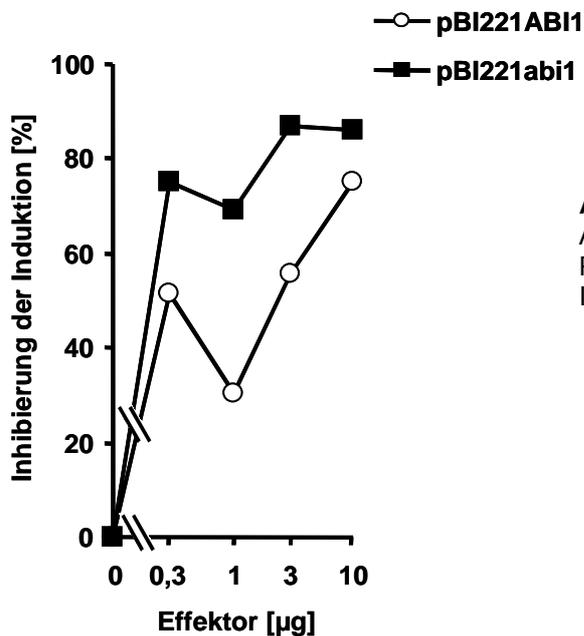


Abb. 36: Regulation der *RAB18LUC*-Aktivität in Abhängigkeit von ABI1 und abi1 in *ahr1*-Protoplasten. Die Inhibierung der ABA-vermittelten Induktion des Reporters ist dargestellt.

der Induktion. Der maximale sich ergebende Induktionswert ohne Effektor wurde als 0% Inhibierung eingesetzt. Bei größter eingesetzter Effektormenge (10 μg) ergibt sich für ABI1 eine 75%ige und für *abi1* eine 86%ige Inhibierung der Induktion.

In *gca2*-Protoplasten wurde die ABA-abhängige Signaländerung bei Coexpression der Proteinphosphataseformen näher untersucht. Dazu wurde die in Wildtyp- und *ahr1*-Protoplasten die größte Inhibierung der Induktion bewirkende Menge an Effektor eingesetzt. Mutantenprotoplasten wurden cotransfiziert mit 100 μg pBI221Aequorin, 20 μg pSKAscIRAB18LUC und 10 μg Effektor beziehungsweise ohne Effektor als Kontrolle. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Protoplasten aufgeteilt und für weitere 24 h mit verschiedenen Abscisinsäurekonzentrationen inkubiert. **Abb. 37** zeigt die standardisierte Reporteraktivität in Abhängigkeit der Abscisinsäurekonzentration. Die Steigung der in **Abb. 37** gezeigten Regressionsgeraden entspricht der ABA-abhängigen Signaländerung. Ohne Effektor ist die Aktivitätszunahme am größten, die Gerade am steilsten, die ABA-abhängige Signaländerung am höchsten. Entsprechend den Ergebnissen für die Inhibierung der Induktion in Wildtyp und *ahr1*-Protoplasten führt die Coexpression von *abi1* zu der kleinsten Aktivitätszunahme und geringsten ABA-abhängigen Signaländerung. Allerdings zeigen die Meßwerte der Transfektionen ohne Effektor und mit pBI221*abi1* eine hohe Streuung und damit schlechte Näherung durch die Regressionsgerade. Eine verlässlichere Aussage bezüglich der durch Abscisinsäure bedingten Signaländerung in Abhängigkeit der Proteinphosphataseformen in *gca2*-Protoplasten bleibt damit weiteren Untersuchungen vorbehalten.

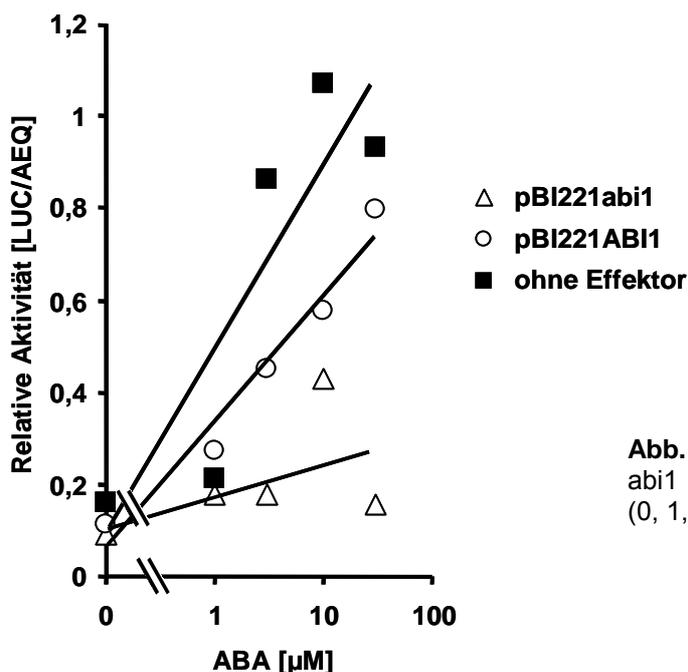


Abb. 37: Effekt der Coexpression von ABI1 und *abi1* in *gca2* Protoplasten auf die ABA-abhängige (0, 1, 3, 10, 30 μM) *RAB18LUC*-Regulation.

3.4.4. Überexpression von ABI2 und Derivaten

Die zu ABI1 homologe Proteinphosphatase 2C ABI2 könnte wie ABI1 ein negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion sein. Der Vergleich der Genregulation in Mutantenprotoplasten hatte für *abi2* eine wesentlich geringere, im transienten Expressionssystem nicht mehr erfaßbare Auswirkung auf die ABA-vermittelte Reporterinduktion als bei *abi1* gezeigt (vgl. Abb. 28 c-f, 29). Bei beiden Mutanten ist durch den gleichen Aminosäureaustausch von Glycin gegen Asparaginsäure innerhalb der katalytischen Domäne die Phosphataseaktivität stark reduziert auf cirka 5 % (Bertauche et al., 1996; Leube et al., 1998; Leung et al., 1997; Rodriguez et al., 1998). Damit sind die verschiedenen Effekte auf die Genregulation vermutlich nicht auf die Mutation, sondern auf andere Unterschiede zwischen ABI1 und ABI2 zurückzuführen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen ergibt für den N-terminalen Bereich die größte Diversität. Die Überexpression des N-Terminus von ABI1 alleine führte im transienten Expressionssystem

ABI2	MDEVSPAVAVPFRPFTDPHAGLR-----GYCN-----GESRVTLPE-SSCSGDG	43
ABI2NLS(ABI1)	MDEVSPAVAVPFRPFTDPHAGLR-----GYCN-----GESRVTLPE-SSCSGDG	43
ABI1	MEEVSPAIAAGPFRPFSETQMDFTGIRLGKGYCENQYSNQDSENGDLMVSLPETSSCSVSG	60
	*:*****:* *****: : . : ***** * : * :***** * : *	
ABI2	AMKDSS----FEINTRQDSLTSSSSA-MAGVDISAGDEINGSDEFDPRSMNQSEKKVLS	97
ABI2NLS(ABI1)	AMKDSS----FEINTRQDSLTSSSSA-MAGVDISAGDEINGSDEFDPRSMNQSEKKVLS	97
ABI1	SHGSESRKVLISRINSPNLNMKESAAADIVVVDISAGDEINGSD-----ITSEKKMIS	113
	: . . * . ** : : . . . * : * : . ***** * : * :***** * : *	
ABI2	RTESRSLFEFKCVPLYGVTSICGRRPEMEDSVSTIPRFLQVSSSSLLDGRVTNGFNPHLS	157
ABI2NLS(ABI1)	RTESRSLFEFKCVPLYGVTSICGRRPEMEDSVSTIPRFLQVSSSSLLDGRVTNGFNPHLS	157
ABI1	RTESRSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRFLQSSSGSMLDGR----FDPQSA	169
	***** * : * :***** * : * :***** * : * :***** * : *	
ABI2	AHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDGDWTQEKWKALFNSFMRVD	217
ABI2NLS(ABI1)	AHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDGDWTQEKWKALFNSFMRVD	217
ABI1	AHFFGVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIEAKEPMLCDGDWTLEKWKALFNSFLRVD	229
	***** * : * :***** * : * :***** * : * :***** * : *	
ABI2	SEIETVAHAPETVGSTSVVAVVFPTHIFVANCDSRAVLCRGKTPLALSVDHKKPDRDDEA	277
ABI2NLS(ABI1)	SEIETVAHAPETVGSTSVVAVVFPTHIFVANCDSRAVLCRGKTPLALSVDHKKPDRDDEA	277
ABI1	SEIESVA--PETVGSTSVVAVVFPSHIFVANCDSRAVLCRGKTALPLSVDHKKPDRDDEA	287
	***** * : * :***** * : * :***** * : * :***** * : *	
ABI2	ARIEAAGKVIIRWNGARVFGVLA MSRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVKEDDCLILASD	337
ABI2NLS(ABI1)	ARIEAAGKVIIRWNGARVFGVLA MSRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVKEDDCLILASD	337
ABI1	ARIEAAGKVIQWNGARVFGVLA MSRSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDDCLILASD	347
	***** * : * :***** * : * :***** * : * :***** * : *	
ABI2	GLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEA-LLPAEKRGEGKDPAAMSAAEYLSKMLA	396
ABI2NLS(ABI1)	GLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEA-LLPAEKRGEGKDPAAMSAAEYLSKLAI	396
ABI1	GVWDVMTDEEACEMARKRILLWHKKNAVAGDASLLADERRKEGKDPAAMSAAEYLSKLAI	407
	*:*****:* * : :***** * : * :***** * : * :***** * : *	
ABI2	QKGSKDNI SVVVVDLKGIRKFKSKSLN	423
ABI2NLS(ABI1)	QKGSKDNI SVVVVDL <u>KPRRKLKSKPLN</u>	423
ABI1	QKGSKDNI SVVVVDL <u>KPRRKLKSKPLN</u>	434
	*:***** * : * :***** * : * :***** * : *	

NLS

Abb. 38: Sequenzvergleich von ABI1, ABI2 und ABI2NLS(ABI1) mit Clustal W (<http://www2.ebi.ac.uk>). In der ABI2NLS(ABI1)-Sequenz wurden 30 Aminosäuren am Carboxyterminus von ABI2 gegen die entsprechende ABI1-Sequenz (unterstrichen) ausgetauscht.

allerdings zu keiner Veränderung der ABA-abhängigen Reporterregulation im Vergleich zur Kontrolle ohne N-Terminus (siehe Abb. 34). Dagegen wirkt ABI1 ohne N-Terminus wie das Volllängeprotein als negativer Regulator bei Überexpression (Sheen, 1998). Ein weiterer möglicher Unterschied zwischen ABI1 und ABI2 ist die Lokalisation der Proteine in der Zelle. PSORT (Prediction of Protein Localization Sites version 6.4; <http://psort.nibb.ac.jp>) ergibt für ABI1 eine Wahrscheinlichkeit für Kernlokalisierung von 60 % und für ABI2 dagegen eine Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytoplasma von 65 %. Im Gegensatz zu ABI2 findet sich am C-Terminus von ABI1 ein mögliches Kernlokalisierungssignal KPRRK (NLS; Position 423-427, **Abb. 35**) bestehend aus mehreren basischen Aminosäuren (Dingwall und Laskey, 1991).

Zur Untersuchung des Effekts von ABI2 und *abi2* bei Überexpression im transienten System und einer möglichen Auswirkung des putativen NLS in ABI1 wurde entsprechend **Abb. 30** die für ABI2 beziehungsweise *abi2* codierende Sequenz in pBI221 ligiert. Im resultierenden pBI221ABI2 wurde die für 30 Aminosäuren am Carboxyterminus von ABI2 codierende Sequenz gegen die entsprechende, ein Kernlokalisierungssignal enthaltene Sequenz von *ABI1* ausgetauscht (ABI2NLS(*ABI1*), **Abb. 38**). Mit Pwo-Polymerase wurde die *ABI2*-beziehungsweise *abi2*-Sequenz amplifiziert (Oligonukleotide siehe Anhang) und als BglIII-blunt Fragment in den mit BamHI und Ecl136II geöffneten pBI221 ligiert (**Abb. 39**). Als

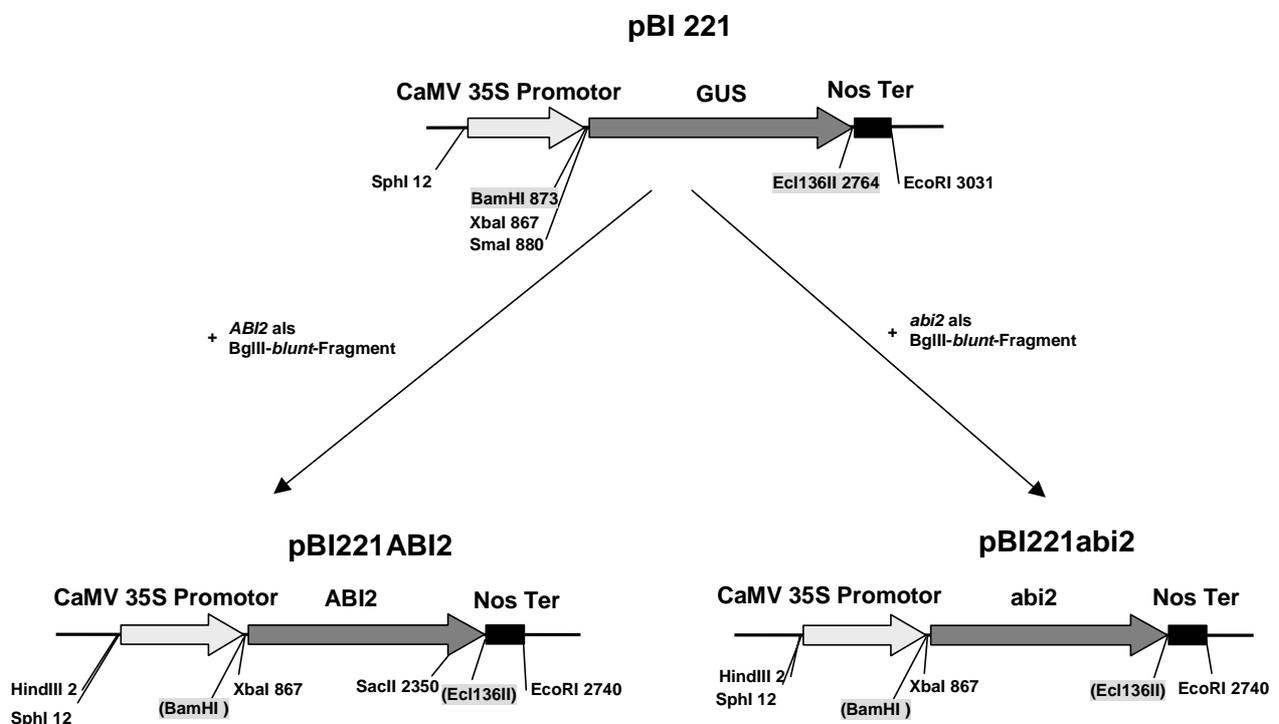


Abb. 39: Klonierungen zur Überexpression von ABI2 und *abi2* (Details siehe Text).

Matrize für die PCR diene genomische DNA für die Amplifikation von *ABI2* und pBIC20-*abi2* für die Vervielfältigung von *abi2*. Zum Austausch der für das NLS codierenden Sequenz wurde ein HindIII-SacII-Fragment aus pBI221ABI2 in den entsprechend verdauten pBI221ABI1 gesetzt (**Abb. 40**).

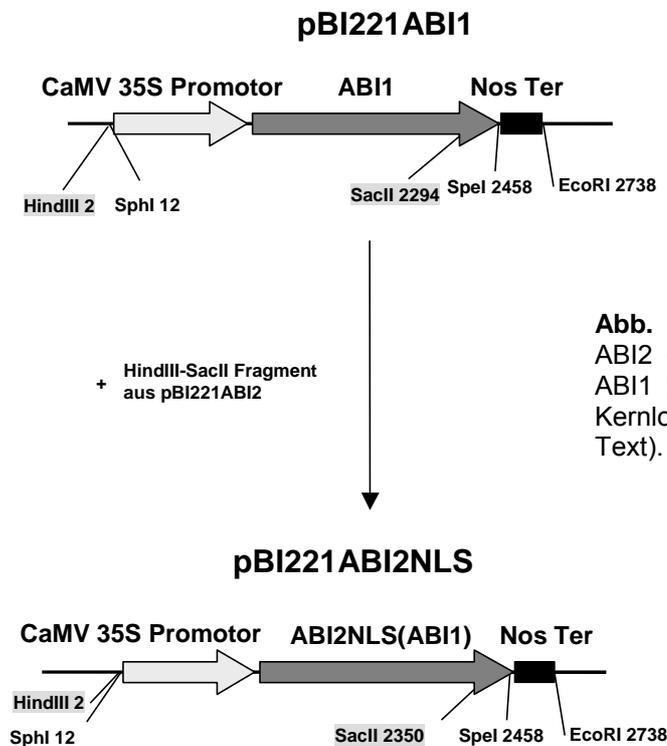


Abb. 40: Ersatz des Carboxyterminus von ABI2 durch die entsprechende Sequenz von ABI1 zur Überexpression von ABI2 mit dem Kernlokalisierungssignal von ABI1 (Details siehe Text).

Die generierten Klone pBI221ABI2, pBI221abi2 und pBIABI2NLS wurden im transienten Expressionssystem zur Überexpression der entsprechenden Proteine eingesetzt. Je 10 µg des Effektorplasmids wurden mit 20 µg pSKAscIRAB18LUC und 100 µg pBI221Aequorin cotransfiziert. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Ansätze gesplittet und ohne beziehungsweise mit ABA (30 µM) für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde im Extrakt die Aequorin- und Luciferaseaktivität bestimmt. In **Abb. 41** ist die Induktion von *RAB18LUC* als Quotient aus spezifischer Aktivität mit ABA beziehungsweise ohne ABA dargestellt. Für jede der drei eingesetzten ABI2-Formen zeigt sich eine verringerte ABA-Induktion des Reporterkonstrukts. Damit wirkt ABI2 bei Überexpression im transienten System ähnlich wie ABI1 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion. Im Gegensatz zu ABI1 zeigt sich für ABI2 ein vergleichbarer negativer Effekt auf die Reporterinduktion wie bei *abi2*. ABI1 zeigt einen schwächeren Effekt auf die Induktion als *abi1*. Eine mögliche Ursache sind Expressionsschwankungen bis zu einem Faktor 2 beim Vergleich verschiedener Transfektionen (siehe Abb. 14). Um eine exakte Aussage treffen zu können sind detaillierte

Analysen nötig. Das Vorhandensein eines möglichen Kernlokalisierungssignals führt beim Vergleich der drei eingesetzten Formen ABI2, abi2 und ABI2NLS zu keinem Unterschied.

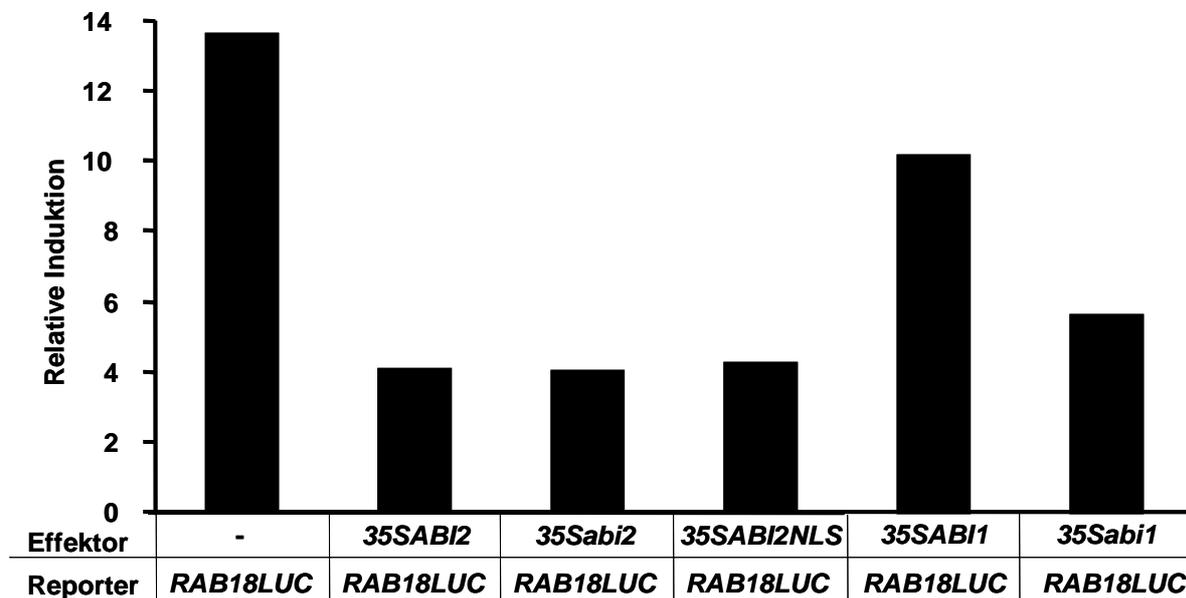


Abb. 41: Überexpression von ABI2, abi2, ABI2NLS, ABI1 und abi1 und Effekt auf die ABA-vermittelte (30 μ M) *RAB18LUC*-Regulation in RLD-Protoplasten.

3.4.5. AtHB-6, ein ABA regulierter HD-Zip Transkriptionsfaktor

Das *Arabidopsis*-Genom codiert für etwa 1500 Transkriptionsfaktoren. Davon können 89 der Homöobox-Genfamilie zugerechnet werden. In etwa 50 % der Transkriptionsfaktoren dieser Familie folgt auf die Homöodomäne ein Leucin Zipper (Riechmann et al., 2000). Charakteristisch für Homöoboxgene ist eine konservierte 183 bp–Nukleotidsequenz, die für eine DNA-bindende Domäne, die Homöodomäne, bestehend aus drei α -Helices codiert (Gehring et al., 1994). Durch die Helix 3 der Homöodomäne können spezifische DNA-Sequenzen erkannt werden. Das auf die Homöodomäne folgende Leucin-Zipper-Motiv ermöglicht mit der wiederholten Anordnung von Leucin-Resten in einer α -Helix eine Dimerisierung der Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (Ruberti et al., 1991). AtHB-6, ein Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor wird wie AtHB-7 und AtHB-12 durch Abscisinsäure reguliert (Söderman et al., 1999). Bei der Analyse von Proteininteraktionen der Proteinphosphatase 2C ABI1 wurde AtHB-6 als Komponente der ABA-Signaltransduktion identifiziert (Himmelbach et al., 2001). Es zeigte sich eine von der Proteinphosphataseaktivität abhängige Interaktion zwischen ABI1 und AtHB-6. Zudem wurde in Gelretardationsexperimenten eine Bindung von AtHB-6 an ein im Promotor von AtHB-6 vorkommendes *cis*-Element nachgewiesen (Himmelbach et al., 2001). In transienten

Expressionsexperimenten wurde die Wirkung von AtHB-6 als transkriptioneller Regulator untersucht. Zunächst ist die Auswirkung auf seinen eigenen Promotor analysiert worden. In **Abb. 42** sind die verwendeten Effektoren dargestellt. Sowohl Volllänge AtHB-6 wie auch eine für das DNA-Bindemotiv deletierte Version, Δ AtHB-6, wurde unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in Protoplasten als Effektor exprimiert.

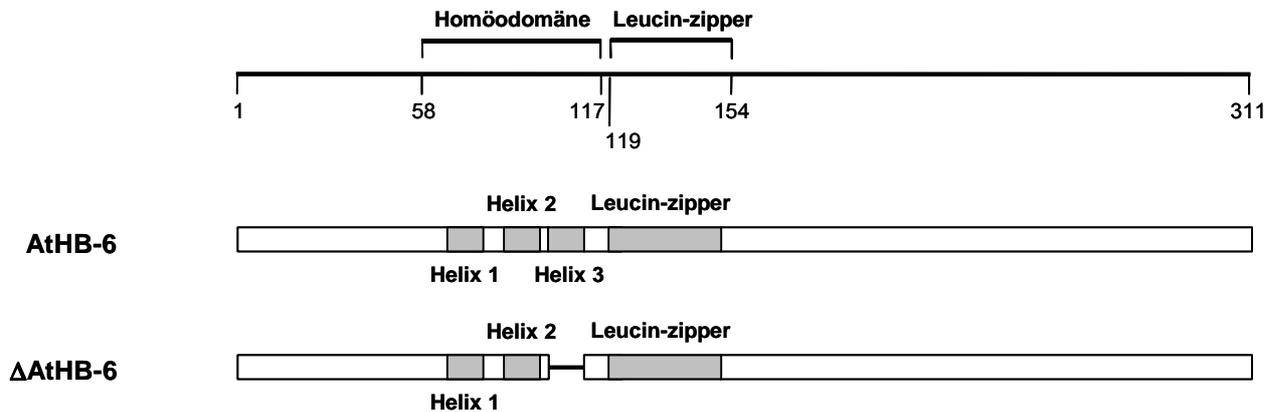


Abb. 42: Schematische Darstellung der als Effektoren verwendeten AtHB-6-Formen. Die Positionen der Homöodomäne mit den drei α -Helices und des Leucin-Zippers sind gezeigt. In der Δ AtHB-6 Form wurde im Vergleich zur Volllänge-Version AtHB-6 das DNA-Bindemotiv, die α -Helix 3 der Homöodomäne deletiert.

Im Promotor von *AtHB-6* findet sich neben der Bindestelle für die Homöodomäne unter anderem ein ABA *Response Element* (ABRE) (**Abb. 43**). Neben der unveränderten Promotorsequenz wurde in transienten Expressionsexperimenten mit einer mutierten Version des HD-ZIP Bindemotivs als Kontrolle gearbeitet. Durch die Mutation wird eine Bindung der Homöodomäne an die DNA verhindert (Himmelbach et al., 2001).

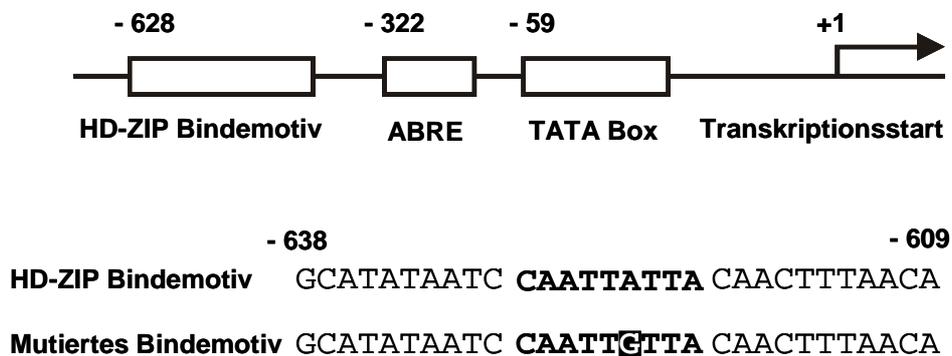


Abb. 43: Schematische Darstellung des *AtHB-6*-Promotors mit der DNA-Bindestelle des Homöodomän-Leucin-Zipper-Proteins, einem ABA *Response Element* (ABRE) und der TATA Box. Als Kontrolle wurde in transienten Expressionsexperimenten ein mutiertes HD-ZIP-Bindemotiv verwendet, bei welchem ein für die Bindung der Homöodomäne kritischer Adeninrest durch einen Guaninrest ersetzt wurde.

In der Regel besitzen Transkriptionsfaktoren eine DNA-bindende Domäne und eine Aktivator-oder Repressor-Domäne oder beides zur Regulation der Transkription (Roberts, 2000). Zur Analyse der regulatorischen Wirkung von AtHB-6 auf seinen eigenen Promotor wurde in RLD-Protoplasten AtHB-6 unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors überexprimiert und der Effekt auf cotransfizierte Reporter untersucht. Als Reporterkonstrukt wurde pSKAscIHB6LUC und eine mutierte Version (pSKAscIHB6*LUC), die entsprechend **Abb. 43** eine Mutation im HD-ZIP Bindemotiv aufweist, verwendet. Durch das Fehlen des korrekten HD-ZIP-Bindemotivs bei *AtHB-6*LUC* sollte eine mögliche transkriptionelle Regulation des Reporters durch Bindung von AtHB-6 an den Promotor ausgeschlossen sein. In **Abb. 44** sind die sich ergebenden Induktionswerte dargestellt. Induktion beschreibt dabei das Verhältnis der standardisierten Aktivitäten von mit Effektor cotransfizierten beziehungsweise mit ABA behandelten zu ohne Effektor transfizierten, nicht behandelten Protoplasten. Für beide Reporter, *AtHB-6LUC* und *AtHB-6*LUC*, ergibt sich keine im transienten Expressionssystem erfaßbare ABA-abhängige Regulation mit Induktionswerten von 0,8 für *AtHB-6LUC* beziehungsweise 1,2 für *AtHB-6*LUC*. Wie für Abscisinsäure zeigt sich auch bei Überexpression von AtHB-6 als möglichen transkriptionellen Regulator keine signifikante Veränderung der Expression. Die resultierenden Induktionswerte liegen nahe 1. Damit zeigt sich in Protoplasten bei Verwendung des Vollänge-Promotors von *AtHB-6* keine Beeinflussung der Transkription durch die Überexprimierung von AtHB-6.

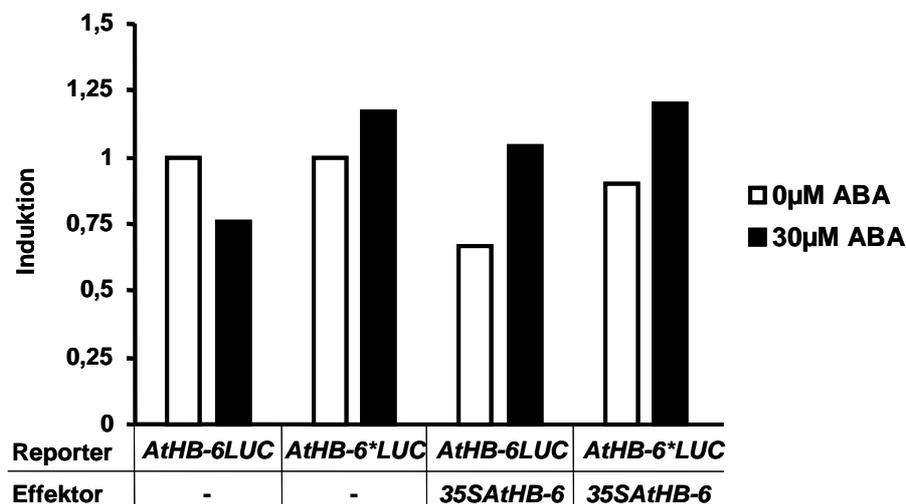
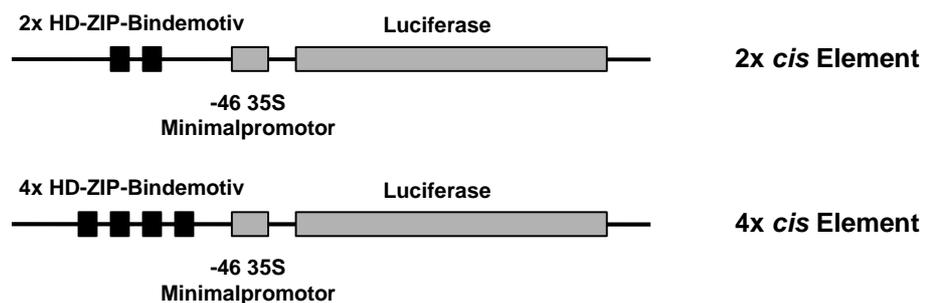


Abb. 44: Transfektion von RLD-Protoplasten mit 50 μg pSKAscIHB6LUC (*AtHB-6LUC*) bzw. pSKAscIHB6*LUC (*AtHB-6*LUC*) als Reporter, 100 μg pBI221Aequorin als internem Standard und mit bzw. ohne 50 μg Effektorplasmid (*35SAtHB-6*). Dargestellt ist die ABA-abhängige (30 μM) und AtHB-6 abhängige Induktion der verwendeten Reporter.

3.4.6. Transkriptionelle Regulation eines künstlichen Promotors durch AtHB-6

Im Gegensatz zur Northernanalyse (vgl. Abb. 15) zeigt sich in Protoplasten keine ABA-abhängige *AtHB-6*-Regulation. Sowohl die ABA-Regulation des Reporters wie auch die Regulation des *AtHB-6*-Promotors durch das AtHB-6-Protein ist in Protoplasten unterbunden. Um eine Beeinflussung der Analyse durch andere regulatorische Mechanismen möglichst einzuschränken wurde für weitere transiente Expressionsexperimente nicht der Vollängepromotor von *AtHB-6*, sondern ein Promotor bestehend aus mehreren Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs, fusioniert an einen verkürzten CaMV 35S Promotor, verwendet. Entsprechend zeigten etwa Uno et al. (2000) die Transaktivierung eines künstlichen Promotors bestehend aus einem Minimalpromotor und mehreren Kopien eines Promotorfragments. **Abb. 45** zeigt schematisch die für weitere Analysen eingesetzten Reporter.

wtHB6beLUC



mtHB6beLUC

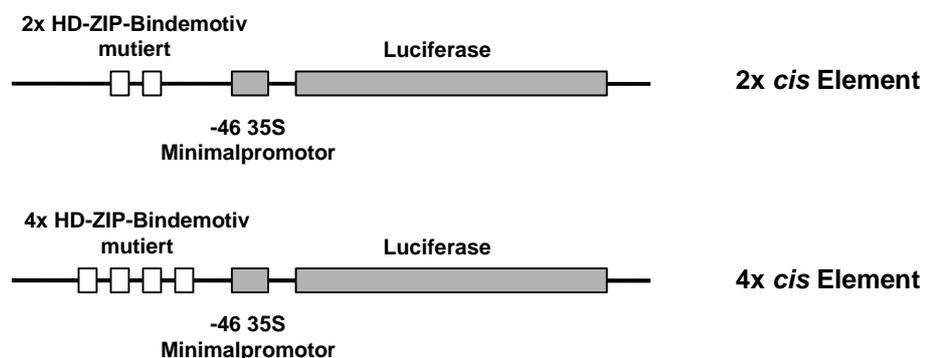


Abb. 45: Schematische Darstellung der Reporter, die zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation durch AtHB-6 verwendet wurden. Je zwei oder vier Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs (*wtHB6beLUC*) bzw. des mutierten HD-ZIP-Bindemotivs (*mtHB6beLUC*) (vgl. **Abb. 43**) wurde an einen verkürzten CaMV 35 S Minimalpromotor und der für Luciferase codierenden Sequenz fusioniert.

Als Minimalpromotor diente die -46 bis +1 Region des CaMV 35S Promotors (Fang et al., 1989). Zwei beziehungsweise vier Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs wurden an diesen Minimalpromotor fusioniert. Als Kontrolle wurden gleiche Reporterkonstrukte mit der mutierten HD-ZIP-Bindungsstelle verwendet. Die -46 bis +1 Region des CaMV 35S Promotors wurde mit Vent-Polymerase amplifiziert (Oligonukleotide siehe Anhang) und als SpeI-BamHI-Fragment in die entsprechenden Restriktionsstellen des pSKAscILUCTER ligiert.

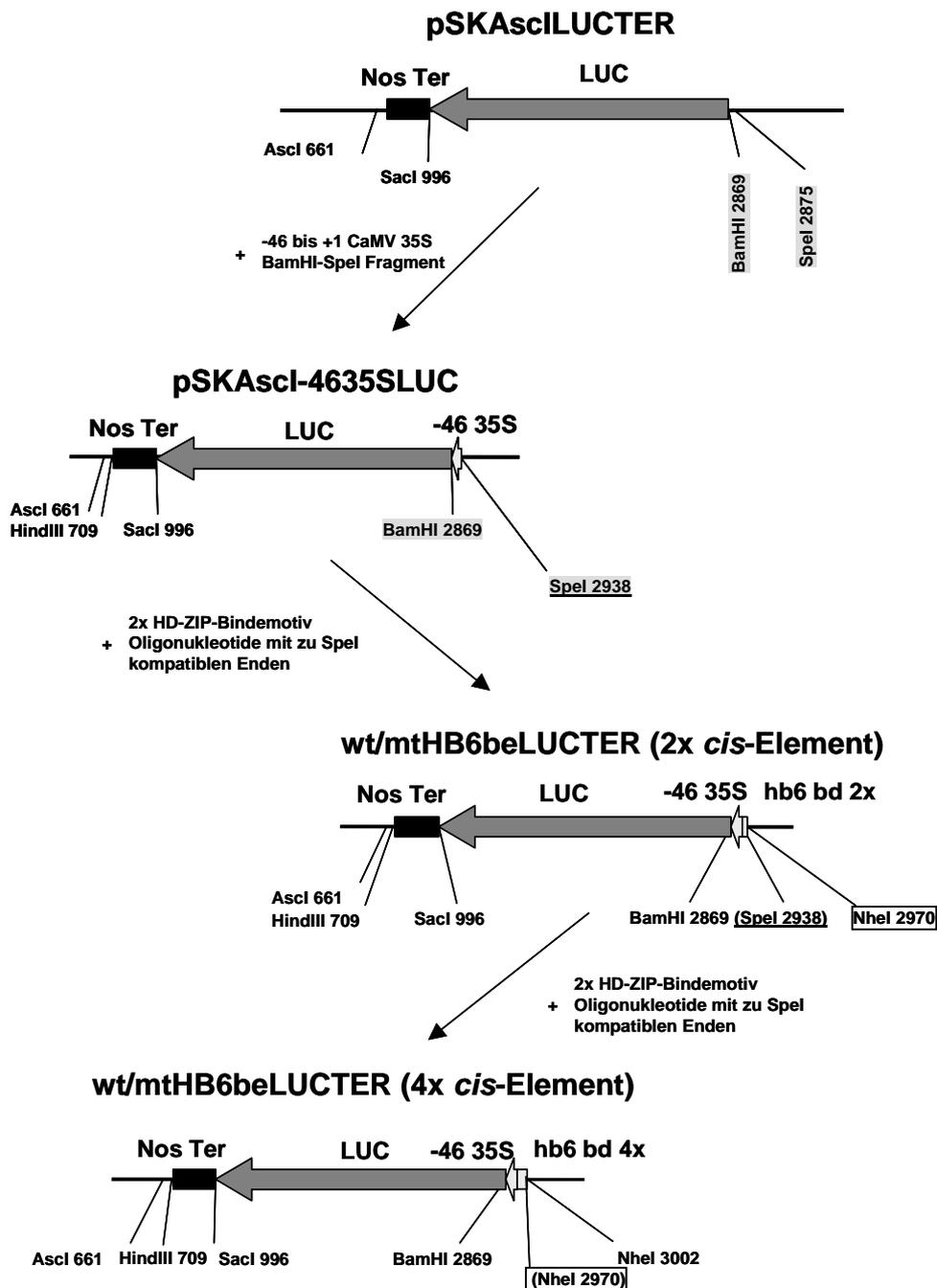


Abb. 46: Klonierungsschema der HD-ZIP-Bindemotiv-LUC-Reporter (Details siehe Text).

In den damit generierten Vektor, pSKAscI-4635SLUC, wurden, um eine gerichtete Ligation und definierte Kopienanzahl des HD-ZIP-Bindemotivs zu erreichen, Oligonukleotide mit zu Spel kompatiblen überhängenden Enden und einer zusätzlichen NheI-Schnittstelle in die Spel-Restriktionsstelle eingesetzt (Sequenzen siehe Anhang). Die Spel-Schnittstelle wurde dabei zerstört. Die eingeführten Oligonukleotide beinhalten zwei Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs. In die neu eingeführte NheI-Schnittstelle wurden erneut die zwei Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs beinhaltenden Oligonukleotide ligiert und die zur Klonierung benutzte NheI-Restriktionsstelle zerstört (**Abb. 46**). Durch die bei den Klonierungen jeweils eingeführte NheI-Schnittstelle konnte die Orientierung und Anzahl der vorhandenen Oligonukleotide überprüft werden. Analog zur Klonierung der das HD-ZIP-Bindemotiv enthaltenden Reporter wurden Oligonukleotide mit einer mutierten Version des Bindemotivs (vgl. Abb. 43) zur Klonierung von Reporterkonstrukten, die in transienten Expressionsexperimenten als Kontrolle eingesetzt wurden, verwendet.

Durch die beschriebenen Klonierungen wurden die in **Abb. 45** schematisch dargestellten Reporterkonstrukte erhalten. Zur Untersuchung eines möglichen regulatorischen Effekts von AtHB-6 auf das HD-ZIP-Bindemotiv wurden RLD-Protoplasten cotransfiziert mit 25 µg Reporterplasmid, 50 µg Effektor und 100 µg pBI221Aequorin als internem Standard. Als Reporter wurden die oben beschriebenen (**Abb. 45**), das HD-ZIP-Bindemotiv in zwei- (*2x cis*-Element) beziehungsweise vierfacher (*4x cis*-Element) Kopie enthaltenden Konstrukte (*wtHB6beLUC*) und die entsprechenden mutierten Versionen (*mtHB6beLUC*) verwendet. Der Effektor war AtHB-6 unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. 16 h nach der Transfektion wurden die Protoplasten aufgeteilt und mit 30 µM ABA beziehungsweise ohne Abscisinsäure weitere 24 h inkubiert. In **Abb. 47** sind die resultierenden Induktionswerte als Verhältnis zwischen standardisierten Aktivitätswerten mit Effektor zu Werten ohne Effektor dargestellt.

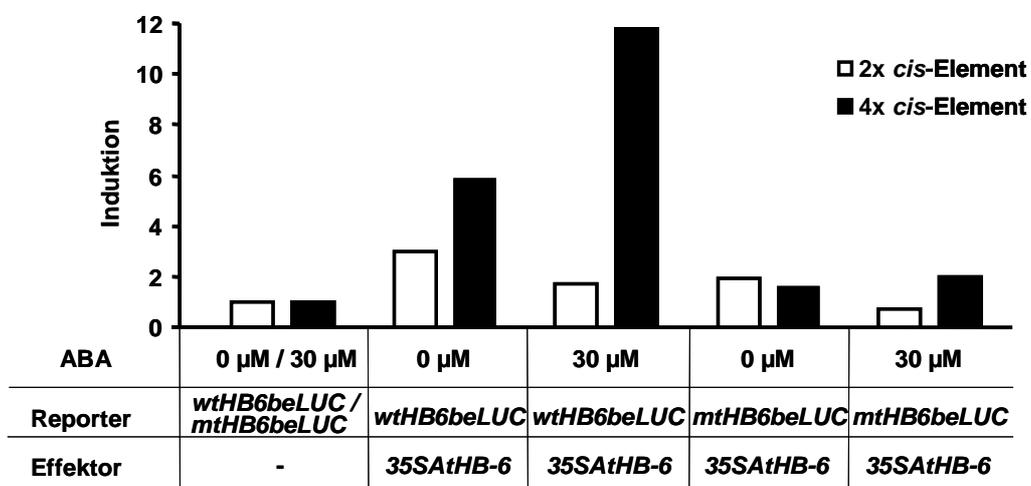


Abb. 47: AtHB-6 abhängige Regulation der HD-ZIP-Bindemotiv-Reporter (*wtHB6beLUC* / *mtHB6beLUC*). Vergleich der Induktion in Abhängigkeit der Kopienzahl sowie bei Inkubation mit (30 µM) und ohne ABA. Als Kontrolle wurden Reporter mit mutiertem HD-ZIP-Bindemotiv (*mtHB6beLUC*) verwendet.

Für die Reporter, die zwei Kopien der *cis*-Elemente enthalten, ergibt sich beim Vergleich der mutierten und nicht mutierten Form nur ein geringfügiger Induktionsunterschied. Dagegen zeigt sich bei den Reporterkonstrukten mit vier Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs ein deutlicher Unterschied in der Induktion zwischen mutierter und nicht mutierter Form. Durch die Coexpression von AtHB-6 wird der künstliche, das HD-ZIP-Motiv enthaltende Promotor, positiv reguliert. Ohne ABA ergibt sich durch die AtHB-6-Expression eine etwa sechsfache Induktion des Reporters. Durch Abscisinsäure wird die Induktion zusätzlich erhöht, so daß sich schließlich mit AtHB-6 und ABA in Kombination eine etwa zwölfmal höhere Aktivität ergibt als mit ABA ohne AtHB-6. Der mutierte Kontrollpromotor wird dagegen nicht durch AtHB-6 aktiviert.

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Aktivierung von der DNA-Bindung wurde an Stelle von AtHB-6 die deletierte Version Δ AtHB-6 als Effektor eingesetzt (vgl. Abb. 42). Ohne Helix 3 der Homöodomäne sollte keine Bindung an die DNA und damit keine Aktivierung der Reporter möglich sein. In **Abb. 48** ist die durch AtHB-6 beziehungsweise Δ AtHB-6 bedingte Induktion des vier Kopien des HD-ZIP-Motivs beinhaltenden Promotors dargestellt. Das unter gleichen Bedingungen wie oben (**Abb. 47**) durchgeführte Experiment ergibt bei Δ AtHB-6 unabhängig von Abscisinsäure keine Aktivierung des künstlichen Promotors.

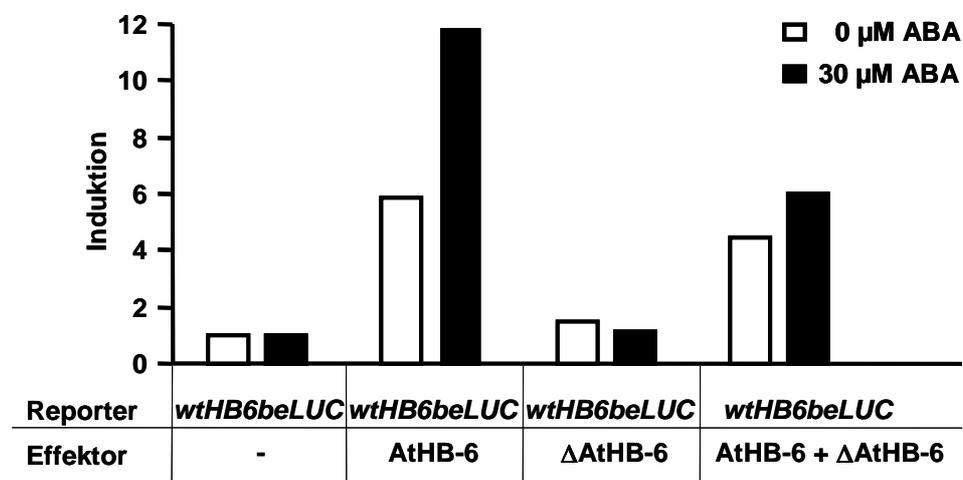


Abb. 48: Vergleich des Effekts von AtHB-6 und Δ AtHB-6 auf die Regulation eines künstlichen Promotors mit vier Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs (*wtHB6beLUC*). Bei alleiniger Expression von AtHB-6 bzw. Δ AtHB-6 wurden 50 μ g der Effektorplasmide bei Kombination 50 μ g des AtHB-6-Expressionsvektors und 150 μ g des Δ AtHB-6-Expressionsvektors zur Transfektion eingesetzt.

Durch das Leucin-Zipper Motiv können HD-ZIP-Proteine Homo- oder Heterodimere bilden. AtHB-1 und AtHB-2 etwa bilden *in vitro* Homodimere (Sessa et al., 1993), AtHB-5 und AtHB-6 können *in vitro* heterodimerisieren (Johannesson et al., 2001). Dementsprechend sollte bei simultaner Expression von AtHB-6 und Δ AtHB-6 eine Konkurrenz zwischen beiden Formen auftreten. Die in **Abb. 48** dargestellte Coexpression von AtHB-6 und Δ AtHB-6 im Verhältnis 1:3 führt zu einer verringerten Expression und Induktion des Reporters im Vergleich zur Aktivierung ausschließlich mit AtHB-6.

Δ AtHB-6 kompetiert die AtHB-6 vermittelte Reporterinduktion. Bei konstant gehaltener Effektormenge und nicht wie oben (siehe Abb. 48) zusätzlich angebotenen Effektor ergibt sich ein vergleichbares Bild (**Abb. 49**). RLD-Protoplasten wurden transfiziert mit 100 μ g pBI221Aequorin, 25 μ g wtHB6beLUCTER (4x cis-Element) als Reporter und 50 μ g Effektorplasmid zur Expression von AtHB-6 oder Δ AtHB-6 beziehungsweise Effektorplasmidgemisch. Mit zunehmender Menge an Δ AtHB-6 nimmt die AtHB-6 abhängige Induktion ab. Wie in Abb. 48 zeigt sich bei diesem Experiment (**Abb. 49**) die Konkurrenz zwischen AtHB-6 und Δ AtHB-6.

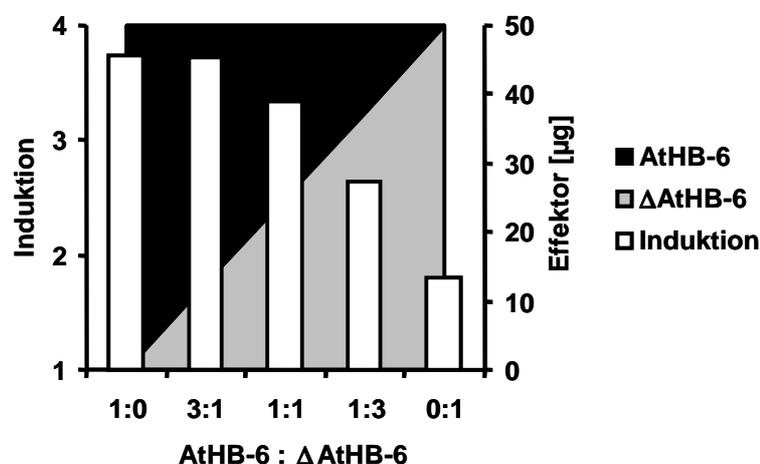


Abb. 49: Expression von AtHB-6 und Δ AtHB-6 in unterschiedlichem Verhältnis in RLD-Protoplasten cotransfiziert mit 100 μ g pBI221Aequorin als internem Standard und 25 μ g wtHB6beLUCTER (4x cis-Element) als Reporter. Die eingesetzte Effektorplasmidmenge (50 μ g) wurde konstant gehalten.

3.4.7. ABI1 als Effektor der durch AtHB-6 vermittelten transkriptionellen Regulation

AtHB-6 wurde als Interaktionspartner der Proteinphosphatase 2C ABI1 identifiziert (Himmelbach et al., 2001). Aus diesem Grund wurde in transienten Expressionsexperimenten eine mögliche Beeinflussung der AtHB-6 abhängigen Induktion des vier Kopien des HD-ZIP-Bindemotivs enthaltenden künstlichen Promotors durch die Überexpression von ABI1 beziehungsweise der N-terminalen Region von ABI1 untersucht. In **Abb. 50** ist die Auswirkung der Coexpression unterschiedlicher Mengen ABI1 als Effektor dargestellt. RLD-Protoplasten wurden cotransfiziert mit 100 µg pBI221Aequorin als internem Standard, 50 µg wtHB6beLUC (4x *cis*-Element) beziehungsweise pSKAscl-4635SLUC als Reporter sowie 25 µg 35SAtHB-6 Expressionsvektor und verschiedenen Mengen pBI221ABI1 (25; 50; 75 µg) als Effektoren. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die einzelnen Transfektionsansätze geteilt und ohne beziehungsweise mit 30 µM ABA für weitere 24 h inkubiert. Der Kontrollansatz mit pSKAscl-4635SLUC als Reporter zeigt die vom HD-ZIP-Bindemotiv unabhängige Hintergrundaktivität. Im Gegensatz zu *wtHB6beLUC* wird die -4635SLUC-Aktivität durch ABA nicht beeinflusst. Bei vorhandenem HD-ZIP-Bindemotiv des *wtHB6beLUC*-Reporters führt Abscisinsäure zu einer Induktion der Luciferaseaktivität.

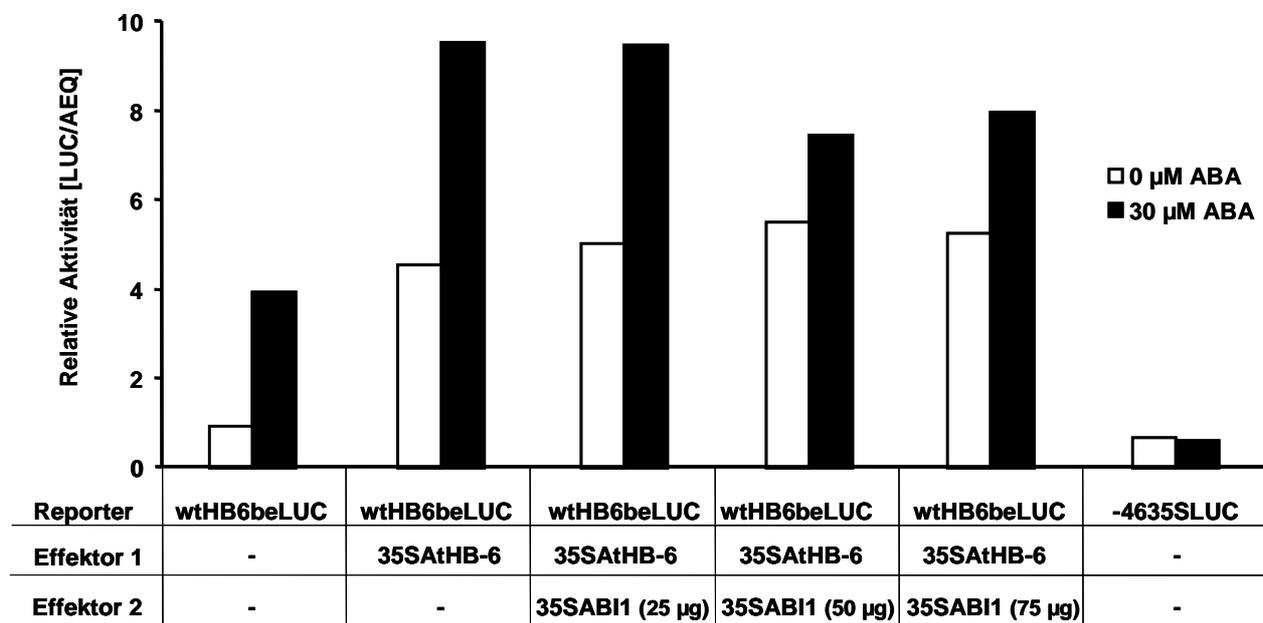


Abb. 50: Effekt von ABI1 auf die AtHB-6 abhängige Induktion von *wtHB6beLUC* (4x *cis* -Element). RLD-Protoplasten wurden cotransfiziert mit 100 µg pBI221Aequorin, 50 µg *wtHB6beLUC* bzw. pSKAscl-4635SLUC (Reporter), 25 µg 35SAtHB-6 Expressionsvektor (Effektor 1) und verschiedenen Mengen pBI221ABI1 (25; 50; 75 µg; Effektor 2).

Sowohl durch ABA als auch durch AtHB-6 ergibt sich eine Induktion des künstlichen Bindemotivpromotors. Die zusätzliche Expression von ABI1 verändert nicht die Reporteraktivitäten im Schwankungsbereich der Aktivitätsmessung verschiedener Transfektionen (vgl. Abb. 14). Dagegen führt die Coexpression des N-terminalen Bereichs von ABI1 zu einem deutlichen Effekt. **Abb. 51** zeigt ein unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben durchgeführtes Experiment bei welchem an Stelle von pBI221ABI1 pBI221NterABI1 als zusätzlicher Effektor in unterschiedlicher Menge eingesetzt wurde. Die Cotransfektion des ABI1-N-Terminus verringert in Abhängigkeit der eingesetzten Menge die ABA- und AtHB-6-vermittelte Induktion des künstlichen Promotors. Bei der größten Effektormenge ist keine oder kaum mehr eine Induktion der Reporteraktivität im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Im Gegensatz zur Volllängeversion von ABI1 interferiert die N-terminale Region von ABI1 mit der ABA- und AtHB-6-vermittelten Induktion des eingesetzten künstlichen Promotors.

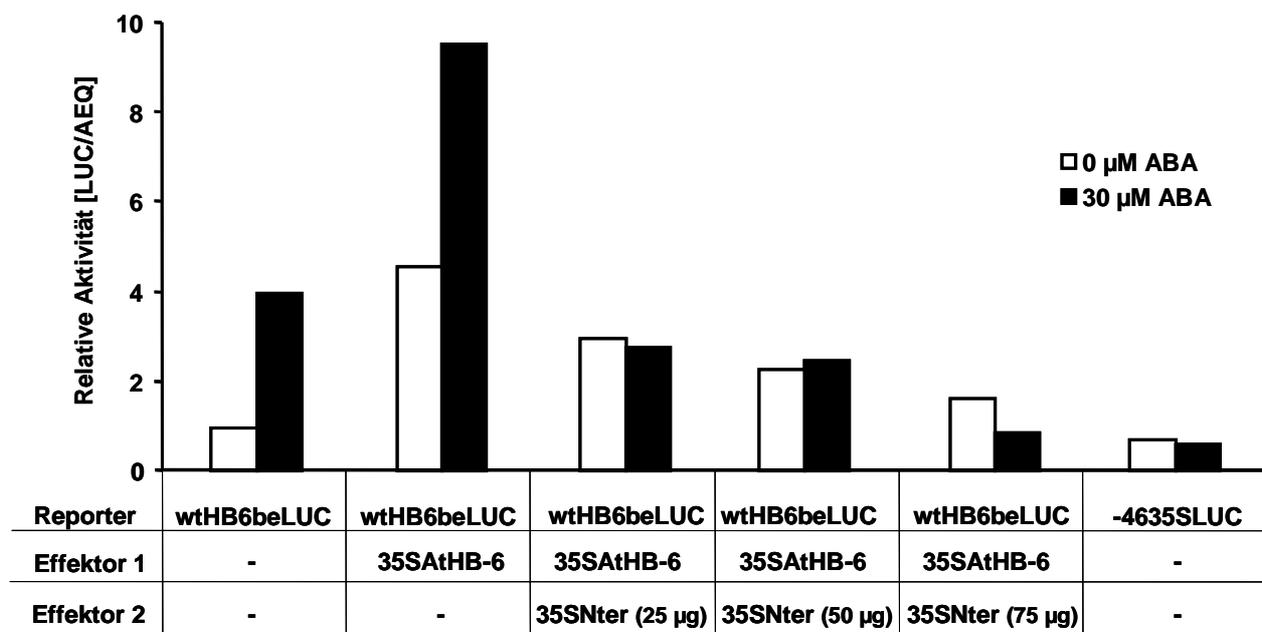


Abb. 51: ABI1-N-Terminus als Effektor der AtHB-6- und ABA-abhängigen Induktion von *wtHB6beLUC* (4x *cis*-Element). RLD-Protoplasten wurden cotransfiziert mit 100 μg pBI221Aequorin, 50 μg *wtHB6beLUC* bzw. pSKAscI-4635SLUC (Reporter), 25 μg *35SAtHB-6* Expressionsvektor (Effektor 1) und verschiedenen Mengen pBI221NterABI1 (25; 50; 75 μg; Effektor 2).

3.5. Lokalisation von Fusionsproteinen in Protoplasten

Die subzelluläre Lokalisation und die Interaktion mit anderen zellulären Komponenten kann Aufschluß geben über die Funktion von Proteinen. Zur weiteren Charakterisierung der oben beschriebenen Proteine ABI1, ABI2 und AtHB-6 wurden Expressionsvektoren für das

transiente Expressionssystem konstruiert, die eine subzelluläre Lokalisation als GFP-Fusion (Hanson und Köhler, 2001) ermöglichen. **Abb. 52** zeigt das Klonierungsschema der GFP-Fusionen. In ein pBI221-Derivat mit CaMV 35S Promotor, S1 *Enhancer* (Fütterer et al., 1990) und GFP-Sequenz mit mutiertem Stop-Codon wurden die *ABI1*, *ABI2* beziehungsweise *AtHB-6*-Sequenz ligiert.

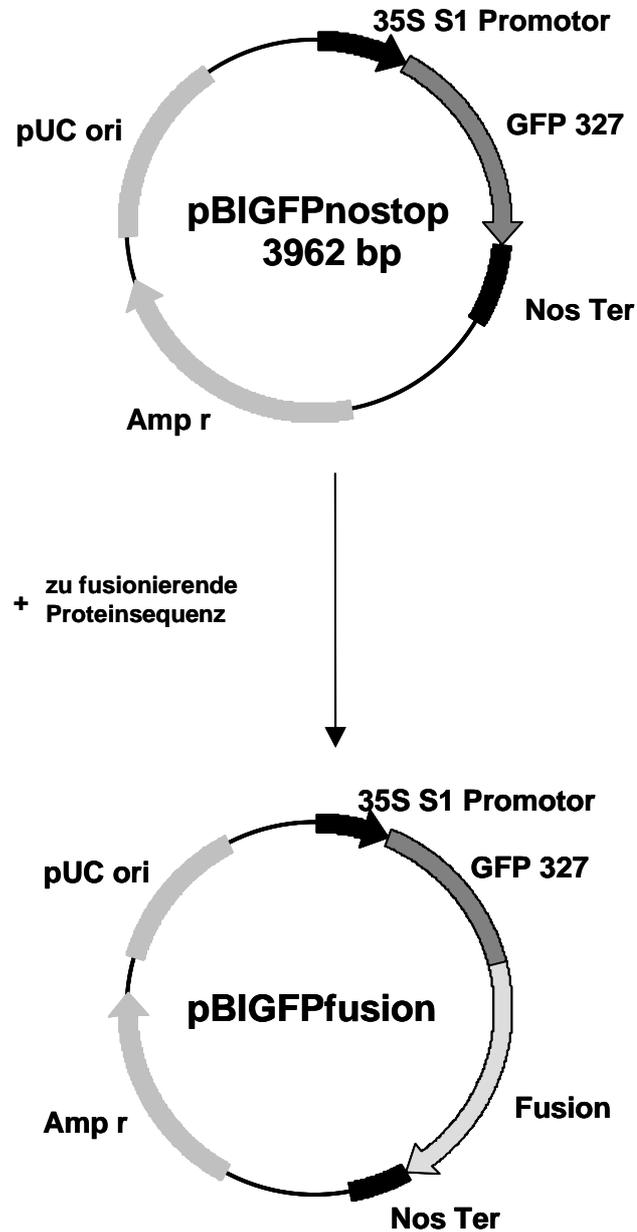


Abb. 52: Klonierungsschema der GFP-Fusionexpressionsklone für die transiente Expression (Details siehe Text).

Zur Konstruktion des in **Abb. 52** gezeigten pBIGFPnostop wurde in oben beschriebenen pSKAscILUCTER (3.2.2.) das für Luciferase codierende BamHI-SacI-Fragment gegen das entsprechende für GFP 327 codierende Fragment aus pSMRSGFP (Davis und Viestra, 1996) ausgetauscht (**Abb. 53**). Anschließend wurde in die aufgefüllte BamHI-

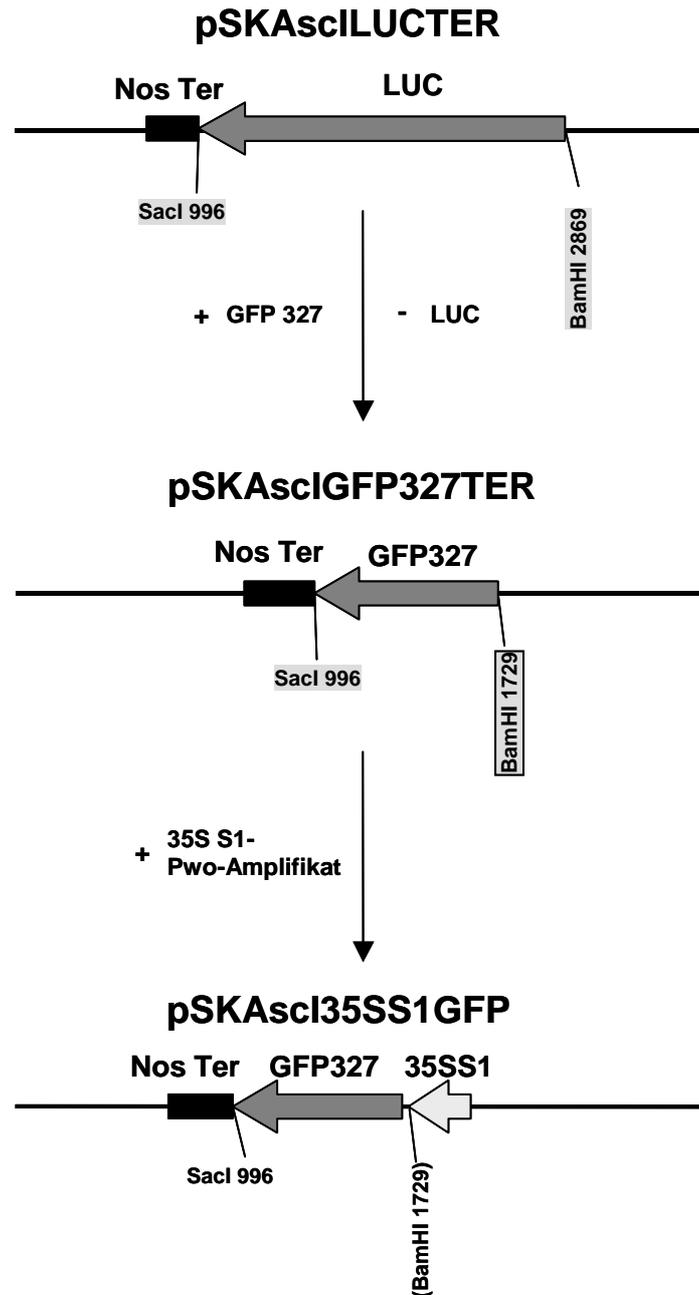


Abb. 53: Konstruktion des GFP-Expressionsvektors für die transiente Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten (Details siehe Text).

Restriktionsstelle des resultierenden pSKAscIGFP327TER ein Pwo-Amplifikat (Oligonukleotide siehe Anhang) des CaMV 35S Promotors mit S1 *Enhancer* ligiert (**Abb. 53**). Der damit generierte pSKAscI35SS1GFP wurde als Kontrolle in transienten Expressionsexperimenten verwendet. Für die Konstruktion von GFP-Fusionsklonen wurde das Stop-Codon der GFP-Sequenz des pSKAscI35SS1GFP mit Hilfe von PCR mutiert und eine zusätzliche XhoI-Schnittstelle eingeführt (Oligonukleotide siehe Anhang). Der daraus hervorgegangene pSKAscIGFPnostop enthielt neben der neu eingeführten XhoI-Schnittstelle eine weitere XhoI-Restriktionsstelle, weshalb die Reporter-kassette als SphI-EcoRI-Fragment

in die entsprechenden Schnittstellen des pBI221 überführt wurde. In den damit generierten Vektor pBIGFPnostop wurde die ABI1-, ABI2- und AtHB-6-Sequenz als Pwo-Amplifikat in die XhoI-Schnittstelle entsprechend **Abb. 52** ligiert.

Als Kontrolle der Funktionalität der GFP-ABI1- beziehungsweise GFP-ABI2-Fusion wurde die Auswirkung der entsprechenden Expressionsklone auf die ABA-abhängige Regulation von *RD29BLUC* und *RAB18LUC* in transienten Expressionsexperimenten untersucht (**Abb. 54**).

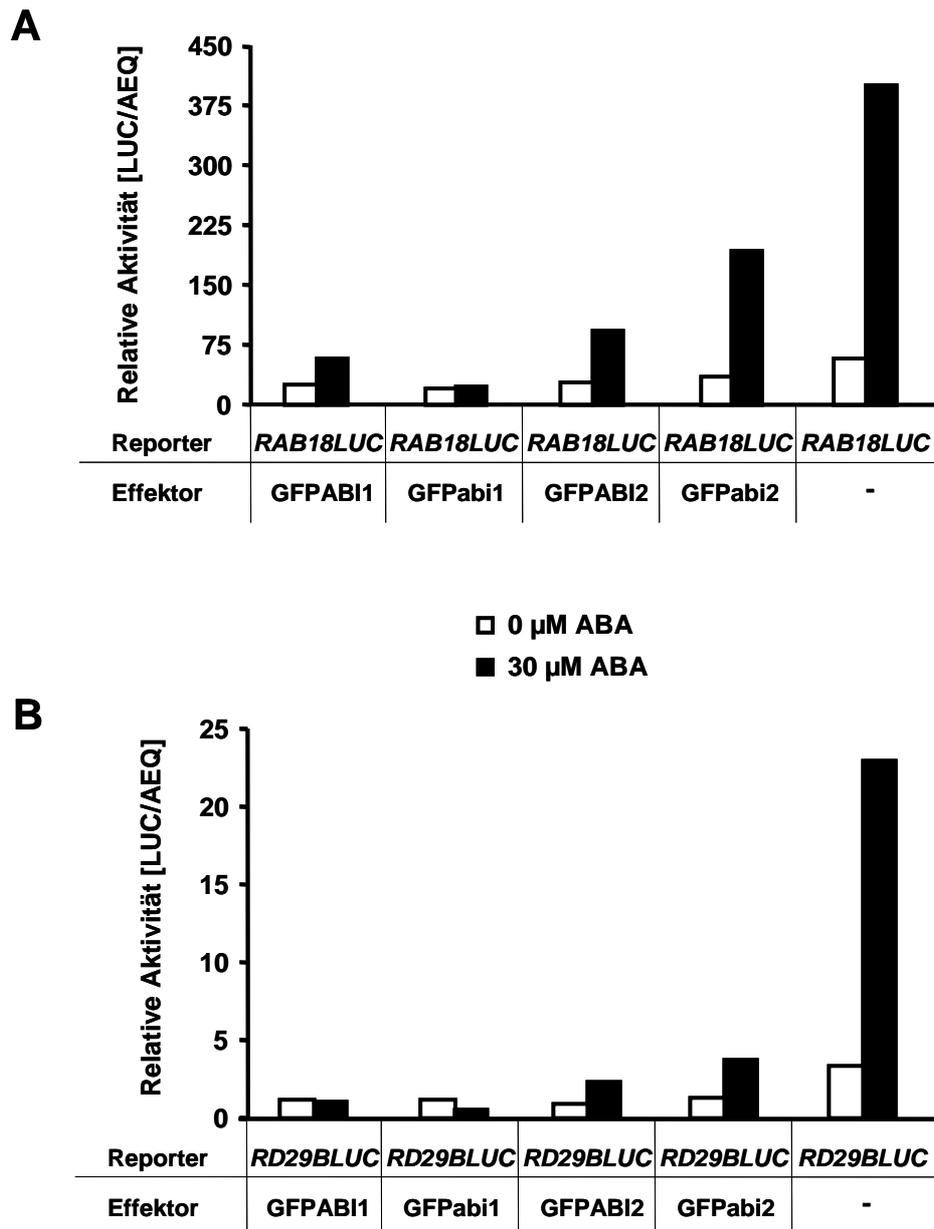


Abb. 54: GFP-Fusionen (GFPABI1, GFPabi1, GFPABI2, GFPabi2) als Effektoren der ABA-abhängigen (0; 30 μM) *RAB18LUC*- (**A**) beziehungsweise *RD29BLUC*- (**B**)-Regulation.

RLD-Protoplasten wurden cotransfiziert mit 100 µg pBIAequorin als internem Standard, 20 µg pSKAscIRAB18LUC beziehungsweise 80 µg pSKAscIRD29BLUC als ABA-reguliertem Reporter und 50 µg Effektorplasmid. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Transfektionsansätze geteilt und ohne beziehungsweise mit 30 µM ABA für weitere 24 Stunden inkubiert. In jedem Fall zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle ohne Effektor bei Coexpression einer GFP-Fusion eine verminderte Reporteraktivität. In **Abb. 55** sind die Verhältnisse der Reporteraktivitäten mit ABA inkubierter Protoplasten zu ohne ABA behandelten Protoplasten als Induktion dargestellt.

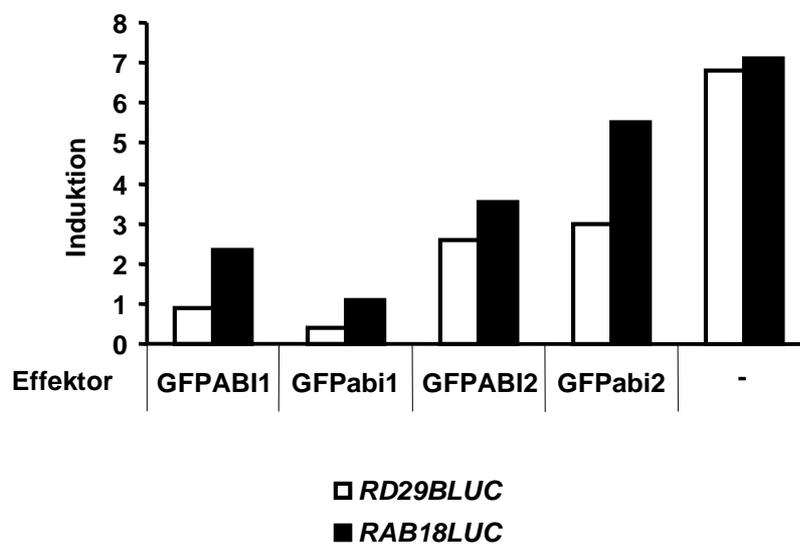


Abb. 55: GFP-Fusionen (GFPABI1, GFPabi1, GFPABI2, GFPabi2) als Effektoren der ABA vermittelten *RAB18LUC*- bzw. *RD29BLUC*-Induktion.

Der stärkste Effekt als negativer Regulator der ABA-Induktion ergibt sich für GFPabi1, gefolgt von GFPABI1. Weniger stark wirkt sich die Coexpression von GFPABI2 und GFPabi2 aus. Mit GFPabi2 als Effektor ist der Unterschied der *RAB18LUC*-Induktion mit und ohne Effektor sehr gering. Insgesamt zeigt sich jedoch in jedem Fall eine negative Beeinflussung der ABA-abhängigen Genregulation, was für die Funktionalität der Fusionen vergleichbar zur Funktion der nicht fusionierten ABI1- und ABI2-Formen bei Überexpression im transienten Expressionssystem spricht. Als Kontrolle des mikroskopischen GFP-Nachweises wurden RLD-Protoplasten transfiziert mit je 100 µg pSKAscI35SS1GFP beziehungsweise pBIGFPnostop und verglichen mit Protoplasten, die mit pBI221Aequorin transfiziert worden waren. In **Abb. 56** sind die entsprechenden Bilder der transfizierten Protoplasten dargestellt. Für nicht GFP-exprimierende Protoplasten ergab sich eine relativ starke Hintergrundfluoreszenz, was eindeutige Aussagen schwierig macht. Bei mit GFP-

Konstrukten transfizierten Protoplasten zeigt nur ein sehr geringer Anteil, etwa ein Protoplast unter 10^5 eine eindeutig vom Hintergrund unterscheidbare Fluoreszenz. Trotz der geringen Häufigkeit ist die GFP-Expression nachweisbar. In **Abb. 56** ist deutlich der Unterschied zwischen Hintergrundfluoreszenz und GFP-Fluoreszenz erkennbar. Zudem zeigt sich damit die Funktionalität der für weitere Konstruktionen verwendeten GFP-Vektoren.

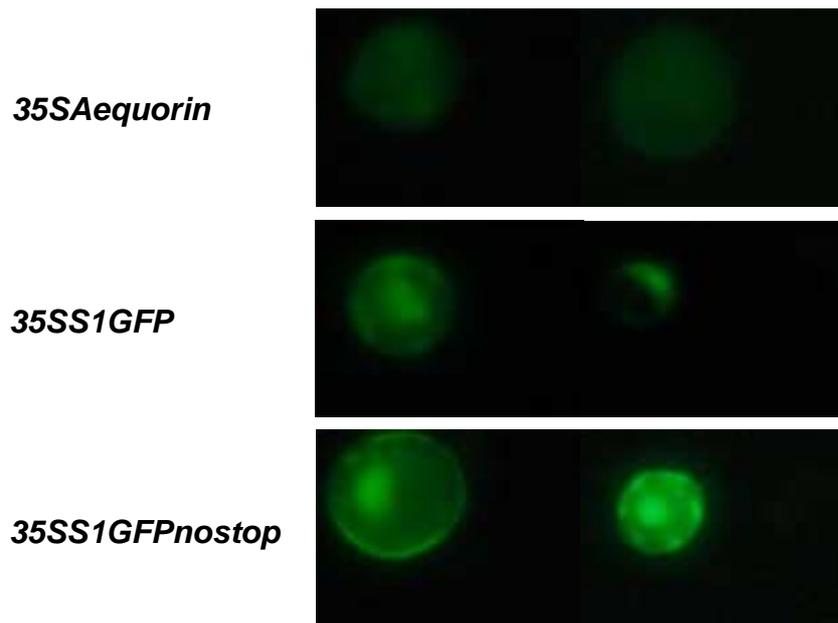


Abb. 56: Mikroskopischer Nachweis von GFP in mit pBI221Aequorin (*35SAequorin*), pSKAscI35SS1GFP (*35SS1GFP*) bzw. pBIGFPnostop (*35SS1GFPnostop*) transfizierten RLD-Protoplasten.

Zur Untersuchung der Lokalisation der ABI1-, ABI2- und AtHB-6-GFP-Fusion wurden RLD-Protoplasten mit je 100 µg des Expressionsvektors transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation zum Teil mit 30 µM ABA beziehungsweise ohne ABA wurden die Protoplasten mikroskopiert. Als Kontrolle der Kernlokalisierung wurden die Zellen mit DAPI behandelt. Sowohl DAPI, wie auch GFP-Fluoreszenz wurde nachgewiesen. In **Abb. 57** sind jeweils GFP- und DAPI-Fluoreszenzaufnahmen gegenübergestellt. Bei den DAPI-Aufnahmen ist neben der blauen Fluoreszenz des Farbstoffs die rote Chlorophyllfluoreszenz sichtbar. Die ersten beiden Bilder zeigen mit *35SS1GFPAtHB-6* transfizierte Protoplasten. In den ohne ABA inkubierten Protoplasten ist bei Vergleich zur DAPI-Aufnahme deutlich die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors zu erkennen. In den folgenden Bildern sind mit *35SS1GFPABI1* beziehungsweise *35SS1GFPABI2* transfizierte Protoplasten dargestellt. In beiden Fällen ist mit oder ohne ABA keine eindeutige Lokalisation zu erkennen. Die GFP-Fluoreszenz ist über

die ganze Zelle verteilt zu beobachten. Unterbrochen wird die GFP-Fluoreszenz durch Chloroplasten, erkennbar an der roten Chlorophyllfluoreszenz im DAPI-Bild. Damit lässt sich für GFPABI1 und GFPABI2 keine Aussage über die subzelluläre Lokalisation treffen. Eine Möglichkeit zur exakteren Untersuchung der Verteilung der GFP-Fusionen in der Zelle wäre die Analyse mit einem CLSM (*Confocal laser scanning microscope*).

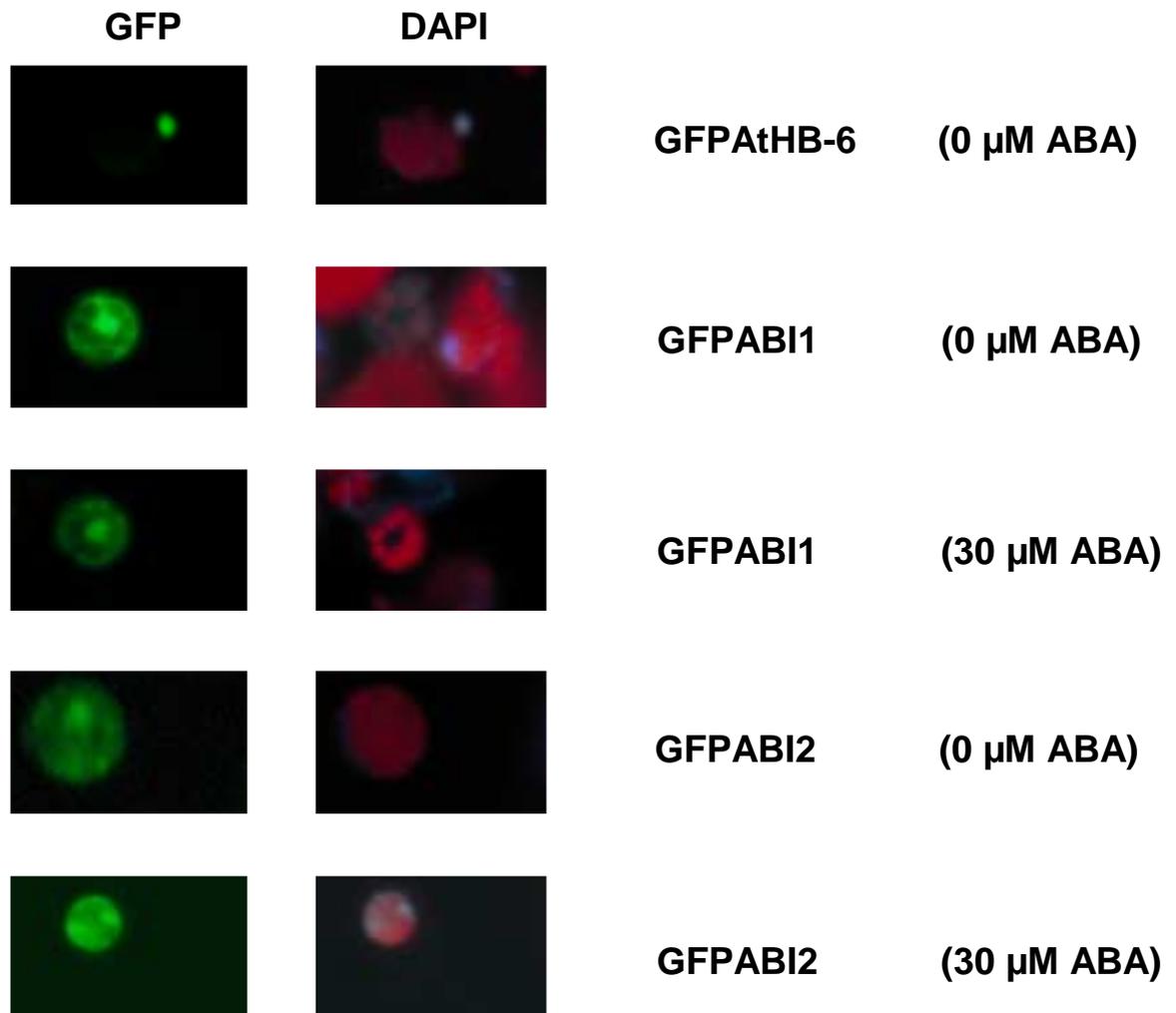


Abb. 57: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionen. Nachweis des Zellkerns erfolgte mit DAPI. RLD-Protoplasten wurden transfiziert mit *35SS1GFPAtHB-6*, *35SS1GFPABI1* und *35SS1GFPABI2*, aufgeteilt und mit 30 μM ABA bzw. ohne ABA inkubiert (Details siehe Text).

3.6. Cotransfektion von Cosmiden im transienten Expressionssystem

Eine Möglichkeit Signaltransduktionswege zu untersuchen und beteiligte Komponenten zu identifizieren ist die genetische Analyse der Signalkaskade. Bei positioneller Klonierung von Genen etwa kann der Mutantenphänotyp durch Einbringen von Wildtyp-DNA-Fragmenten in die rezessive Mutante komplementiert oder bei dominanten Mutanten durch Transformation von Wildtyppflanzen mit DNA-Fragmenten, welche die entsprechende Mutation beinhalten, der Mutantenphänotyp ausgelöst werden. Sehr zeitaufwendig ist dabei die zur Identifizierung des mutierten Gens nötige stabile Transformation der Pflanzen. Eine weniger zeitaufwendige mögliche Alternative ist die Verwendung eines transienten Expressionssystems zur Analyse der zur Klonierung des mutierten Gens in Frage kommenden DNA-Fragmente.

In **Abb. 58** und **59** ist die Anwendung des transienten Expressionssystems zur Identifizierung von mutierten DNA-Fragmenten beispielhaft gezeigt. Zum Test wurden verschiedene Cosmide eingesetzt. Zwei, die je ein mutiertes Gen trugen, *abi1* beziehungsweise *abi2*, und eines, das nur Wildtyp-DNA beinhaltete. RLD-Protoplasten wurden cotransfiziert mit 80 µg pSKAscIRD29BLUC als ABA-reguliertem Reporter, 100 µg pBI221 als internem Standard und unterschiedlichen Mengen (0; 10; 20; 40 µg) an Kontrollcosmid beziehungsweise *abi1*-Cosmid (**Abb. 58**). Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Transfektionsansätze geteilt und für weitere 24 Stunden ohne und mit 30 µM ABA weiter inkubiert. Für die mit *abi1*-Cosmid cotransfizierten Protoplasten ergibt sich eine um etwa die Hälfte verringerte Induktion des regulierten Reporters und damit entsprechend dem Mutantenphänotyp ein insensitives Verhalten gegenüber ABA (**Abb. 58**).

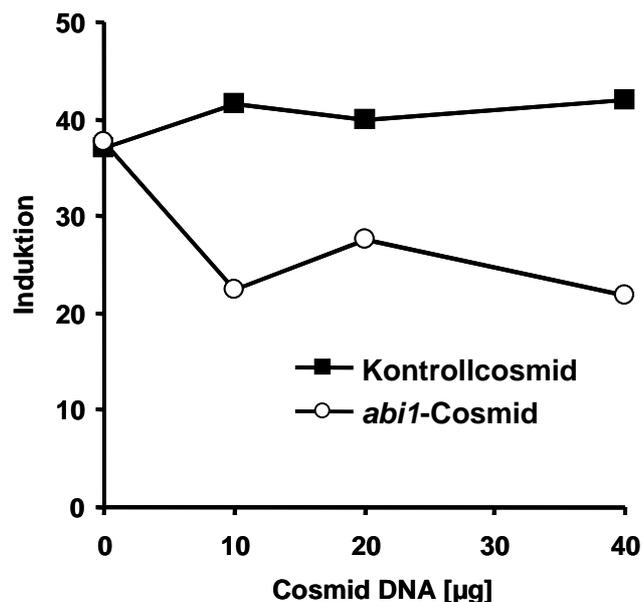


Abb. 58: Auswirkung der Cotransfektion von *abi1*-Cosmid und Kontrollcosmid auf die ABA-abhängige *RD29BLUC*-Induktion (Details siehe Text).

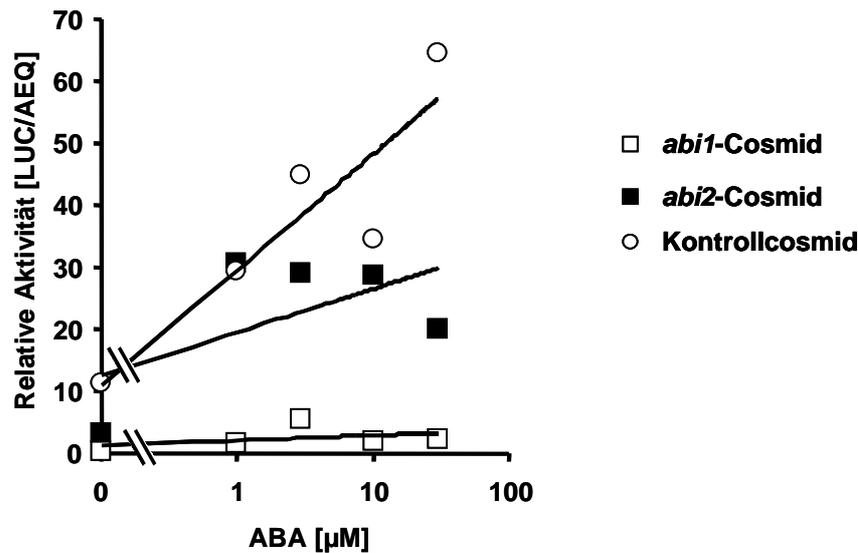


Abb. 59: Coexpression von *abi1*-, *abi2*- und Kontrollcosmid mit *RAB18LUC* (Details siehe Text).

In **Abb. 59** ist die Coexpression von *abi1*-, *abi2*-, und Kontrollcosmid mit *RAB18LUC* dargestellt. RLD-Protoplasten wurden transfiziert mit 20 µg pSKAscI*RAB18LUC* als reguliertem Reporter, 100 µg pBI221Aequorin als internem Standard und je 20 µg Cosmid-DNA. Nach der Transfektion wurden die Protoplasten 16 Stunden und anschließend für weitere 24 Stunden mit unterschiedlichen Abscisinsäurekonzentrationen (0; 1; 3; 10; 30 µM) inkubiert. Bei den mit Mutanten-Cosmiden transfizierten Ansätzen zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle eine verringerte ABA-vermittelte Expression des Reporters. Die ABA-abhängige Signaländerung ist entsprechend den insensitiven Mutanten-Phänotypen bei den Ansätzen mit *abi1*- beziehungsweise *abi2*-Cosmid geringer als bei dem Ansatz mit Kontrollcosmid.

Mit den beschriebenen Experimenten zeigt sich die prinzipielle Möglichkeit der Anwendung des transienten Expressionssystems als Hilfsmittel bei positionellen Klonierungen. Ein Nachteil der Transfektion großer DNA-Fragmente mit der genannten Methode ist die Anlagerung der Protoplasten an die DNA während der PEG-vermittelten DNA-Aufnahme, was etwa bei der Verwendung von Mutantenprotoplasten zu einer starken Schädigung der Protoplasten führt und damit die Reporteraktivität stark verringern kann. Zudem sind für eine exaktere Aussage über die ABA-abhängige Signaländerung eine größere Anzahl an Messungen nötig um eine möglichst genaue Näherung und geringe Streuung der Daten zu erhalten.

3.7. Transgene Reporterlinien

Die beschriebenen im transienten Expressionssystem verwendeten Reporter-genkonstrukte wurden zur Generierung stabiler Reporterlinien genutzt. Diese Linien können zum einen als Kontrolle der Regulation im transienten Expressionssystem im Vergleich zur Regulation in den Transgenen zum anderen durch Kreuzung zur Charakterisierung von Mutanten dienen. Zur Pflanzentransformation wurde ein modifizierter pBI121 (Jefferson, 1987) verwendet. Das die GUS-Kassette beinhaltende HindIII-EcoRI-Fragment des pBI121 wurde gegen Oligonukleotide (Sequenz siehe Anhang) mit entsprechenden Überhängen ausgetauscht. Durch diese Oligonukleotide wurden zwei 8-Basenpaar-Schnittstellen (Ascl und Fsel) eingeführt. In Kombination mit oben beschriebenem pSKAscl (3.2.2.) ergibt sich ein einfach handhabbares Klonierungssystem. Konstrukte, die in Pflanzen eingebracht werden sollen, können in der *multiple cloning site* des pSKAscl erstellt und mittels dem selten schneidenden Ascl-Enzym in den modifizierten pBI121 (pBIAscl) überführt werden (**Abb. 60**).

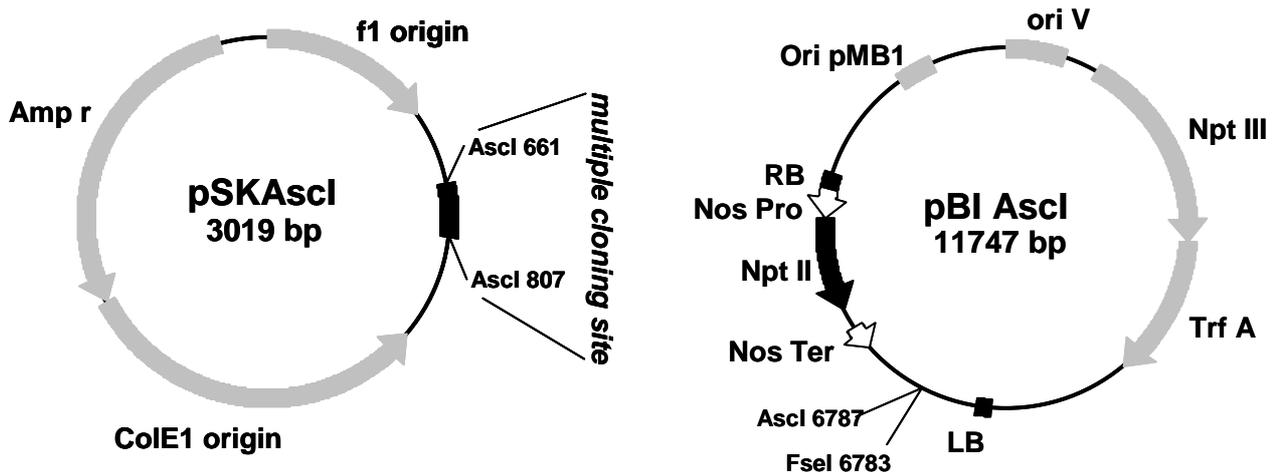


Abb. 60: Vektorsystem zur einfachen Klonierung und Transformation von Pflanzen. Konstruktttransfer von pSKAscl zu pBIAscl ist möglich über eingeführte Ascl-Schnittstellen.

In *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia wurde *RD29BLUC* beziehungsweise *AtHB-6LUC* als ABA-reguliertes Reporter-genkonstrukt mittels Agrobakterien eingebracht. Die transgenen Pflanzen wurden auf Kanamycin selektiert. Für nachfolgende Untersuchungen wurde je Reporter-genkonstrukt eine homozygote Linie verwendet.

3.7.1. Vergleich der Genregulation im transienten System und in stabilen Reporterlinien

Zum Test der Reporteraktivität wurden von den transgenen Linien Samen auf MS-Agarplatten angezogen. Nach 5 Tagen wurden die Keimlinge auf Platten ohne beziehungsweise mit 30 μM ABA transferiert. Nach weiteren 24 h wurde die Lichtemission der Keimlinge über 30 min aufgenommen. In **Abb. 61** ist die Aktivität von RD29BLUC- und AtHB-6LUC-Pflanzen dargestellt. Das erste Bild zeigt jeweils die Position der Keimlinge

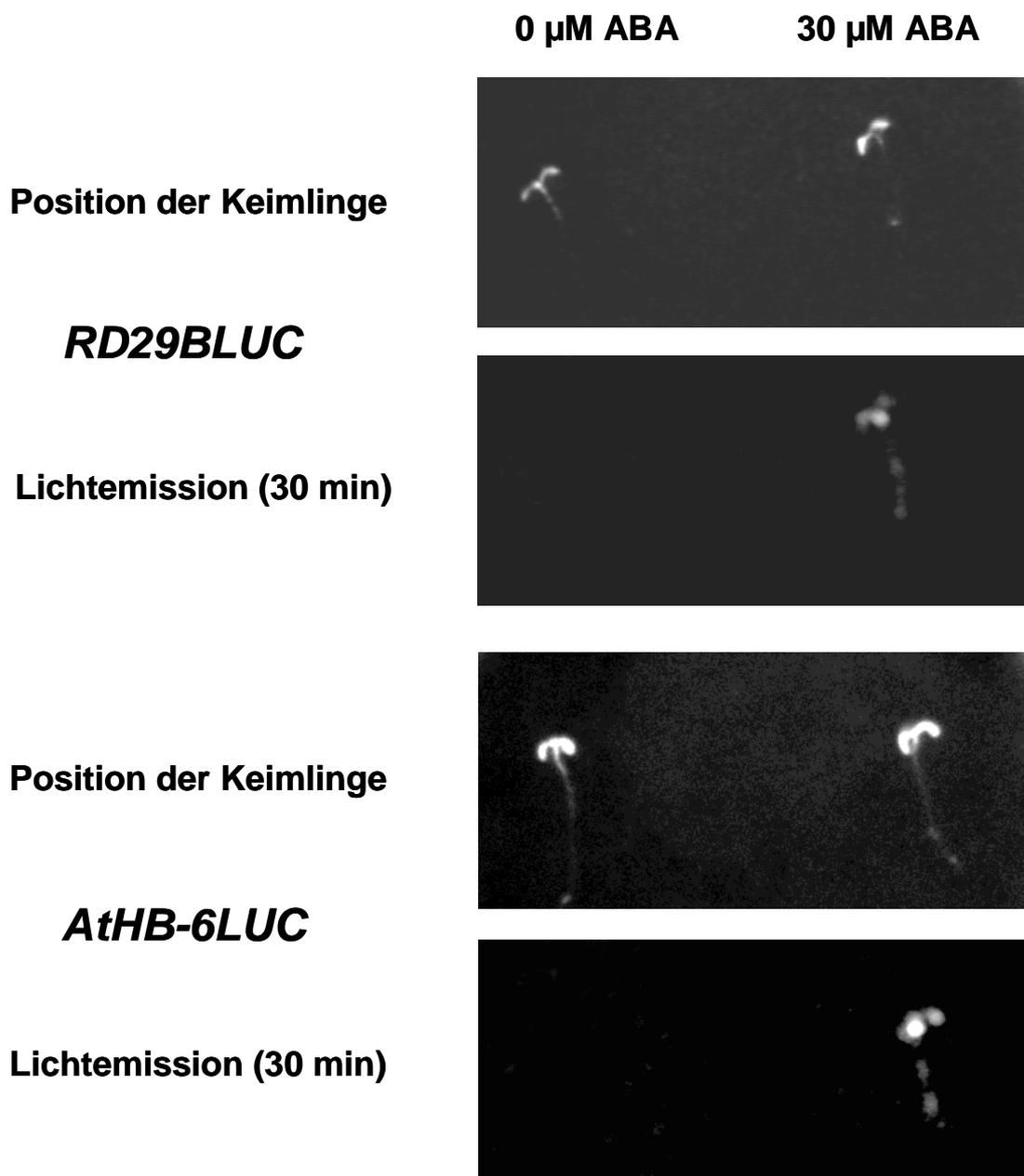


Abb. 61: Lichtemission transgener Reporterlinien (*RD29BLUC* und *AtHB-6LUC*) bei Induktion der Reporter durch Abscisinsäure (30 μM). Die Keimlinge wurden mit Luciferinlösung besprüht und die Biolumineszenz über 30 min mit einer hochsensitiven Kamera (ARGUS-50 System mit einer C2400-47 Kamera; Hamamatsu Photonics, Herrsching) aufgenommen (vgl. 2.2.8.2.).

während der Aufnahme, das zweite das in 30 min emittierte Licht. Nur bei den mit Abscisinsäure behandelten Keimlingen ist eine Lichtemission erkennbar. Ohne ABA war keine Lichtemission aufzunehmen. Damit zeigt sich bei beiden transgenen Linien eine deutliche ABA-abhängige Reporteraktivität. Neben den in **Abb. 61** gezeigten Bildern wurde als Vergleich zur Reporterregulation im transienten Expressionssystem die Luciferaseaktivität in Pflanzenextrakten der transgenen Reporterlinien bestimmt. Die Pflanzen wurden als Schüttelkulturen angezogen und mit unterschiedlichen Abscisinsäurekonzentrationen (0; 1; 10 μM) behandelt. Nach 24-stündiger Hormonbehandlung wurden die Luciferaseaktivitäten bezogen auf den Proteingehalt analysiert (**Abb. 62**).

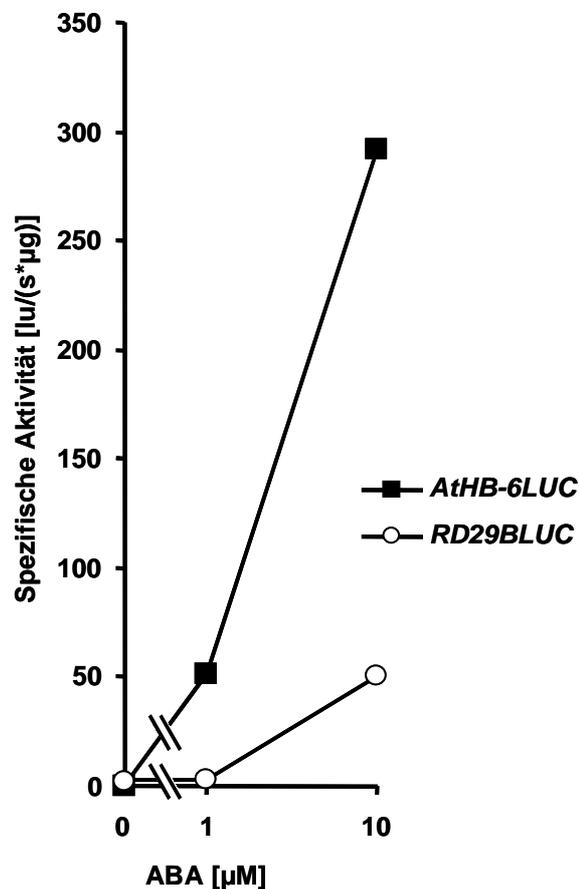


Abb. 62: *AtHB-6LUC*- und *RD29BLUC*-Regulation in Transgenen. Die Spezifische Aktivität nach Behandlung mit unterschiedlichen Abscisinsäurekonzentrationen (0; 1; 10 μM) ist dargestellt.

Beide untersuchten Reporterengenkonstrukte werden stark durch Abscisinsäure induziert. Für *RD29BLUC* ergibt sich bei 10 μM ABA eine etwa 30-fache Induktion. Bei *AtHB-6LUC* findet man eine 1200-fach höhere spezifische Aktivität bei 10 μM ABA im Vergleich zur Aktivität bei 0 μM ABA. Damit liegt die Induktion des *RD29BLUC*-Konstrukts in stabil transformierten Pflanzen und bei transienter Expression in Protoplasten im gleichen

Größenordnungsbereich, im Gegensatz zur *AtHB-6LUC*-Regulation. In transienten Expressionsexperimenten (3.2.2.) fand sich für *AtHB-6LUC* keine ABA-abhängige Induktion, in Transgenen dagegen eine 1200-fache Induktion. Damit scheint in Protoplasten eine ABA-abhängige *AtHB-6*-Regulation nicht mehr gegeben zu sein. Zur Kontrolle wurden Blätter der oben untersuchten transgenen *AtHB-6LUC*-Linie zur Protoplastierung verwendet. Die Protoplasten wurden unterschiedlich lang (0; 2; 20; 25 h) ohne und mit 30 μM Abscisinsäure inkubiert. In **Abb. 63** sind die entsprechenden Aktivitätswerte dargestellt. Es zeigt sich keine ABA-abhängige Reporterregulation. Bei längerer Inkubation der Protoplasten ist die Luciferaseexpression verringert, in keinem Fall wird jedoch der Reporter durch Abscisinsäure induziert.

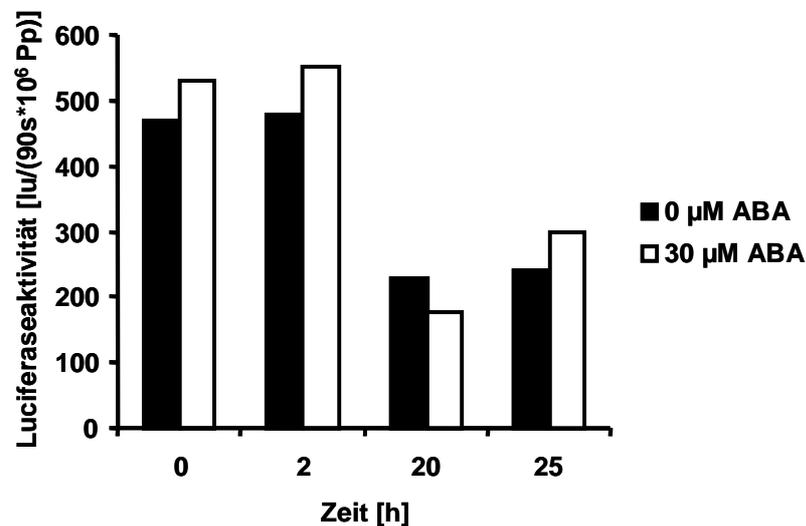


Abb. 63: *AtHB-6LUC*-Regulation in Protoplasten aus Blättern der transgenen *AtHB-6LUC*-Linie.

Der Vergleich der Regulation im transienten Expressionssystem mit der in transgenen Pflanzen führt bei beiden Konstrukten (*RD29BLUC* und *AtHB-6LUC*) zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für *RD29BLUC* ist sowohl transient wie auch stabil die ABA-abhängige Reporterregulation nachweisbar. *AtHB-6LUC* dagegen wird in ganzen Pflanzen sehr stark durch ABA induziert, während in Protoplasten keine Abscisinsäure-vermittelte Regulation feststellbar ist. Damit zeigt sich deutlich eine Einschränkung des transienten Expressionssystems als Modellsystem im Vergleich zu ganzen Pflanzen.

3.7.2. Kreuzungen der Reporterlinien mit ABA hypersensitiven bzw. insensitiven Mutanten und Transgenen

Zur Charakterisierung von Mutanten und als Kontrolle des transienten Expressionssystems wurde die transgene AtHB-6LUC-Reporterlinie mit verschiedenen Mutanten gekreuzt. Als Vergleich diente jeweils eine Kreuzung mit dem der Mutante entsprechendem Wildtyp. Die Analysen wurden mit segregierendem F2-Samenmaterial erfolgreicher Kreuzungen durchgeführt. Durch Verwendung des segregierenden Samenmaterials ergibt sich ein nivellierender Effekt auf die Reporteraktivität. Bei angenommener 1:3 Segregation der Mutation und des Transgens sind 3/16 der für die Analyse verwendeten Pflanzen homozygot für die Mutation und homo- oder heterozygot für das Reporter-gen, 3/8 der Pflanzen sind heterozygot für die Mutation und homo- oder heterozygot für das Reporter-gen. Damit verhalten sich bei einer Kreuzung mit einer rezessiven Mutante 9/16 der verwendeten Pflanzen, die das Transgen enthalten, wie Wildtyp und nur 3/16 dem Mutantenphänotyp entsprechend, bei einer dominanten Mutante umgekehrt 9/16 wie die Mutante und 3/16 wie der Wildtyp. Eine mögliche Beeinflussung der Reporteraktivität durch Verwendung homo- oder heterozygoter Pflanzen bezüglich des Reporter-gens ist dabei nicht berücksichtigt. Ein deutlicher Unterschied in der Reporterregulation beim Vergleich der segregierenden Mutantenkreuzungen mit den entsprechenden Wildtypkreuzungen würde aus diesem Grund im homozygoten Zustand einen noch größeren Einfluß der Mutation bedeuten.

Abb. 64 zeigt die spezifische AtHB-6LUC-Reporteraktivität in Abhängigkeit der Abscisinsäurekonzentration. Für die ABA-insensitive Mutante *abi1* ergibt sich das zu erwartende insensitive Verhalten. Der Reporter wird durch ABA wesentlich schwächer induziert als in der Wildtypkontrollkreuzung. Vergleichbar führt die Kreuzung mit der *ahr1*-Mutante zu einem dem ABA-hypersensitiven Phänotyp entsprechenden Aktivitätsverlauf. *AtHB-6LUC* wird in der Mutantenkreuzung stärker als in der Kontrollkreuzung induziert. Für beide Mutanten ergibt sich damit ein dem Phänotyp entsprechendes Verhalten. Im Vergleich zur transienten Expression ABA-regulierter Reporter in Mutantenprotoplasten (3.3.1.) stimmt die Regulation des Reporters in den Kreuzungen mit den Resultaten aus transientser Expression überein. Im Gegensatz zu den transienten Expressionsexperimenten zeigt die *gca7*-Kreuzung keinen Unterschied der Reporterinduktion im Vergleich zur Kreuzung mit dem Wildtyp. Bei transienten Expressionsexperimenten in *gca7*-Protoplasten ergab sich ein insensitive Verhalten (3.3.1.). Die verwendeten Reporter, *RAB18LUC* und *RD29BLUC* wurden weniger stark durch Abscisinsäure induziert als in den Wildtypprotoplasten. Die Kreuzung mit der ABA-insensitiven *gca2*-Mutante schließlich zeigt wie bei transienten Expressionsexperimenten (3.3.1.) eine erhöhte Abscisinsäure-abhängige Reporterinduktion und damit bezüglich der Genregulation ein hypersensitives Verhalten.

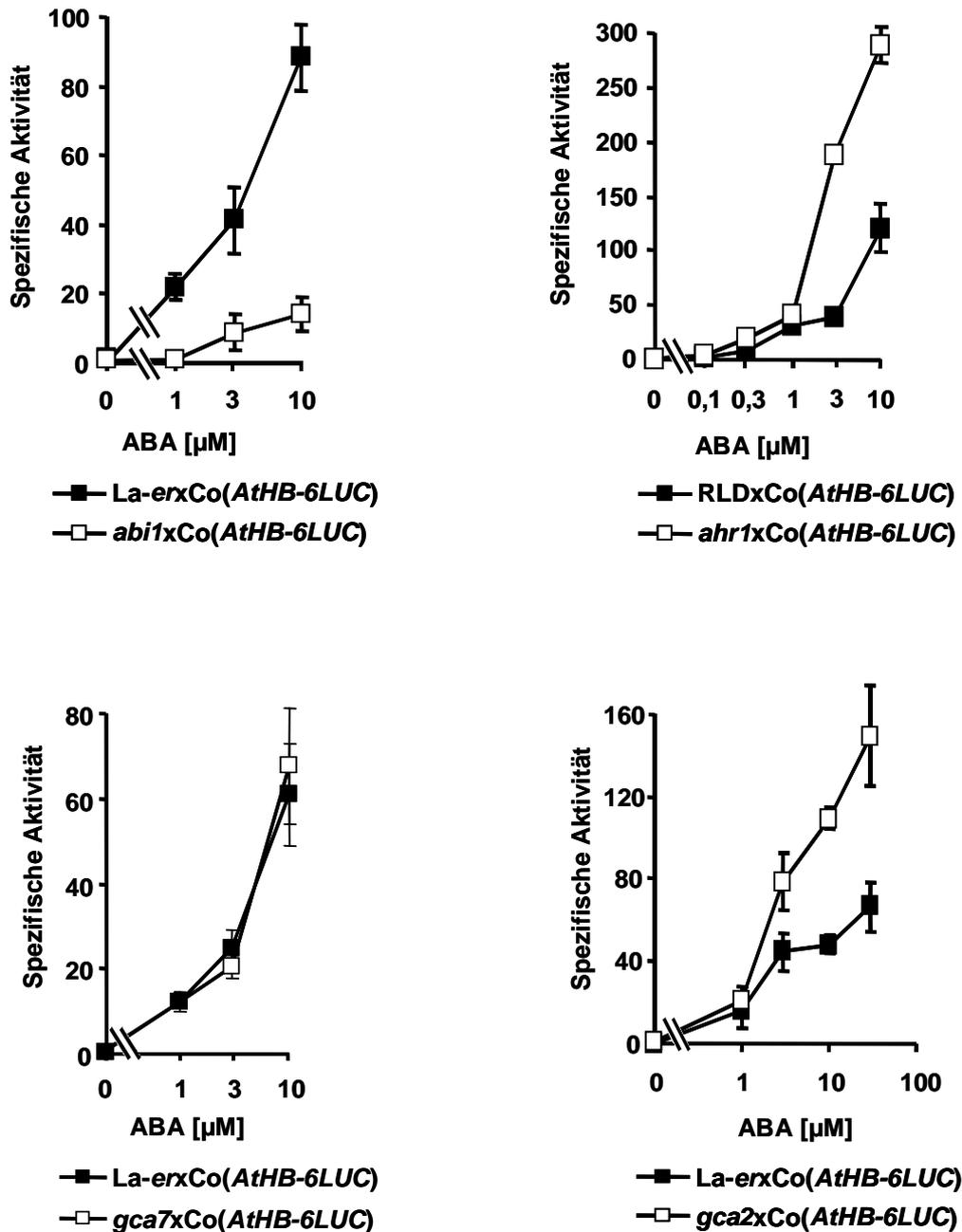


Abb. 64: Analyse der Kreuzungen zwischen Mutanten (*abi1*, *ahr1*, *gca7* und *gca2*) und der AtHB-6LUC-Reporterlinie. Gezeigt ist jeweils die spezifische Aktivität der Kreuzung mit der Mutante im Vergleich zur Kreuzung mit dem entsprechenden Wildtyp in Abhängigkeit der Abscisinsäurekonzentration. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Parallelen sind dargestellt.

Neben Mutanten wurden für Kreuzungen verschiedene von Dr. A. Himmelbach generierte transgene Linien eingesetzt, welche unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors AtHB-6 in *sense* oder *antisense* Orientierung beziehungsweise Δ AtHB-6 (siehe Abb. 42) exprimieren. Für Reporteranalysen wurde segregierendes F2-Samenmaterial verwendet. Als Wildtypkontrolle ist die im gleichen Ökotyp generierte heterozygote AtHB-6LUC-Reporterlinie eingesetzt worden. **Abb. 65** zeigt zusammengefaßt die spezifischen Aktivitätswerte für 0 und

10 μM ABA. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt jede der untersuchten Kreuzungen eine stärkere Induktion des Reporters bei 10 μM ABA. Ohne Abscisinsäure ergibt sich keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Jeder der verwendeten Effektoren hat damit die gleiche schwach positive Auswirkung auf die Abscisinsäure-vermittelte Induktion des Reporters.

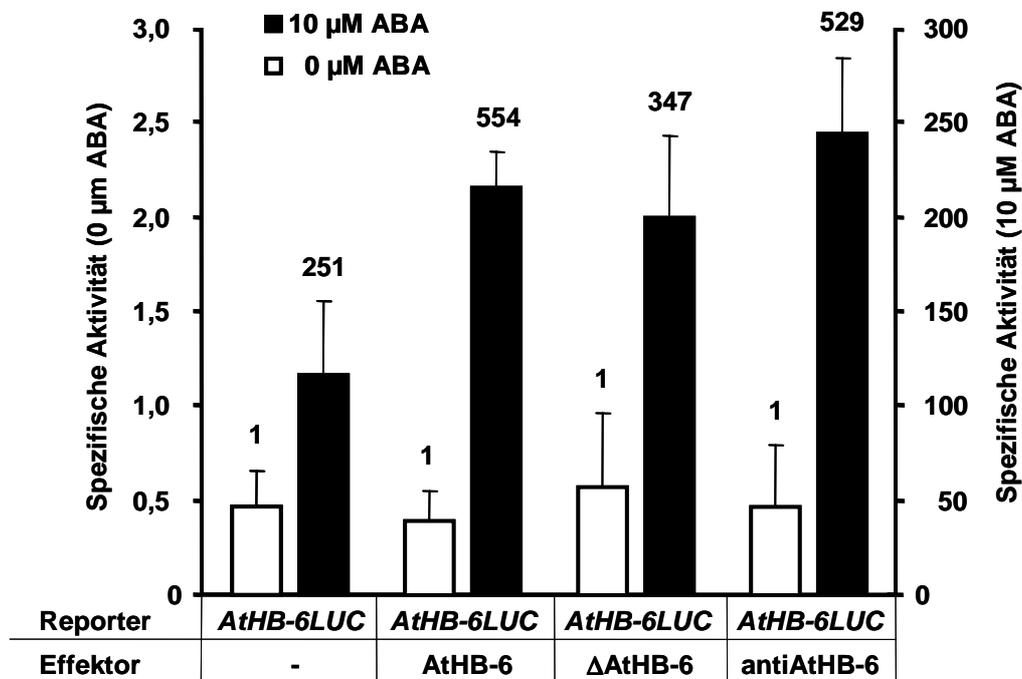


Abb. 65: Kreuzungen zwischen Transgenen ($35S_{AtHB-6}$; $35S_{antiAtHB-6}$ und $35S_{\Delta AtHB-6}$) und der AtHB-6LUC-Reporterlinie. Dargestellt ist die spezifische Aktivität bei 0 und 10 μM ABA. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Parallelen, die Zahlen geben die Induktionsfaktoren an.

3.8. Membranpotentialmessungen

Neben den beschriebenen Effekten auf die Genregulation können auch andere durch Abscisinsäure hervorgerufenen Veränderungen in der Zelle zur Charakterisierung von Mutanten und Untersuchung der Signaltransduktion genutzt werden. ABA führt zu sehr schnellen Antworten, die nicht auf differenzierter Genexpression beruhen, sondern welchen eine Änderung in Ionenflüssen zu Grunde liegt. Der durch ABA induzierte Stomataschluß bietet etwa die Möglichkeit diese schnellen Änderungen zu untersuchen. Durch den Einfluß auf die Ionenflüsse führt ABA zu einer Membrandepolarisation (Thiel et al., 1992). Diese meßbaren Depolarisationen können zur Charakterisierung von Pflanzen und zur Analyse der ABA-Signaltransduktion herangezogen werden. Die im folgenden dargestellten Membranpotentialmessungen wurden im Labor von Prof. Dr. J. I. Schröder, *University of*

California, San Diego, durchgeführt. Die ABA-abhängige Membrandepolarisation in *Arabidopsis*-Wurzelzellen wurde untersucht und die Potentialänderung in Wildtyp- und Mutantpflanzen verglichen. **Abb. 66** zeigt die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von Abscisinsäure. Nach der Injektion der Mikroelektrode und Erreichen eines stabilen Potentials wurde die Lösung mit welcher die Pflanze umspült wurde gegen eine Abscisinsäure-haltige Lösung (30 μ M bzw. 1 mM) ausgetauscht. Nach einigen Minuten wurden die Lösungen wieder gewechselt. Bei einer ABA-Konzentration von 1 mM ergab sich eine deutliche Depolarisation des Membranpotentials (etwa 40 mV). Dagegen führte eine 30 μ M ABA-Konzentration zu einer schwachen Hyperpolarisation (etwa 10 mV).

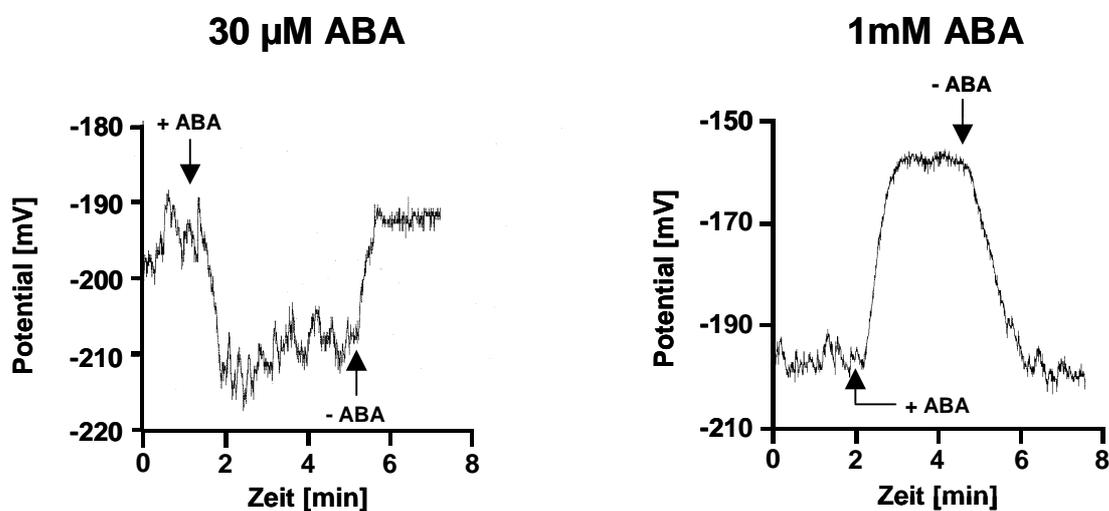


Abb. 66: Membranpotentialmessung an *La-er*-Wurzelzellen. Die Graphen zeigen die Potentialänderung bei Zusatz von Abscisinsäure (30 μ M bzw. 1 mM).

Zur Kontrolle der ABA-Spezifität der Antwort wurde an Stelle von ABA Buttersäure als schwache Säure eingesetzt. Der erste Graph in **Abb. 67** zeigt den Effekt von 1 mM Buttersäure auf das Membranpotential. Die zweite Kurve stellt zum direkten Vergleich die Wirkung von 1 mM ABA und 1 mM Buttersäure gegenüber. 1 mM Buttersäure führt im Gegensatz zu Abscisinsäure zu einer Hyperpolarisierung. Damit ist die durch ABA hervorgerufene Depolarisierung nicht durch die Säurefunktion des Moleküls bedingt.

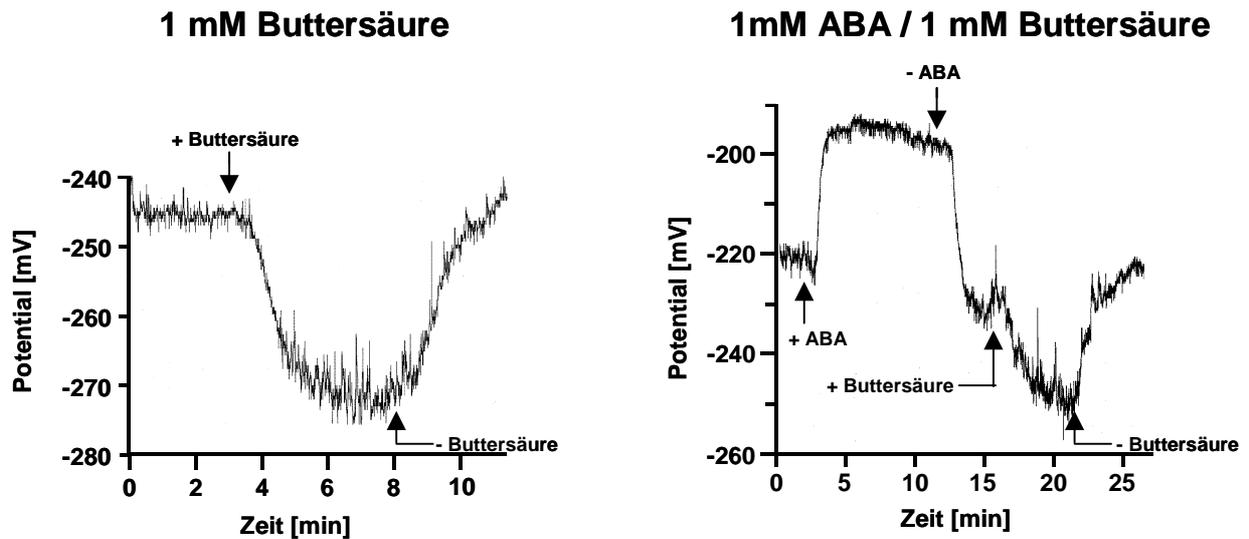


Abb. 67: Buttersäure als Kontrolle der ABA-vermittelten Membrandepolarisation. 1 mM ABA führt zu einer Depolarisation, 1 mM Buttersäure dagegen zu einer Hyperpolarisation.

Neben *La-er* wurde *gca2* als ABA insensitive Mutante bei Membranpotentialmessungen eingesetzt (**Abb. 68**). Für die Mutante ergaben sich wesentlich geringere Effekte als im Wildtyp. Bei 1 mM ABA war eine geringe Depolarisation feststellbar (etwa 10 mV), bei 30 μ M Abscisinsäure war kein Unterschied zum Hintergrundrauschen nachweisbar. Die Membranpotentialmessung ist damit eine weitere Möglichkeit sehr schnell eintretende ABA-Effekte zu untersuchen und auf diese Weise Mutanten zu charakterisieren.

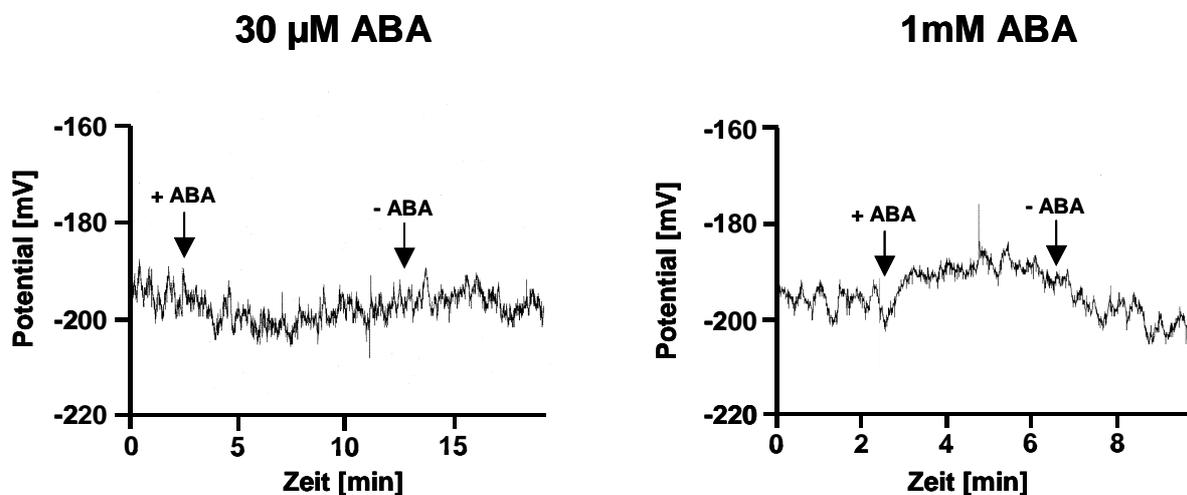


Abb. 68: Membranpotentialmessung in *gca2* in Abhängigkeit von ABA (30 μ M, 1 mM).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde neben Membranpotentialmessungen die Verwendung eines transienten Expressionssystems zur Untersuchung der ABA-Signaltransduktion beschrieben. ABA-regulierte Reportergenkonstrukte wurden zur transienten Expression eingesetzt, um die ABA-Signalkaskade in transienten Expressionsstudien zu analysieren. Bekannte Effektoren der ABA-Signaltransduktion wurden daher im transienten System näher charakterisiert. So gewonnene Ergebnisse aus transienten Expressionsexperimenten wurden mit Hilfe transgener Reporterlinien auf ihre Übertragbarkeit *in planta* überprüft. Im Nachfolgenden soll die Verwendung von transienter Expression in *Arabidopsis* Protoplasten als Modellsystem und die Analyse der ABA-Signaltransduktion mit diesem System beziehungsweise durch Membranpotentialmessungen diskutiert werden.

4.1. Transiente Expressionsstudien ein Modellsystem?

Verschiedene Methoden wie Partikelbeschuss (Klein et al., 1987), Mikroinjektion (Wu et al., 1997) und Protoplastentransfektion (Abel und Theologis, 1994) können zur transienten Expression in Pflanzenzellen eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit beschriebene PEG-vermittelte Protoplastentransfektion bietet neben der einfachen Durchführung im Vergleich zu den anderen transienten Expressionsmethoden den Vorteil, daß zur Transfektion eine homogene Zellsuspension verwendet wird die eine freie Zugänglichkeit der Gene für jede Zelle in definierter Konzentration ermöglichen (Potrykus, 1991). Im Unterschied zur Analyse in transgenen Pflanzen ist der Zeitaufwand zur Untersuchung der Genregulation in allen transienten Systemen relativ gering. Zum Beispiel sind für die Generierung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen und die anschließende Analyse cirka 4 Monate nötig, wogegen der direkte Gentransfer durch PEG in Protoplasten und Analyse der Genregulation nur 3-5 Tage in Anspruch nimmt.

Als Grundlage für das in dieser Arbeit beschriebene transiente Expressionssystem wurde die Methode von Abel und Theologis (1994) zur Protoplastentransfektion eingesetzt. Die PEG-vermittelte Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten und darauffolgende Regeneration stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen wurde bereits von Damm et al. (1989) beschrieben. Ausgehend von Zellsuspensionskulturen optimierten Doelling und Pikaard (1993) die transiente Expression von Luciferase unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in *Arabidopsis*-Protoplasten. Abel und Theologis (1994) schließlich nutzten Protoplasten isoliert aus *Arabidopsis*-Blättern zur Polyethylenglycol-vermittelten Transfektion. Sowohl die subzelluläre Lokalisation einer Reportergenfusion (β -D-Glucuronidase mit IAA1 zur Kernlokalisation) wie auch die Pflanzenhormon-abhängige Regulation eines

Reportergenkonstrukts (Auxin-vermittelte Regulation des PS-IAA1/5 Promotors fusioniert an CAT) wurde im transienten Expressionssystem beispielhaft von Abel und Theologis (1994) gezeigt.

In dieser Arbeit sollten sich in transienten Expressionsstudien als funktionelles Modellsystem in vereinfachter Weise neue Aspekte zum Untersuchungsgegenstand, der ABA-Signaltransduktion ergeben. Der erste Schritt zum Modellsystem war die konstitutive Expression von Reportergenen zur Überprüfung der transienten Expression in *Arabidopsis* Protoplasten. Entscheidenden Einfluß auf die Reporterexpression zeigte die Protoplastierung. Durch Modifikation der zum Verdau verwendeten Enzymlösung konnte eine wesentliche Verbesserung der Expression und damit Reproduzierbarkeit des Systems erreicht werden. Für eine Enzymlösung entsprechend den Angaben aus der Literatur (Abel und Theologis, 1994) ergab sich über die Verdauzeit eine Verringerung der Reporteraktivität bis auf ein Neuntel des Ausgangswertes wogegen bei modifizierter Enzymlösung die Aktivität sogar zunahm (siehe 3.1.1.). Die Modifikation der Lösung, der Zusatz von BSA, die Hitze- sowie PMSF-behandlung und Dialyse führt vermutlich zu einer Inaktivierung vorhandener Proteasen in den zum Verdau der Zellwand benutzten Enzymfraktionen. Bei langer Verdauzeit mit unbehandelter Enzymlösung werden die Protoplasten stark geschädigt im Gegensatz zur Verwendung der modifizierten Enzymlösung, nachweisbar durch Färbung der überlebenden Protoplasten mit FDA (**Abb. 69**).

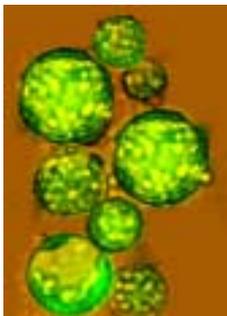


Abb. 69: Mit Fluoresceindiacetat (FDA) gefärbte Protoplasten aus RLD-Blättern.

Zum Test der Nachweisverfahren verschiedener Reporter wurden die entsprechenden Gene unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors transient in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert. Dabei zeigte sich, daß bei verschiedenen Ökotypen eine unterschiedlich hohe Glucuronidase-Hintergrundaktivität vorhanden war. In *La-er* wurde eine etwa 4-fach höhere Hintergrundaktivität gemessen als in RLD (siehe Tab. 6). Endogene GUS-Aktivitäten zeigen sich auch in anderen Pflanzen wie Tabak oder Reis (Kosugi et al., 1990). Kosugi et al. (1990) fanden beim Zusatz von Methanol zum Substratpuffer eine Unterdrückung endogener GUS-Aktivitäten. Für einen möglichst empfindlichen Nachweis ohne Hintergrundaktivitäten

schied GUS dementsprechend zur Anwendung in *La-er* als reguliertes Reporter-gen aus. Luciferase und Apoaequorin konnten hingegen wegen geringer oder nicht vorhandener Hintergrundaktivität sehr empfindlich im Luminometer nachgewiesen werden, weshalb für die meisten Experimente diese Reporter-gene Verwendung fanden.

Untersuchungen der Abhängigkeiten der Reporter-genaktivitätsmessung (siehe Abb. 10, 13) ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Aktivität des Reporters. Die Reproduzierbarkeit der Messungen bei Verwendung von Protoplasten der gleichen Isolation ergab eine maximale Abweichung um etwa den Faktor 2 (vgl. Abb. 14). Obwohl möglichst konstante Bedingungen bei den Experimenten hinsichtlich Pflanzenmaterial und Protoplastierung gewählt wurden, können Transfektionen an verschiedenen Tagen bei Vergleich der Aktivitäten zu sehr hohen Expressionsschwankungen, bis Faktor 100 führen (vgl. Abb. 28). Ähnliche Ergebnisse beschreiben Luehrsen et al. (1992) bezüglich Expressionsschwankungen in Maisprotoplasten mit Variationen um einen Faktor 50.

Verschiedene Parameter beeinflussen die Effizienz der Transfektion und führen zu Expressionsschwankungen beim Vergleich unabhängiger Transfektionen. Eine wesentliche Rolle spielt das Pflanzenmaterial, bedingt vermutlich durch nicht faßbare Umwelteinflüsse selbst bei Anzucht in Phytokammern (Doelling und Pikaard, 1993). Neben der Verdauzeit und möglicher Nebenaktivitäten der Protoplastierungslösung (siehe Abb. 5, 6; Tab. 3) wirkt sich die Reinheit der DNA (Nunberg und Thomas, 1993) auf die Reporter-genexpression aus. Zusätzlich ist die Expression abhängig von der eingesetzten DNA-Menge und der Inkubationszeit der Protoplasten. Zwischen eingesetzter DNA-Menge und Reporteraktivität ergab sich für konstitutiv exprimierte Reporter ein etwa linearer Zusammenhang (vgl. Abb. 10). Der untersuchte zeitliche Verlauf der Expression von Reportern unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors zeigt über 48 h eine stetige Zunahme der Expression (vgl. Abb. 11, 12) entsprechend den Untersuchungen von Abel und Theologis (1994), die eine Zunahme der GUS-Aktivität über 36 h beobachteten.

Eine Voraussetzung, die transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem zur Untersuchung der Abscisinsäure-Signaltransduktion einzusetzen, ist der Nachweis einer ABA-Antwort in diesem System. Abscisinsäure reguliert die Expression verschiedener Gene (Chandler und Robertson, 1994). Für *RAB18* (Lang und Palva, 1992), *RD29B* (Nordin et al., 1993; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994), *AtHB-6* (Söderman et al., 1999) und *CDC2A* (Hemerly et al., 1993) wurde die ABA-abhängige Regulation in Northern beziehungsweise RTPCR-Experimenten untersucht (siehe Abb.: 15, 16). Dabei ergab sich eine starke Induktion durch ABA von *RAB18*, *RD29B* und *AtHB-6* (vgl. Abb. 15). *CDC2A* wurde nicht von ABA reguliert (siehe Abb. 17). Durch ABA-regulierte Promotoren, fusioniert an einfach nachweisbare Reporter-gene, sollte bei erfolgreicher Transfektion und Expression

der Reporterkonstrukte durch Analyse der Reporteraktivität in Abhängigkeit exogen angebotener Abscisinsäure die Weiterleitung des Abscisinsäuresignals bis zur Genexpression nachprüfbar sein. Dementsprechend wurden die Promotoren von *RAB18*, *RD29B* und *AtHB-6* zur Klonierung von Reportergenkonstrukten für die transiente Expression eingesetzt. Zusätzlich als Kontrolle des transienten Systems wurden die gleichen Reportergenkonstrukte in einen binären Vektor, pBIAscl (siehe 3.7., Abb. 60), zur Pflanzentransformation kloniert.

In transienten Expressionsexperimenten mit Tabak und Mais wurden verschiedene durch ABA-regulierte Promotoren oder Promotorelemente untersucht, wie die ABA-abhängige Regulation des *HVA1*- und *RBCS*-Promotors in Maisprotoplasten (Sheen, 1996 und Sheen, 1998). Kovtun et al. (2000) haben die Induktion des *RD29A*-Promotors in *Arabidopsis*-Protoplasten beschrieben. In *Arabidopsis* und Tabakpflanzen konnte der durch ABA-induzierbare *ADH1*-Promotor durch Expression des Transkriptionsfaktors AtMYB2 *in trans* aktiviert werden (Hoeren et al., 1998). In Transaktivierungsexperimenten in *Arabidopsis*-Protoplasten wurde die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren AREB1 und AREB2 an der ABA-vermittelten Induktion des *RD29B*-Promotors (Uno et al., 2000) nachgewiesen. Entsprechend wurde die Transaktivierung des ABA-induzierbaren *RD22*-Promotors durch RD22BP1 und AtMYB2 in *Arabidopsis*-Protoplasten gezeigt (Abe et al., 1997). Eine genaue Analyse eines durch ABA regulierten Reporters im transienten homologen Expressionssystem bezüglich etwa der ABA-Konzentrations-, Plasmidmengen- oder Inkubationszeitabhängigkeit wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Zur weiteren Absicherung der ABA-Abhängigkeit der Reporterexpression wurde dementsprechend die Zeit-, Plasmidmengen- und ABA-Abhängigkeit der Reporteraktivität detaillierter untersucht (siehe Abb. 25, 26, 27).

Im transienten Expressionsexperiment führt sowohl der *RD29B*-Promotor wie auch der *RAB18*-Promotor, fusioniert an das Luciferasegen, zu einer hohen ABA-vermittelten Induktion (vgl. Abb. 24) mit Aktivitätsanstiegen bis zu Faktor 22.

Zur Verringerung der experimentiellen Streuung wurde bei transienten Expressionen ein interner Standard verwendet. Eingesetzt wurden konstitutiv exprimierte Reportergene unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors zur Expression von β -D-Glucuronidase beziehungsweise Apoaequorin. In der Regel findet man jedoch große Übereinstimmung oder nur geringe Abweichungen bis zu etwa 25 % beim Vergleich standardisierter mit nicht normalisierten Aktivitäten (vgl. Abb. 28).

Entsprechend der zeitabhängigen Expression konstitutiv exprimierter Reporter (vgl. Abb. 11, 12) nimmt die Aktivität der ABA-regulierten Konstrukte *RD29BLUC* und *RAB18LUC* über die Inkubationszeit zu (siehe Abb. 25). Interessanterweise ergeben sich für das Verhältnis aus induzierter zu nicht induzierter Aktivität nach längerer Zeit höhere Induktionswerte (**Abb. 70**).

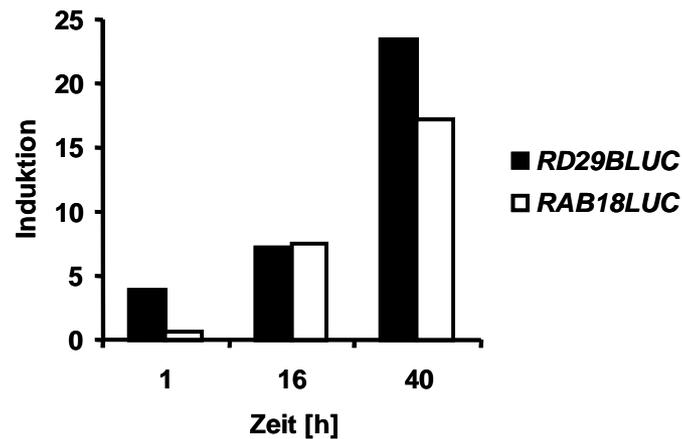


Abb. 70: Zunahme der ABA-abhängigen Reporterinduktion über die Zeit.

Bei gleicher Zunahme beider Aktivitäten, induziert und nicht induziert, über die Zeit würde das Verhältnis der Aktivitäten, induziert zu nicht induziert abnehmen. Damit läßt sich vermuten, daß nach längerer Inkubations- und Regenerationszeit der Protoplasten nicht nur die Fähigkeit zur Expression eingebrachter Konstrukte zunimmt, sondern auch die Antwort auf exogen angebotene Abscisinsäure verstärkt wird. Der Proteinturnover und die ABA-Aufnahme könnten sich ändern. Möglicherweise werden limitierende Faktoren der Signalkaskade erst nach einiger Zeit in ausreichendem Maß gebildet oder inhibierend wirkende Faktoren werden nach einiger Zeit inaktiviert. Entsprechend der verstärkten ABA-Wirkung auf *RD29BLUC* und *RAB18LUC* nach längerer Inkubationszeit zeigt sich nach etwa 24 h ein Effekt von Abscisinsäure auch auf konstitutiv exprimierte Reporter. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Apoaequorinexpression unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors mit beziehungsweise ohne ABA nimmt nach etwa 24 h die Aequorinaktivität aus mit ABA behandelten Protoplasten weniger stark zu als bei Protoplasten, die ohne ABA inkubiert werden (vgl. Abb. 25). Abscisinsäure als generelles Stresshormon (Chandler und Robertson, 1994) scheint die Stoffwechselaktivität an sich herabzusetzen. Möglicherweise wird durch Abscisinsäure die mRNA-Prozessierung beeinflusst, worauf neueste Befunde der Beteiligung von ABH1 als mRNA-Cap-Bindeprotein an der ABA-Signaltransduktion hinweisen könnten (Hugouvieux, et al., 2001). Dieser ABA-Effekt auf den internen Standard führt bei Betrachtung der relativen Aktivitäten, des Verhältnisses der Aktivitäten zwischen reguliertem und als Standard verwendeten Konstrukt, zu einer Erhöhung des ABA-Effektes. Ingesamt läßt sich aus den Ergebnissen zum zeitlichen Expressionsverlauf feststellen, daß die Inkubationszeit die ABA-Induktion, das Verhältnis der Aktivitäten aus mit ABA zu ohne ABA inkubierten Protoplasten wesentlich beeinflusst. Für den Vergleich verschiedener

Experimente ist entsprechend die Einhaltung gleicher Inkubationszeiten bei unterschiedlichen Transfektionen entscheidend.

Zur Untersuchung der Plasmidmengen- und Abscisinsäurekonzentrationsabhängigkeit der Reporterexpression wurden verschiedene Mengen an ABA-reguliertem Reporterkonstrukt transfiziert und die Protoplasten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen inkubiert (vgl. Abb. 26). Für die Expression der Reporter in Abhängigkeit der ABA-Konzentration wäre für einen bestimmten Konzentrationsbereich eine Proportionalität zwischen Enzymaktivität und dem Logarithmus der ABA-Konzentration zu erwarten, entsprechend dem Kurvenverlauf bei der Untersuchung des Primärwurzelwachstums in Abhängigkeit der ABA-Konzentration (Ehrler, 1997). Zwischen 0,1 und 10 μM ABA ergibt sich in semilogarithmischer Darstellung ein linearer Zusammenhang zwischen Primärwurzellänge und ABA-Konzentration. Im transienten Expressionsexperiment zeigte sich entsprechend ein linearer Zusammenhang zwischen der Reporteraktivität, *RD29BLUC* oder *RAB18LUC*, und dem Logarithmus der ABA-Konzentration (vgl. Abb. 26).

Damit ergeben sich Parallelen zu psychophysischen Beziehungen wie etwa beim Sehen oder Hören. Reizstärke-Reaktionsbeziehungen können durch die Formel $R = a \frac{I}{b + cI}$ (R=Reaktion; I=Reizintensität; a,b,c=Konstanten) beschrieben werden (Hoppe et al., 1982). In begrenzten Bereichen gilt als Näherung das Weber-Fechner-Gesetz $R = a \log I + b$ (R=Reaktion; I=Reizintensität; a,b=Konstanten). Demnach ist die Reaktion proportional zum Logarithmus der Reizintensität (Spada, 1992). Bezogen auf den Zusammenhang zwischen ABA-Konzentration und Reporteraktivität bedeutet dies, daß die ABA-Konzentrationserhöhung, die zu einer Aktivitätszunahme führt, in einem konstanten Verhältnis zur vorhandenen ABA-Konzentration steht. Diese ABA-abhängige Signaländerung spricht für die Funktionalität des transienten Expressionssystems als Modellsystem zur Untersuchung der ABA-Signaltransduktion.

Die Variation der zur Transfektion eingesetzten Plasmidmenge führte zu einer veränderten Abscisinsäure-abhängigen Signaländerung des Systems. Im transienten Expressionssystem ergab sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Plasmidmenge und der Enzymaktivität des ABA-regulierten Reporters. Mit steigender Menge an Reporter-genplasmid nimmt die resultierende Reporterexpression zu. Entsprechend ist die ABA-abhängige Signaländerung, die Aktivitätsänderung bezogen auf den Logarithmus der ABA-Konzentration beschrieben durch die Steigung der Regressionsgeraden in semilogarithmischer Darstellung in etwa linear abhängig von der eingesetzten Plasmidmenge (**Abb. 71**; vgl. Abb. 27).

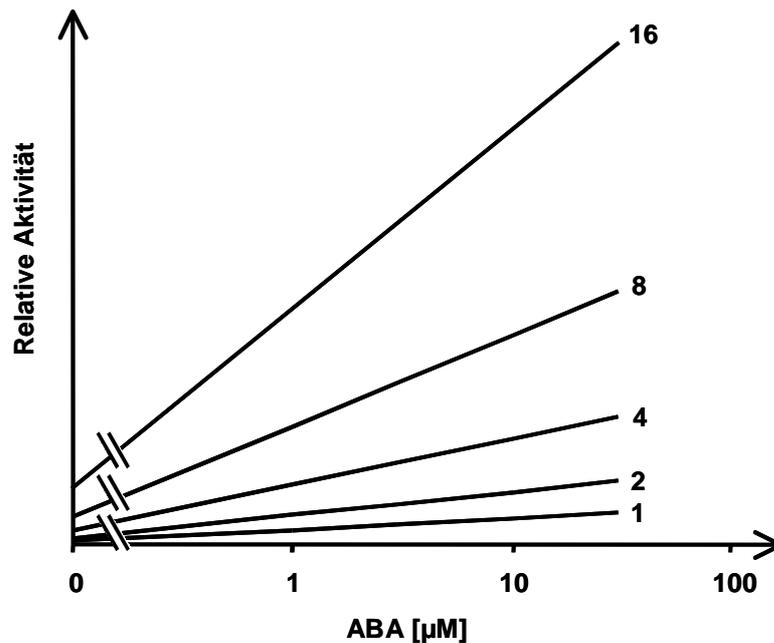


Abb. 71: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen ABA-Konzentration, Plasmidmenge (1;2 4; 8; 16-fache Menge) und Reporteraktivität.

Zu vermuten war, daß bei Erhöhung der Plasmidmenge des ABA-regulierten Reporter-genkonstrukts die Expression des Reporters in entsprechendem Maße zunimmt. Ohne Limitierungen aus dem System führt eine größere Anzahl an Promotoren zu einer erhöhten Transkription und schließlich Expression der Reporter. Zwischen eingesetzter Plasmidmenge und Enzymaktivität besteht eine direkte Proportionalität. Die Genexpression ist in diesem Rahmen durch die Plasmidmenge pro Protoplast nicht limitiert. Damit bleibt die ABA-abhängige Induktion der Reporter, das Verhältnis der Aktivitäten aus mit ABA inkubierten Protoplasten zu ohne ABA behandelten Protoplasten unverändert, die ABA-abhängige Signaländerung des Systems, die absolute Aktivitätszunahme bei Erhöhung der Abscisinsäurekonzentration nimmt jedoch mit steigender Plasmidmenge zu.

Damit läßt sich feststellen, daß die transiente Expression ABA-regulierter Reporter-genkonstrukte in Protoplasten als ABA-reguliertes Meßsystem funktionieren kann, wobei verschiedene Parameter die Reporterexpression und -regulation beeinflussen. Auswirkungen auf die Expression der Reporter haben das Pflanzenmaterial, die Behandlung der Protoplastierungslösung, die Verdauzeit, die Reinheit der DNA, die eingesetzte Plasmidmenge und die Inkubationszeit der Protoplasten. Die Induktion des Reporters ist direkt abhängig von der Inkubationszeit; mit längerer Inkubation nimmt die ABA-vermittelte Induktion zu. Die ABA-abhängige Signaländerung des Systems kann variiert werden durch Veränderung der eingesetzten Plasmidmenge des regulierten Reporter-genkonstrukts.

Daraus ergeben sich für den Vergleich verschiedener Experimente die folgenden Konsequenzen. Das Pflanzenmaterial sollte unter gleichen Bedingungen angezogen werden, die gleiche Präparation der Protoplastierungslösung und der DNA, sowie dieselbe DNA-Menge sollte verwendet werden und gleiche Inkubationszeiten sollten eingehalten werden. Durch Verwendung eines internen Standards können Abweichungen, die sich etwa durch das Pflanzenmaterial oder die Protoplastierungslösung ergeben, verringert werden.

Als weiterer Test der Funktionalität des Modellsystems wurde die ABA-abhängige Reporterexpression in Wildtyp- und Mutantenprotoplasten verglichen und der ABA-Regulation in transgenen Reporterlinien und Kreuzungen zwischen den Transgenen und Mutanten gegenübergestellt.

Zunächst zeigt die Betrachtung der Reporterexpression in Mutanten- und Wildtypprotoplasten für die ABA-vermittelte Induktion und die ABA-abhängigen Signaländerung in den meisten Fällen die gleiche Tendenz. Bei der hypersensitiven Mutante *ahr1* etwa liegen sowohl die Werte für die ABA-abhängige Signaländerung wie auch für die Induktion höher als beim Wildtyp, bei der insensitiven Mutante *abi1* dagegen sind die Werte für die Mutante geringer als beim Wildtyp. Am deutlichsten wird der Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp beim Vergleich der ABA-abhängigen Signaländerung.

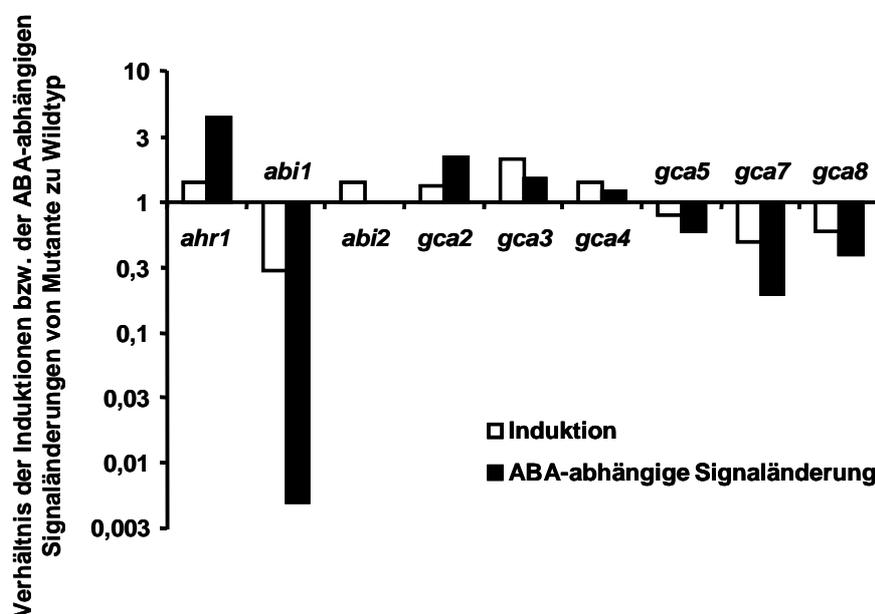


Abb. 72: Quotienten der Induktions- bzw. der ABA-abhängigen Signaländerung der *RAB18LUC*-Expression in Mutanten- und den entsprechenden Wildtypprotoplasten. Induktion ist das Aktivitätsverhältnis der Reporterexpression bei 30 μM ABA zu 0 μM ABA, die ABA-abhängige Signaländerung ist beschrieben durch die Aktivitätsänderung bezogen auf den Logarithmus der ABA-Konzentration.

Abb. 72 zeigt die Quotienten aus Mutanten- zu Wildtypwerten der Induktion beziehungsweise der ABA-abhängigen Signaländerung der *RAB18LUC*-Expression.

Es ergeben sich beim Vergleich der Werte für die Induktion mit denen für die ABA-abhängige Signaländerung wesentlich größere Unterschiede zwischen Mutanten- und Wildtypprotoplasten bei den Werten für die ABA-abhängige Signaländerung. Die Quotienten der Werte für die ABA-abhängige Signaländerung liegen zwischen 0,01 für *abi1* und 8 für *ahr1*, was einer etwa 100-fach geringeren beziehungsweise 8-fach höheren Aktivitätsänderung bezogen auf den Logarithmus der ABA-Konzentration der Mutante entspricht (siehe Abb. 29). Das Verhältnis der Induktionswerte dagegen liegt zwischen 0,3 für *abi1* und 3 für *ahr1*, was jeweils eine etwa 3-fache Änderung gegenüber dem Wildtyp darstellt.

Damit scheinen verlässlichere Aussagen zur Charakterisierung der Mutanten über die ABA-abhängige Signaländerung möglich zu sein. Endogen vorhandene Abscisinsäure kann beispielsweise unterschiedlich Einfluß nehmen auf die Induktion und die ABA-abhängige Signaländerung. Eine höhere Reporterexpression ohne exogen applizierte Abscisinsäure bedingt durch endogene ABA würde bei gleicher ABA-abhängiger Signaländerung zu einem kleineren Verhältnis von induzierter zu nicht induzierter Reporteraktivität und damit zu einer geringeren Induktion führen. Entsprechend wird durch die Induktion bei endogen vorhandener Abscisinsäure die ABA-Antwort nicht mehr erfaßt. Daraus läßt sich schließen, daß für die Untersuchung der ABA-Antwort etwa zum Vergleich von Wildtyp und Mutanten die ABA-abhängige Signaländerung geeigneter ist als die Induktion. Zudem repräsentieren in den angeführten Beispielen die Werte für die ABA-abhängige Signaländerung mehr Meßdaten als die einfache Induktion. Auftretende Schwankungen bei einzelnen Messungen wirken sich aus diesem Grund bei Verwendung der ABA-abhängigen Signaländerung zur Charakterisierung der Mutanten weniger stark aus.

Schließlich wurden zur Kontrolle der Funktionalität des Modellsystems die Ergebnisse aus den transienten Expressionsexperimenten verglichen mit der Reporterregulation in transgenen Reporterlinien und entsprechenden Kreuzungen. Die ABA-abhängige Reporterregulation in transgenen Pflanzen mit *RD29BLUC* und *AtHB-6LUC* als ABA-reguliertem Reportergenkonstrukt ergab in beiden Fällen eine starke ABA-abhängige Induktion des Reporters (vgl. Abb. 61, 62). Im Gegensatz dazu war in Protoplasten keine ABA-abhängige Regulation von *AtHB-6LUC* nachweisbar, weder bei transienter Expression (siehe Abb. 24) noch bei Verwendung von Protoplasten aus transgenen Reporterpflanzen (vgl. Abb. 63). Dies zeigt deutlich Limitierungen des transienten Expressionssystems.

Verschiedene Gründe können verantwortlich sein für die fehlende Induktion von *AtHB-6LUC* in Protoplasten. Zum einen wird durch die Verwendung von Blättern zur Protoplastierung

eine gewebsspezifische Expression in anderen Geweben nicht mehr erfaßt. Im Fall von AtHB-6 wurde jedoch die Expression in Blättern von Söderman et al. (1999) gezeigt.

Zum anderen führt die Verletzung der Pflanze bei der Protoplastierung zur Aktivierung oder Inhibierung von Signalkaskaden. Signaltransduktionswege von Pflanzenhormonen sind beteiligt an einem komplexen Netzwerk, das für die Steuerung verschiedenster Prozesse verantwortlich ist und können sich gegenseitig beeinflussen (Davies, 1995). Mutanten, die bezüglich eines Effekts auf ein Pflanzenhormon isoliert worden sind zeigen dementsprechend oft auch veränderte Sensitivität gegenüber ein anderes Pflanzenhormon (Ross und O'Neill, 2001).

Bei der Protoplastierung wird beispielsweise Ethylen gebildet (Krens et al., 1994). Beaudoin et al. (2000) und Ghassemian et al. (2000) haben eine starke Interaktion zwischen den Ethylen- und Abscisinsäuresignaltransduktionswegen gezeigt. In *Arabidopsis* wirken Abscisinsäure und Ethylen antagonistisch auf die Samendormanz. Ethylen fördert die Keimung indem es als negativer Regulator der ABA-Signalkaskade wirkt. Im Gegensatz dazu kann sowohl Abscisinsäure wie auch Ethylen zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums führen. Eine mögliche Erklärung ist, daß für die Inhibierung des Wurzelwachstums durch ABA und Ethylen ein gemeinsamer Signalweg besteht. Ethylen und ABA könnten kompetieren bezüglich der Aktivierung dieses Signalweges. Damit könnte eine verringerte ABA-Sensitivität bei hoher Ethylenkonzentration erklärt werden (Ghassemian et al., 2000). Entsprechend könnte in Protoplasten durch die Interaktion der Ethylen- und ABA-Signalkaskaden die AtHB-6LUC-Regulation beeinflusst werden. Das vorhandene Ethylen könnte eine ABA-abhängige Reporterregulation inhibieren. Die Reporterregulation in den transgenen Pflanzen bei simultaner Applikation von Ethylen und Abscisinsäure im Vergleich zu einzeln angebotenen Hormonen könnte einen Hinweis auf die Beteiligung der Ethylensignaltransduktion an der Reporterregulation geben. Möglicherweise werden die verschiedenen getesteten Promotoren durch unterschiedliche ABA-Signalwege, zum Teil ethylenabhängig zum Teil unabhängig induziert.

Schließlich könnte auch der Abbau der Zellwand über *stretch*- oder mechano-sensitive Kanäle die ABA-Signaltransduktion beeinflussen. In Schließzellen beispielsweise beschreibt MacRobbie (1998) eine mögliche Interferenz von ABA mit einem Kontrollsystem durch welches Zellvolumen oder Turgor erfaßt werden etwa über *stretch*- beziehungsweise mechano-sensitive Kanäle.

Der Vergleich der Ergebnisse aus transienter Expression in Protoplasten der *gca2*, *gca7*, *abi1* und *ahr1* Mutanten und entsprechenden Wildtyppflanzen mit Kreuzungen zwischen diesen Mutanten und der *AtHB-6LUC*-Reporterlinie zeigt deutlich Übereinstimmungen (vgl. Abb. 64) und damit die Verwendbarkeit des Modellsystems zur Analyse und Charakterisierung der ABA-Signaltransduktion. Für *abi1*, *ahr1* und *gca2* ergab sich für die

Kreuzungen das gleiche Bild wie im transienten Modellsystem. Überraschenderweise verhielt sich in beiden Systemen *gca2* bezüglich der Genregulation hypersensitiv, obwohl die Mutante ansonsten als ABA-insensitiv charakterisiert wurde (Benning, 1999). Im Gegensatz zum transienten System entsprach die Kreuzung mit *gca7* bezüglich der ABA-Regulation dem Wildtyp. In Protoplasten zeigte die Mutante ein insensitives Verhalten gegenüber ABA (vgl. Abb. 28). Neben dem ABA-insensitivem Primärwurzelwachstum ist die *gca7*-Mutante auch in der physiologischen Antwort auf ACC und Ethephon gestört (Ehrler, 1997). Möglicherweise beeinflusst das Vorhandensein sowohl von Ethylen wie auch von ABA in Protoplasten die Regulation der Reporter und beide Pflanzenhormone parallel führen bei *gca7*-Protoplasten im Gegensatz zur Analyse der Kreuzungen zu einer veränderten ABA-Regulation der Reporter.

Aus den gezeigten Ergebnissen und Auswertungen läßt sich feststellen, daß die transiente Expression in *Arabidopsis* Protoplasten als Modellsystem eine sinnvolle Ergänzung etwa zu Untersuchungen in transgenen Pflanzen darstellt. Mit der Kombination aus transienter Expression und Transgenen wurde etwa die Cytokinin-Signaltransduktion analysiert (Hwang und Sheen, 2001) oder die Suppression der Auxin-Signaltransduktion durch eine MAPK-Kaskade (Kovtun et al., 1998) gezeigt.

Hwang und Sheen (2001) haben auf der Basis der transkriptionellen Aktivierung eines Cytokinin-regulierten Gens, *ARR6*, ein transientes Expressionssystem verwendet, mit welchem sie in *Arabidopsis* Protoplasten die Cytokinin-Signaltransduktion untersucht haben. Die Analyse Cytokinin-abhängiger Reporterexpression und Proteinlokalisierung im transienten System zusammen mit transgenen Pflanzen führte zu einem im wesentlichen aus vier Schritten bestehenden Signaltransduktionsweg, der Cytokininrezeption und Signalweiterleitung, der phosphorylierungsabhängigen Translokation von AHP-Proteinen, der ARR-spezifischen transkriptionellen Aktivierung und der negativen Rückkopplung durch Cytokinin induzierter ARR-Gene (**Abb. 73**).

Im transienten Expressionssystem konnte die subzelluläre Lokalisation von CKI1, AHP1, AHP2, ARR2 und ARR6 fusioniert an GFP, wie auch die transkriptionelle Regulation von ARR-Genen durch ARR-Proteine in Zusammenhang mit der Cytokininsignaltransduktion untersucht werden. In Ergänzung mit Transgenen zeigen die von Hwang und Sheen (2001) durchgeführten transienten Expressionsexperimente die Verwendbarkeit der transienten Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten als Modellsystem zur Analyse von Pflanzenhormonsignalkaskaden.

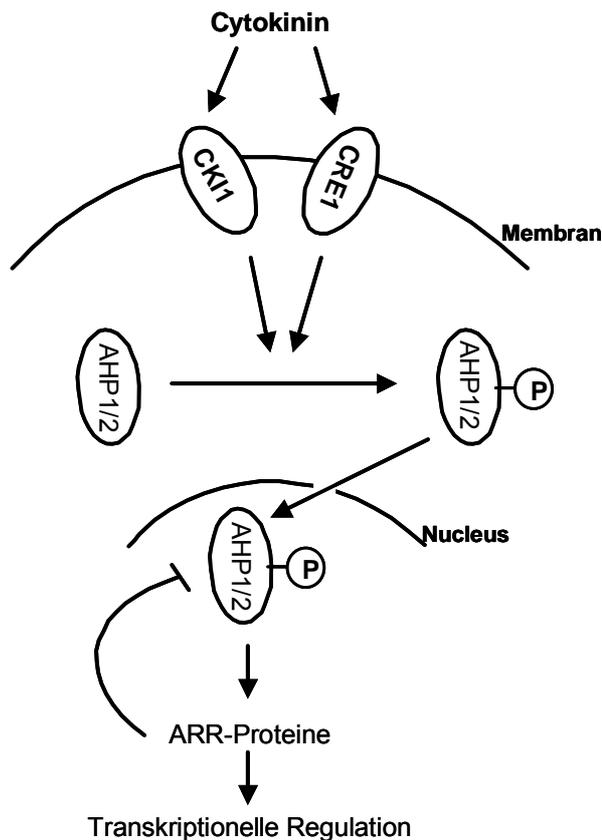


Abb. 73: Vereinfachtes Modell der Cytokinin-Signaltransduktion (Hwang und Sheen, 2001)

Zudem können Limitierungen des Modellsystems, zum Beispiel die unterschiedliche *AtHB-6LUC*-Regulation in Protoplasten und transgenen Reporterlinien, zu neuen Perspektiven einer Fragestellung verhelfen.

Die Arbeit mit Protoplasten bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten. Durch Verwendung unterschiedlichem Pflanzenmaterials zur Protoplastierung können in kurzer Zeit Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden.

Bei genetischen Analysen können zur Komplementation identifizierter Mutanten große genomische DNA-Fragmente (bis zu 80 kb) beispielsweise mittels eines TAC (*transformation-competent artificial chromosome*) Vektors stabil in Pflanzen eingebracht werden (Liu et al., 1999). Zusätzlich zu transgenen Pflanzen bietet die transiente Expression in Protoplasten dabei eine Möglichkeit zur Identifizierung mutierter Gene durch die Transfektion von Cosmiden. Am Beispiel von *ABI1* und *ABI2* wurde im transienten Expressionssystem die Verwendung von Cosmiden zur Isolierung mutierter DNA-Fragmente gezeigt (vgl. Abb. 58 und 59).

Im transienten System können verschiedene Effektoren der Genregulation getestet werden. Pharmakologisch wirksame Stoffe, beispielsweise Inhibitoren wie Tunicamycin als

Glykolisierungsinhibitor (Hwang und Sheen, 2001), Ionophore, wie der Calciumionophor A23187 (Sheen, 1996) oder Antagonisten wie 7-Deaza-8-bromo-cADPR als membrangängiger, hydrolysebeständiger Antagonist der cyclischen ADP-Ribose (Sethi et al., 1997) könnten als Effektoren in transienten Expressionsexperimenten eingesetzt werden. Die Expression von Genkonstrukten, zum Beispiel die Überexpression von an Signaltransduktionswegen beteiligten Komponenten, wie die Überexpression von CKI1 und CRE1 zur Untersuchung der Cytokininsignaltransduktion (Hwang und Sheen, 2001) bietet eine weitere Möglichkeit Effekte auf die Genregulation im transienten System zu analysieren. Denkbar wäre auch die Transfektion von doppelsträngiger RNA um durch RNA-Interferenz (RNA_i) posttranskriptionelles *Silencing* (Waterhouse et al., 2001) und damit einen Effekt auf die Genregulation auszulösen. Mit entsprechenden Reporter-genkonstrukten wie GFP-Fusionen ist im transienten Expressionssystem neben der quantitativen Analyse der Genregulation eine subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen möglich. Der Kernimport und -export kann zum Beispiel untersucht werden (Haasen et al., 1999). Die Abwandlung von Promotoren bietet die Möglichkeit Promotorstudien im transienten System durchzuführen. Damit ergeben sich durch die Variation der Reporter, Effektoren oder Promotoren eine Vielzahl von Anwendungen der transienten Expression als Modellsystem zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen.

4.2. ABA-Signaltransduktion

ABA-Signaltransduktion bezeichnet die Weiterleitung biologischer Information, in diesem Fall die Weiterleitung des Abscisinsäuresignals in der Pflanze. Ein häufig an der Regulation zellulärer Prozesse und Signalweiterleitung in der Zelle beteiligter Mechanismus ist die Proteinphosphorylierung, wie etwa bei MAPKinase-Kaskaden (Mizoguchi et al., 1997) oder Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen (Urao et al., 2000). Proteinphosphatasen wirken als Modulatoren und sichern die Reversibilität der Proteinkinase-Reaktionen. Die Beteiligung von Proteinphosphatasen 2C an der ABA-Signaltransduktion zeigte sich durch die Klonierung der *ABI1* (Meyer et al., 1994) und *ABI2* (Leung et al., 1997; Rodriguez et al., 1998) Gene von *Arabidopsis thaliana*. Für beide Gene ergab sich bei der genetischen Analyse durch Untersuchung intragener Revertanten eine Funktion als negativer Regulator der Abscisinsäure Signaltransduktion (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Überexpressionsexperimente in Maisprotoplasten führten für *ABI1* und einer weiteren Proteinphosphatase 2C *AtPP2C* zu einem entsprechenden Ergebnis und zeigten die Wirkung der Phosphatasen als Inhibitor der ABA-vermittelten Genregulation (Sheen, 1998). Die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression von *ABI1* und *abi1* in *Arabidopsis*-Protoplasten ergab einen negativen Effekt auf die ABA-abhängige Regulation von *RD29BLUC* (siehe

Abb. 32). Dabei wies die Mutantenform einen stärkeren negativen Effekt auf die ABA-Regulation des Reporters auf als die Wildtypform (vgl. Abb. 33). Die N-terminale Region von ABI1 und die inaktive ABI1-Form hatten keine Auswirkung auf die ABA-vermittelte Reporterregulation (siehe Abb. 34). In Mutantenprotoplasten von *gca2* und *ahr1* zeigte sich wie im Wildtyp die inhibierende Wirkung von ABI1 und *abi1*. In beiden Mutanten wurde die Reporterregulation durch Überexpression von *abi1* in größerem Maß beeinflusst als durch ABI1 (vgl. Abb. 35-37).

Entsprechend den Ergebnissen aus Überexpressionsexperimenten ergab der Vergleich der Reporterregulation in Protoplasten aus der *abi1*-Mutante und Wildtypprotoplasten eine Inhibierung der Reporterinduktion in *abi1*-Protoplasten. Sowohl die Induktion durch ABA als auch die ABA-abhängige Signaländerung ist wesentlich geringer als im Wildtyp (vgl. Abb. 28 c, d, 29).

Die Überexpression der zu ABI1 homologen Proteinphosphatase 2C ABI2 führte wie ABI1 zu einer Inhibierung der ABA-vermittelten Reporterinduktion (vgl. Abb. 41). ABI2 wie auch *abi2* wirken als negative Regulatoren in Überexpressionsexperimenten.

Der Vergleich der Reporterregulation in Protoplasten der Mutanten *abi1* und *abi2* ergibt jedoch einen wesentlichen Unterschied zwischen *abi1* und *abi2*. Interessanterweise zeigt sich in *abi1*-Protoplasten ein deutlich insensitives Verhalten bezüglich der ABA-abhängigen Reporterregulation, wogegen in *abi2*-Protoplasten die Reporterinduktion vergleichbar ist mit der in Wildtyp-Protoplasten. In *abi2*-Protoplasten findet sich keine negative Regulatorfunktion bezüglich der Induktion durch ABA oder der ABA-abhängigen Signaländerung (vgl. Abb. 28 e, f, 29). Damit stellt sich die Frage wodurch die unterschiedliche Regulation in den Mutantenprotoplasten bedingt ist.

Für die Funktion von ABI1 beziehungsweise ABI2 als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion scheint die Phosphataseaktivität der Proteinphosphatasen 2C wesentlich zu sein. In Maisprotoplasten zeigte die Überexpression einer inaktiven ABI1-Form im Gegensatz zu ABI1, *abi1* oder einer N-terminal verkürzten Version keinen Einfluß auf die Reporteraktivität (Sheen, 1998). Vergleichbar führte die Überexpression von ABI1, *abi1*, ABI2 oder *abi2* in *Arabidopsis*-Protoplasten zu einem inhibierenden Effekt auf die ABA-vermittelte Reporterinduktion (vgl. Abb. 32, 41). Die Cotransfektion der N-terminalen Region von ABI1 oder einer inaktiven ABI1-Form dagegen ergab keine negative Beeinflussung der Reporterinduktion (siehe Abb. 34). Intragene Revertanten der ABA insensitiven Mutanten *abi1* und *abi2* weisen einen schwach hypersensitiven (*abi1*-1R1 – *abi1*-1R7) oder dem Wildtyp vergleichbaren (*abi2*-1R1) Phänotyp auf. Die entsprechenden Proteine zeigen 1000-beziehungswiese 100-fach niedrigere Phosphataseaktivität als die Wildtypproteine (Merlot et al., 2001). Damit läßt sich eine Abhängigkeit der Regulation der ABA-Signalkaskade durch ABI1 oder ABI2 von der Phosphataseaktivität vermuten. Inaktive Formen zeigten keinen

Effekt oder führten im Falle der intragenen Revertanten zu einem hypersensitiven Verhalten. Allerdings ist in den beiden Abscisinsäure-insensitiven Mutanten, *abi1* und *abi2*, durch den gleichen Aminosäureaustausch von Glycin gegen Asparaginsäure innerhalb der katalytischen Domäne die Phosphataseaktivität stark reduziert auf etwa 5 % (Bertauche et al., 1996; Leube et al., 1998; Leung et al., 1997; Rodriguez et al., 1998; **Abb. 74**).

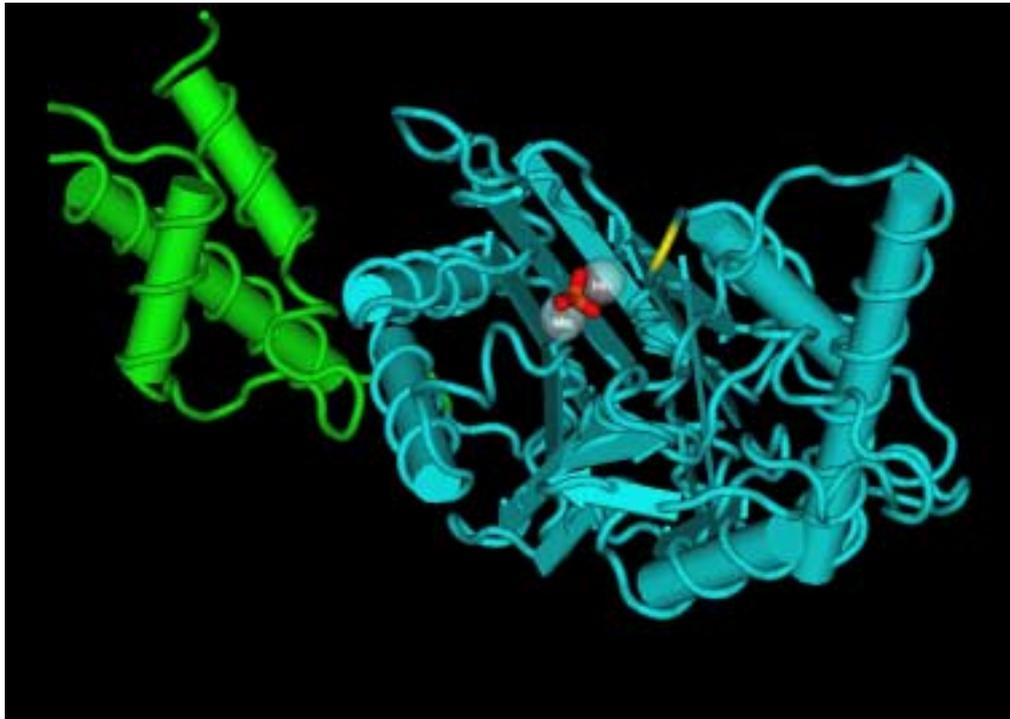


Abb. 74: Kristallstruktur der menschlichen Proteinphosphatase 2C α (Das et al., 1996). Das in den Proteinphosphatasen 2C *abi1* und *abi2* mutierte in der katalytischen Domäne liegende Glycin ist gelb markiert.

Nach obiger Annahme müßten diese Proteine im Vergleich zum Wildtyp eine schwächere Auswirkung auf die Signaltransduktion besitzen. Es ergab sich jedoch ein vergleichbarer oder sogar stärker negativer Effekt in Überexpressionsexperimenten (siehe Abb. 33, 41). Eine mögliche Erklärung für den dominant negativen Effekt von *abi1* und *abi2* sind Konformationsänderungen in der katalytischen Domäne, durch welche Substrate gebunden und der Signalkaskade entzogen werden (Gosti et al., 1999). Beide Phosphatasen, *ABI1* und *ABI2* könnten an einer negativen Rückkopplung der ABA-Signaltransduktion beteiligt sein (Merlot et al., 2001). Durch ABA wird die Phosphataseaktivität erhöht, die Transkription von *ABI1*- und *ABI2* wird induziert. Die Phosphatasen könnten ein an der Signaltransduktion beteiligtes Protein dephosphorylieren und so die Signalkaskade negativ regulieren (**Abb. 75**).

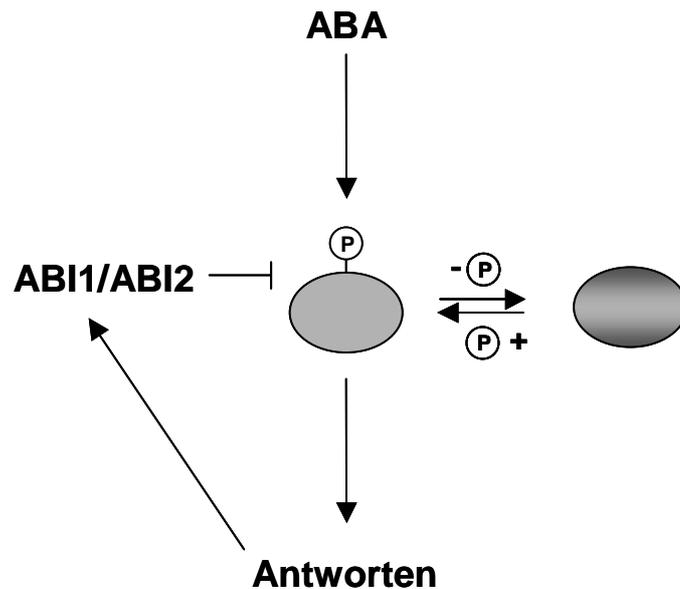


Abb. 75: Modell für die Rolle von ABI1/ABI2 in der ABA-Signaltransduktion (verändert nach Merlot et al., 2001).

Neben ABI1 und ABI2 könnten noch weitere Proteinphosphatasen an der ABA-Signaltransduktion beteiligt sein. Für AtPP2C beispielsweise wurde bei Überexpression in Maisprotoplasten ein zu ABI1 vergleichbarer negativer Effekt auf die Reporterexpression gefunden (Sheen, 1998). In der *Arabidopsis*-Sequenz finden sich etwa 70 putative Proteinphosphatasen 2C (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), von denen nur wenige näher charakterisiert sind wie ABI1, ABI2 oder KAPP (*kinase-associated protein phosphatase*). KAPP ist als negativer Regulator am CLAVATA1 Signaltransduktionsweg, der die Meristementwicklung kontrolliert, beteiligt (Stone et al., 1998). Verschiedene Proteinphosphatasen 2C könnten überlappende Funktion besitzen etwa durch verschiedene Substratspezifität oder Lokalisierung in der Zelle. Damit zeigt sich auch eine mögliche Gefahr von Überexpressionsexperimenten. Durch die massive Expression eines Proteins könnten andere Signalwege, als die an denen das Protein eigentlich beteiligt ist beeinflusst werden (Downward, 2001). Eine Erklärung für die Unterschiede zwischen Überexpressionsexperiment mit ABI1 und ABI2 und der Analyse in Mutantenprotoplasten von *abi1* und *abi2* wäre eine unterschiedliche, gewebsspezifische Expression der Proteine. In Northernexperimenten haben Leung et al. (1997) eine höhere Expression von ABI1 im Vergleich zu ABI2 in Blättern nachgewiesen. Wäre ABI1 in Blättern exprimiert und ABI2 nicht oder in wesentlich geringerem Maß, wäre damit in Protoplasten aus *abi2*-Blättern im Gegensatz zu *abi1* kein Effekt der Mutation auf die Reporterregulation zu erwarten. Durch die konstitutive Überexpression von ABI2 könnte entsprechend der hohen Homologie zu

ABI1 ein Effekt auf die ABA-Signaltransduktion in Blättern auftreten. Allerdings zeigt die *abi2*-Mutante ein deutlich ABA-insensitives Verhalten für den Stomataschluß (Koornneef et al., 1984), was für eine Expression des Proteins zumindest in Stomata spricht. Northern- und Westernexperimente sowie entsprechende Promotor-Reportergerätenkonstrukte könnten Aufschluß über eine gewebsspezifische Expression von ABI1 und ABI2 geben.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Regulation der ABA-abhängigen Reporter in *abi1*- beziehungsweise *abi2*-Protoplasten neben der gewebsspezifischen Expression besteht in der unterschiedlichen Lokalisation der Proteine in der Zelle. Am C-Terminus von ABI1 findet sich im Gegensatz zu ABI2 ein Kernlokalisierungssignal KPRRK (siehe Abb. 38). Durch die unterschiedliche Lokalisation der Proteine könnten sich verschiedene Auswirkungen auf die Genregulation in Mutantenprotoplasten ergeben. Zur Überprüfung wurde in Überexpressionsexperimenten der Effekt von ABI1, ABI2 und einer Fusion zwischen ABI1 und ABI2 untersucht. Für die Fusion wurden die letzten 30 Aminosäuren von ABI2, gegen die entsprechenden das Kernlokalisierungssignal enthaltenden Aminosäuren von ABI1 ausgetauscht. Es ergab sich jedoch für jedes der transfizierten Proteine eine Inhibierung der Reporterexpression und nicht wie in Mutantenprotoplasten für ABI2 keine inhibierende Wirkung auf die ABA-Induktion des Reporters (vgl. Abb. 41). Damit läßt sich keine Aussage über die Beteiligung des Kernlokalisierungssignals an der unterschiedlichen Reporterregulation in Mutantenprotoplasten treffen. Zur weiteren Klärung wurden GFP-Fusionen mit ABI1 und ABI2 (siehe 3.5.) verwendet. Die Fusionsproteine wurden in Protoplasten exprimiert und die Lokalisation in der Zelle untersucht. Als funktionaler Test der Fusionen wurde der Effekt auf die ABA-regulierten Reportergerätenkonstrukte analysiert. Entsprechend den nicht fusionierten Proteinen zeigte sich für jede Fusion eine negative Beeinflussung der ABA-Induktion des Reporters (vgl. Abb. 55). Durch das Kernlokalisierungssignal in der ABI1-Sequenz sollte eine Kernlokalisierung zu erwarten sein. Schließlich konnte jedoch für keines der Proteine eine eindeutige Kernlokalisierung festgestellt werden (siehe Abb. 57). Dagegen zeigte als Kontrolle die GFP-Fusion mit AtHB-6 eindeutig die Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors. Eine mögliche Erklärung für die nicht nachweisbare Kernlokalisation von ABI1 wäre ein Kernexportsignal. Tatsächlich existiert am Carboxy-Terminus von ABI1 ein potentielles Exportsignal (**Abb. 76**).

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

Abb. 76: Mögliches Kernexportsignal (NES) von ABI1. Der Vergleich zeigt die Sequenzen von ABI1, AtRanBP1a (Haizel et al., 1997), Rev (Fischer et al., 1995) und mPKI α (Wen et al., 1995). Die für den Export kritischen hydrophoben Aminosäuren sind grau unterlegt.

Ein Vergleich mit anderen Kernexportsignalen zeigt, daß in ABI1 am Carboxy-Terminus die entsprechenden kritischen hydrophoben Aminosäuren für eine Bindung an AtXPO1, einem Kernexportrezeptor (Haasen et al., 1999) vorhanden sind. Ein ständiger Export aus dem Kern könnte die Anreicherung des Fusionsproteins im Kern verhindern und den Nachweis erschweren.

Damit ist die unterschiedliche Reporterregulation in Mutantenprotoplasten von *abi1* und *abi2* noch nicht geklärt. Für die inhibierende Wirkung von ABI2 könnte ein Kernimport nötig sein. Ohne ein Kernlokalisierungssignal wäre entsprechend in *abi2*-Protoplasten keine Inhibierung der Reporterexpression nachzuweisen. Durch die ektopische Expression könnte jedoch wegen *mistargeting* auch ABI2 im Kern zu finden sein und als negativer Regulator der ABA-Antwort fungieren. Eine Möglichkeit zur weiteren Analyse wäre das putative Kernexportsignal von ABI1 zu mutieren um auf diese Weise eine Anreicherung im Kern zu erreichen und eine eventuelle Kernlokalisierung nachzuweisen.

Als weitere Komponente der ABA-Signaltransduktion wurde als Interaktionspartner von ABI1 in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen AtHB-6 identifiziert (Himmelbach et al., 2001). AtHB-6, ein Homöodomän-Leucin-Zipper-(HD-ZIP)-Transkriptionsfaktor wird wie AtHB-7 und AtHB-12 durch Abscisinsäure reguliert (Söderman et al., 1999). Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren sind charakterisiert durch eine Homöodomäne und einem Leucin-Zipper-Motiv. Die Homöodomäne bestehend aus drei α -Helices stellt das DNA-Bindemotiv des Transkriptionsfaktors dar, der Leucin-Zipper ermöglicht durch die wiederholte Anordnung von Leucin-Resten in einer α -Helix die Dimerisierung von Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (Ruberti et al., 1991).

Die Interaktion von AtHB-6 mit ABI1 korreliert mit der Proteinphosphataseaktivität von ABI1 (Himmelbach et al., 2001). Damit könnte AtHB-6 ein Substrat der Proteinphosphatase 2C ABI1 sein. Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung kann die Funktion von Transkriptionsfaktoren über verschiedene Mechanismen beeinflussen: durch die Regulation der Kernlokalisierung, die Regulation der proteolytischen Degradierung, durch die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, Koregulatoren und des basalen Transkriptionskomplexes, durch Regulation der DNA-Bindung und durch Modifizierung der Chromatinstruktur (Whitmarsh und Davis, 2000).

Wichtig für die DNA-Bindung von Homöodomänproteinen ist die α -Helix 3 der Homöodomäne, durch welche spezifische DNA-Sequenzen erkannt werden (Gehring et al., 1994). Die α -Helix 3 von AtHB-6 ist homolog zur entsprechenden Region von AtHB-1 (Sessa et al., 1993), wodurch eine mögliche Bindestelle im Promotor von AtHB-6 identifiziert werden konnte. In Gelretardationsexperimenten wurde die Bindung von AtHB-6 an das im Promotor von AtHB-6 vorkommende *cis*-Element (vgl. Abb. 43) nachgewiesen (Himmelbach et al., 2001). Die AtHB-6 bedingte Aktivierung eines künstlichen Promotors der dieses *cis*-Element

enthielt konnte *in vivo* in transienten Expressionsexperimenten gezeigt werden (siehe Abb. 47). Als Kontrolle wurde eine punktmutierte Version des *cis*-Elements eingesetzt (vgl. Abb. 43). Konstruiert wurde der künstliche Promotor durch Fusion des *cis*-Elements beziehungsweise der punktmutierten Version des *cis*-Elements in unterschiedlicher Kopienzahl (2 beziehungsweise 4 Kopien) an einen minimalen CaMV 35S Promotor (Position -46 bis +1; Fang et al., 1989; siehe Abb. 45). Die ektopische Expression von AtHB-6 in Kombination mit den *cis*-Element-Konstrukten zeigte in Protoplasten deutlich eine Aktivierung des künstlichen Promotors. Die punktmutierten Versionen konnten nicht durch AtHB-6 aktiviert werden. Dieser Befund und die Tatsache, daß eine höhere Anzahl an *cis*-Elementen zu einer verstärkten Aktivierung führt, spricht für eine spezifisch von dem verwendeten *cis*-Element abhängigen Aktivierung.

In einer weiteren Kontrolle wurde an Stelle von AtHB-6 eine deletierte Version Δ AtHB-6 eingesetzt. In Δ AtHB-6 wurde die α -Helix 3 der Homöodomäne deletiert, um eine Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA zu verhindern. In transienten Expressionsexperimenten führte Δ AtHB-6 nicht zu einer Aktivierung des künstlichen Promotors. Darüberhinaus ergab sich bei simultaner Expression von AtHB-6 und Δ AtHB-6 eine Konkurrenz zwischen den beiden Formen bezüglich der Aktivierung des künstlichen Promotors (siehe Abb. 48 und 49). Die Konkurrenz der beiden Formen kann durch die mögliche Dimerisierung über den Leucin-Zipper der Homöodomäntranskriptionsfaktoren zustande kommen. Durch die Bildung von Heterodimeren aus AtHB-6 und Δ AtHB-6 wird die Anzahl an Transkriptionsfaktoren, die die Transkription aktivieren können, reduziert (**Abb. 77**).

Daraus folgt, daß im transienten Expressionsexperiment AtHB-6 spezifisch den künstlichen Promotor, der das im Promotor von AtHB-6 vorkommende *cis*-Element enthält, aktiviert. Bei der Verwendung eines künstlichen Promotors mit 4 Kopien des *cis*-Elements ergab sich eine etwa sechsfache Erhöhung der Reporteraktivität. Interessanterweise führte die Anwesenheit von Abscisinsäure zu einer weiteren Stimulierung der Expression auf eine cirka 12-fache Induktion (vgl. Abb. 47).

Zu berücksichtigen ist zusätzlich beim Betrachten der AtHB-6 vermittelten Induktion des künstlichen Promotors die durch den minimalen CaMV 35S Promotor verursachte Grundexpression. Diese Grundexpression ist in etwa vergleichbar mit der Expression des künstlichen Promotors ohne zusätzlichen Effektor (vgl. Abb. 50 und 51). Damit führt das im künstlichen Promotor vorhandene *cis*-Element ohne ektopisch exprimiertem AtHB-6 und ohne ABA zu keiner Erhöhung der Grundexpression.

Die Wirkungsweise von Abscisinsäure bei der Stimulierung der Induktion des künstlichen Promotors ist nicht geklärt. ABA könnte die Aktivität von AtHB-6 durch Aktivierung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren die mit AtHB-6 interagieren erhöhen. Johannesson et al.

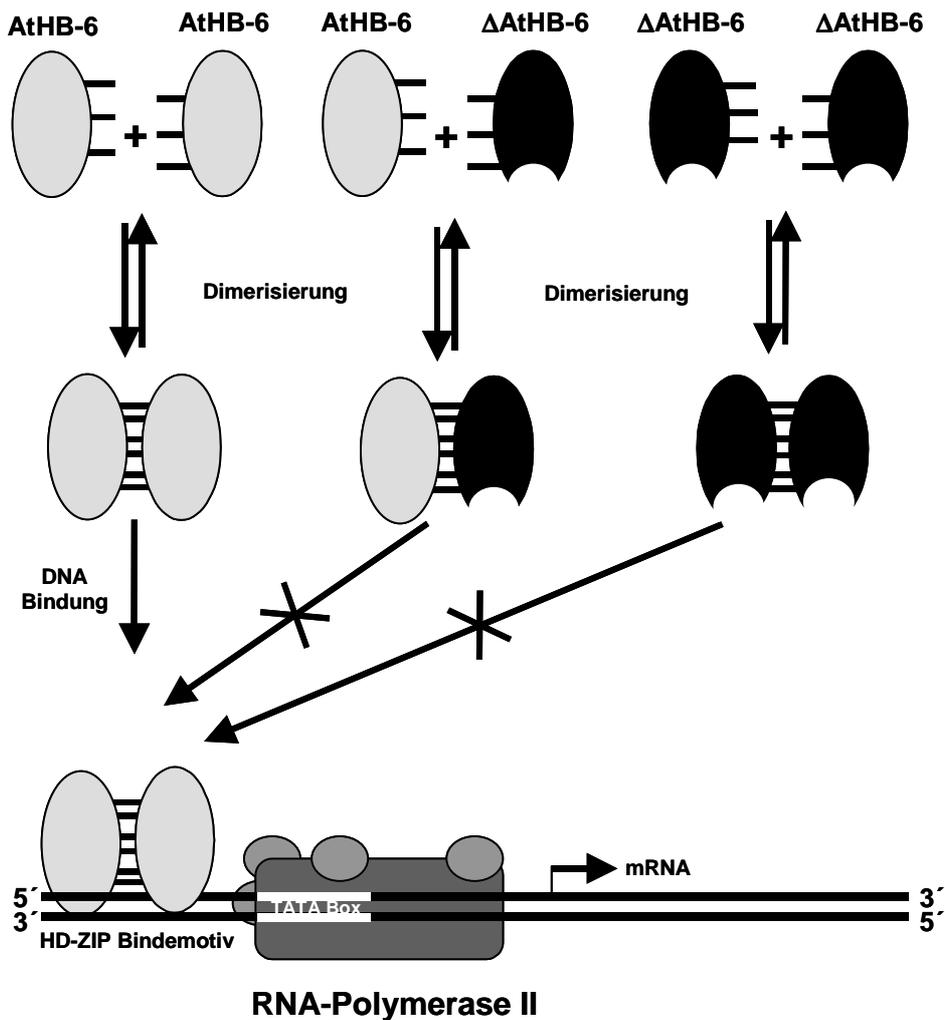


Abb. 77: Schematische Darstellung der Konkurrenz zwischen AtHB-6 und Δ AtHB-6. AtHB-6-Monomere sind grau unterlegt, Δ AtHB-6-Monomere sind schwarz dargestellt. Gezeigt wird eine mögliche Dimerisierung und DNA-Bindung. Eine Dimerisierung unter Beteiligung von Δ AtHB-6 führt zu Dimeren, die nicht mehr an die DNA binden können.

(2001) haben beispielsweise *in vitro* eine Heterodimerisierung von AtHB-5 und AtHB-6 nachgewiesen. AtHB-6 könnte an einem Netzwerk von Transkriptionsfaktoren beteiligt sein über dessen kombinatorische Kontrolle die Transkription reguliert wird, wie es von Söderman et al. (2000) für ABI3, ABI4 und ABI5 vorgeschlagen wurde.

Zudem könnte die Aktivität von AtHB-6 durch Abscisinsäure über die Proteinphosphatase 2C ABI1 als Interaktionspartner durch die Veränderung des Phosphorylierungszustandes von AtHB-6 beeinflusst werden. Durch Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung könnte zum Beispiel die Kernlokalisierung von AtHB-6 bestimmt werden, wie es für den basischen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor CPRF2 aus *Arabidopsis* beschrieben worden ist (Wellmer et al., 1999). Lokalisationsexperimente mit einer Fusion von AtHB-6 an GFP im transienten Expressionssystem (vgl. Abb. 57) und von Dr. A. Himmelbach durchgeführte Experimente mit Transgenen, die AtHB-6 fusioniert an GUS exprimieren zeigen jedoch eine eindeutige von Abscisinsäure unabhängige Kernlokalisierung des HD-ZIP-Transkriptions-

faktors. Dementsprechend muß für eine Interaktion zwischen ABI1 und AtHB-6 der Kerntransport der Proteinphosphatase 2C postuliert werden.

ABI1 enthält sowohl ein Kernlokalisations- wie auch Kernexportsignal (siehe Abb. 38 und 75). Eine dynamische Verteilung von ABI1 zwischen Cytosol und Kern in Abhängigkeit von ABA könnte eine Weiterleitung des ABA-Signals in den Kern ermöglichen. Einen Hinweis auf den Einfluß von ABI1 auf die AtHB-6 bedingte Aktivierung des künstlichen Promotors gibt die Coexpression von ABI1 beziehungsweise des N-terminalen Bereichs von ABI1. Im transienten Expressionssystem ergab sich bei Coexpression von ABI1 unabhängig von Abscisinsäure kein Einfluß auf die Induktion des künstlichen Promotors (siehe Abb. 50). Interessanterweise führte jedoch die Coexpression der N-terminalen Region von ABI1 zu einer Inhibierung der Aktivierung des künstlichen Promotors (vgl. Abb. 51).

Möglicherweise kompetiert der N-terminale Bereich von ABI1 mit dem nativen ABI1 und verhindert damit eine Dephosphorylierung und Aktivierung von AtHB-6. Durch den Phosphorylierungszustand könnte beispielsweise die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors reguliert werden, was für Homöodomän-transkriptionsfaktoren aus Tieren bereits gezeigt worden ist (Coqueret et al., 1998).

Aus den Analysen im transienten Expressionssystem läßt sich ein durch ABA-reguliertes *cis*-Element definieren, wobei AtHB-6 als positiver Regulator bezüglich dieses *cis*-Elements wirkt. Durch das Vorhandensein des *cis*-Elements im Promotor von AtHB-6 läßt sich eine positive Autoregulation des Promotors vermuten. Für AtHB-2, einem anderen Homöodomän-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* wurde von Ohgishi et al. (2001) eine negative Autoregulation gezeigt. AtHB-2 bindet vergleichbar mit AtHB-6 an ein im Promotor von AtHB-2 vorhandenes *cis*-Element und wirkt im Gegensatz zu AtHB-6 als Repressor der eigenen Transkription.

In transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (*AtHB-6LUC*) führt Abscisinsäure zu einer enormen Induktion des *AtHB-6* Promotors. Es ergab sich durch ABA eine 1200-fach höhere Reporterexpression (siehe Abb. 62). In Kreuzungen zwischen der transgenen Reporterlinie (*AtHB-6LUC*) und der *abi1* Mutante wurde die Aktivierung des *AtHB-6* Promotors durch ABA blockiert (vgl. Abb. 64). Dies zeigt deutlich die ABI1-abhängige ABA-Regulation des Reporters.

Kreuzungen zwischen der Reporterlinie (*AtHB-6LUC*) und Transgenen zur Überexpression von AtHB-6, Δ AtHB-6 und AtHB-6 in *antisense* Orientierung wiesen überraschenderweise keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zur Wildtyp-Kreuzung auf (vgl. Abb. 65). Nach der im transienten Expressionssystem festgestellten positiven Autoregulation von AtHB-6 wäre bei Überexpression von AtHB-6 eine Induktion des Reporters zu erwarten gewesen. Für die Kreuzungen mit Δ AtHB-6 und *antisense* AtHB-6 hätte sich eine geringere Induktion ergeben sollen. Es zeigte sich jedoch sowohl für die AtHB-6-, wie auch für die Δ AtHB-6- und

antisense AtHB-6-Kreuzung eine geringfügig höhere Induktion des Reporters durch Abscisinsäure im Vergleich zur nicht gekreuzten AtHB-6LUC-Reporterlinie. Daraus läßt sich schließen, daß für die Regulation des *AtHB-6*-Promotors noch weitere Komponenten wesentlich sind.

Aus den transienten Expressionsexperimenten und der Reporterregulation in Transgenen läßt sich vermuten, daß AtHB-6 über ein komplexes regulatorisches Netzwerk an der ABA-Signaltransduktion beteiligt ist. Eine wichtige Komponente dabei ist ABI1, welches als Interaktionspartner von AtHB-6, dessen Aktivität zu modulieren scheint. Interessant erscheint eine mögliche Weiterleitung des Abscisinsäuresignals über eine modulierbare-ABI1 Lokalisation. Gerade diese subzelluläre Lokalisierung könnte die unterschiedliche Reporterregulation in *abi1*- und *abi2*- Protoplasten erklären. ABI2 könnte ohne Kernimport- und Kernexportsignal ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert sein, wohingegen ABI1 in Abhängigkeit von Abscisinsäure zwischen Kern und Cytoplasma verteilt sein könnte.

Abscisinsäure führt neben der im transienten Expressionssystem und in den Reporterlinien untersuchten Genregulation zu sehr schnellen Antworten, die auf Änderungen von Ionenflüssen zurückzuführen sind. In Schließzellen (Thiel et al., 1992) wie in Wurzelzellen (Roberts und Snowman, 2000) wird durch ABA eine Membrandepolarisation hervorgerufen. Roberts und Snowman (2000) haben in Wurzelzellen von Mais eine Depolarisation des Membranpotentials durch Abscisinsäure von etwa 35 mV nachgewiesen. In *Arabidopsis*-Wurzeln konnte entsprechend eine durch ABA hervorgerufene Membrandepolarisation gezeigt werden (vgl. Abb. 66).

Damit ergibt sich ergänzend zu Untersuchungen an Stomata eine Möglichkeit Auswirkungen von Abscisinsäure auf Ionenflüsse zu analysieren. Mutanten, betroffen in der ABA-Signalkaskade können mit dieser Methode charakterisiert werden. Für *gca2* beispielsweise ergab sich der phänotypischen Charakterisierung entsprechend eine geringere Depolarisation und somit insensitives Verhalten bei Applikation von ABA (siehe Abb. 68). Interessanterweise zeigte die Analyse der Genregulation im transienten Expressionssystem (siehe Abb. 28 g,h) und in Kreuzungen mit Reporterlinien (vgl. Abb. 64) für *gca2* ein hypersensitives Verhalten gegenüber Abscisinsäure. Es stellt sich die Frage welches Genprodukt verantwortlich ist für das entgegengesetzte Verhalten bei Membrandepolarisation und Genregulation.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Genregulation und ABA-vermitteltem Stomataschluß wurde durch die Identifizierung von ABH1 einem mRNA-Cap-Bindeprotein als negativem Regulator der ABA-Antwort hergestellt (Hugouvieux et al., 2001). Die Kombination der Analyse der Genregulation im transienten Expressionssystem und von Membranpotentialmessungen an Wurzelzellen bietet eine Möglichkeit den Zusammenhang

zwischen sehr schnellen durch Ionenflüsse bedingte ABA-Antworten und der durch Abscisinsäure vermittelten Genregulation genauer zu analysieren.

Für weitergehende Untersuchungen der ABA-Signaltransduktion im transienten Expressionssystem sind zahlreiche Strategien denkbar. Posttranskriptionelles *Silencing* von Komponenten der ABA-Signalkaskade durch RNA-Interferenz (Waterhouse et al., 2001) könnte etwa Hinweise auf die Rolle dieser Komponenten als positive oder negative Regulatoren geben. Ein anderer sehr interessanter Ansatz wäre die Verwendung ABA-regulierter Promotoren zur Expression beziehungsweise zum ABA-abhängigen *Silencing* durch RNA_i von an der ABA-Signaltransduktion beteiligten Komponenten. Damit könnte sich eine positive oder negative Rückkopplung in der Signalkaskade ergeben. Durch eine ähnliche Vorgehensweise haben Kasuga et al. (1999) stresstolerantere Pflanzen generiert. In *Arabidopsis*-Pflanzen wurde unter der Kontrolle des stressinduzierbaren *RD29A*-Promotors ein Transkriptionsfaktor, DREB1A, exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor erkennt spezifisch ein in *cis* wirkendes Promotorelement, DRE (*dehydration response element*), welches eine wichtige Rolle spielt bei der Genregulation bedingt durch Umwelteinflüsse wie Trockenheit, Salzstress oder Kälte (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994). Die Expression des Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors führte zwar zu einer höheren Stresstoleranz aber zugleich zu einem stark retardierten Pflanzenwachstum unter normalen Wachstumsbedingungen. Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung des *RD29A*-Promotors das Pflanzenwachstum unter normalen Wachstumsbedingungen kaum oder nicht beeinflusst, die Stresstoleranz jedoch erheblich erhöht, stärker als bei CaMV 35S kontrollierter Expression.

Die Analyse der ABA-Signaltransduktion könnte entsprechend zu biotechnologisch interessanten Anwendungen führen. Die Verwendung beispielsweise des enorm durch ABA induzierten *AtHB-6*-Promotors zur Expression von an Stressantworten beteiligten Transkriptionsfaktoren wie DREB1A oder die Expression von AtHB-6 unter Kontrolle eines anderen stressinduzierbaren Promotors könnte in ähnlicher Weise wie bei den von Kasuga et al. (1999) beschriebenen Pflanzen eine erhöhte Stresstoleranz bewirken.

5. Literatur

Abe, H., Yamaguchi Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9 (10): 1859-1868

Abel, S., Theologis, A. (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant Journal* 5 (3): 421-427

Abeles, F. B., Morgan, P. W., Saltveit, Jr. M. E. (1992). *Ethylene in Plant Biology*. 2nd edition. Academic Press, Inc., San Diego

Addicott, F. T. (ed.) (1983). *Abscisic Acid*. Praeger Publishers, New York

Allen, G. J., Chu, S. P., Harrington, C. L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y. Y., Grill, E., Schroeder, J. I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*: 411 (6841): 1053-1057

Allen, G. J., Chu, S. P., Schumacher, K., Shimazaki, C. T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, S. D., Tallman, G., Tsien, R. Y., Harper, J. F., Chory, J., Schroeder, J. I., (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* 289 (5488): 2338-2342

An, Y.-Q., Huang, S., McDowell, J. M., McKinney, E. C., Meagher, R. B. (1996). Conserved Expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 Actin Subclass in Organ Primordia and Mature Pollen. *Plant Cell* 8: 15-30

Badminton, M. N., Sala-Newby, G. B., Kendall, J. M., Campbell, A. K. (1995). Differences in stability of recombinant apoaequorin within subcellular compartments. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217 (3): 950-957

Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12 (7): 1103-1115

Benning, G. (1999). Positionelle Klonierung des GCA2-Locus aus *Arabidopsis thaliana*. Diss. ETH Zürich, Nr. 13163

Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B. J. (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1859

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (6410): 315-325

Bertauche, N., Leung, J., Giraudat, J. (1996). Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 241: 193-200

Bonetta, D., McCourt, P. (1998). Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in plant science* 3 (6): 231-234

Chandler, P. M., Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 45: 113-141

- Chang C., Kwok F., Bleecker A. B., Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262 539-544
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89 (7): 1133-1144
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159
- Chory, J., Wu, D. (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiology* 125 (1): 77-80
- Church, G. M., Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (7): 1991-1995
- Coqueret, O., Martin, N., Bérubé, G., Rabbat, M., Litchfield, D. W., Nepveu, A. (1998). DNA Binding by Cut Homeodomain Proteins Is Down-modulated by Casein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 273 (5): 2561-2566
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S., McCourt, P. (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273 (5279): 1239-1241
- Damm, B., Schmidt, R., Willmitzer, L. (1989). Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Molecular & General Genetics* 217(1):6-12
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO Journal* 15 (24): 6798-6809
- Davies, P. J. (1995). *Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, London
- Davis, S. J., Vierstra, R. D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology* 36: 521-528
- Dingwall, C., Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences: a consensus? *Trends in Biochemical Science* 16: 178-181
- Doelling, J. H., Pikaard, C. S. (1993). Transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts derived from rapidly established cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 12: 241-244
- Downward, J. (2001). The ins and outs of signalling. *Nature* 411 (6839): 759-762
- Duckham, S. C., Linforth, R. S. T., Taylor, I. B. (1991). Abscisic-acid-deficient mutants at the *aba* gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant Cell and Environment* 14: 601-606
- Ehrler, T. (1997). Genetische und physiologische Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit ABA-insensitivem Primärwurzelwachstum. Diss. ETH Zürich Nr. 12269
- Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerstrom, M., Rask, L., (2000). Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3

domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant Journal* 24 (1): 57-66

Fang, R.-X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., Chua, N.-H. (1989). Multiple *cis* Regulatory Elements for Maximal Expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Plants. *Plant Cell* 1: 141-150

Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132 (1): 6-13

Finkelstein, R. R. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5 (6): 765-771

Finkelstein, R.R., Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12 (4): 599-609

Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., Goodman, H. M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10 (6): 1043-1054

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82 (3): 475-483

Foster, R., Chua, N. H. (1999). An *Arabidopsis* mutant with deregulated ABA gene expression: implications for negative regulator function. *Plant Journal* 17 (4): 363-372

Fütterer, J., Gordon, K., Sanfacon, H., Bonneville, J. M., Hohn, T. (1990). Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA. *EMBO Journal* 9 (6): 1697-1707

Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 (1): 151-158

Gehring, W. J., Affolter, M., Burglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annual Review of Biochemistry* 63: 487-526

Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., McCourt, P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (7): 1117-1126

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (7): 2725-2729

Gilroy, S., Read, N. D., Trewavas, A. J. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346 (6286): 769-771

Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., Goodman, H. M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4 (10): 1251-1261

Gomez-Cadenas, A., Verhey, S. D., Holappa, L. D., Shen, Q. X., Ho, T. H. D., Walker-Simmons, M. K. (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4): 1767-1772

- Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., Ho, T. H. (2001). Gibberellin/Abscisic Acid Antagonism in Barley Aleurone Cells. Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13 (3): 667-79
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A. R., Vartanian, N., Giraudat, J. (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11 (10): 1897-1909
- Grabov, A., Blatt, M. R. (1998). Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *Journal of Experimental Botany* 49 (Special Issue): 351–360
- Grebenok, R. J., Pierson, E., Lambert, G. M., Gong, F.-C., Afonso, C. L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J. C., Galbraith, D. W. (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant Journal* 11 (3): 573-586
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., Jacobsen, J. V. (1995). Gibberellin-Regulated Expression of a Myb Gene in Barley Aleurone Cells - Evidence For Myb Transactivation of a High-PI Alpha-Amylase Gene Promoter. *Plant Cell* 7 (11): 1879-1891
- Haasen, D., Köhler, C., Neuhaus, G., Merkle, T. (1999). Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 20 (6): 695-705
- Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E., Nagy, F. (1997). Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 11 (1): 93-103
- Hanson, M. R., Köhler, R. H. (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany* 52 (356): 529-539
- Hemerly, A. S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., Inze, D. (1993). *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5: 1711-1723
- Himmelbach, A., Iten, M., Grill, E. (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 353 (1374): 1439-1444
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Grill, E. (2001). The homeodomain protein ATHB-6 regulates hormone responses in *Arabidopsis* and is a target of the protein phosphatase ABI1. 12th International *Arabidopsis* Meeting.
- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant Journal* 19 (6): 679-689
- Hoeren, F. U., Dolferus, R., Wu, Y. R., Peacock, W. J., Dennis, E. S., (1998). Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* 149 (2): 479-490
- Holappa, L. D., Walker-Simmons, M. K. (1995). The Wheat Abscisic Acid-Responsive Protein-Kinase Messenger-Rna, Pkaba1, Is Up-Regulated By Dehydration, Cold Temperature, and Osmotic-Stress. *Plant Physiology* 108 (3): 1203-1210

- Hong, S. W., Jon, J. H., Kwak, J. M., Nam, H. G. (1997). Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 113 (4): 1203-1212
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (1982). *Biophysik*. 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Schroeder, J. I. (2001). An mRNA Cap Binding Protein, ABH1, Modulates Early Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106: 477-487
- Hwang, I. W., Goodman, H. M., (1995). An *Arabidopsis Thaliana* Root-Specific Kinase Homolog Is Induced By Dehydration, ABA, and NaCl. *Plant Journal* 8 (1): 37-43
- Hwang, I., Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413 (6854): 383-389
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409 (6823): 1060-1063
- Iten, M. (1992). Identifizierung und Charakterisierung von Abscisinsäure-insensitiven Mutanten von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, ETH Zürich, Abteilung XA
- Iten, M., Hoffmann, T., Grill, E. (1999). Receptors and signalling components of plant hormones. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research* 19(1-4): 41-58
- Iwasaki, T., Yamaguchi Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1995). Identification of a Cis-Regulatory Region of a Gene in *Arabidopsis thaliana* Whose Induction By Dehydration Is Mediated By Abscisic-Acid and Requires Protein-Synthesis. *Molecular & General Genetics* 247 (4): 391-398
- Jacob, T., Ritchie, S., Assmann, S. M., Gilroy, S. (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (21): 12192-12197
- Jeannette, E., Rona, J.-P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B., Miginiac, E. (1999). Induction of *RAB18* gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Journal* 18 (1): 13-22
- Jefferson, A. R. (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter* 5 (4): 387-405
- Johannesson, H., Wang, Y., Engström, P. (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*. *Plant Molecular Biology* 45: 63-73
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17 (3): 287-291
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., Snaford, J. C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73

- Knight, M. R., Smith, S. M., Trewavas, A. J. (1992). Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 4967-4971
- Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of T.sub.L -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics* 204: 383-396
- Koornneef, M., Reuling, G., Karssen, C. M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61 377-383
- Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K., Arai, Y. (1990). An improved assay for β -Glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -Glucuronidase activity. *Plant Science* 70: 133-140
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Zeng, W. K., Sheen, J. (1998). Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395 (6703): 716-720
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen- activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6): 2940-2945
- Krens, F., Molendijk, L., Wallems, G., Schilperoort, R. (1982). In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-Plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74
- Krens, F. A., Jamar, D., Keizer, L. C. P., Hall, R. D. (1994). The effect of N-propyl-gallate on the formation of ethylene during protoplast isolation in sugar-beet (*Beta Vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany* 45 (281): 1899-1901
- Lang, V., Palva, E. T. (1992). The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology* 20: 951-962
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R., Allen, G. J., Sanders, D., Hetherington, A. M., (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP- ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15837-15842
- Leon-Kloosterziel, K. M., Gil, M. A., Ruijs, G. J., Jacobsen, S. E., Olszewski, N. E., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A., Koornneef, M. (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant Journal* 10 (4): 655-661
- Leube, M. P., Grill, E., Amrhein, N. (1998). ABI1 of *Arabidopsis* is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* 424 (1-2): 100-104
- Leung, J., Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 49: 199-222
- Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9 (5): 759-771
- Liu, Y.-G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., Shibata, D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6535-6540

- Lopez-Molina, L., Chua, N. H. (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 41 (5): 541-547
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Chua, N.-H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8): 4782-4787
- Luehrsen, K. R., De Wet, J. R., Walbot, V. (1992). Transient Expression Analysis in Plants Using Firefly Luciferase Reporter Gene. *Methods in Enzymology* 216 (35): 397-414
- Maathuis, F. J. M., Sanders, D. (1994). Mechanism of high-affinity postassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9272-9276
- MacRobbie, E. A. C. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 353 (1374): 1475-1488
- MacRobbie, E. A. C. (2000). ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22): 12361-12368
- Marcotte, W. R., Bayley, C. C., Quatrano, R. S. (1988). Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. *Nature* 335: 454-457
- Mayerhofer, R., Langridge, W. H. R., Cormier, M. J., Szalay, A. A. (1995). Expression of recombinant *Renilla* luciferase in transgenic plants results in high levels of light emission. *Plant Journal* 7 (6): 1031-1038
- McAinsh, M. R., Brownlee, C., Hetherington, A. M. (1990). Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* 343: 186-188
- McAinsh, M. R., Brownlee, C., Hetherington, A. M. (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100 (1): 16-29
- McCarty, D. R., Chory, J. (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103 (2): 201-209
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal* 25 (3): 295-303
- Meyer, K., Leube, M. P., Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264 (5164): 1452-1455
- Millar, A. J., Short, S. R., Hiratsuka, K., Chua, N.-H., Kay, S. A. (1992). Firefly Luciferase as a Reporter of Regulated Gene Expression in Higher Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10 (4): 324-337
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K. (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Biotechnology* 15: 15-19

- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Chua, N.-H. (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (4): 1406-1410
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T., Bates, S. E. (1990). Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 29 (45): 10351-10356
- Niedz, R. P., Sussman, M. R., Satterlee, J. S. (1995). Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Reports* 14: 403-406
- Ng, C. K., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., Hetherington, A., M. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410 (6828): 596-599
- Nordin, K., Vahala, T., Palva, E. T. (1993). Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology* 21: 641-653
- Nunberg, A. N., Thomas, T. L. (1993). *Transient Analysis of Gene Expression in Plant Cells. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology.* CRC Press, Boca Raton. Glick, B., Thompson, J. 9: 147-154
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I., Aoyama, T. (2001). Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *Plant Journal* 25 (4): 389-398
- Paszkowski, J., Shillito, R., Saul, M., Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, I. (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO Journal* 3: 2717-2722
- Pei, Z. M., Ghassemian, M., Kwak, C. M., McCourt, P., Schroeder, J. I. (1998). Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282 (5387): 287-290
- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E., Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406 (6797): 731-734
- Penson, S. P., Schuurink, R. C., Fath, A., Gubler, F., Jacobsen, J. V., Jones, R. L. (1996). cGmp is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 8 (12): 2325-2333
- Potrykus, I. (1991). Gene Transfer to Plants: Assessment of Published Approaches and Results. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 42: 205-225
- Prasher, D., McCann, R. O., Cormier, M. J. (1985). Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 126 (3): 1259-1268
- Ramagli, L. S., Rodriguez, L. V. (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6: 559-563
- Reed, K. C., Mann, D. A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Research* 13 (20): 7207-7221

- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., Yu, G.-L. (2000). *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Roberts, S. G. E. (2000). Mechanisms of action of transcription activation and repression domains. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 1149-1160
- Roberts, S. K., Snowman, B. N. (2000). The effects of ABA on channel-mediated K⁺ transport across higher plant roots. *Journal of Experimental Botany* 51 (200): 1585-1594
- Rock, C. D., Zeevaart, J. A. D. (1991). The *aba* Mutant of *Arabidopsis thaliana* is Impaired in Epoxy-Carotenoid Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 7496-7499
- Rodriguez, P. L., Benning, G., Grill, E. (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS* 421 (3): 185-190
- Rogers, S. O., Bendich A. J. (1994). Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. *Plant Molecular Biology Manual*, 3rd edition, Kluwer Academic Press, Dodrecht, The Netherlands. Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A. D1: 1-8
- Rohde, A., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1999). The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 22 (3): 261-270
- Ross, J., O'Neill, D. (2001). New interactions between classical plant hormones. *Trends in Plant Science* 6 (1): 2-4
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., Morelli, G. (1991). A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO Journal* 10 (7): 1787-1791
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Savoure, A., Hua, X.-J., Bertauche, N., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* 254 (1): 104-109
- Schroeder, J. I., Hedrich, R. (1989). Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends in Biochemical Science* 14: 187-192
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M., Allen, G. J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410 (6826): 327-330
- Schwartz, S. H., LeonKloosterziel, K. M., Koornneef, M., Zeevaart, J. A. D. (1997a). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. May 114 (1): 161-166
- Schwartz, S. H., Tan, C. B., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. R. (1997b). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276 1872-1874

- Sessa, G., Morelli, G., Ruberti, I. (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO Journal* 12 (9): 3507-3517
- Sethi, J. K., Empson, R. M., Bailey, V. C., Potter, B. V. L., Galione, A. (1997). 7-Deaza-8-bromo-cyclic ADP-ribose, the First Membrane-permeant, Hydrolysis-resistant Cyclic ADP-ribose Antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 272 (26): 16358-16363
- Sheen, J. (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274 (5294): 1900-1902
- Sheen, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3): 975-980
- Shen, O. X., Ho, T. H. D. (1995a). An Abscisic-Acid Response Complex Consists of a G-Box and a Novel Coupling Element. *Plant Physiology* 108 (2): 46-46
- Shen, Q. X., Ho, T. H. D. (1995b). Functional Dissection of an Abscisic-Acid (Aba)-Inducible Gene Reveals 2 Independent Aba-Responsive Complexes Each Containing a G-Box and a Novel Cis-Acting Element. *Plant Cell* 7 (3): 295-307
- Shen, Q. X., Zhang, P. N., Ho, T. H. D. (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8 (7): 1107-1119
- Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59: 223-240
- Shimomura, O., Johnson, F. H. (1973). Chemical nature of light emitter in bioluminescence of aequorin. *Tetrahedron Letters* 31: 2963-2966
- Shinozaki, K., Yamaguchi Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3 (3): 217-223
- Skriver, K., Olsen, F. L., Rogers, J. C., Mundy, J. (1991). Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7266-7270.
- Söderman, E., Hjellstrom, M., Fahleson, J., Engstrom, P. (1999). The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Molecular Biology* 40 (6): 1073-1083
- Söderman, E. M., Brocard, I. M., Lynch, T. J., Finkelstein, R. R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* 124 (4): 1752-1765
- Spada, H. (1992). *Lehrbuch allgemeine Psychologie*. 2. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern.
- Staxen, I., Pical, C., Montgomery, L. T., Gray, J. E., Hetherington, A. M., McAinsh, M. R. (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4): 1779-1784

- Straub, P. F., Shen, Q., Ho, T. D. (1994). Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene, HVA1. *Plant Molecular Biology* 26 (2): 617-630
- Steber, C. M., Cooney, S. E., McCourt, P. (1998). Isolation of the GA-response mutant sly1 as a suppressor of ABI1-1 in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149 (2): 509-521
- Stone, J. M., Trotochaud, A. E., Walker, J. C., Clark, S. E. (1998). Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiology* 117: 1217-1225
- Tamminen, I., Makela, P., Heino, P., Palva, E. T. (2001). Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 25 (1): 1-8
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814): 796-815
- Thiel, G., MacRobbie, E. A. C., Blatt, M. R. (1992). Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control. *Journal of Membrane Biology* 126 (1): 1-18
- Thompson, J. F., Hayes, L. S., Lloyd, D. B. (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* 103 (2): 171-177
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (21): 11632-11637
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science* 5 (2): 67-74
- Ward, J. M., Pei, Z. M., Schroeder, J. I. (1995). Roles of Ion Channels in Initiation of Signal-Transduction in Higher-Plants. *Plant Cell* 7 (7): 833-844
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B., Finnegan, E. J. (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends in Plant Science* 6 (7): 297-301
- Wellmer, F., Kircher, S., Rügner, A., Frohmeyer, H., Schäfer, E., Harter, K. (1999). Phosphorylation of the Parsley bZIP Transcription Factor CPRF2 Is Regulated by Light. *Journal of Biological Chemistry* 274 (41): 29476-29482
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82 (3): 463-473
- Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 1172-1183
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R., Chua, N. H. (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-Ribose in plants. *Science* 278 (5346): 2126-2130
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). A Novel *cis*-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* 6: 251-264

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217 (4566): 1214-1222

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., van Montagu, M., Schell, J. (1983). Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without altering their normal regeneration capacity. *EMBO Journal* 2: 2143-2150

Zeevaart, J. A. D., Creelman, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 39: 439-473

6. Anhang**Oligonukleotide für Sonden**

<i>CDC2A</i>	F	5'- GGA ATT CGT GGA GTT TAC TTC AGC	-3'
	R	5'- GGA ATT CGG AGA ACC CTA TGA GAG	-3'
<i>AtHB-6</i>	F	5'- GAC GCC TCG AGA TGA AGA GAT TAA GTA GTT C	-3'
	R	5'- CGG GAT CCT GCA GTC AAT TCC AAT GAT CAA CG	-3'
<i>RD29B</i>	F	5'- CAG AAT TCG ATG ATG AGT ATG ACG AGC	-3'
	R	5'- CAG AAT TCC GCC TTT ATG CGT GGG ATC AG	-3'
<i>ACT1</i>	F	5'- TGG GAT GAC ATG GAG AAG AT	-3'
	R	5'- ATA CCA ATC ATA GAT GGC TGG	-3'

Oligonukleotide für Promotoren

<i>AtHB-6</i>	F	5'- TCC CCG CGG ATC TCT CGC GAC CCA ATA TCC	-3'
	R	5'- CGG GAT CCC AAC AAT CTT TAA TTA CTT TCG	-3'
<i>AtHB-6*</i>	F	5'- ATA ATC CAA TTG TTA CAA CTT TAA C	-3'
	R	5'- TTG TAA CAA TTG GAT TAT ATG C	-3'
<i>RD29B</i>	F	5'- TCC CCG CGG CTC AAG TTT ACT TCA TCC	-3'
	R	5'- GCG GAT CCT TCA AGT GAA TCA ATC AAA C	-3'
<i>-46 CaMV35S</i>	F	5'- GAC TAG TGC AAG ACC CTT CCT C	-3'
<i>RAB18</i>	F	5'- TCC CCG CGG ATC TAA ACG CGG CGT TTG G	-3'
	R	5'- CGC GGA TCC ACT TTG AGC TAA GCT AG	-3'

Oligonukleotide für die Ascl-Schnittstelle

EcoRI/HindIII	5'- AAT TGG CCG GCC GGC GCG CAA	-3'
	5'- AGC TTG GCG CGC CGG CCG GCC	-3'
KpnI	5'- AGT ACT GGC GCG CCT GTA C	-3'
	5'- AGG CGC GCC AGT ACT GTA C	-3'

Oligonukleotide für AtHB-6-Bindemotiv-Promotor

HD-ZIP-Motiv	F	5'- CTA GCT AGC AAT TAT TAC AAT TAT TAG ATA	-3'
	R	5'- CTA GTA TCT AAT AAT TGT AAT AAT TGC TAG	-3'
Mutiertes Motiv	F	5'- CTA GCT AGC AAT TGT TAC AAT TGT TAG ATA	-3'
	R	5'- CTA GTA TCT AAC AAT TGT AAC AAT TGC TAG	-3'

Oligonukleotide für ABI1/abi1/N-terminus

ABI1	F	5'- CGG GAT CCA TGG AGG AAG TAT CTC C	-3'
ABI1stop	R	5'- CAA GAG CAA ACC CTT GAA CTA GTA CTA GGCCTT	-3'
Nterstop	R	5'- CTG CGA GCT CAC TTC TCG CTA GTA ATA TCT G	-3'

Oligonukleotide für CaMV 35S1-Promotor

Nheen35sr	R	5'- GCT AGC TAC AGG ACG GAC CAT GG	-3'
Sphen35sf	F	5'- GCA TGC TCT AGA TTC ATT AAT GC	-3'

Oligonukleotide für ABI2

ABI2 fwBglII	F	5'- CCT AGA TCT ATG GAC GAA GTT TCT CCT	-3'
ABI2 Nter	F	5'- CGG GAT CCA TGG ACG AAG TTT CTC CT	-3'
ABI2Cternostop	R	5'- GAA GAT CTA TTC AAG GAT TTG CTC TT	-3'
ABI2revstop	R	5'- CCT TCT TTT TCA ATT CAA GG	-3'
ABI2fwSall	F	5'- ACG CGT CGA CAA TGG ACG AAG TTT CTC C	-3'
ABI2revXhoI	R	5'- TAC TCG AGC CTT CTT TTT CAA TTC AAG G	-3'

Oligonukleotide für Lokalisation (GFP327)

GFPnostopXho	R	5'- CGA GCT CGA GTT GTY TAG TTC ATC CAT GC	-3'
--------------	---	--------------------------------------------	-----

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Thomas Hoffmann
Adresse:	Griegstr. 13 80807 München
geboren am:	14.03.1972 in Straubing
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildungsdaten

1978 – 1982	Grundschule in Wallersdorf
1982 – 1991	Gymnasium Landau an der Isar
1991 – 1992	Zivildienst
1992 – 1996	Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität
1997 – 2001	Doktorarbeit am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München
1998	Besuch des Dept. of Biology, Univ. of California, San Diego, bei Prof. Dr. J. I. Schroeder

Publikationen

Iten, M., Hoffmann, T., Grill, E. (1999). Receptors and Signalling Components of Plant Hormones. *J. Receptor Signal Transduct. Res.* 19: 41-58

Himmelbach, A., Benning, G., Hoffmann, T., Grill, E. (2000). Targets of Modifying Plant Growth and Development by ABA-mediated Signaling. J. H. Cherry et al. (eds.), *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering. NATO Science Series 83*: 223-232

Allen, G. J., Chu, S. P., Harrington, C. L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y. Y., Grill, E., Schroeder, J. I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411 (6841): 1053-1057

Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., Grill, E. The homeodomain protein ATHB-6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *Submitted*