

**BETEILIGUNG EINES VERTRETERS DER  
*ARABIDOPSIS* WRKY-MULTIGENFAMILIE  
AN PFLANZLICHEN ENTWICKLUNGSPROZESSEN**

**DISSERTATION**

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

**SILKE ROBATZEK**

aus  
Uelzen

angefertigt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Köln 2000

Gutachter: **PROF. DR. KLAUS HAHLBROCK**

**PROF. DR. ULF-INGO FLÜGGE**

Tag der Abgabe: 04.04.2000

Tag der Disputation: 15.06.2000



---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	iii
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	v
<b>I EINLEITUNG</b>	1
<b>1. PFLANZLICHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN</b>	3
<b>2. WRKY-FAKTOREN</b>	9
<b>3. ZIELE</b>	13
<b>II MATERIAL</b>	14
<b>1. CHEMIKALIEN, ENZYME UND RADIOISOTOPE</b>	14
<b>2. BAKTERIEN UND PLASMIDE</b>	14
<b>3. DESOXYOLIGONUKLEOTIDE</b>	15
<b>4. PFLANZENMATERIAL</b>	18
4.1 Entwicklungsstadien, Organe und Behandlungen	18
4.2 Zellkulturen	18
4.3 Flüssigkulturen	19
<b>III METHODEN</b>	20
<b>1. ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	20
1.1 Southern-Analysen	21
1.2 Kartierungen	22
1.3 5'-RACE	23
1.4 Expressions-Analysen	23
<b>2. ANALYSE VON DIMERISIERUNGEN</b>	25
<b>3. ANALYSE SUBZELLUÄRER LOKALISATIONEN</b>	26
<b>4. GEWINNUNG UND ANALYSE VON ANTIKÖRPERN</b>	27
4.1 Heterologe Expression und Reinigung	27
4.2 Charakterisierung der Antikörper	28
<b>5. IDENTIFIKATION UND ANALYSE VON NULL-MUTANTEN</b>	30
5.1 Analyse molekularer Phänotypen	31
5.2 RFDD	31
<b>6. HERSTELLUNG UND ANALYSE TRANSGENER PFLANZEN</b>	33
6.1 Promotor-Reporter-Analysen	35
6.2 Ektopische Überexpression	36
<b>IV ERGEBNISSE</b>	38

---

<b>1. <i>AtWRKY</i>-FAKTOREN</b>	38
1.1 Einzel-Kopie-Gene	40
1.2 Verteilung im Genom	41
1.3 Expressionsmuster	44
1.4 Null-Mutanten	46
<b>2. FUNKTIONELLE DOMÄNEN VON <i>AtWRKY6</i></b>	49
2.1 Kernimportsignale	50
2.2 Dimerisierungsdomäne	54
<b>3. EXPRESSIONSTUDIEN VON <i>AtWRKY6</i></b>	56
3.1 Promotor-Reporter-Studien	56
3.2 Promotor-Deletionen	65
<b>4. <i>AtWRKY6</i> NULL-MUTANTEN</b>	69
4.1 EN und DEL	72
4.2 RFDD zur Isolierung von Zielgenen	78
4.3 Expressionsmuster möglicher Zielgene	84
<b>5. EKTOPISCHE EXPRESSION VON <i>AtWRKY6</i></b>	89
5.1 35S:: <i>AtWRKY6</i> Phänotyp	92
<b>V DISKUSSION</b>	95
<b>1. <i>AtWRKY6</i></b>	95
1.1 Biochemische Charakteristika	95
1.2 Transkriptionelle Regulation	98
1.3 Expressionsverhalten	100
1.4 Biologische Aufgaben	103
1.5 Zielgene	108
<b>2. <i>AtWRKY</i>-MULTIGENFAMILIE</b>	111
2.1 Biologische Aufgaben	114
<b>3. AUSBLICK</b>	118
<b>VI ZUSAMMENFASSUNG</b>	121
<b>VII LITERATURVERZEICHNIS</b>	124
<b>VIII ANHANG</b>	143
<b>1. <i>AtWRKY6</i> GENOMISCHE SEQUENZ</b>	143
<b>2. <i>AtWRKY</i> REFERENZEN</b>	146

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine, chemische Substanzen und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der 'International Union for Biochemistry' (Liebecq, 1978). Ferner wurden Bezeichnungen für diverse Chemikalien und Methoden in Anlehnung an 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual' (Sambrock *et al.*, 1989) verwendet. Weitere bekannte Abkürzungen entstammen dem allgemeinen Sprachgebrauch.

<i>Af</i>	<i>Avena fatua</i>
AS	Aminosäuren
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>avr</i>	<i>Avirulenzgen</i>
BAC	'Bacterial Artificial Chromosome'
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Col-0	Ecotyp Columbia 0
<i>Cs</i>	<i>Cucumis sativus</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
GFP	'Green Fluorescent Protein'
GUS	$\beta$ -Glukuronidase
HR	hypersensitive Reaktion
<i>Ib</i>	<i>Ipomoea batatas</i>
JA	Jasmonsäure
KT	Kurztag
LT	Langtag
MeOH	Methanol

---

MW	Molekulargewicht
mRNA	‘messenger’ Ribonukleinsäure
NLS	‘Nuclear Localization Signal’
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Pc</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
PCD	‘programmed cell death’
PCR	‘polymerase chain reaction’
PR	‘Pathogenesis Related’
pv	pathovar
RACE	‘Rapid Amplification of cDNA’
RFDD	‘Restriction Fragment Differential Display’
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	‘reactive oxygen species’
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
SA	Salicylsäure
U	‘Unit’
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -galaktosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -glukoronsäure
YAC	‘Yeast Artificial Chromosome’

## I EINLEITUNG

Pflanzen wie Tiere sind sehr komplexe mehrzellige Organismen. Beide haben wahrscheinlich als letzten gemeinsamen Vorfahren einen einzelligen Eukaryonten. Ausgehend vom diesem 'Starter-Organismus' haben Pflanzen und Tiere mit den gleichen funktionellen Genen als Grundbausteine so unterschiedliche Lebensformen hervorgebracht, wie es sie derzeit gibt (Meyerowitz, 1999). Die Vorläufer der Pflanzen haben sich dann durch eine weitere Inkorporation eines prokaryontischen Endosymbionten in einer einzigartigen Weise Licht als Energie- und Kohlenstoffdioxid als Baustoffquelle zu Nutze gemacht. Die folgende Weiterentwicklung zu höheren Pflanzen erforderte neue Massnahmen wie die der Festlegung von Organidentitäten, zeitliche Kontrolle von vegetativer und reproduktiver Phase, aber auch aufgrund der sessilen Lebensform besondere Mechanismen im Umgang mit Stresssituationen. In vielen Aspekten ist die grundlegende Biologie der Pflanzen der anderer Organismen durchaus vergleichbar und unterliegt auch ähnlichen regulatorischen Prozessen. Sie verfügen wie alle höheren Lebensformen über sehr komplexe und äusserst vernetzte Systeme der Regulation, welche auf den unterschiedlichsten Ebenen ablaufen kann. Hervorzuheben sind dabei besonders die Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation, der Signaltransduktion und der Transkriptionsregulation (Meyerowitz, 1999).

Allerdings haben Pflanzen auch sehr spezifische Systeme für ihre eigenen Bedürfnisse entwickelt. In der Zell-Zell-Kommunikation, welche eine wichtige Rolle sowohl in der Entwicklung als auch bei Reaktionen auf verschiedenste Umweltbedingungen spielt, haben Pflanzen ein System der Zell-Zell-Verbundenheit durch Plasmodesmata geschaffen, die in Tieren nicht vorkommen. Auch bei der Wahrnehmung von äusseren Reizen sowie deren Signalübermittlung haben Pflanzen einen eigenen Weg beschritten. Sie verfügen beispielsweise über Rezeptoren aus der Klasse der Serin/Threonin- und der Histidin-Kinasen. Bei Tieren hingegen dominieren Hormonrezeptoren im Sinne der menschlichen Steroidrezeptoren, an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren und Tyrosin-Kinasen. Viele durch Rezeptoren registrierte Reize werden als Signalkaskade weitergegeben und amplifiziert. Da die Reaktion auf ein bestimmtes Signal vielfach eine *de novo* Synthese von Proteinen benötigt, setzen sich Signalkaskaden häufig im Zellkern fort und äussern sich in einer veränderten Expression von Genen. Viele biologische Prozesse unterliegen somit einer vielfach auf der Ebene der Transkription ablaufenden Regulation der Genexpression. Die gezielte Regulation der Genexpression wird über bestimmte *cis*-Elemente in ihren Promotoren sowie über daran bindende Faktoren vermittelt. Transkriptionsfaktoren spielen daher in ihrer Eigenschaft als regulatorische Proteine eine bedeutende Rolle. Sie vermitteln so eine geordnete und

kontrollierte Genexpression in Abhängigkeit von internen und externen Stimuli während der gesamten Entwicklung des Organismus. Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren wird aber auch im Zusammenhang mit der Evolution von Organismen sowie der Artenvielfalt diskutiert (Doebley & Lukens, 1998).

Gerade in den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aus Pflanzen isoliert worden. Die Klassifizierung der putativen offenen Leserahmen aus dem Genom-Sequenzierungsprojekt von *Arabidopsis thaliana* ergab, dass der zweitgrößte Anteil von Proteinen, die an der Transkription beteiligt sind, eingenommen wird (Bevan *et al.*, 1998). Allein daran wird deutlich, wie wichtig die Regulation auf transkriptioneller Ebene ist. Im allgemeinen sind die Unterschiede zwischen Pflanze und Tier hier eher gering. Die Transkriptionsmaschinerie sowie das System der regulierten Genexpression sind miteinander vergleichbar. Auch einige der an der Genexpression beteiligten Klassen von Transkriptionsfaktoren kommen in beiden Organismen vor. Dabei tragen sie oft nur gleiche oder ähnliche funktionelle Domänen, die aus zuvor vorhandenen Prototypen von funktionellen Motiven modifiziert, neu arrangiert und in einen neuen Kontext gestellt wurden (Takatsuji, 1998). Auf diese Weise haben Pflanzen so gewonnene Faktoren für ihre eigenen spezifischen regulatorischen Prozesse genutzt. Darüberhinaus stellt aber eine besondere Lebensform wie die der Pflanzen auch neue Ansprüche an den Organismus. Beispielsweise müssen Pflanzen gerade aufgrund ihrer sessilen Lebensweise mit den verschiedensten äusseren Gegebenheiten umgehen. Ebenso erfordert der pflanzliche Mechanismus der Energie- und des Kohlenstoffgewinns unter anderem neue Komponenten in der Regulation. Man findet demnach auch eine Reihe von funktionellen Motiven in Transkriptionsfaktoren, die in anderen Organismen nicht vorkommen. Diese neuartigen Faktoren übernehmen möglicherweise die Regulation rein Pflanzen-spezifischer Prozesse.

Das Verstehen der Entstehung der Pflanzen, aber auch ihrer Entwicklung und Verbreitung inklusive ihrer Anpassungen an unterschiedlichste äussere Bedingungen wird nicht nur der allgemeinen Aufklärung des Lebens *per se* dienen. Pflanzen sind als Produzenten von Sauerstoff und organischen Kohlenstoffverbindungen eine Grundlage des gesamten irdischen und damit menschlichen Lebens. Mit einer wachsenden Weltbevölkerung steigt auch der Nahrungsbedarf, nicht nur in Quantität, sondern ebenso in Qualität. Das Wissen über die biologischen Prozesse in Pflanzen zusammen mit modernen molekularbiologischen Methoden kann dann in der Pflanzenzüchtung zur Lösung von Ernährungsproblemen verwendet werden (Peng *et al.*, 1999).

## 1. PFLANZLICHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Transkriptionsfaktoren können auf die Transkription eines bestimmten Gens als Aktivator oder als Repressor wirken. (Schwechheimer & Bevan, 1998). In Abhängigkeit von einer bestimmten Entwicklungsphase, einem bestimmten Zelltyp oder einem bestimmten physiologischen Zustand eines Organismus sprechen Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl verschiedener Zielgene an. Dabei kann ihre Spezifität, aber auch ihre Aktivität im einzelnen verändert sein. So kann ein einzelner Transkriptionsfaktor je nach Kontext sowohl aktivierend als auch reprimierend die Expression unterschiedlicher Zielgene beeinflussen (McCarty *et al.*, 1991; Hoecker *et al.*, 1995). Bisher sind in Eukaryonten positive *cis*-Elemente in Promotoren und somit daran bindende aktivierend wirkende Faktoren häufiger bekannt. Damit übereinstimmend liegen viele Gene, bedingt durch ihre räumliche Position in speziellen nuklearen Kompartimenten, in einem reprimierten Status vor (Cockell & Gasser, 1999). In der Regel ist die Transkription von Genen durch ihre Verpackung in Chromatin reprimiert (Kornberg, 1999). Nur ein spezifischer positiver Regulationsmechanismus erlaubt eine Transkription von Genen. Ein Transkriptionsfaktor ist in erster Linie ein Sequenz-spezifisch DNA-bindender Faktor. Dieser wirkt im Falle einer Bindung an ein positives *cis*-Element als Aktivator und stimuliert die Transkription nicht durch direkte Einflussnahme auf die Aktivität der RNA-Polymerase II Transkriptionsmaschinerie, sondern durch mehrere Protein-Protein-Interaktionen. Zum einen interagiert der Aktivator mit Co-Aktivatoren, was dann zu einer Rekrutierung einer Acetylase und damit zu einer Acetylierung der Histone führt, und zum anderen finden Interaktionen mit Mediatoren statt, die dann in direktem Kontakt mit der RNA-Polymerase II Transkriptionsmaschinerie stehen. Ein Repressor interagiert mit Co-Repressoren, die eine Deacetylase von Histonen rekrutieren.

Die Regulation der Genexpression kann daher durch jede einzelne Komponente aus diesem Transkriptionskomplex und nicht nur durch Transkriptionsfaktoren im Sinne von Sequenz-spezifisch DNA-bindenden Faktoren beeinflusst werden. Die enorme regulatorische Funktion von interagierenden Faktoren wird anhand der WD Polycomb Gruppe deutlich. Vertreter dieser Gruppe sind wichtige Bestandteile der kontrollierten Expression von Genen während der pflanzlichen Embryogenese und Samenentwicklung (Grossniklaus *et al.*, 1998; Ohad *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999). In Tieren regulieren Polycomb-Faktoren die Expression homeotischer Gene (Pirota, 1998). Allerdings sind solche regulatorischen Faktoren besonders in Pflanzen noch wenig bekannt. Dem gegenüber steht eine grosse Zahl von Transkriptionsfaktoren, welche vor allem in ihrer Funktion als Sequenz-spezifisch DNA-bindende Faktoren innerhalb des Transkriptionskomplexes von Bedeutung sind.

Typische Transkriptionsfaktoren weisen funktionelle Domänen wie DNA-Binde-Regionen, Dimerisierungs-, Transkriptionsregulationsdomänen und Kernlokalisierungssignale auf (Liu *et al.*, 1999). Die Gegenwart von Kernlokalisierungssignalen ist für die Translokation der Transkriptionsfaktoren an ihren Wirkungsort verantwortlich. Proteine der Kern-Transport-Rezeptor-Familie erkennen solche Signale und bewirken dann einen aktiven Import aus dem Cytoplasma über den Kernporenkomplex in den Zellkern (Nakielny & Dreyfuss, 1999). In der Regel besitzen Transkriptionsfaktoren DNA-Binde- und auch Protein-Protein-Interaktionsmotive von je einem oder zwei verschiedenen Typen. Zumeist werden Transkriptionsfaktoren von Genfamilien kodiert. Die Klassifikation von Transkriptionsfaktoren in bestimmte Familien wird anhand von gemeinsamen Strukturmerkmalen vorgenommen. Diese häufig sehr grossen Genfamilien werden dann weiter unterteilt in Subfamilien oder –gruppen in Abhängigkeit von der Anzahl der konservierten Domänen oder dem Abstand der konservierten Aminosäuren innerhalb der Domäne. Solche Multigenfamilien können im Genom entweder in sogenannten ‘clustern’ vorliegen oder komplett über alle Chromosomen verteilt sein (Takatsuji, 1998).

Wie aus tierischen Organismen, so sind auch aus Pflanzen ähnliche Transkriptionsfaktoren einer Reihe verschiedener Familien isoliert worden. Dazu zählen neben anderen die Multigenfamilien der bHLH-, der Homeobox-, der MYB-, der MADS-Box-, der bZIP-Faktoren und der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren. Alle Transkriptionsfaktorfamilien unterscheiden sich in der Struktur ihrer DNA-Binde-Motive. In der bHLH-Domäne ist eine basische Region mit einem ‘Helix-Loop-Helix’-Motiv verbunden, die Homoedomäne besteht aus drei bis vier  $\alpha$ -Helices mit einem N-terminalem Arm, die MYB-Domäne wird aus bis zu drei Wiederholungen (R1, R2, R3) eines ‘Helix-Turn-Helix’-Motives gebildet, die MADS-Domäne zeichnet sich durch eine lange  $\alpha$ -Helix mit zwei  $\beta$ -Strängen aus, das bZIP-Motiv beinhaltet eine basische Region zusammen mit einem Leucizipper-Motiv, und das Zink-Finger-Motiv ist eine Anordnung aus mehreren Cystein- und/oder Histidin-Resten um ein Zink-Atom (Liu *et al.*, 1999). Die funktionelle Bedeutung einiger Faktoren dieser Genfamilien ist vor allem in Tieren, aber auch in Pflanzen untersucht.

Neben überlappenden Funktionen, die beispielsweise die Zell-Zyklus-Kontrolle betreffen, können Vertreter einer in Tieren und Pflanzen vorkommenden Genfamilie rein Organismus-spezifische Aufgaben übernehmen. Faktoren der bHLH-Familie sind in Tieren an der koordinierten Genexpression im Skelettmuskel beteiligt (Spicer *et al.*, 1996). In Pflanzen sind sie hingegen in die Regulation von Pigmentierungsprozessen involviert (Bodeau & Walbot, 1992; Consonni *et al.*, 1993). In einigen Genfamilien spiegeln sich diese funktionellen Organismus-Spezifitäten in kleinen strukturellen Merkmalen wieder, die eine Unterscheidung in



Tier- oder Pflanzen-spezifische Vertreter ermöglichen. Homeobox-Faktoren spielen in tierischen Organismen eine entscheidende Rolle in der Festlegung der Organidentität ganzer Körpersegmente (Biggin & Tijan, 1989; Gellon & McGinnis, 1998). In Pflanzen sind Homeobox-Faktoren im allgemeinen an Organentwicklungen durch Zellspezifizierung und der Festlegung einer Abfolge verschiedener Zelltypen, aber auch an der Pigmentierung beteiligt (Kubo *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 1999). Innerhalb der Homeobox-Familie finden sich rein Pflanzen-spezifische Vertreter wie die HD-ZIP- und die PHD-Finger-Faktoren, die z.B. während des programmierten Zelltods oder in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (Mayda, *et al.*, 1999; Korfhage *et al.*, 1994).

Ebenso findet sich ein Strukturmerkmal in der Unterscheidung zwischen typisch tierischen und pflanzlichen MYB-Faktoren. Die Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren ist sehr divers in der Anzahl ihrer DNA-Binde-Motive. Der klassische MYB-Faktor beinhaltet drei Wiederholungen (R1, R2, R3). In Vertebraten bilden die MYB-Faktoren eine eher kleine Genfamilie und nehmen an der Kontrolle der Zellproliferation sowie an der Entwicklung teil. MYB-Faktoren mit nur einer Wiederholung (R3) spielen eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Neben nur einer äusserst geringen Anzahl solcher MYB-Faktoren in Pflanzen (Jin & Martin, 1999), beläuft sich die Zahl der typisch pflanzlichen MYB-Faktoren mit zwei Wiederholungen (R2, R3) auf über 100 in *Arabidopsis thaliana* (Kranz *et al.*, 1998). Als multifunktionale Genfamilie kontrollieren sie verschiedene Pflanzen-spezifische Prozesse wie die Regulation von Sekundärstoffwechselwegen, Zellformen, Pathogenabwehr sowie circadiane Prozesse oder Reaktionen auf Wachstums- und Stressfaktoren (Martin & Paz-Arez, 1997; Wang & Tobin, 1998; Meissner *et al.*, 1999). Die Veränderung des Expressionsmusters eines MYB-Faktors kann beispielsweise einen grossen Effekt auf die Anthocyanbiosynthese bewirken und die Pflanze rötlich gefärbt erscheinen lassen (Dixon & Steele, 1999). In Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie einem zweiten MYB-Faktor und einem Vertreter der Homeobox-Familie ist ein MYB-Faktor für die Abfolge von verschiedenen Zelltypen in der Wurzelepidermis verantwortlich (Lee & Schiefelbein, 1999).

Ähnlich der Familie der MYB-Faktoren unterscheiden sich auch pflanzliche und tierische Vertreter der MADS-Box-Familie, die als Homo- oder Heterodimere an die sogenannte CarG-Box mit der Konsensussequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG binden (Huang *et al.*, 1996). In tierischen Organismen spielen MADS-Box-Faktoren während der Embryogenese eine Rolle in der Muskel- und Nerven-Entwicklung (Naya *et al.*, 1999). In Pflanzen hingegen arbeiten sie in einem anderen Kontext. MADS-Box-Faktoren sind nicht nur bei der Transition von vegetativer zu reproduktiver Phase und der Entwicklung von Sporocyten wichtig (Michaels & Amasino, 1999; Yang *et al.*, 1999). In der Hauptsache sind sie in die Blütenentwicklung involviert

(Davies *et al.*, 1999). Als Blüten-homeotische Gene sind ihre Produkte an den Blütenorganidentitätsfunktionen beteiligt, die für die Ausbildung von Karpellen, Stamina, Petalen und Sepalen verantwortlich sind (Weigel & Meyerowitz, 1994). Entscheidend beeinflusst wird die Expression dieser Gene durch die Produkte der Blütenmeristem-Identitätsgene (Parcy *et al.*, 1998).

Zu den grossen Multigenfamilien in Pflanzen zählen insbesondere die bZIP-Familie ebenso wie die Familie der Zink-Finger-Proteine. Vertreter der bZIP-Familie binden an *cis*-Elementen mit der Kernsequenz ACGT wie die A-, C- und G-Boxen (Ramachandran *et al.*, 1994). Nicht nur anhand unterschiedlicher Binde-Affinitäten zu den verschiedenen Boxen, sondern auch in ihrem Expressionsmuster können bZIP-Faktoren differenziert werden. Einige Gene der bZIP-Familie werden Licht-abhängig reguliert, andere hingegen werden durch Phytohormone wie Abscisinsäure, Auxin oder Salicylsäure beeinflusst. Darüberhinaus vermitteln sie auch Hormon-induzierte Genexpressionen (Hobo *et al.*, 1999). Hauptsächlich finden bZIP-Faktoren ihre Bedeutung in der Pflanze als Regulatoren der Expression von Genen, die am Photosyntheseapparat beteiligt sind.

Die Familie der Zink-Finger-Proteine kann in Abhängigkeit von den an dem Zink-Finger-Motiv beteiligten Cystein- und Histidin-Resten in fünf Klassen aufgeteilt werden (Liu *et al.*, 1999). Neben dem klassischen Zink-Finger-Motiv C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> existieren noch weitere Cystein/Histidin-Strukturen. Dazu zählen das C<sub>3</sub>-H- sowie das C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-Motiv des sogenannten GATA-Fingers, das C<sub>3</sub>-H-C<sub>4</sub>-Motiv, welches unter dem Begriff Ring-Finger bekannt ist, und das C<sub>2</sub>-H-C<sub>5</sub>-Motiv, das als LIM-Finger bezeichnet wird. Allen gemein ist die Fähigkeit Zink zu komplexieren, wodurch eine Struktur entsteht, die zum einen Kontakte zu DNA, zum anderen aber auch Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Takatsuji, 1998). Vertreter aller fünf Klassen sind in pflanzlichen wie in tierischen Organismen zu finden. Allerdings gibt es trotz gleicher Motive wie dem klassischen C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Zink-Finger grundlegende Unterschiede in der Art der DNA-Bindung (Takatsuji, 1999). Die Heterogenität der Familie der Zink-Finger-Faktoren spiegelt sich in ihren vielschichtigen Funktionen bei der pflanzlichen Entwicklung wieder. Zink-Finger-Faktoren sind beispielsweise an der Entwicklung vegetativer und reproduktiver Organe beteiligt. Sie spielen auch eine Rolle als negative Regulatoren wie in der Reaktion auf Gibberellin-Signale oder beim Zelltod (Fridborg *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 1997).

Zu den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren in Pflanzen zählen unter anderem die Vertreter der YABBY-Familie. Sie weisen neben einem C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> Zink-Finger-Motiv zusätzlich auch eine Helix-Loop-Helix-Domäne mit Homologien zu den ersten zwei Helices der HMG-Box auf ('YABBY'-Domäne), welche normalerweise eine L-förmigen Domäne mit drei  $\alpha$ -Helices bildet (Sawa *et al.*, 1999). Neue Studien zeigen, dass zwei Vertreter der YABBY-Familie die

abaxiale Zellidentität in lateralen Organen spezifizieren, und ein weiterer Vertreter für die normale Entwicklung von Karpellen und Nektarien notwendig ist (Golz & Hudson, 1999; Sessions & Yanofsky, 1999; Bowman, 2000).

Pflanzliche Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren lassen sich aber nicht nur diesen fünf Klassen zuordnen. Die Zink-Finger-Motive einer Reihe pflanzlicher Transkriptionsfaktoren weisen Abwandlungen in ihrem Cystein-Histidin-Muster auf. Solche Pflanzen-spezifischen Zink-Finger-Motive sind charakteristisch für Vertreter der Dof-Familie oder der WRKY-Familie, von der später die Rede sein wird (Takatsuji, 1998). Die Dof-Familie ist durch das Vorhandensein eines einzelnen Fingers, der dem der GATA-Klasse, aber mit veränderten Abständen zwischen den Cysteinen ähnlich ist, gekennzeichnet, auf den dann eine Region basischer Aminosäurereste folgt. Vertreter der Dof-Familie zeigen eine durch Auxin und Salicylsäure beeinflusste Expression bzw. vermitteln z.B. eine Licht-regulierte und Gewebespezifische Expression ihrer Zielgene (Kang & Singh, 2000; Yanagisawa & Sheen, 1998).

Neben funktionellen Motiven pflanzlicher Transkriptionsfaktoren, die in tierischen Organismen gleichermassen konserviert sind, liegen viele dieser Motive in stark abgewandelter Form, die sich aber immer noch ähnlich sind, vor. Einige Genfamilien Pflanzen-spezifischer Transkriptionsfaktoren weisen allerdings funktionelle Domänen auf, die keine Homologien zu Domänen aus tierischen Faktoren besitzen. Dazu zählen die Familien der GT- und der AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren. GT-Faktoren besitzen als DNA-Binde-Region eine oder zwei Trihelices aus basischen, sauren und Prolin/Glutamin-reichen Motiven. Sie binden an *cis*-Elemente mit der Konsensussequenz G-(G)-(T/A)-A-A-(T/A)-(T/A). Diese GT-Elemente kommen in der Regel in Tandem-Wiederholungen in Promotoren überwiegend Licht-regulierter Pflanzengene vor. Somit liegt es nahe, dass GT-Faktoren in die Kontrolle Licht-regulierter Genexpression involviert sind (Dehesh *et al.*, 1995; Zhou, 1999).

Die AP2/EREBP-Multigenfamilie ist durch die sogenannte AP2-Domäne gekennzeichnet. Sie ist eine Region bestehend aus 68 Aminosäuren mit einer konservierten Domäne, die möglicherweise eine amphiphatische  $\alpha$ -Helix bildet (Liu *et al.*, 1999). Faktoren mit einem DNA-Binde-Motiv wie der AP2-Domäne sind bisher ausschliesslich aus Pflanzen bekannt (Riechmann & Meyerowitz, 1998). Die Anzahl der DNA-Binde-Motive dient der Gliederung der AP2/EREBP-Familie. Vertreter mit einer einzelnen AP2-Domäne werden in der EREBP-Subfamilie zusammengefasst, Faktoren mit zwei Domänen zählen zur AP2-Subfamilie. Diese strukturelle Aufteilung findet sich aber auch in den unterschiedlichen funktionellen Aufgaben der Faktoren in der Pflanze wieder. AP2-Faktoren nehmen Schlüsselfunktionen in der Kontrolle von Entwicklungsprozessen wie der Blütenentwicklung ein (Kunst *et al.*, 1989; Bomblies *et al.*, 1999). Dagegen sind EREBP-Vertreter in die Reaktion auf biotische und

abiotische Stressfaktoren wie Pathogenbefall, Kälte und Trockenheit involviert (Zhou *et al.*, 1997; Stockinger *et al.*, 1997, Gilmour *et al.*, 1998; Menke *et al.*, 1999).

Zusätzlich zu der grossen Anzahl von Transkriptionsfaktoren, die sich in mehreren Multigenfamilien zusammenfassen lassen, existieren auch eine Reihe von Faktoren, die eher kleine Familien bilden. Dazu gehören unter anderem die ARF- und die GRAS-Familie. ARF-Faktoren binden an Auxin-responsive *cis*-Elemente mit der Kernsequenz TGTCTC und sind somit in die Kontrolle Auxin-regulierter Genexpression involviert (Ulmasov *et al.*, 1997; Ulmasov *et al.*, 1995). Vertreter der GRAS-Familie nehmen an der Regulation des Gibberellin-Signalweges oder an der Wurzelentwicklung teil (Silverstone *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 1999).

Das Vorkommen einer solch grossen Anzahl an pflanzlichen Transkriptionsfaktoren, die einerseits zu anderen Organismen ähnliche und andererseits Pflanzen-spezifische funktionelle Domänen besitzen, scheint auf eine Notwendigkeit für die Entstehung der pflanzlichen Lebensform und dessen Weiterentwicklung hinzudeuten (Doebley & Lukens, 1998). Die konservierten Domänen von Transkriptionsfaktoren sind zwar zumeist strukturell charakterisiert, hingegen ist die Funktion vieler dieser Proteine noch immer unbekannt. Zum Einen interessiert die Frage nach den primären Zielgenen dieser Faktoren, zum anderen ist es wichtig, die Mechanismen der Regulation ihrer Expression zu verstehen. Die Expression ihrer Gene ist wiederum sowohl transkriptionell (Wagner *et al.*, 1999) als auch post-transkriptionell (Comelli *et al.*, 1999) reguliert. Die Aktivität ihrer Proteine kann post-translational z.B. durch Phosphorylierung (Reindl *et al.*, 1997; Wellmer *et al.*, 1999) modifiziert, aber auch durch Interaktion mit anderen Faktoren beeinflusst werden (Schwechheimer & Bevan, 1998). Gerade über Interaktionen der Faktoren z.B. mit sich selbst, mit Partnern innerhalb einer Familie oder mit Partnern verschiedener Familien bildet sich ein äusserst verzweigtes Netzwerk zur Kontrolle biologischer Prozesse (Scheres, 1998; Parcy *et al.*, 1998, Barton & Scheres, 2000). Wird dann noch eine zeitliche Abhängigkeit berücksichtigt, so ergibt sich ein regulatorisches System ungeheurer Komplexität (Hempel *et al.*, 2000). Daher können Änderungen in dem Expressionsmuster der Aktivität oder der Spezifität solcher regulatorischen Proteine grosse Effekte in der Pflanze hervorrufen. Die Kontrolle der Genexpression sowie der Funktion von Transkriptionsfaktoren ist somit ein wesentlicher Prozess, der zu der äusserst komplexen Regulation von Zielgenen im weitesten Sinne beiträgt. Nur so ist gesichert, dass in einer bestimmten Umweltsituation für die Pflanze keine ziellosen Reaktionen der Pflanze entstehen. Pflanzen haben einen spezifischen Transkriptions-Regulationsapparat mit einem hohen Vernetzungsgrad entwickelt, der ihnen durch eine enorme Anpassungsfähigkeit das Leben und Überleben in ihrer Umwelt sichert.

## 2. WRKY-FAKTOREN

Einige Multigenfamilien von Transkriptionsfaktoren kommen ausschliesslich im Pflanzenreich vor. Hierzu zählt die Familie der WRKY-Proteine. Sie wurden zunächst als Sequenz-spezifisch DNA-bindende Proteine aus einer Reihe verschiedener Pflanzen wie Süsskartoffel (SPF1), Gurke (SE71), Flug-Hafer (ABF1, 2), Petersilie (WRKY1, 2, 3, 4, 5), Tabak (WRKY1, 2, 3, 4, 5, WIZZ) und *Arabidopsis* (ZAP1, TTG2) isoliert (Ishiguro & Nakamura, 1994; Kim *et al.*, 1997; Rushton *et al.*, 1995; Rushton *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, eingereicht; Wang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999; Chen & Chen, 2000; Hara *et al.*, 2000; de Pater *et al.*, 1996; Johnson & Smyth, 1998). Kennzeichnend war dabei ihre Fähigkeit an ein bestimmtes *cis*-Element zu binden, welches als W-Box beschrieben ist. Die W-Box besteht aus dem Sequenzkernmotif TGAC, liegt aber in zwei verschiedenen Formen vor (Rushton & Somssich, 1998). In der einen ist das Sequenzkernmotif in das Hexamer TTGACC/T eingebettet, in der anderen ist es als Tetramer in einem Palindrom TGAC-GTCA (Eulgem *et al.*, 1999) oder auch in einem Tandem TGAC-TGAC (Yang *et al.*, 1999) angeordnet. Funktionell sind W-Boxen bisher als Elizitor-responsive Elemente charakterisiert, die eine schnelle und transiente Genexpression vermitteln (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999).

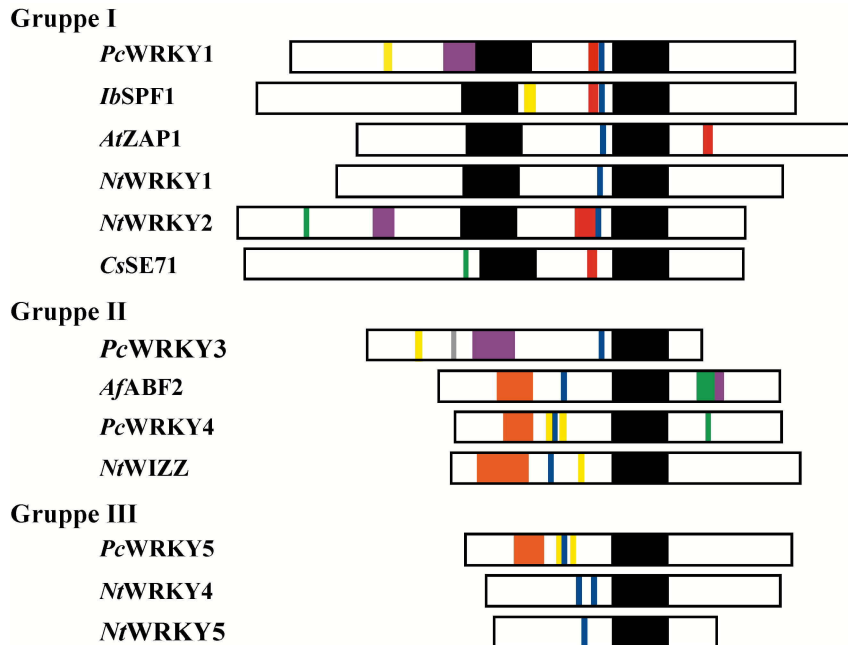
Ein weiteres Kennzeichen der WRKY-Proteine liegt in ihrer Primärstruktur, welches als Klassifizierungsmerkmal für die WRKY-Familie verwendet wird. Auffällig in der Struktur der WRKY-Proteine ist ein hoch konserviertes Motiv, bestehend aus rund 60 Aminosäuren mit der Konsensus-Sequenz D-WRKYGQK-PR-YY-C-C-K-V-R-Y-H-H/C (Eulgem *et al.*, 2000). Diese Domäne beinhaltet neben dem namensgebenden Motiv 'WRKY' auch eine hoch konservierte Abfolge aus zwei Cysteinen und zwei Histidinen (Abb.2, s. S. 15). Neben dem Vorhandensein dieser Domäne in allen WRKY-Proteinen ist ihnen ihre Fähigkeit an W-Boxen zu binden gemein. Die WRKY-Domäne übernimmt demnach die Funktion einer Sequenz-spezifisch DNA-bindenden Domäne, die mit hoher Affinität an W-Boxen bindet. Das C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motiv stellt in Anlehnung an bisher beschriebene C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motive aus Zink-Finger-Proteinen wahrscheinlich eine neuartige Zink-Finger-ähnliche Struktur dar (Liu *et al.*, 1999; Takatsuji, 1998). Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass die DNA-Bindung von der Gegenwart von Metallionen abhängig ist. Die Zugabe von chelatierenden Agenzien wie EDTA oder 1,10-*o*-Phenanthrolin unterbindet eine *in vitro* DNA-Bindung (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 2000). Eine mögliche Bedeutung der absolut konservierten Peptidsequenz 'WRKYGQK' ist noch völlig unklar. Vielleicht ist sie als Akzeptor in einer Signalkaskade involviert und mit für die optimale Ausbildung der DNA-Bindung verantwortlich. Hierfür gibt

es allerdings keinen Hinweis. Tatsächlich ist eine isolierte WRKY Domäne fähig, Sequenz-spezifisch an W-Boxen zu binden (Eulgem *et al.*, 1999). Jedoch besteht weiterhin die Frage, ob das WRKYGQK Peptid daran beteiligt ist.

Ausserhalb der WRKY-Domäne sind bei den meisten WRKY-Proteinen nahezu keine Sequenz-Homologien zu finden. Eine Ausnahme bilden dabei Merkmale, die Transkriptionsfaktoren im allgemeinen kennzeichnen wie Kernlokalisierungs-, Transkriptionsregulierungs-, Protein-Protein-Interaktions- und Phosphorylierungsmotive (Eulgem *et al.*, 2000). Damit übereinstimmend ist für einige WRKY-Faktoren eine Lokalisierung im Zellkern (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000) bzw. eine transaktivierende Fähigkeit gezeigt (de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999; Cormack *et al.*, eingereicht). Hingegen ist noch nicht eindeutig bestätigt, dass WRKY-Faktoren als Monomere, Homodimere oder Heterodimere DNA binden. Allerdings kann das Vorhandensein einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne wie ein Leucinzipper für eine effiziente DNA-Bindung durchaus von Bedeutung sein, indem WRKY-Faktoren als Teile von Proteinkomplexen fungieren (Yang *et al.*, 1999; Cormack *et al.*, eingereicht). Für eine mögliche Phosphorylierung von WRKY-Faktoren gibt es ebenfalls Hinweise (Fukuda, 1997; Yang *et al.*, 1999). Weitere Homologien ausserhalb der WRKY-Domäne sind nur kurze Sequenzmotive wie z.B. die hoch konservierte HARF-Domäne (Eulgem *et al.*, 2000).

Anhand der WRKY-Domäne als Klassifizierungsmerkmal können die WRKY-Proteine in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Abb.1). Gruppe I beinhaltet Vertreter von WRKY-Proteinen mit zwei WRKY-Domänen. Für ihre DNA-Bindung ist allerdings die C-terminale WRKY-Domäne alleine ausreichend (Ishiguro & Nakamura, 1994; de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Die Funktion der N-terminalen WRKY-Domäne ist dagegen unklar. Als schwache DNA-bindende Domäne oder aber auch als mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne könnte sie einer Erhöhung der Affinität oder der Spezifität bei der DNA-Bindung dienen. WRKY-Proteine mit einer einzelnen WRKY-Domäne werden in der Gruppe II zusammengefasst. Die WRKY-Domäne dieser Vertreter ist der C-terminalen WRKY-Domäne der Proteine aus Gruppe I ähnlicher als der N-terminalen Domäne. Zusätzlich zu dieser Verwandtschaft ist sie ebenfalls als DNA-bindende Domäne charakterisiert (Cormack *et al.*, eingereicht). WRKY-Vertreter der Gruppe III unterscheiden sich von denen der Gruppe II nur in ihrem Zink-Finger-Muster. In ihrer einzelnen WRKY-Domäne ist anstelle des C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Musters ein C<sub>2</sub>-H-C Muster getreten. Zusätzlich ist der Abstand zwischen den ersten zwei Cysteinen um zwei Aminosäuren vergrössert. Bisher sind alle WRKY-Faktoren mit einem Leucinzipper den Gruppen II und III zuzuordnen (Eulgem *et al.*, 2000). Eine detaillierte Gliederung der WRKY-Faktoren ist anhand der Sequenzhomologien in ihrer DNA-bindenden

WRKY Domäne erkennbar. Diese wird durch das zusätzliche Vorhandensein konservierter Kurzmotive wie z.B. der HARF-Domäne sowie ein bestimmtes Arrangement dieser Motive gestützt (Eulgem *et al.*, 2000).



**Abb1.:** Übersichtsdarstellung aller publizierten WRKY-Faktoren (nach Eulgem *et al.*, 2000). Charakteristische Domänen und Regionen der WRKY-Proteine aus Petersilie (*Pc*), Süsskartoffel (*Ib*), *Arabidopsis* (*At*), Tabak (*Nt*), Gurke (*Cs*) und Flug-Hafer (*Af*) sind wie folgend gekennzeichnet: WRKY-Domäne (schwarz), HARF-Domäne (grau), mögliche basische NLS (blau), Leucinzipper (orange), Serin/Threonin-reich (gelb), Glutamin-reich (violett), Prolin-reich (grün) und saure Regionen (rot).

Als ein weiteres Untergliederungsmerkmal kann die Genstruktur herangezogen werden. So ist die kodierende Region der DNA-bindenden WRKY-Domäne in fast allen Fällen von einem Intron nach dem Kodon für Arginin vor dem C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motiv unterbrochen. In zwei Untergruppen der Gruppe II ist das Intron allerdings 16 Kodons weiter C-terminal gelegen (Eulgem *et al.*, 2000). Einzige Ausnahmen dieses strukturellen Merkmales von insgesamt 66 *WRKY*-Genen aus *Arabidopsis thaliana* und auch den publizierten *WRKY*-Genen aus anderen Organismen sind *TTG2/AtWRKY44* und *AtWRKY53*, bei denen an dieser Position die kodierende Sequenz nicht durch ein Intron unterbrochen ist. All diese Gliederungsmerkmale können für eine Analyse einer Multigenfamilie von grosser Bedeutung sein, vor allem im Hinblick auf mögliche überlappende Expressionsmuster und Kontrolle von Zielgenen.

Obwohl eine grosse Zahl an Sequenzen von *WRKY*-Genen in den Datenbanken vorhanden ist, ist nur wenig über die Funktion ihrer Proteine in der Pflanze bekannt. Einige Hinweise dazu

finden sich dennoch in den Expressionsmustern bestimmter *WRKY*-Gene. Neben verschiedenen Gewebe-spezifischen Expressionen z.B. in Wurzeln, grünen Geweben und Blüten (Ishiguro & Nakamura, 1994; de Pater *et al.*, 1996) oder auch ganz speziell in Trichomen und Teilen der Samenschale (Johnson & Smyth, 1998), zeigen sich auch Entwicklungs-abhängige Expressionsmuster. Die Transkriptmenge von *SE71* steigt während der Entwicklung und Reifung von Koteltydonen bis hin zu ihrer Seneszenz an (Kim *et al.*, 1997). Darüberhinaus ist die Expression von *WRKY*-Genen durch Hormone wie Salicylsäure induziert (Yang *et al.*, 1999). Aber auch andere Stimuli beeinflussen die Expression von *WRKY*-Genen. Dazu zählen verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien und Oomyceten (Wang *et al.*, 1998; Dellagi *et al.*, 1999; Eulgem *et al.*, 1999), aber auch pilzliche Elizitoren, Verwundung und lokale mechanische Stimulation (Rushton *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, eingereicht; Hara *et al.*, 2000; Gus-Meyer *et al.*, 1998). Die Art des Expressionsmusters nach einem Stimulus zeigt dabei häufig das Bild einer sehr schnellen und transienten Reaktion, die wahrscheinlich von einer *de novo* Synthese anderer Faktoren unabhängig ist (Rushton *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 2000; Cormack *et al.*, eingereicht).

Zusätzlich zu diesen Expressionsdaten ist eine grosse Zahl an *WRKY*-Sequenzen aus 'expressed sequenced tags' (ESTs) in Datenbanken vorhanden. Diese stammen sowohl aus vegetativen Geweben wie Wurzeln und Blättern, aus reproduktiven Geweben wie Blüten und speziell Ovulen und Samen als auch aus seneszenten Geweben wie Abscissionszonen. Hinzu kommen noch Behandlungen von Geweben mit Pathogenen oder Salz- und Trockenstress (Eulgem *et al.*, 2000). Zusammengefasst betrachtet, sind dies alles Andeutungen auf eine Funktion von *WRKY*-Faktoren in verschiedensten Gewebe- und Zelltypen als Reaktion auf eine bestimmte Stresssituation sowie während der Entwicklung. Die Vermutung, dass *WRKY*-Faktoren auch an der pflanzlichen Entwicklung beteiligt sind, wird durch den mutanten Phänotyp des Verlustallels *ttg2/AtWRKY44* gestärkt (Johnson & Smyth, 1998). Die Faktoren der *WRKY*-Multigenfamilie, die als rein Pflanzen-spezifische Vertreter der Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren gelten, können demnach als Regulatoren in vielen biologischen Prozessen im Laufe eines pflanzlichen Lebenszyklus fungieren. Ihre und auch die funktionelle Analyse und eingehende Charakterisierung anderer Multigenfamilien pflanzlicher Transkriptionsfaktoren ist daher von beachtlicher Bedeutung für das Verstehen des pflanzlichen Organismus und seiner besonderen Lebensweise.

### 3. ZIELE



Das Arbeiten mit neuen Genfamilien wie der WRKY-Familie ist eine grosse Herausforderung. Zum Einen sind viele Fragestellungen, wie z.B. nach der biologischen Funktion der einzelnen WRKY-Faktoren, einer Gruppe von WRKY-Faktoren oder sogar der gesamten Bedeutung der WRKY-Familie noch unbeantwortet, zum anderen stellt die Komplexität einer Multigenfamilie einen hohen Anspruch an das experimentelle System. Weltweit ist *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus einer höheren Pflanze für molekularbiologische und genetische Studien etabliert. Gerade im Hinblick auf 'functional genomics' ist *Arabidopsis thaliana* durch einfache Methoden der Transformation (Clough & Brent, 1998) sowie durch das Vorhandensein von grossen Insertions-Mutanten-Kollektionen (Wisman *et al.*, 1998; Speulman *et al.*, 1999; Tissier *et al.*, 1999; Parinov *et al.*, 1999) die Modellpflanze *per se*. Neben Insertionspopulationen existieren in *Arabidopsis thaliana* aber auch 'enhancer trap'-Kollektionen (Sundaresan *et al.*, 1995). Hinzu kommt, dass durch das internationale Genom-Sequenzierungsprojekt eine grosse Anzahl von Informationen als genomische Sequenzen oder auch als ESTs vorhanden sind (<http://www.arabidopsis.org/>). So sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt rund 60% der genomischen Sequenz von *Arabidopsis thaliana* in öffentlichen Datenbanken zugänglich (Somerville & Somerville, 1999). Trotz dieser Masse von Sequenzen ist die Funktion von nur etwa 50% der Gene annähernd bekannt (Bevan *et al.*, 1998). In den Datenbanken lassen sich derzeit mindestens 66 Sequenzen für WRKY-Genen finden (Abb.2 und Tab.4, s. S. 151).

Mittels 'functional genomics' soll eine Aufklärung der Funktion einer grossen Zahl unbekannter Gene erfolgen. Zusammen mit der Tatsache, dass *Arabidopsis thaliana* ein kleines Genom von rund 120 Mb mit einer hohen Gendichte von etwa 28000 Genen hat (Meyerowitz, 1999), ist es der ideale Organismus für die Analyse einer pflanzlichen Familie von Transkriptionsfaktoren wie der WRKY-Faktoren. Dabei werden detaillierte Analysen von Expressionsmustern, Null- und Überexpressionsmutanten auf die Spur der Funktion eines unbekanntes Proteins führen und mögliche Rollen in den verschiedensten biologischen Prozessen einer Pflanze aufweisen.

Derzeitig (Anfang 2000) wird die Grösse der WRKY-Superfamilie in *Arabidopsis thaliana* auf etwa 100 WRKY Faktoren geschätzt. Zu Beginn der Arbeit (Anfang 1997) waren davon nur 18 Vertreter bekannt. Noch weniger war über Funktionen von WRKY-Faktoren und ihrer Zielgene bekannt. Zu den Funktionen zählt möglicherweise eine Beteiligung an der Kontrolle Pflanzen-spezifischer Prozesse wie Pathogenabwehr (Rushton *et al.*, 1996). Allerdings beziehen sich die bisher vorliegenden Informationen nicht auf Vertreter der WRKY-Multigenfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Doch gerade diese 'Modellpflanze' für

molekulargenetische Analysen ist der ideale Organismus zur Identifizierung von ‘Gen’-Funktionen mittels reverser Genetik. Anhand einiger Kurz-Charakterisierungen der zur Verfügung stehenden WRKY-Proteine sollten deshalb sowohl interessante als auch geeignete Kandidaten für eine intensive funktionelle Analyse bestimmt werden. Da zu Beginn der Arbeit keine WRKY Null-Mutanten bekannt waren, sollte vor allem die Identifizierung solcher Mutanten erfolgen. Bei der daran anschließenden funktionellen Charakterisierung sollte im Mittelpunkt des Interesses die Frage nach der Bedeutung der WRKY-Faktoren als Regulatorproteine stehen, d.h. in welche Signalkaskaden sie involviert und welche Gene durch diese Faktoren in ihrer Expression beeinflusst sind. Die Aufklärung ihrer biologischen Relevanz als Transkriptionsfaktoren sollte dabei unter anderem durch die Identifikation von möglichen Zielgenen als Fernziel vor Augen stehen.

**A**

**Gruppe I**

```

WRKY1    IREKVMEDGYNWRKYGQKLVKGNEFVRSYYRCTHPNCKAKKQLERSAG.GQVVDTVYFGEHDEPKPL
WRKY2    AGGAPAE DGYNWRKYGQKLVKGSEYPRSYYKCTNPNQVKKKVERSRE.GHITETIYKGAHNLKPP
WRKY3    NADKPADDGYNWRKYGQKQVKGSDFPSYKCTHPACPVKKKVERS LD.GQVTEIYKQHNELPQ
WRKY4    NVDKPAD DGYNWRKYGQKQVKGSEFPSYKCTNPGCPVKKKVERS LD.GQVTEIYKQHNELPQ
WRKY19   NVDKQVNDGYNWQKYGQKLVKGSKFLSYKCTYLGCPSKRKVERS LD.GQVAEIVYKDRHNEFPN
WRKY20   TPSILADDGYNWRKYGQKHVKGSEFPSYKCTHPNCEVKKLFERSHD.GQITDIYKGTDEPKPQ
WRKY25   MVSRSNSDGYGWRKYGQKQVKKSENPFSYFKCTYPDQVSKKIVETASD.GQITEIYKGGHNEPKPE
WRKY26   SSNKTSD DGYNWRKYGQKQVKGSENPFSYFKCTYPNCLTKKKVETSLVKGQMIETVYKGSNNEPKPQ
WRKY32   VPRTPARDGYNWRKYGQKQVKSPKGSRSYYRCTYTECCAKKIECSNDS.GNVVEIVNKGLHTEPPR
WRKY33   REQRKGEDGYNWRKYGQKQVKGSENPFSYKCTFPNCEPTKKKVERSLE.GQITEIVYKGSNNEPKPQ
WRKY34   ACCAPADDGYNWRKYGQKLVKGSEYPRSYKCTHPNCEAKKVERSRE.GHIETIYTGDIHESKPP
WRKY44   TGDSSVDGYNWRKYGQKQVKGSECPFSYKCTHPKCPVKKKVERSVE.GQVSEIVYQGEHNEPKPS
WRKY58   NVDKPAD DGYNWRKYGQKPIKGEYPRSYKCTHVNCPVKKKVERS SD.GQITQIYKQHDNERPQ
    
```

**B** s. folgende Seite

**Abb2.:** Sequenzvergleich von WRKY-Domänen der derzeitigen bekannten Vertretern der *At*WRKY-Multigenfamilie (schwarz). **A** N-terminale WRKY-Domänen der Gruppe I-Faktoren. **B** C-terminale (DNA-bindenden) WRKY-Domänen der Gruppe I-Faktoren zusammen mit den einzelnen WRKY-Domänen der Gruppe II- und III-Faktoren. Die jeweiligen Gruppen und Subgruppen sind gekennzeichnet. Hoch konservierte Aminosäurereste inklusive dem ‘WRKYGQK’-Peptid sind rot sowie die putativen Zink-Liganden des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>- bzw. C<sub>2</sub>HC-Musters blau hervorgehoben. Das Sequenz-‘alignment’ wurde mit dem PILEUP Programm (‘default’ Parameter) des GCG Pakets Version 10.0 erstellt.

**B**

**Gruppe I**

WRKY1 TLFDIVNDGYRWRKYGQKSVKGSFYPRSYRCSSPG...CPVKKHVERSSHDTKLLITTYEGKHHDHMP  
 WRKY2 SDVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTAPG...CTVRKHVERASHDLKSVITTYEGKHNDHVP  
 WRKY3 SEVDLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPFYPRSYRCTTPD...CGVRKHVERAATDPKAVVTTYEGKHNDHVP  
 WRKY4 SEVDLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPFYPRSYRCTTPG...CGVRKHVERAATDPKAVVTTYEGKHNDHVP  
 WRKY20 SEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTAHG...CPVRKHVERASHDPKAVITTYEGKHHDHVP  
 WRKY25 SDIDVLDIGFRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTFQG...CGVKKOVERSADERAVLTTYEGRHHDI P  
 WRKY26 SDIDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTFTG...CFVRKHVERAFQDPKSVITTYEGKHKHQIP  
 WRKY32 GDVIGCGDGYRWRKYGQKMKVGNPNPRSYRCTTSAG...CPVRKHVETAVENTKAVITTYEGKHNDHMP  
 WRKY33 SDIDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTTIG...CPVRKHVERASHDMRAVITTYEGKHNDHVP  
 WRKY34 SDIDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTANG...CTVTKHVERASDDPKSVITTYEGKHNDHVP  
 WRKY44 VESDSLEDGFRWRKYGQKVVKGNAYPRSYRCTSAN...CRARKHVERASDDPRAFITTYEGKHNDHLL  
 WRKY45 SQVDILDDGYRWRKYGQKAVKNPFPRSYRCTEEG...CRVKQVQRQWDEGVVTTYQGVHTHAVD  
 WRKY58 SEVDLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCTTPN...CTVRKHVERASTDAKAVITTYEGKHNDHVP  
 WRKY10 SDEDNPNDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYRCKTNI...CRVKKHVERGADNIKLVTTYDGTNHPS P

**Gruppe II**

a) WRKY18 DTSLTVKDGFRWRKYGQKVTRDNPSPRAYFRCSFAPS...CPVKKKQVRSADPSLLVATYEGTHHNLGP  
 WRKY40 KDGFRWRKYGQKVTRDNPSPRAYFRCSFAPS...CSVKKKQVRSVEDQSVLAVTYEGTHHNPMP  
 WRKY60 VSSLTVKDGFRWRKYGQKITRDNPSRAYFRCSFAPS...CLVKKKQVRSADPSFLVATYEGTHHNTGP  
 b) WRKY6 SEAPMISDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCTMATG...CPVRKQVQRCAEDRSILITTYEGNHHPPL  
 WRKY9 CETATMNDGCQWRKYGQKTAKGNPCPRAYRCTVAPG...CPVRKQVQRCAEDMSILITTYEGNHHPPL  
 WRKY31 SEAMISDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCTMAGG...CPVRKQVQRCAEDRSILITTYEGNHHPPL  
 WRKY36 CEDPSINDGCQWRKYGQKTAKTNLPRAYRCSMSNS...CPVRKQVQRCEETSFAFMTTYEGNHHPPL  
 WRKY42 SEAPMLSDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCTMAVG...CPVRKQVQRCAEDRTILITTYEGNHHPPL  
 WRKY47 HKQHEVNDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCTMAVG...CPVRKQVQRCAEDTTILITTYEGNHHPPL  
 WRKY8 NDGCQWRKYGQKIAGKNPCPRAYRCTIAAS...CPVRKQVQRCEEDMSILITTYEGNHHPPL  
 c) WRKY12 TEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSFYPRSYRCTTQK...CNVKKRVERSYQDPTVVITTYEGNHHPPI P  
 WRKY13 SDVDVLDGYRWRKYGQKVVKNSLHPRSYRCTHNN...CRVKKRVERLSEDCRMVITTYEGRHHHIPS  
 WRKY23 SEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSFYPRSYRCTTAS...CNVKKRVERSFDPSTVVITTYEGQHTHISP  
 WRKY24 SDDVLDGYRWRKYGQKSVKHNAPRPSYRCTYHT...CNVKKQVQRLAKDPNVVTTYEGVHNHPCE  
 WRKY28 SEVDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSFYPRSYRCTTQK...CNVKKRVERSFQDPTVVITTYEGNHHPPI P  
 WRKY43 SDADILDDGYRWRKYGQKSVKNSLHPRSYRCTQHM...CNVKKQVQRLSKETSIVETTYEGHHPHPC  
 WRKY48 KSIDNLDGYRWRKYGQKAVKNSFYPRSYRCTTVG...CGVKKRVERSSDPSIVMTTYEGQHTHPFP  
 WRKY49 NSNGMCDGYRWRKYGQKSIKNSPNPRSYRCTNPI...CNAKKQVERSIDESNTYITTYEGHHPHYTY  
 WRKY50 SEVEVLDGFRWRKYGQKMKVKNPFPRSYRCSVDG...CPVKKRVERDRDPSIVITTYEGSHHSSM  
 WRKY51 DVMDGFRWRKYGQKSVKNNINKRNYRCSSEG...CSVKRVERDGDAAAVITTYEGVHNHESL  
 WRKY56 SDDVLDGYRWRKYGQKSVKNNAPRPSYRCTYHT...CNVKKQVQRLAKDPNVVTTYEGVHNHPCE  
 WRKY57 SDVDNLEDGYRWRKYGQKAVKNSFFPRSYRCTNSR...CTVKKRVERSSDPSIVITTYEGQHCHQTI  
 WRKY59 DEKVALDDGYRWRKYGQKPIKGSFFPRHYHVCSSPD...CNVKKKIERDTNPNPDYILTYEGRHHHPSP  
 WRKY68 SEVLHLDGYRWRKYGQKPKVDSFFPRNYRCTTTW...CDVKKRVERSFSDPSSVITTYEGQHTHPRP  
 d) WRKY7 KMAIDIPSDSFRWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSVRG...CPARKHVERALDDAMLIIVTYEGDHHALV  
 WRKY11 KIADIPDDEYSWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSFTFRG...CPARKHVERALDDPAMLIIVTYEGHHPHNSQS  
 WRKY15 KMSDVPDDYSWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSVRG...CPARKHVERAADSSMLIVTYEGDHHNSLS  
 WRKY17 KIADIPDDEYSWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSFTFRG...CPARKHVERALDDSTMLIVTYEGHHPHHQS  
 WRKY21 KVADIPDDEYSWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSMRG...CPARKHVERCLEDDPAMLIIVTYEGHHPHKL  
 WRKY39 KIADIPDDEYSWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSVRG...CPARKHVERCIDETSMLIVTYEGHHPHNSRI  
 e) WRKY14 SGEVVPSDLWAWRKYGQKPIKGSFPHRGYRCSSSKG...CSARKQVERSRDTPNMLVITTYTSEHHPWP  
 WRKY16 DRGSRSSDLWAWRKYGQKPIKGSFYPRSYRCSASSG...CFARKQVERSRDTPNVSVITTYISEHHPFP  
 WRKY22 AAEALNSDVWAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSG...CLARKQVERNRSDPKMFIVTYTAEHHPAP  
 WRKY27 TQENLSSDLWAWRKYGQKPIKGSFYPRNYRCSSSKG...CLARKQVERSNLDPNIFIVTYTGEHTHPRP  
 WRKY29 KEENLSSDAWAWRKYGQKPIKGSFYPRNYRCSSSKG...CLARKQVERNPQNPEKFTITYTNEHHPHELP  
 WRKY35 SGEVVPSDLWAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSSKG...CSARKQVERSRDTPNMLVITTYTSEHHPWP  
 WRKY65 GDTTPPSDSWAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTKG...CPARKQVERSRDPTMILITTYTSEHHPWP  
 WRKY69 GEVYPPSDSWAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSSKG...CPARKQVERSRVDPKLMITTYACDHHHPFP

**Gruppe III**

WRKY30 GVDRTLDDGFRWRKYGQKIDILGAKFRGYRCTYRKSQGCATKQVQRSDENQMLLEISYRGTHSCSQ  
 WRKY38 SPDPYYDGYLWRKYGQKSIKSNHQRSYRCSYNKDHNCARKHEQIKDNPPVYRTTYFGHTCKTE  
 WRKY41 GLEGPHDDIFSWRKYGQKIDILGAKFRPSYRCTFRNTQYCATKQVQRSDGDPTIFEVYRGTHTCSQG  
 WRKY46 QENGSIDDGHCWRKYGQKEIHGSKNPRAYRCTHRFTQDLAVKQVQRSDTDPSEFVKYLGHTCNNI  
 WRKY52 IPAIDEGDLWTWRKYGQKIDILGSRFRGYRCAFKFTHGCKATKQVQRSETDSNMLAITTYLSEHHPRP  
 WRKY53 GLEGPODDVFSWRKYGQKIDILGAKFRPSYRCTHRSTQNCWATKQVQRSDGDATVFEVYRGTHTCSQA  
 WRKY54 VEAKSSEDRYAWRKYGQKEILNTFFPRSYRCTHKTPTQGCATKQVQRSDQDSEMFOITYIGYHTCTAN  
 WRKY55 NTDLPDDNHTWRKYGQKEILGSRFRAYRCTHQKLYNCPAKQVQRLNDPPTFRVYRGSHTCYN  
 WRKY62 SRTMCPNDGFTWRKYGQKIKASAHKRCYRCTYARDQNCNATKRVQIKDNPPVYRTTYLGHVCKAF  
 WRKY63 SPNPRLDGFTWRKYGQKTIKTSYQRCYRCAAYARDQNCNATKRVQMIQDPPVYRTTYLGHVCKAF  
 WRKY64 SPTPRPDGFTWRKYGQKTIKTSYQRCYRCAAYARDQNCNATKRVQMIQDPPVYRTTYLGHVCKAV  
 WRKY66 SPTPAHIDGFIWRKYGQKTIKTSYQRCYRCAAYARDQNCNATKRVQIKDNPPVYRTTYLGHVCKACEAP  
 WRKY67 SPTPIYHDFLWRKYGQKIKESYQRSYRCAAYTKDQNCNATKRVQIKIHNPPYRSTTYFGHTICQLH

## II MATERIAL

### 1. CHEMIKALIEN, ENZYME UND RADIOISOTOPE

Alle im analytischen Reinheitsgrad verwendeten Laborchemikalien wurden in der Regel von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von Merck. Substanzen für die Herstellung von Kulturmedien wurden von den Firmen Difco Lab (Detroit, USA), GibcoBRL (Paesley, GB) und Sigma geliefert. Sämtliche Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, DNase, RNase, Mazerase, Lysozym und Zellulase sowie DNA-, RNA- und Protein-Größenmarker wurden von den Firmen Amersham (Buckinghamshire, UK), Roche/Boehringer (Mannheim), GibcoBRL, New England Biolabs (New England, USA), Serva und Stratagene verwendet. Hersteller des benutzten Radioisotops ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-dCTP (3000 Ci/mmol) war Amersham. Das für die Reinigung radioaktivmarkierter Sonden verwendete Säulenmaterial G-50 wurde von Pharmacia bezogen. Die Röntgenfilme lieferte die Firma Kodak (Rochester, USA).

### 2. BAKTERIEN UND PLASMIDE

**Tab.1:** Übersicht über die benutzten Bakterienstämme und Vektoren inklusive zugehöriger Merkmale und Referenzen.

<i>E. coli</i> -Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
DH5 $\alpha$	F, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
SG13009 [pREP4]	<i>nal</i> <sup>S</sup> , <i>str</i> <sup>S</sup> , <i>rif</i> <sup>S</sup> , <i>lac</i> <sup>-</sup> , <i>ara</i> <sup>-</sup> , <i>gal</i> <sup>-</sup> , <i>mtl</i> <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , <i>recA</i> <sup>+</sup> , <i>uvr</i> <sup>+</sup>	Firma Qiagen
SURE	<i>e14(mcr)</i> , $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsd-SMR-mrr</i> )171, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> , <i>umuC::Tn5(kan<sup>r</sup>)</i> , <i>uvrC</i> , {F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Z $\Delta$ (M15Tn10, tet <sup>r</sup> )}	Firma Stratagene
<i>Saccharomyces</i>	wesentliche Merkmale	Referenz

<i>cerevisiae</i> -Stamm		
EGY48	<i>MATa, ura3, his3, trp1, LexA<sub>op(x6)</sub>-LEU2</i>	Estojak <i>et al.</i> , 1995
<i>A. tumefaciens</i> - Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
GV3101	mit pMP90-virulenz Plasmid, C59C1, rif <sup>r</sup>	van Labereke <i>et al.</i> , 1974
Plasmid	wesentliche Merkmale	Referenz
pBluescriptSK(+/-)	<i>f1ori, colE1ori, lacZ</i> , amp <sup>r</sup>	Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992
pBT8-Luc	<i>colE1ori</i> , amp <sup>r</sup> , 35S-Promotor, <i>luc</i> -ORF ( $\Delta$ <i>Xba</i> I, $\Delta$ <i>Eco</i> RI, $\Delta$ <i>Clal</i> ), <i>nos</i> PA, MCA	Sprenger, 1997
pCR2.1-TOPO	<i>f1ori, lacZ<math>\alpha</math></i> , T7-Promotor, pUCori, kan <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup>	Firma Invitrogen
pEG202	<i>LexA<sub>(1-202)</sub>, HIS3</i> , amp <sup>r</sup>	Gyuris <i>et al.</i> , 1993
pGPTV	left border, pAnos, <i>uidA</i> -ORF, MCS, <i>Pnos, nptII</i> , PAg7, right boeder, RK2ori, kan <sup>r</sup>	Koncz & Schell, 1986
pGJ619	2 x 35S-Promotor, TL, 2 x <i>GFP</i> -ORF, 35S-pA, amp <sup>r</sup>	Reichel <i>et al.</i> , 1996
pJG4-5	acidic activator B42, <i>TRP1</i> , amp <sup>r</sup> , HA epitope tag	Gyuris <i>et al.</i> , 1993
pQE30	T5-Promotor, 2x <i>Lac</i> Op, RBSII, MCS, His <sub>6</sub> , T <sub>0</sub> , amp <sup>r</sup>	Firma Qiagen
pREP4	kan <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	Farabaugh, 1978
pSK-GFP	2 x 35S-Promotor, TL, <i>GFP</i> -ORF, 35S-pA, amp <sup>r</sup>	Reichel <i>et al.</i> , 1996
pTA7002	left border, 6xGAL4UAS, 35S-Promotor, pea <i>rbcS</i> -3A-Terminator, <i>nos</i> -Terminator, <i>hpt</i> , <i>nos</i> -Promotor, pea <i>rbcS</i> -E9-Terminator, ratGR, VP16, GAL4, 35S-Promotor, right border, kan <sup>r</sup>	Aoyama & Chua, 1997
pUC-GUS	<i>uidA</i> -ORF, <i>nos</i> polyA, amp <sup>r</sup>	van de Löcht <i>et al.</i> , 1990

### 3. DESOXYOLIGONUKLEOTIDE

Alle verwendeten Desoxyoligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG (Ebersbach) oder von der Firma GibcoBRL bezogen. Die Sequenzen der Primer sind jeweils in 5'→3'-Orientierung angegeben.

*AtWRKY2*-spezifische Oligonukleotide:

---

A2I	TGA TGA TAT TGG AGC ATC ATT CAG C
A2II	TCA CGT ATG GCT CTT GTT GAT CCA C
A2IV	TCT GCA TCA TTG CTT CAC TCA TCC
WK2a	CTG GTG GTG CGC CTG CAG AGG ATG
WK2b	CAT TAG AGA ATG TTG AAG AAG CAT CAA CC

***AtWRKY3*-spezifische Oligonukleotide:**

WK3a	CCT CAA CGG TTA ACT TCA ATC ATC AAC
WK3b	CTG TAA TAT CAG AGA TTC TGT CCA GAG AAA CC

***AtWRKY4*-spezifische Oligonukleotide:**

WK4a	GCA GTA AGT CAA GCT ACG ACA ACA GAG C
WK4b	CAA ACC GCC AGG TCG ATT ATC TGG

***AtWRKY7*-spezifische Oligonukleotide:**

WK7a	GAT GAG ATG ACT GTT GAG CTG ATG ATG AG
WK7b	GAC GGT GCT CCG TTT GCG AGC ATC
A7II	GTC ACC ACC AGT CTC AGC GAC GAA C
A7III	ATT TTG CTA CTT ACT GCT GGA ACT C
A7IV	TGT CAT GAT TCA TCG TCG TCG TCT C

***AtWRKY11*-spezifische Oligonukleotide:**

WK11a	CTG AGT GCT CAT GCT CGA GAC ATC TC
WK11b	GAC TGC TCC GAG ATC ACT GAC TTC AC

***AtWRKY20*-spezifische Oligonukleotide:**

A4I	ACC TTT ACT GAG CAG AAG TCC AGT G
A4II	CTC AAC CTG GTC GCC GAA ACT CTG G
A4IIIb	AAG CTC CCG GAT GGG TTT CAC TAA G
A4IV	TGG GTA AGA TGA ATT GTT CAA GGA C
R4I	CAC CAT CGT CAG ATG CTG AGA TAG
R4II	CCA GAG TTT CGG CGA CCA GGT TGA G

***AtWRKY6*-spezifische Oligonukleotide:****Promotor-spezifische Oligonukleotide:**

WK6p	TTA AGG ATC CAG ACC ATC CTC TGT CCA TAT ATA G
WK6p1	AAT TAA GCT TTC ACG TGG AAC GCG CCG CAG
WK6p2	AAT TAA GCT TAT ATT AAT CTG ATT CAT AAT CTT A
WK6p3	AAT TAA GCT TGC TTT GAA AGG ATT GCC CAA TTG TTT G
WK6p4	AAT TAA GCT TTG AAT TTC CAT GAA AAT GAA ACG GGC TTA G
WK6p5	AAT TAA GCT TAA GTC TCC GGA AAA TAA AAT CAA AGT TCA TTA AC

**Gen-spezifische Oligonukleotide:**



---

A6I	AGG TAA TAG AAG CTG CTG AGA AGC C
A6II	TGA GTC CAA CAA AAT TCA GAA GGT G
A6III	ATC CCG TCG TGA CTA GAC ATT GAC
A6IV	GAA GGA TTG GAA CCA TTA GGA GGT G
R6II	CAC CTT CTG AAT TTT GTT GGA CTC A
WK6-Eco	GAA CCG AAT TCA TGG ACA GAG GAT GGT CTG GT
WK6-for	TTC GTC AAC CTG TTA CCC AAT AGC
WK6-rev	TCT CTG TTT CCT ATA ACC CAG TTG G
WK6-Sac	GAA CCG AGC TCG TTT CCT ATA ACC CAG TTG G
WK6-Spe	GAA CCA CTA GTG TTT CCT ATA ACC CAG TTG G
WK6-Xba	TCG TCA ATT CTA GAC ATC GCC AAA GG
WK6-Xho	GAA CCC TCG AGC CTT CGT TAA TCT CGT GAT CTC

#### cDNA-spezifische Oligonukleotide:

LZ6-Eco	GAA CCG AAT TCG AGT CAA TGA TCG ATG ATG GAG AAT CTT C
LZ6-Xho	GAA CCC TCG AGC TGC ATT AGT GAA ACA AGA TGC ATC TG
W6ExC-Bam	GAA CCG GAT CCA TGT CTA GTC ACG ACG GGA TG
W6ExC-Kpn	GAA CCG GTA CCG CCG TCG TGG TGG TTC GTA CCA T
W6ExN-Bam	GAA CCG GAT CCA TGG ACA GAG GAT GGT CTG GT
W6ExN-Kpn	GAA CCG GTA CCC CTC ATC GTA GCT TCA GCG GTT T
W6dNco	GTT GCC GCC AGC CGC GGT AGC TAT GGC TTC TAC CAC CAC G
W6NLSI	GAA CCC CAT GGA CAG AGG ATG GTC TGG TC
W6NLSII	GAA CCC CAT GGC CTC ACC TAC TGC TCT CGT AGG G
W6NLSIII	GAA CCC CAT GGA TTG ATT TTT GTT GTT TCC TTC GCC GTC G
W6NLSIV	GAA CCC CAT GGC ACG CCC AAG TCT CTT CCC GTT ACT ACG C
W6NLSV	GAA CCC CAT GGC GCT TAT CAT CGG AGC TTC CGA TCG GGC AC
W6NLS <sub>mut</sub>	CAT TTG ATC AAA CCG CTG AAG CTA CGA TGG CGG CAG CCC GTG TCT CCG TTC GTG CCC GAT CGG AAG

#### sonstige Oligonukleotide:

35Sfor	GAC GCA CAA TCC CAC TAT CC
En205	AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA
En50	GCC GAC ACT TCT TAA TCG AAG
En7706	GCT CCA ATG ACC CAC CAA CAG AAT G
En8130	GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC
GUSrev	GCG ATC CAG ACT GAA TGC CCA CAG GCC
pGA1	GTT GTG TGG AAT TGT GAG CGG
pTAfor	ATG CAT GAC GTT ATT TAT GAG ATG G
pTArev	TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC
PTVR	GAC TGG CTT TCT ACG TGT TTC CGC

## 4. PFLANZENMATERIAL

### 4.1 Entwicklungsstadien, Organe und Behandlungen

Für alle Analysen wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps *Col-0* verwendet. In der Regel erfolgte die Anzucht in Erde zunächst in Phytokammern unter Kurztag (KT) Bedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit, 20 °C) und dann anschliessend im Gewächshaus unter Langtag (LT) Bedingungen. Die Samen wurden bei 4 °C gelagert und so zur verbesserten Keimung einer Vernalisation ausgesetzt. Gesunde Organe (Blätter, Sproßachsen, Blüten und Schoten) wurden dann entsprechend geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Wurzeln wurden von etwa drei Wochen alten Pflanzen, die auf Sand angezogen wurden, gewonnen. Blätter wurden zu drei verschiedenen Entwicklungsstadien entnommen. Dabei stammten junge Blätter von etwa drei Wochen alten im KT gezogenen Pflanzen, voll entwickelte Blätter von kurz vor der Blüte stehenden Pflanzen und senescente Blätter von voll blühenden Pflanzen. In Kreuzungen eingesetzte Blüten waren bei der 'Empfänger'-Pflanze noch jung und ungeöffnet. Bei der 'Spender'-Pflanze waren sie dagegen weit geöffnet und in der Regel schon befruchtet. Für diverse Behandlungen mit Hormonen wurden entweder etwa zwei Wochen alte Keimlinge, die unter sterilen Bedingungen auf Platten (0,5 x MS-Medium, 1 % Saccharose, 0,6 % Agar, 500 µl/l Gamborg's Vitamine) angezogen wurden, oder voll entwickelte Blätter verwendet. Verwundungen und Infektionen mit *Pseudomonas syringae* wurden an voll entwickelten Blättern durchgeführt. Infektionen mit *Peronospora parasitica* fanden mit etwa zwei Wochen alten Keimlingen statt.

### 4.2 Zellkulturen

Die Kultivierung der *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur (Ökotyp *Col-0*, Linie AT7) erfolgte im Dauerdunkel unter Verwendung von modifiziertem B5- und MS-Medium (Trezza *et al.*, 1993; Kombrink & Hahlbrock, 1986). Die Zellen wurden fünf Tage nach der Subkultivierung entweder für transiente Transfektionen oder Behandlungen mit Elizitoren verwendet.



---

### 4.3 Flüssigkulturen

Die Kultivierung von *Arabidopsis*-Flüssigkulturen fand unter LT-Bedingungen (16 h Licht, 20 °C) statt. Für die Gewinnung von Wurzelmaterial wurden etwa 40 Oberflächen-sterile Samen vier bis fünf Wochen in 40 ml flüssigem Medium (1 x MS-Medium, 3 % Saccharose, 0,1 g/l Myo-Inositol, 0,5 g/l MES, pH 5,7) gegeben. Behandlungen mit Elizitor wurden mit drei Wochen alten Keimlingen aus etwa 80 Oberflächen-sterilen Samen durchgeführt.

### III METHODEN

#### 1. ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Alle in Laborhandbüchern wie Sambrook *et al.*, 1989 beschriebenen und allgemein üblichen molekularbiologischen Methoden sind nicht näher dargestellt.

PCR-Ansätze wurden in einem Gesamt-Volumen von 50 µl mit 10 pmol spezifischen Primern, 100 ng genomischer DNA oder 1 ng Plasmid-DNA als Matrize, 0,2 mM eines dNTP-Mixes, 1 U *Taq*- oder 2,5 U *Tfu* bzw. *Pfu*-DNA-Polymerase und entsprechendem 1 x PCR-Puffer hergestellt. Die anschließende Reaktion fand mittels der PCR-Maschinen PTC-225 Peltier Thermal Cycler der Firma Biozym (Hess. Oldendorf) oder GeneAmp PCR Systems 9700 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) statt. Dazu wurden Temperatur-Programme wie 94 °C, 2 min + [94 °C, 30 s + 55-65 °C, 1 min + 72 °C, 1,5 min] x 25-35 + 72 °C, 5 min gewählt.

Eine ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des *TOPO-TA-Cloning-Kits* der Firma Invitrogen (Groningen, NL). Die Angaben des Herstellers wurden mit Ausnahme der zur Transformation eingesetzten Menge, die auf 5µl erhöht wurde, befolgt.

Die Restriktionsendonuklease-Spaltungen von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA wurden in der Regel in 20-50 µl Gesamt-Volumen durchgeführt. Bei Spaltungen von genomischer DNA wurden Gesamt-Volumen von 200 µl eingesetzt. Die Enzyme wurden entsprechend der Angaben der Hersteller zusammen mit den zugehörigen Puffern verwendet. Eine evtl. folgende Dephosphorylierung erfolgte in einem Gesamt-Volumen von 50 µl und 1 U alkalischer Phosphatase 1 h bei 37 °C.

Für die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten fanden das *Qiaquick-Gel-Extraction*- und das *Qiaquick-PCR-Purification-Kit* der Firma Qiagen Anwendung.

Ligationen wurden in 10 µl Gesamt-Volumen nach der beschriebenen Methode (Sambrook *et al.*, 1989) mit T4-DNA-Ligase und dem zugehörigen Puffer angesetzt. Die Inkubationen wurden entweder 1 h bei RT, über Nacht bei 16 °C oder über zwei Tage bei 4 °C durchgeführt.

Die Transformationen mit Plasmid-DNA oder Ligationsprodukten, von denen 5-10 µl des Ligationsansatzes eingesetzt wurden, erfolgten nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan *et al.*, 1983). Die dazu benötigten kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode gewonnen.

Die erhaltenen Kolonien diverser Klonierungen wurden in der Regel zunächst anhand von PCR-Reaktionen geprüft, bei denen entsprechende Gen- und Vektor-spezifische Primer zusammen mit ein paar Zellen der Kolonien eingesetzt wurden.

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA wurde das *Wizard-Plasmid-Mini-Kit* der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Zu quantitativen Plasmid-Präparationen wurde das *Plasmid-Maxi-Kit* der Firma Qiagen genutzt.

Alle Sequenzierungen wurden durch die zentrale Einrichtung ADIS des MPI für Züchtungsforschung durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen erfolgten mit dem *Ready Reaction DyeDeoxyTerminator AmpliTaqFS Kit* der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt). Die elektrophoretische Auftrennung fand mit dem ABI PRISM™-System 377 und 3700 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems statt. Zur Speicherung und Auswertung der Sequenzdaten wurde das GCG-Programm-Paket Version 10.0 der University of Wisconsin genutzt. Sequenzrecherchen wurden in Datenbanken mit Hilfe der Programme BLASTn, BLASTx und tBLASTx durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

## 1.1 Southern-Analysen

Für die Isolation von genomischer DNA wurden etwa 100 mg Material aus voll entwickelten Blättern eingesetzt. Die Extraktion fand dann unter Verwendung des *Nucleon-PhytoPure, plant and fungal DNA-Extraction-Kits* der Firma Amersham statt. Dabei wurde den Angaben des Herstellers zusammen mit dem optionalen Schritts des RNase-Verdaus gefolgt. In den Restriktions-Spaltungen für anschließende Southern-Analysen wurden in der Regel 0,5-1 µg genomische DNA verwendet, wobei eine zweimalige Enzymgabe von je 20-40 U im Abstand von einem halben Tag erfolgte.

Für DNA-Blot-Analysen wurden die DNA-Fragmente in 0,8 % igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel 30 min in 0,4 M NaOH denaturiert. Der nachfolgende Gravitationsblot der DNA-Fragmente auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Nylon-Membran der Firma Amersham fand ebenfalls mittels 0,4 M NaOH über Nacht statt. Zur Neutralisierung der Membran wurden zwei Inkubationen von je 5 min in 5 x SSPE-Puffer (3,6 M NaCl, 20 mM EDTA, 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) durchgeführt. Direkt im Anschluss wurden die Membranen für Hybridisierungen eingesetzt. Diese erfolgte bei 65 °C in verschliessbaren Röhren in einem Roll-Inkubator. Zunächst wurden die Membranen einer Prähybridisierung von mindestens 2 h in 6 x SSC, 3 % SDS, 0,2 mg/ml PVP, 0,2 mg/ml Ficoll, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA unterzogen. Nach dem Austausch gegen 3 x SSC, 1 % SDS, 0,2 mg/ml

PVP, 0,2 mg/ml Ficoll, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA wurde eine hitzedenaturierte Sonde (mindestens 8 Mio cpm) hinzugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Membranen wurden dann zwei- bis dreimal je für 30-60 min in 0,2 x SSC, 0,5 % SDS bei 65 °C gewaschen, anschliessend in Folie eingeschweisst und für die Autoradiographie bei -80 °C exponiert.

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden, zu denen sowohl DNA-Inserts aus diversen Klonen als auch PCR-Fragmente genutzt wurden, erfolgte unter Verwendung des *Ready-To-Go-Kits* der Firma Pharmacia zusammen mit  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP. Die Reinigung von DNA-Sonden fand über einen Gelfiltrationsschritt mit Sephadex G50 statt. Als Sonden wurden DNA-Fragmente entsprechender EST-Klone (*EST2*, 3, 4, 6, 7, 11) und PCR-Fragmente (*AtWRKY20*, *En-1* rechter bzw. linker Arm) eingesetzt.

Zur Rehybridisierung der Membranen wurde die gebundene Sonde durch Waschen für 30-60 min bei 90 °C in 0,1 % SDS entfernt.

## 1.2 Kartierungen

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation wurde anhand von Hybridisierungen mit einer CIC-YAC-Bibliothek (Creusot *et al.*, 1995) durchgeführt. Dazu wurden Membranen, die einen Abdruck der gesamten Hefe-Kolonien tragen, verwendet. Für Hybridisierungen wurden diese Membranen zunächst 10 min bei RT in 4 x SSC mit der Kolonie-Seite nach oben geschwenkt. Anschliessend fand die Prähybridisierung unter Benutzung eines Schwenkwasserbads 2 h bei 65 °C in 5 x Denhardts-Puffer (1 mg/ml Ficoll, 1 mg/ml PVP, 1 mg/ml BSA), 0,5 % SDS, 4 x SSC, 200 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA statt. Nach Zugabe einer hitzedenaturierten Sonde dauerte die Hybridisierung bei 65 °C über Nacht. Die Membranen wurden dann 30 min bei 65 °C in 4 x SSC, 0,5 % SDS und erneut 30 min bei 65 °C in 2 x SSC, 0,5 % SDS gewaschen. Im folgenden wurden sie bei RT getrocknet, in Folie eingewickelt und zur Autoradiographie bei -80 °C exponiert. Die Herstellung und Reinigung der Sonden wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Sonden wurden DNA-Fragmente entsprechender EST-Klone (*EST2*, 3, 4, 7, 11) und PCR-Fragmente (*AtWRKY20*) eingesetzt.

Nach einer Zuordnung der Signale wurden die jeweiligen als positiv identifizierten Hefe-Kolonien einer weiteren Absicherung unterzogen. Dazu wurden DNA-Extraktionen jeder Hefe-Kolonie nach der schnellen Phenol/Chloroform-Isolierungsmethode der Firma Clontech (Heidelberg) durchgeführt. Diese wurden dann entsprechend der untersuchten Gene

(*AtWRKY2*, 3, 4, 7, 11, 20) mit Gen-spezifischen Primern (A2II/A2III, WK3a/WK3b, WK4a/WK4b, A7II/A7III, WK11a/WK11b, A4II/A4III) in einer PCR geprüft.

### 1.3 5'-RACE

Zur Bestimmung der vollständigen Länge der kodierenden Regionen und der 5'-nicht-translatierten Bereiche zusammen mit einer Bestimmung der Transkriptionsiniationsstelle wurde für einige Gene (*AtWRKY6*, 7, 20) ein 5'-RACE durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung des *3'/5'-RACE-Kits* der Firma Boehringer. Als Ausgangsmaterial wurden pro 5'-RACE-Reaktion 2 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern eingesetzt. Unter Benutzung des jeweiligen ersten Gen-spezifischen Primers (A6III, A7III, R4I) wurden schon in der ersten PCR-Reaktion spezifische Produkte gewonnen. Diese wurden dann nicht in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt, sondern direkt kloniert. Je vier unabhängige Klone wurden dann einer Sequenzanalyse unterzogen.

### 1.4 Expressions-Analysen

Die Isolierung von Gesamt-RNA im Mini-Maßstab erfolgte ausgehend von etwa 100 mg Pflanzenmaterial unter Verwendung des *PUREscript RNA-Isolation-Kits* der Firma Gentra Systems (Minneapolis, USA) oder des *RNeasy Plant RNA-Mini-Kits* der Firma Qiagen. In der Regel wurde die Qualität der RNA durch eine nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung erhöht. Etwa 2 g Pflanzenmaterial wurde für die Isolierung von Gesamt-RNA im Maxi-Maßstab mit Hilfe des *RNA/DNA-Maxi-Kits* der Firma Qiagen verwendet.

Als Ausgangsmaterial dienten einerseits diverse pflanzliche Gewebe und andererseits Blätter bzw. Keimlinge, die verschiedenen Behandlungen ausgesetzt waren. Dazu zählten Infiltrationen unter anderem mit 50 µM Lösungen von 2,4D, ABA, Brassinolid, CuSO<sub>4</sub>, Ethephon, GA<sub>3</sub>, Kinetin, MeJA, NaCl und NaSA in KPO<sub>4</sub>-Puffer (in Anlehnung an McClure & Guilfoyle, 1987) sowie Verwundungen für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 h (Ehltling *et al.*, 1999) und Hand-Inokulationen für 0, 2, 4, 6, 10, 24, 48 h mit 10<sup>8</sup> cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1* und Infektionen für 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 Tage mit 50 Konidien/µl *Peronospora parasitica* pv. *Noks1* (Ehltling *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden für 0, 1, 2, 4, 6, 8 h mit 50 µg/ml Pmg-Elizitor behandelte Zellkulturen verwendet (Ayers *et al.*, 1976).

Für RNA-Blot-Analysen wurden entweder 10 oder 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Nach 10 min bei 65 °C denaturieren der RNA-Proben wurden sie elektrophoretisch in 1,2 % igen, 1,88 % Formaldehyd-haltigen Agarosegelen in 1 x MOPS-Puffer aufgetrennt. In einem Gravitationsblot folgte dann mittels 20 x SSC der Transfer der RNA auf eine Biodyne-B Nylon-Membran der Firma PALL-Filtron (Dreieich) über Nacht. Anschliessend wurde die Membran für 2 h bei 80 °C gebacken. Die Hybridisierungen erfolgten in Röhren in einem Rollinkubator entweder bei 65 °C in 1 M NaCl, 1 % SDS, 10 % Dextransulfat, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA oder bei 42 °C in *ULTRAhyb*-Puffer der Firma Ambion (Austin, USA). Nach mindestens 2 h bzw. 30 min Prähybridisierung wurde die hitzedenaturierte Sonde (mindestens 8 Mio cpm) hinzugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Membranen wurden danach entweder 30-60 min bei 65 °C in 0,2 x SSC, 0,5 % SDS oder 2 x 5 min bei 42 °C in 2 x SSC, 0,1 % SDS und dann 2 x 15 min bei 42 °C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Die Membranen wurden anschliessend in Folie eingeschweisst und für die Autoradiographie bei -80 °C exponiert. Die Herstellung und Reinigung der Sonden wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Sonden wurden DNA-Fragmente entsprechender EST-Klone (*EST2*, *3*, *4*, *6*, *7*, *11*) und PCR-Fragmente (*AtWRKY20*) eingesetzt. Weiter wurden DNA-Fragmente der Klone *ELI3* (Trezza *et al.*, 1993), *SAG12* und *13* (Lohmann *et al.*, 1994) *PR1*, *PR5* (Uknes *et al.*, 1992) und *THI2.1* (Vignutelli *et al.*, 1998) sowie des EST-Klons M22F19139, welcher die kodierende Sequenz der grossen Untereinheit von RUBISCO trägt, und ein aus dem RFDD isolierten Klon 16WT196 verwendet.

Zur Rehybridisierung der Membranen wurde die gebundene Sonde durch Waschen für 15-30 min bei 85 °C in 0,1 % SDS entfernt.

Im Falle nicht-detektierbarer Transkriptmengen (*AtWRKY20*) wurde eine semi-quantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurde das *Titan One Tube RT-PCR System* der Firma Boehringer zusammen mit Gen-spezifischen Primern (A4I/A4IV) verwendet. Zunächst wurde der lineare Bereich der PCR-Reaktion anhand einer Konzentrationsreihe von 10 ng, 100 ng, 500 ng, 1 µg, 2 µg Gesamt-RNA aus voll entwickelten Blättern eingengt. Im Anschluss wurde die Expression in den Organen Wurzel, junges Blatt, voll entwickeltes Blatt, senescentes Blatt, Sproß, Blüte und Schote durch Einsatz von je 100 ng Gesamt-RNA pro RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Je 20 µl wurden in einem 0,8 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, welches dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I der Firma Biozym inkubiert wurde. Die quantitative Analyse der Signalintensitäten der RT-PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des Phospho-Imagers STORM 860 der Firma Molecular Dynamics (Sunnyval, USA). Nach einer Anregung bei 450 nm wurden die Signalintensitäten der DNA-

Banden bei 520 nm gemessen. Die Quantifizierung fand über das Programm ImageQuant der Firma Molecular Dynamics statt.

## 2. ANALYSE VON DIMERISIERUNGEN

Zur Charakterisierung des Leucinzippers wurden seine Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System der LexA-Variante (Gyuris *et al.*, 1993; Estojak *et al.*, 1995) studiert. In PCR-Reaktionen mit *AtWRKY6*-cDNA zusammen mit den Primern LZ6-Eco und LZ6-Xho wurde die Leucinzipper-Region amplifiziert. Da beide Primer Schnittstellen für *EcoRI* bzw. *XhoI* als 5'-Verlängerung beinhalten, wurde das PCR-Produkt nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* in die ebenso gespaltenen binären Vektoren pEG202 und pJG4-5 als 'bait' bzw. als 'prey' ligiert. Nach Transformation in DH5 $\alpha$  wurden die Klonierungen durch Sequenzanalysen überprüft.

Beide Klone wurden zusammen und in diversen Kombinationen mit den jeweiligen leeren Vektoren pEG202 und pJG4-5 sowie mit den Klonen GDI und ROP (Bischoff *et al.*, 2000) in den Hefe-Stamm EGY48 transformiert. Als positive Kontrolle wurde die Transformation eines die GAL4 DNA-Binde-Domäne tragenden Klons zusammen mit dem Vektor pJG4-5 durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll der kleinen-LiAc-Transformation der Firma Clontech verfahren. Die transformierten Zellen wurden dann auf SD<sup>-His-Trp+Leu+Gluc+Ura</sup>-Platten gegeben und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Danach wurde je eine Kolonie der einzelnen Transformationen in H<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils auf eine SD<sup>-His-Trp+Leu+Gluc+Ura</sup>-Platte, eine SD<sup>-His-Trp-Leu+Gluc+Ura</sup>-Platte und eine SD<sup>-His-Trp-Leu+Gal+Raf+Ura</sup>-Platte ausgestrichen. Das Hefe-Wachstum wurde nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30 °C beobachtet.

Für die Herstellung eines 'prey'-Konstruktes, das die komplette *AtWRKY6*-cDNA enthält und für eine Protein-Protein-Interaktionsanalyse mit SNI1 genutzt werden soll (X. Dong, persl. Mitteilung), wurde zunächst ein durch einen Restriktionsverdau des ExWK6-Konstruktes mit *EcoRI* und *SalI* isoliertes DNA-Fragment in den ebenso gespaltenen Vektor pJG4-5 ligiert. Durch eine PCR-Reaktion mit *AtWRKY6*-cDNA und den Primern WK6-Eco und W6ExN-Kpn und einem anschliessenden Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde das N-terminale Fragment der *AtWRKY6*-cDNA in das schon bestehende Konstrukt, das ebenfalls mit *EcoRI* gespalten wurde, eingesetzt. Die Transformation erfolgte in DH5 $\alpha$ . Die richtige Orientierung wurde anhand von PCR-Reaktionen der erhaltenen Kolonien mit dem Primerpaar A6I/A6III ermittelt. Anschliessend wurde das Konstrukt über Sequenzierungen geprüft.

### 3. ANALYSE SUBZELLULÄRER LOKALISATIONEN

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von *AtWRKY6* wurden C-terminale translationale Fusionen an GFP hergestellt. Dazu wurde einerseits die komplette kodierende Region durch PCR-Reaktionen mit *AtWRKY6*-cDNA und den Primern W6NLSI und W6NLSIII durchgeführt. Hierfür mußte eine interne *NcoI* Schnittstelle in der *AtWRKY6* cDNA entfernt werden, was durch die sogenannte Mega-Primer-Methode (Ke & Madison, 1997) erreicht wurde. Das durch eine PCR-Reaktion mit den Primern W6dNco und W6NLSIII gewonnene Fragment wurde als Mega-Primer in einer erneuten PCR-Reaktion mit dem Primer W6NLSI eingesetzt. Die Primer W6NLSI und W6NLSII enthalten beide in einer 5'-Verlängerung eine *NcoI* Schnittstelle. Nach einem Restriktionsverdau des so erhaltenen PCR-Produktes mit *NcoI* wurde es sowohl in den ebenso gespaltenen Vektor pSK-GFP als auch in den Vektor pGJ619 ligiert und dann jeweils in DH5 $\alpha$  transformiert. Zur Überprüfung der Orientierung des cDNA-Fragmentes wurden die erhaltenen Kolonien in PCR-Reaktionen mit dem Primer 35Sfor und dem Primer W6NLSII eingesetzt. Im Anschluss erfolgte durch eine Sequenzierung die Überprüfung der Klonierung.

Analog zu dieser Verfahrensweise wurden vier C-terminale Verkürzungen von *AtWRKY6* translational an GFP fusioniert. Dazu wurden einerseits die Primer W6NLSII, W6NLSIV und W6NLSV (t1-, t2-, t3-Konstrukt) und andererseits die interne *NcoI* Schnittstelle in der *AtWRKY6* cDNA (t4-Konstrukt) genutzt. Darüber hinaus wurde durch die Mega-Primer-Methode mit dem Primer W6NLS<sub>mut</sub> im Kontext des t4-Konstruktes ein gezielter Austausch zweier basischer Aminosäuren und durch fehlerhaftes Arbeiten der *Taq*-Polymerase ein zufälliger Austausch eines einzelnen Lysins im Kontext des t3-Konstruktes eingebracht. Diese Konstrukte wurden alle in den Vektor pGJ619 kloniert. Nur das t1-Konstrukt wurde auch in den Vektor pSK-GFP ligiert.

Alle *AtWRKY6*::GFP-Fusions-Konstrukte wurden zusammen mit den leeren Vektoren pSK-GFP und pGJ619 als Kontrolle transient in Protoplasten der *Arabidopsis*-Zelkultur eingebracht. Zur Protoplastierung wurden 40 ml Zellen in 25 ml 240 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und über Nacht bei 26 °C in 40 ml 570 U Zellulase, 120 U Mazerase, 240 mM CaCl<sub>2</sub> unter leichtem Schütteln bei 20 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde das Schütteln für 30 min auf 40 rpm erhöht. Nach einem Waschen des Zellen/Protoplasten-Gemisches in 25 ml 240 mM CaCl<sub>2</sub> folgte eine Resuspendierung in 14 ml 1 x B5-Medium, 0,4 M Saccharose, 0,1 mg/ml Dichlorphenoxyessigsäure, pH 5,7, was dann durch eine Zentrifugation zur Trennung von Zellen und Protoplasten führt. Die abgenommen Protoplasten wurden erneut in 1 x B5-Medium, 0,4 M Saccharose, 0,1 mg/ml Dichlorphenoxyessigsäure, pH 5,7 aufgenommen und



durch Zentrifugation von Zellen gereinigt. Für die Transfektion wurden je 200  $\mu$ l Protoplasten mit 20  $\mu$ g Plasmid-DNA und 200  $\mu$ l 25 % PEG 6000, 100 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 450 mM Mannitol vermischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Protoplasten mit 5 ml 275 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  gewaschen, anschliessend in 7 ml 1 x B5-Medium, 0,4 M Saccharose, 0,1 mg/ml Dichlorphenoxyessigsäure, pH 5,7 aufgenommen und über Nacht im Dunkeln bei 26 °C inkubiert. Die subzellulären Lokalisationen der einzelnen Konstrukte wurden unter einer doppelten Bestrahlung von Blaulicht und Durchlicht am Axiophot Mikroskop (Anregungsfilter 450-490 nm, Sperrfilter 510 nm, Langpassfilter 520 nm) der Firma Zeiss (Oberkochen) anhand der GFP-Fluoreszenz verfolgt.

## 4. GEWINNUNG UND ANALYSE VON ANTIKÖRPERN

### 4.1 Heterologe Expression und Reinigung

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden unter Verwendung der Primer-Kombinationen W6ExN-Bam/W6ExN-Kpn, W6ExC-Bam/W6ExC-Kpn und W6ExN-Bam/W6ExC-Kpn die entsprechenden PCR-Produkte zu ExN, ExC und ExWK6 gewonnen. Da die Primer jeweils eine *Bam*HI bzw. eine *Kpn*I Schnittstelle als 5'-Verlängerung enthalten, wurden die PCR-Produkte nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Kpn*I in den ebenso gespaltenen Vektor pQE30 ligiert und so mit einem N-terminalen 6 x His-tag versehen. Die Transformation wurde in SURE-Zellen vorgenommen. Zur Überprüfung der Klonierungen wurden Sequenzanalysen durchgeführt.

Zur Expression dieser rekombinanten Proteine wurden die Konstrukte in den *E. coli*-Stamm SG13009 (pREP4) transformiert. Pro Konstrukt wurden je 500 ml  $\text{LB}^{\text{Kan, Amp}}$  mit 20 ml der Übernachtskulturen angeimpft und bis einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle wurden eine identische Behandlung nur mit dem leeren Vektor pQE30 transformierte SG13009-Zellen durchgeführt. Durch Zugabe von je 1 ml 1 M IPTG wurde die massive Expression der Proteine erreicht. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch eine über den 6 x His-tag vermittelte Bindung an Ni-NTA-Agarose. Zur

Lyse wurden in 100 ml aliquotierte Zellpellets in je 10 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert, 1 h bei RT und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die anschließende Reinigung wurde mit Hilfe des *B-PER 6 x His Spin Purification Kits* der Firma Pierce (Rockford, USA) vorgenommen. Dabei wurde in der Prozedur nach den Angaben des Herstellers verfahren. Allerdings wurden denaturierende Puffer verwendet. So wurde die eingesetzte Menge Ni-NTA-Agarose zunächst in 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0 äquilibriert. Insgesamt wurden vier Wasch-Schritte mit je 500 µl 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3 durchgeführt, die von vier Elutions-Schritten mit je 500 µl 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris-HCl, pH 4,5 gefolgt wurden. Jeweils 18 µl der einzelnen aufgefangenen Fraktionen wurden in einem 15 % igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Eine genauere Angabe des Molekulargewichts von ExN, ExC und ExWK6 wurde durch eine Auftrennung von je 18 µl des ersten Eluates in einem Gradientengel der Firma Novex (San Diego, USA) erreicht. Die Protein-Gehalte in den einzelnen Eluaten wurden nach der BCA-Methode der Firma Sigma ermittelt. Da die Eluate aber noch Verunreinigungen aufwiesen, wurden pro rekombinantes Protein insgesamt 1,5 mg Protein in präparativen 15 % igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Färbung dieser Gele wurde das *GelCode E-Zinc Reversible Stain Kit* der Firma Pierce verwendet. Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Bande wurde diese wieder entfärbt.

Alle auf diese Weise gereinigten rekombinanten Proteine wurden zur Immunisierung je zweier Kaninchen genutzt. Diese wurde am Babraham Institute (Cambridge, UK) durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus den Gel-Stückchen elektro-eluiert. Jedes Kaninchen wurde zunächst mit 200 µg Protein immunisiert, die dreimal von je 100 µg Protein 'boosts' gefolgt wurden. Aus allen Kaninchen wurde das Präimmenserum zusammen mit allen vier Blutungen erhalten. Dabei entspricht antiExNI N68, antiExNII N69, antiExCI M172, antiExCII M173, antiExWK6I N66 und antiExWK6II N67.

## 4.2 Charakterisierung der Antikörper

Die Western-Analysen erfolgten in der Regel in einem semi-trockenen Blot-Verfahren mit einem drei-Puffer-System bestehend aus einem ersten Anoden-Puffer (300 mM Tris-HCl, 20% MeOH, pH 10,4), einem zweiten Anoden-Puffer (25 mM Tris-HCl, 20 % MeOH, pH 10,4) und einem Kathoden-Puffer (25 mM Tris-HCl, 40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure). Der Transfer durch 1 h bei 100 mA fand entweder auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen der

Firmen Sartorius (Göttingen) bzw. Boehringer statt. Die Membranen wurden dann in der Regel über Nacht bei 4 °C in 40 ml Block-Puffer I (5 % Magermilch, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) unter Schütteln geblockt. Nach einem Austausch gegen 20 ml frischen Block-Puffer I wurden die Seren in einer 1:1000 Verdünnung hinzugegeben und mindestens 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss an 4-6 Wasch-Schritte von je 5-15 min in 20 ml Wasch-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers, der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase gekoppelt ist, in einer 1:2000 Verdünnung zu 20 ml Block-Puffer II (2% Magermilch, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,5) zusammen mit einer Inkubation unter Schütteln von mindestens 30 min bei RT. Die erneute Durchführung von 4-6 Wasch-Schritten von je 5-15 min in 20 ml Wasch-Puffer wurde von 2 weiteren Kurz-Inkubationen in H<sub>2</sub>O abgeschlossen. Zur Entwicklung des Western-Blots wurde einerseits das *ECL-Kit* der Firma Amersham und andererseits das *Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Substrate* der Firma Boehringer verwendet. Direkt anschliessend wurden die Membranen zur Autoradiographie 3 s-60 min exponiert.

Zunächst wurden alle Präimmunsereen hinsichtlich vorhandener Hintergrund-Kreuzreaktionen getestet. Dazu wurden 0,5, 1, 5, 10, 20 µg der rekombinanten gereinigten Proteine direkt auf Nitrozellulose-Membranen aufgetragen sowie 5, 10, 20 und 50 µg Gesamt-Zellextrakt der *Arabidopsis*-Zellkultur in einem 12 % igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Anschliessend erfolgte eine Inkubation mit den einzelnen Präimmunsereen in einer 1:1000 Verdünnung.

Weiter wurde jeweils die dritte Blutung der Kaninchen bezüglich ihrer Fähigkeit, *AtWRKY6* Protein zu detektieren, geprüft. Das jeweils zu den Antiseren korrespondierende heterolog exprimierte und gereinigte Protein wurde in 0,5, 1, 5, 10, 20 µg direkt auf Nitrozellulose-Membranen aufgetragen. Darüber hinaus wurden Roh-Extrakte aus 1 ml Zellpellets zu den Zeitpunkten 0 und 4 h Induktion der entsprechenden rekombinanten Proteine sowie ebenfalls 5, 10, 20 und 50 µg Gesamt-Zellextrakt der *Arabidopsis*-Zellkultur in 12 % igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Im Falle der Antiseren gegen *AtWRKY6* Teilproteine wurde auch das vollständige heterolog exprimierte und gereinigte Protein ExWK6 einbezogen. Die jeweiligen Antiseren wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt.

Die Antiseren gegen ExN und ExWK6 wurden eingehender in Western-Analysen mit Kernextrakten charakterisiert. Die Kernextrakte wurden aus unbehandelter und 8 h mit 1 µM Flagellin 22 (Gómez-Gómez *et al.*, 1999) behandelter *Arabidopsis*-Zellkultur gewonnen. Dabei wurden etwa 1,5 ml gemörstertes tiefgefrorenes Material in 800 µl 20 mM Tris-HCl, 5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 50 mM Saccharose, 70 % Glycerin, 1 mM Na-Molybdat, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 1 µg/ml Leupeptin, 200 µM PMSF, pH 7,0 auf Eis resuspendiert, mittels Zentrifugation durch 72 und 20 µM Nylon-Netze filtriert und anschliessend pelletiert. Nach Abnehmen des cytosolischen Überstandes erfolgte eine Resuspendierung in 100 µl 200 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M NaCl, 1 mM Na-Molybdat, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 1 µg/ml Leupeptin, 200 µM PMSF, pH 7,8 und eine Inkubation unter leichtem Schütteln für 30 min bei 4 °C. Darauf fand eine weitere Zentrifugation mit Abnehmen des Kernprotein-haltigen Überstandes statt. Je 10 µg der cytosolischen Extrakte sowie der Kernextrakte wurden in 12 % igen SDS-Gelen elektrophoretische aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die jeweiligen Antiseren wurden in einer 1:1000 Verdünnung getestet.

Analog dazu wurden Kernextrakte aus seneszenten Blättern von Wildtyppflanzen, den EN- und DEL-Mutanten und aus voll entwickelten Blättern von Wildtyppflanzen und der 35S::*WRKY6.9* Linie in einer Western-Analyse mit dem Antiserum ExNI untersucht. Ebenso wurde als Ausgangsmaterial Wurzelgewebe, das aus sterilen Flüssigkulturen gewonnen wurde, eingesetzt. Daneben wurden auch Extrakte aus Keimlingen von Wildtyppflanzen, den EN- und DEL-Mutanten, die in Flüssigkulturen 8 h mit 1 µM Flagellin 22 behandelt wurden, sowie unbehandelten Keimlingen von Wildtyppflanzen und der 35S::*WRKY6.9* Linie verwendet.

## 5. IDENTIFIKATION UND ANALYSE VON NULL-MUTANTEN

Für die Identifikation von *AtWRKY* Null-Mutanten wurde die AMAZE-Population (Wismann *et al.*, 1998) des MPI für Züchtungsforschung durchsucht. Das 'screening' basiert auf einer Kombination aus PCR-Reaktionen mit anschliessender Hybridisierung und wurde an 7600 Linien in der 5. Generation der Population durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Spezifität der benutzten Primer A2I/A2II/WK2b/A2IV, WK3a/WK3b, A6I/A6II/A6III/A6IV und WK7a/A7II/A7III/A7IV in PCR-Reaktionen mit den *En-1*-spezifischen Primern En205 und En8130 zusammen mit sogenannter 'multi-copy' DNA, die aus *Arabidopsis*-Pflanzen mit multiplen *En-1* Insertionen stammt, und nachfolgender Southern-Analyse mit den jeweiligen *AtWRKY* Sonden geprüft. Im Anschluss wurden PCR-Reaktionen in 10 µl Ansätzen mit Primer-Kombinationen aus jeweils einem *AtWRKY*-spezifischen Primer A2II/WK2b, WK3a/WK3b, A6II/A6III, A7II/A7III und einem der beiden *En-1*-spezifischen Primern En205 und En8130 mit allen 44 '3-tray-pools' sowie einer internen positiven Kontrolle jeweils beider *AtWRKY*-spezifischer Primer mit genomischer DNA von Wildtyppflanzen durchgeführt. Alle PCR-Amplifikate wurden in einem 1,5 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und

einer Southern-Analyse mit entsprechenden *AtWRKY* Sonden unterzogen. Zuvor als positiv identifizierte '3-tray-pools' wurden dann weiter in '1-tray-pools', Reihen und Spalten aufgeteilt und in einer erneuten PCR-Reaktion mit der gleichen Primer-Kombination gefolgt von einer Hybridisierung eingesetzt. Wurde in allen Dimensionen jeweils ein Signal der identischen Größe identifiziert, konnte dies einer Pflanze der AMAZE-Population zugeordnet werden. Nachfolgende genomische Southern-Analysen, PCR-Analysen mit jeweils zwei *AtWRKY*-spezifischen Primern bzw. in Kombination mit den *En-1*-spezifischen Primern und Sequenzierungen der PCR-Fragmente dienten einer genauen Charakterisierung der *En-1* Insertion.

### 5.1 Analyse molekularer Phänotypen

Für die Charakterisierung eines molekularen Phänotyps wurden Expressions-Analysen in seneszenten Blättern durchgeführt. Zur genaueren Einengung wurden drei Blatt-Entwicklungsstadien definiert. Dies wurde unter anderem anhand von Chlorophyll-Gehalten vorgenommen. Die Bestimmung der Chlorophyll-Gehalte fand ausgehend von Blattmaterial, das in flüssigen Stickstoff gefroren und zerkleinert wurde, statt. Nach Zugabe von 96 % EtOH mit etwas  $MgCO_3$ , Inkubation von 5 min bei 100 °C, Zentrifugation, Abnehmen des Überstandes und Lagerung auf Eis im Dunkeln wurde die Extinktion bei 470 nm, 648,6 nm, 664,2 nm und 720 nm gemessen. Dabei handelt es sich bei der Extinktion bei 720 nm um den sogenannten Trübungswert, der nachträglich von allen Werten abgezogen wurde. Die Chlorophyll-Gehalte wurden über die Einzel-Werte  $C_a + C_b = 5,24 \times E_{664,2} + 22,24 \times E_{648,6}$  berechnet, auf das eingesetzte Blattgewicht bezogen und in % ausgedrückt.

### 5.2 RFDD

Zur Charakterisierung der molekularen Unterschiede zwischen Wildtyppflanzen und den *AtWRKY6* Null-Mutanten erfolgte ein 'differential display'. Dazu wurde eine mit einer RFLP-Analyse kombinierten Methode angewendet (Bachem *et al.*, 1996). Für die Durchführung des RFDD wurde das *DisplayPROFILE-Kit* der Firma DisplaySystems Biotech (Kopenhagen, DK) genutzt. In der Regel wurde dabei den Angaben des Herstellers gefolgt. Als Ausgangsmaterial wurden 1-2 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern von Wildtyppflanzen und den EN- und DEL-Mutanten eingesetzt. Für eine Erhöhung der RNA-

Qualität wurde zunächst ein DNase I Verdau in 100 µl Gesamt-Volumen für 20 min bei 37 °C mit anschließender Phenol/Chloroform-Reinigung und Fällung durchgeführt.

Nach der Erst-Strang cDNA-Synthese mittels eines Oligo-dT Primers und Reverser Transkriptase wurde die Zweit-Strang cDNA-Synthese über DNA-Polymerase I erreicht. In diesem Schritt wurde ein RNase H Verdau eingeschlossen, dessen eingesetzte Menge entgegen des Hersteller-Protokolls auf 2 U erhöht wurde. Die so erhaltene cDNA wurde insgesamt zweimal Phenol/Chloroform und einmal Chloroform gereinigt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Hälfte der resuspendierten cDNA wurde dann in einem 0,8 % igen Agarosegel hinsichtlich ihrer Qualität geprüft. Nur wenn ein deutlicher Schmier zwischen 100-2000 bp vorhanden war, wurde die cDNA einem Restriktionsverdau mit *TaqI* ausgesetzt. Mittels T4-DNA-Ligase erfolgte dann der Schritt zur Ligation zweier unterschiedlicher Adaptoren. Das so erhaltene 'template' wurde dann zunächst in PCR-Reaktionen mit Kontroll-Primern getestet. Dabei wurde die Anzahl der Zyklen auf 40 erhöht. Die gesamte PCR-Reaktion wurde in einem 1,5 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle eines Schmiere zwischen 50-1000 bp wurde das 'template' in PCR-Reaktionen mit 64 verschiedenen Primer-Kombinationen eingesetzt. Dabei wurde die totale Anzahl der Zyklen auf 45 erhöht.

Für die PCR-Reaktionen wurde ein mit dem blau-Fluoreszenz-markierter FAM-Primer verwendet, der an den mit einem Einzel-Strang-Überhang versehenen Adaptor bindet. Dieser wurde mit 64 verschiedenen Gegenprimern kombiniert, die an dem anderen Adaptor binden und alle einen unterschiedlichen Überhang von drei Basen in den Bereich der cDNA aufweisen. In solchen PCR-Reaktionen wurden Sub-Populationen aller Transkripte amplifiziert. Durch 64 verschiedener Amplifikationen wurde theoretisch eine Amplifikation jedes Transkripts und damit eine statistische Abdeckung der Transkript-Population einer eukaryontischen Zelle erreicht. Die gesamte Prozedur wurde für jeden Ansatz doppelt ausgeführt.

Die Analyse der PCR-Produkte wurde unter Verwendung des Kapillar-Sequenzier-Automaten ABI 310 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems durchgeführt. Je 1 µl der PCR-Reaktion wurde unter Zugabe von 0,5 µl eines gelb-Fluoreszenz-markierten Längenstandards GS-Tamra 500 sowie von 0,5 µl eines rot-Fluoreszenz-markierten Längenstandards GS-Rox 1000 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems mit 11 µl Formamid versetzt und für 2 min bei 90 °C denaturiert. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden grün-markierte 30 cm lange Kapillaren zusammen mit dem Trennmateriale POP4 und dem korrespondierenden EDTA-haltigen Puffer der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems verwendet. Pro Kapillare wurden in der Regel 150-200 Analyse-Läufe durchgeführt. Der Probenauftrag erfolgte für 5 s bei 15 kV. Die Trennung fand über 30 min bei 15 kV statt. Für die Analyse der Rohdaten und damit für die Identifizierung differentiell exprimierter Peaks wurde das GeneScan Programm der

Firma Perkin Elmer Applied Biosystems zusammen mit einer aus den entsprechenden Längenstandards ermittelten Matrix an dem ABI 310 angewendet.

Zur Klonierung zuvor identifizierter Peaks wurde ein PCR-basierendes Verfahren über eine Vereinzelung des Peaks entwickelt. Dazu wurde der in der jeweiligen PCR-Reaktion benutzte Gegenprimer um je eine Base in allen Kombinationen A, C, G, T an 3'-Position verlängert. Eine solche Verlängerung vergrößerte den Überhang in die cDNA und bewirkte in erneut durchgeführten PCR-Reaktionen mit dem Ursprungs-'template' eine Spezifizierung. Dies alleine oder aber eine weitere PCR-Reaktion mit einer zweiten Verlängerung um eine Base in allen vier Kombinationen bewirkte eine ausreichende Vereinzelung der Peaks. Nach einer Wiederholung der zur Vereinzelung führenden PCR-Reaktion mit einem nicht-Fluoreszenzmarkierten Primer wurden die PCR-Produkte in einem 1,5 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Banden isoliert. Diese Produkte wurden mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Kits* der Firma Invitrogen kloniert. Die Sequenzanalyse erfolgte anhand von je 10 einzelnen Kolonien.

Neben Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern als Ausgangsmaterial wurde auch mRNA aus Wurzelgewebe, das aus Flüssigkulturen von Wildtyppflanzen und den EN- und DEL-Mutanten entstammt, für das RFDD eingesetzt. Zunächst wurde total RNA aus den Wurzeln isoliert. Unter Verwendung des *mRNA Kits Oligo[dT]<sub>30</sub>* der Firma BIO 101 (Vista, USA) bzw. des *Quick Prep Micro mRNA Purification Kits* der Firma Pharmacia erfolgte dann eine Präparation von poly-A mRNA ausgehend von jeweils 100 µg total RNA. Pro 'template' Präparation wurden 200 bzw. 500 ng mRNA verwendet. Dabei und in der nachfolgenden Analyse wurde wie oben beschrieben verfahren.

## 6. HERSTELLUNG UND ANALYSE TRANSGENER PFLANZEN

Verschiedene Konstrukte, die in *Arabidopsis*-Pflanzen eingebracht wurden, sind in den binären Vektor pGPTV kloniert worden. Dieser wurde dann in *A. tumefaciens* transformiert. Dazu wurde die Methode der Elektro-Transformation angewendet, bei der 50 µl Elektrokompetente Zellen mit etwa 1 µg Plasmid-DNA in einer vorgekühlten Küvette versetzt und dann einem Stromfluss von 2,5 kV, 25 µF, 400 Ω ausgesetzt wurden. Nach direkter Zugabe von 1 ml YEB-Medium erfolgte ein Vor-Wachstum der Zellen für 2 h bei 28 °C. Die Zellen wurden schließlich auf YEB<sup>Kan, Rif, Gent</sup>-Platten ausplattiert und für etwa 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden dann bezüglich ihrer Transformation in PCR-Reaktionen mit entsprechenden Gen- und Vektor-spezifischen Primern getestet.

Zur Herstellung Elektro-kompetenter Zellen wurden 100 ml YEB-Medium mit 5 ml einer stationären Übernachtskultur des Stamms *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz & Schell, 1986) inokuliert und zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und in 50 ml 1 mM HEPES, pH 7,5 resuspendiert. Nach einer weiteren Pelletierung der Zellen wurde eine Resuspendierung in 50 ml 1 mM HEPES, 10 % Glycerin, pH 7,5 durchgeführt. Einer erneuten Pelletierung folgt eine Aufnahme der Zellen in 800 µl 1 mM HEPES, 10 % Glycerin, pH 7,5, eine Aliquotierung in je 50 µl, Schock-frieren in flüssigen Stickstoff und eine Lagerung bei -80 °C.

Die stabile Transformation wurde entweder durch 20 min Vakuuminfiltrationen (Bechtholt *et al.*, 1993) oder durch kurzes 'dippen' (Clough & Brent, 1998) der Blütenstände von *Arabidopsis*-Pflanzen in Agrobakterien-Suspensionen erreicht. Die dafür benutzten Pflanzen wurden zunächst 4-5 Wochen unter KT-Bedingungen in Phytokammern und anschliessend unter LT-Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Nach Entfernen der primären Infloreszenzen wurden die dann nach etwa 14 Tagen vermehrt gebildeten sekundären Infloreszenzen in jungen bis mittleren Entwicklungsstadien für die Transformationen eingesetzt.

Zur Agrobakterien-vermittelten Transformationen wurden 500 ml YEB<sup>Kan, Rif, Gent</sup>-Medium mit einer Agrobakterien-Kolonie beimpft und für 2 Tage bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Für Vakuuminfiltrationen wurden die Zellen pelletiert und in 300 ml 1 x MS-Medium, 5 % Saccharose, 10 µg/l Benzylaminopurin, pH 5,8 resuspendiert. Die Pflanzen wurden dann über Kopf mit ihren Blütenständen in die Agrobakterien-Suspension getaucht und durch Anlegen eines 20 min Vakuums in einem Exikkator infiltriert. Für das 'dippen' wurden die Zellen ebenfalls pelletiert, dann aber in 5 % Saccharose mit einer OD<sub>600</sub> von 0,8 resuspendiert. Die Blütenstände wurden sofort nach Zugabe von 500 µl/l Silwet L-77 der Firma OSi Specialities (Danbury, USA) zu der Agrobakterien-Suspension etwa 5 s darin eingetaucht. Die transformierten Pflanzen wurden nachfolgend bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert.

Zur Selektion transgener Pflanzen wurden die Samen der infiltrierten Pflanzen durch Behandlung von je 2 min zunächst mit 70 % EtOH und dann 100 % EtOH Oberflächensterilisiert und anschließend auf Selektionsplatten mit 0,5 MS-Medium, 1 x Vitamin-Mix 1 % Saccharose, 0,5 % Agar, 50 mg/l Kanamycin, 250 mg/l Claforan, pH 5,7 ausgebracht. Die Keimung der Samen erfolgte in der Regel unter LT-Bedingungen in einer Phytokammer. Nach 10-14 Tagen konnten Antibiotika-resistente und damit transgene *Arabidopsis*-Pflanzen anhand ihrer Entwicklung von Primärblättern, normalem Wurzelwachstum und normaler grüner Farbe identifiziert werden. Diese Pflanzen wurden dann in Erde gesetzt und im Gewächshaus bis zur Samenreife gebracht.



## 6.1 Promotor-Reporter-Analysen

Der Promotorbereich von *AtWRKY6* wurde mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Dazu wurden der Primer WK6p1 und den über das Startkodon reichende Primer WK6p verwendet. Für die Herstellung der verschiedenen Promotor-Deletions-Konstrukte wurden jeweils die Primer WK6p2, -p3, -p4 und -p5 in Kombination mit dem Primer WK6p genutzt. Der Primer WK6p weist an seinem 5'-Ende eine Verlängerung, die eine *Bam*HI-Schnittstelle enthält, auf. Die übrigen Primer enthalten in ihrer jeweiligen 5'-Verlängerung eine *Hind*III-Schnittstelle. Die PCR-Reaktionen wurden dann entweder mit *Tfu*- oder mit *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Nach einem Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Bam*HI und *Hind*III wurden sie in den ebenso gespaltenen Vektor pUC-GUS ligiert und so translational zu GUS fusioniert, worauf die Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  folgte. Durch einen Restriktionsverdau der so erhaltenen Klone mit *Hind*III und *Sac*I wurden dann die jeweiligen Promotor-Fragmente inklusive GUS in den ebenso gespaltenen Vektor pGPTV kloniert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Zur Überprüfung der Klonierung wurden die Konstrukte sequenziert. Nach einer Transformation der Konstrukte in Agrobakterien erfolgte die Herstellung und Identifizierung transgener Pflanzen. Darüber hinaus wurden Negativ- und Positiv-Kontroll-Pflanzen regeneriert. Als Negativ-Kontrolle wurden Pflanzen mit dem Vektor pGPTV, der nur die TATA-Box des *CaMV* 35S-Promotors vor dem GUS-Leserahmen trägt, transformiert. Für das Konstrukt der Positiv-Kontrolle wurde der *CaMV* 35S-Promotor durch einen Restriktionsverdau mit *Cla*I und *Xho*I aus dem Vektor pBT8 isoliert und in den ebenso gespaltenen Vektor pGPTV vor den GUS-Leserahmen kloniert, was dann zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet wurde.

Die transgenen Linien wurden dann hinsichtlich einer durch *AtWRKY6* Promotor-vermittelte GUS-Expression untersucht. Dazu wurden verschiedene Entwicklungsstadien und Organe, aber auch Behandlungen mit Hormonen und Infiltrationen Pathogenen verwendet. Für die Hormonbehandlungen wurden 2 Wochen alte unter sterilen Bedingungen im LT gezogene Keimlinge 24 h in 0,5 x MS-Medium mit 0,1 mM Lösungen von Ethephon, MeJA oder NaSA inkubiert. Für die Hand-Inokulationen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ohne und mit *avr RPM1* wurden voll entwickelte Blätter im KT gezogener Pflanzen verwendet. Diese wurden dann jeweils mit 10<sup>8</sup> cfu/ml Bakterien-Suspension bzw. MgCl<sub>2</sub> als Kontrolle infiltriert. Zur Herstellung der entsprechenden Bakterien-Suspensionen wurden 50 ml King's-B<sup>Rif, Kan</sup>-Medium (20 % Glycerol, 40 % Proteose, 0,1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % MgSO<sub>4</sub>) mit *P. syringae* DC3000 *avr RPM1* bzw. 50 ml King's-B<sup>Rif</sup>-Medium mit *P. syringae* DC3000 beimpft

und 1-2 Tage bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Pelletieren der Zellen wurden sie einmal in 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und anschliessend in 10 mM MgCl<sub>2</sub> in einer OD<sub>600</sub> von 0,2 resuspendiert. In der Regel folgte dann das Ernten der Blätter 6 h nach der Infiltration.

Zur GUS-Färbung wurden die Pflanzenteile durch ein Vakuum von 20 min in einem Exikkator mit 100 mM NaPO<sub>4</sub>, 2 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,1 % Triton-X-100, 0,5 mg/ml X-Gluc, pH 7 infiltriert. Im Anschluss fand in der Regel eine Inkubation bei 37 °C über Nacht statt, die von einer intensiven Entfärbung des Gewebes durch 70 % EtOH gefolgt wurde. Eine genaue Analyse der diversen GUS-Expressionen wurde sowohl am AxioPhot Mikroskop als auch am Binokular (jeweils im Durchlicht) der Firma Zeiss durchgeführt.

## 6.2 Ektopische Überexpression

Der kodierende Bereich von *AtWRKY6* inklusive flankierender nicht-translatierter Bereiche wurden mittels RT-PCR amplifiziert. Dazu wurden das *Titan One Tube RT-PCR System* der Firma Boehringer zusammen mit den Primern WK6-Sac und WK6-Xho und als Ausgangsmaterial 0,5 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern verwendet. Beide Primer enthalten eine *SacI* bzw. eine *XhoI* Schnittstelle als 5'-Verlängerung. Nach einem Restriktionsverdau der RT-PCR-Produkte mit *SacI* und *XhoI* wurden sie in den ebenso gespaltenen Vektor pBT8 ligiert und so hinter den *CaMV* 35S-Promotor kloniert. Die Transformation fand in den *E. coli*-Stamm DH5α statt. Durch einen Restriktionsverdau des erhaltenen Klons mit *ClaI* und *SacI* wurde dann das *AtWRKY6* cDNA-Fragment zusammen mit dem 35S-Promotor isoliert und in den ebenso gespaltenen Vektor pGPTV ligiert. Die Transformation erfolgte zunächst in DH5α. Zur Überprüfung der Klonierung wurde das Konstrukt sequenziert. Nach einer Transformation in Agrobakterien wurden diese dann für die Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen sowohl im Wildtyp- als auch im EN- und DEL Null-Mutanten-Hintergrund verwendet. Darüber hinaus wurden auch transgene *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt, die eine durch Dexamethason induzierte Expression von *AtWRKY6* zu lassen. Dazu wurde eine PCR-Reaktion mit *AtWRKY6* cDNA und den Primern WK6-Spe und WK6-Xho durchgeführt. Beide enthalten eine *SpeI* bzw. eine *XhoI* Schnittstelle als 5'-Verlängerung. Das mit *SpeI* und *XhoI* verdaute PCR-Produkt wurde in den entsprechend behandelten Vektor pTA7002 ligiert, zunächst in DH5α, dann in Agrobakterien transformiert und schliesslich in *Arabidopsis*-Pflanzen eingebracht. Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte hier über eine Hygromycin-Resistenz.

Die phänotypische Charakterisierung der *AtWRKY6* Überexpressionslinien schliesst auch Behandlungen mit Pathogenen ein. Für Hand-Inokulationen mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ohne und mit *avr RPM1* wurden einerseits Konzentrationen von  $10^8$  cfu/ml und andererseits  $10^7$  bzw.  $10^6$  cfu/ml eingesetzt (Whalen *et al.*, 1991). Neben voll entwickelten Blättern von Wildtyppflanzen wurden die von den charakterisierten Linien 35S::*WRKY6.3*, 5 und 9 mit den verschiedenen Bakterien-Suspensionen und  $MgCl_2$  infiltriert und hinsichtlich Krankheits- bzw. Resistenz-Merkmalen 2-6 Tage beobachtet. Für Inokulationen von 2 Wochen alten Keimlingen von Wildtyppflanzen und der Linie 35S::*WRKY6.9* mit *P. parasitica* pv. *Emoy* wurden 50 Konidien/ $\mu$ l eingesetzt und entsprechend 6-8 Tage beobachtet.

## IV ERGEBNISSE

Mittels molekularbiologischer und genetischer Methoden wird hier der Frage nach möglichen 'WRKY-Funktionen' in *Arabidopsis thaliana* nachgegangen. Dabei steht das Interesse an WRKY6 und seiner Aufgabe für den pflanzlichen Lebenslauf im Mittelpunkt. In der Zukunft wird eine gross angelegte Charakterisierung der WRKY-Multigenfamilie ein weites Feld eröffnen und neue Einblicke in die Regulation diverser biologischer Prozesse einer Pflanze gewähren.

### 1. AtWRKY-FAKTOREN

In *Arabidopsis thaliana* sind bisher (Anfang 2000) 66 - statt der anfangs 18 - verschiedene Vertreter der WRKY-Multigenfamilie von Transkriptionsfaktoren bekannt. Davon lagen als Startmaterial sowohl EST- als auch genomische Klone von *AtWRKY2*, *AtWRKY3*, *AtWRKY4*, *AtWRKY6*, *AtWRKY7* und *AtWRKY11* vor (I.E. Somssich & P. Köchner, persl. Mitteilung). Die Sequenzierung des genomischen Klons, der mit dem EST-Klon *AtWRKY4* gefunden wurde, ergab keine Übereinstimmung zwischen den beiden Klonen. Da es sich aber bei dem gefundenen Klon eindeutig um einen Vertreter der WRKY-Familie handelte, wurde ihm die Bezeichnung *AtWRKY20* zugeteilt. Später konnte die genomische Sequenz auch für *AtWRKY4* durch identische Sequenzen von einem BAC-Klon aus dem *Arabidopsis* Genom-Sequenzierungsprojekt zu dem EST-Klon für *AtWRKY4* bestimmt werden. Ebenso war auch für *AtWRKY3* und *6* die Isolierung eines genomischen Klons nicht erfolgreich. Allerdings lag für *AtWRKY6* schon zu Beginn der Arbeit in den Datenbanken des *Arabidopsis*-Genom-Sequenzierungsprojektes die Sequenz eines BAC-Klons, der identische Sequenzen zu dem entsprechenden EST-Klon für *AtWRKY6* aufwies, vor. Später fanden sich dann in den Datenbanken auch BAC-Klone mit genomischen Sequenzen für *AtWRKY3*. Die unvollständige genomische Sequenz für *AtWRKY11* konnte ebenfalls im Laufe der Arbeit durch Sequenzen aus einem entsprechenden BAC-Klon des *Arabidopsis* Genom-Sequenzierungsprojektes komplettiert werden. Anhand dieser gesammelten Sequenzinformationen lassen sich für jedes der sieben *AtWRKY* Gene die jeweilige Gengrösse und Genstruktur sowie die kodierende Region ableiten (Tab.2).

**Tab.2:** : Zusammenfassung der Klone für *AtWRKY2*, 3, 4, 6, 7, 11 und 20. Die Bezeichnungen der EST- und BAC-Klone entsprechen den 'GenBank accession numbers' (Eulgem *et al.*, 2000). EST Klone, die für Hybridisierungen eingesetzt wurden, sind fett unterlegt. Der Bereich der jeweiligen kodierenden Regionen wurde zumeist auf der Grundlage der genomischen Sequenz mit zusätzlicher Einbeziehung der Sequenzen der entsprechenden EST-Klone sowie der 5'-RACE-Klone von *AtWRKY6*, 7 und 20 ermittelt. Als Gen soll hier der Sequenz-Bereich zwischen Start- und Stoppkodon unter Einbezug der 5'-RACE-Daten für einige *AtWRKY*-Gene verstanden werden.

<b>AtWRKY</b>	<b>Genomische Klone</b>	<b>BAC-Klone</b>	<b>Gen [kb]</b>	<b>EST-Klone</b>		<b>Protein [AS]</b>
<b>2</b>	W2 (6kb)	MXK23	1,88	T44598	AA395490	536
				<b>N37131</b>		
<b>3</b>	-	T4M8.23	2,21	<b>T45479</b>	AI099874	513
		T29F22-Ende		AI993164		
		F1G15-Ende				
		T16K23-Ende				
<b>4</b>	-	F7A19.5	2,43	<b>T22085</b>	W43265	487
				AA585810		
<b>6</b>	-	F19K23.22	2,27	U75592	AA650675	553
				<b>H77127</b>	AA394951	
				AA650826	AI992388	
<b>7</b>	W7H (4,2kb)	F23B24	1,52	N37775	T20578	353
	W7E (2,6kb)	T22A6.70		<b>R30038</b>	AI992658	
<b>11</b>	W11Eg (2,5kb)	F3L17.120	1,39	<b>R64846</b>	T88086	352
	W11Ek (2kb)			R30283	AI998936	
				T22071	T42669	
				Z29806	Z29805	
<b>20</b>	W'4' (5kb)	T15N24.90	3,41	-		557

Darüberhinaus wurden die Transkriptionsstartstellen für *AtWRKY6* und 7 mittels 5'-RACE bestimmt. Der Anteil 5'-nicht-translatierter mRNA beträgt bei *AtWRKY6* und bei *AtWRKY7* jeweils 127 bp (Daten nicht gezeigt). Ein entsprechendes Experiment für *AtWRKY20* konnte für die Ermittlung der kodierenden Sequenz genutzt werden (Daten nicht gezeigt).

Mit diesen insgesamt sieben verschiedenen Klonen von WRKY-Faktoren wurden dann vorläufige Analysen durchgeführt, um einen geeigneten Kandidaten für detailliertere Charakterisierungen zu identifizieren. Unter ihnen befinden sich Mitglieder der Gruppe I-

(*AtWRKY2*, 3, 4, 20) sowie der Gruppe II-WRKY-Faktoren (*AtWRKY6*, 7, 11). Zu den Gruppe II-WRKY-Faktoren zählen mit *AtWRKY6* ein Vertreter der Subgruppe IIb, die sich unter anderem durch ein Leucinzipper-Motiv abgrenzen, und mit *AtWRKY7* und 11 Vertreter der Subgruppe IId, die das für sie charakteristische HARE-Motiv besitzen (Eulgem *et al.*, 2000). Mit *AtWRKY6* gehört zu dieser kleinen Gruppe von WRKY-Genen auch ein Vertreter, bei dem in der Genstruktur die hoch konservierte Position des Introns in der kodierenden Region der funktionellen WRKY-Domäne etwas abweicht (Eulgem *et al.*, 2000). Die strukturellen Merkmale zusammen mit charakteristischen Domänen in der kodierenden Sequenz der sieben WRKY-Faktoren sind in einer Übersicht zusammengefasst (Abb.3).

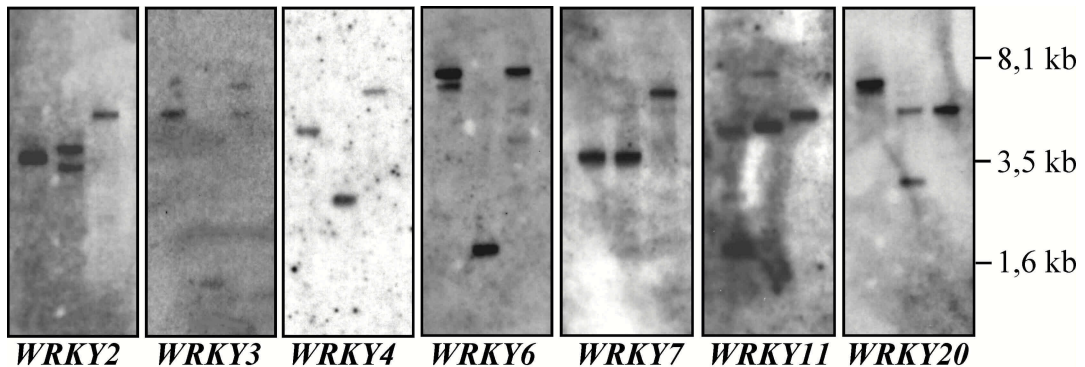


**Abb.3 :** Schematische Darstellung von *AtWRKY2*, 3, 4, 6, 7, 11 und 20. Sie verteilen sich auf die Gruppen I und II mit Subgruppierungen in IIb und IId. Die Intronpositionen mit relativen Grössen sind durch Linien, die Exons entsprechend durch Boxen gekennzeichnet. Charakteristische Domänen und Regionen in der kodierenden Sequenz sind wie folgt ausgewiesen: WRKY-Domäne (schwarz), HARE-Domäne (grau) und Leucinzipper (orange).

## 1.1 Einzel-Kopie-Gene

Da es nun bei genetischen Analysen von Nutzen ist, mit Einzel-Kopie-Genen zu arbeiten, wurden genomische Southern-Analysen durchgeführt. Bei allen getesteten WRKY-Genen konnten überwiegend Einzel-Banden detektiert werden (Abb.4). Zusätzlich auftretende Banden konnten in allen Fällen durch interne Restriktionsschnittstellen in der jeweiligen genomischen Sequenz erklärt werden. Sehr schwach aufleuchtende Banden können entweder durch einen teilweise unvollständigen Restriktionsverdau der genomischen DNA oder durch evtl. Kreuzhybridisierungen mit anderen WRKY-Genen entstanden sein. Mögliche Fälle von

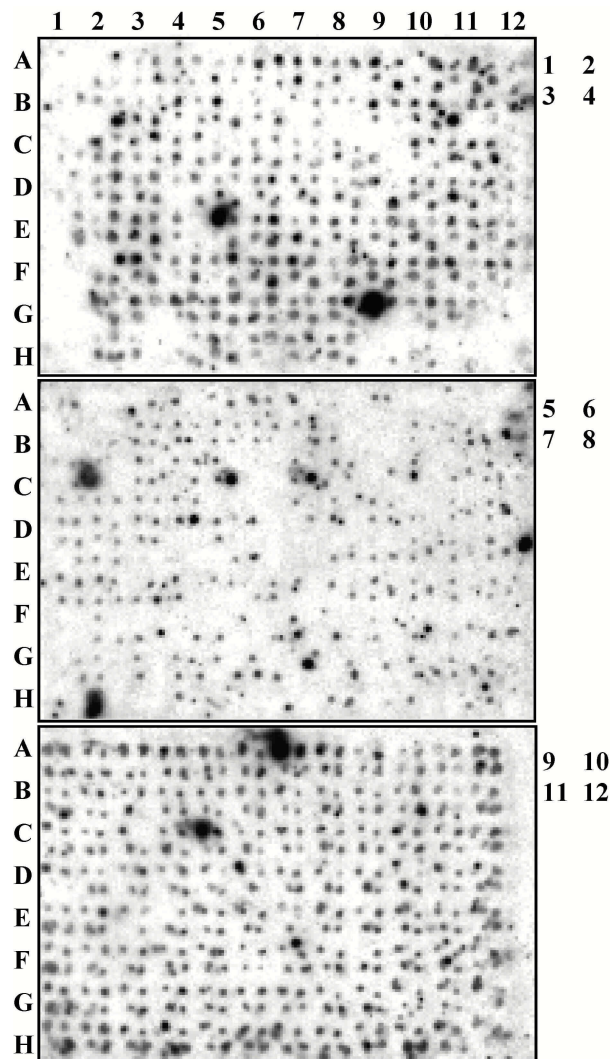
Kreuzhybridisierungen sind bei Genfamilien nicht auszuschliessen. Allerdings sollten Kreuzhybridisierungen unter den gewählten experimentellen Bedingungen minimiert sein und aufgrund nur sehr geringer Sequenzhomologien der *WRKY*-Gene untereinander, mit Ausnahme der *WRKY*-Domäne, eher selten auftreten. Folglich liegen *WRKY2*, *3*, *4*, *6*, *7*, *11* und *20* im Genom von *Arabidopsis thaliana* als Einzel-Kopie-Gene vor. Damit eignen sich zunächst alle sieben Faktoren als mögliche Kandidaten für eine Suche nach Null-Mutanten.



**Abb.4:** Genomische Southern-Analysen. Es wurde jeweils 1 µg genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 pro Spur geladen. In der jeweils ersten Spur ist ein Restriktionsverdau mit *EcoRV*, in der mittleren mit *Bam*HI und in der letzten mit *Hind*III aufgetragen. Als Sonden wurden die entsprechenden EST-Klone und für *WRKY20* ein PCR-Produkt verwendet. Das Vorhandensein von mehr als einem deutlichen Signal pro Spur kann in allen Fällen durch interne Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme innerhalb der Gene erklärt werden.

## 1.2 Verteilung im Genom

Genfamilien können im Genom auf alle Chromosomen verteilt oder in sogenannten 'clustern' vorkommen (Takatsuji, 1998). Welche Form bei der *AtWRKY*-Multigenfamilie vorliegt, wurde mit Hilfe von Kartierungs-Experimenten mit einigen *WRKY*-Genen zusammen mit Informationen aus dem *Arabidopsis*-Genom-Sequenzierungsprojekt untersucht. In den Kartierungs-Experimenten wurden die chromosomalen Lokalisationen von *WRKY2*, *3*, *4*, *7*, *11* und *20* über Hybridisierungen zu einer CIC YAC-Bibliothek (Abb.5), die das gesamte Genom von *Arabidopsis thaliana* representieren soll, festgestellt (Creusot *et al.*, 1995). Für *WRKY6* lag eine genaue Lokalisation auf Chromsom I über Informationen zu dem BAC-Klon F19K23 aus den Datenbanken des *Arabidopsis* Genom-Sequenzierungsprojektes schon vor.



**Abb.5:** Beispiel einer Hybridisierung zu YAC-Filtern. Die deutlich über dem Hintergrund aufleuchtenden Signale können anhand eines genauen Rasters definierten YAC-Klonen zugeordnet werden. Das Raster besteht aus kleinen Quadraten mit je vier Spots, die Quadrate sind dann in Reihen und Spalten angeordnet. Nach der Identifizierung der YAC-Klone erfolgte über eine dazu gehörende Datei der YAC-Bibliothek die Zuordnung entsprechender chromosomaler Marker, die eine genau kartierte Position im Genom darstellen (Creusot *et al.*, 1995). Für die Hybridisierungen wurden die gleichen Sonden wie bei den genomischen Southern-Analysen verwendet.

Die aus den Hybridisierungen identifizierten YAC-Klone für die korrespondierenden *WRKY*-Gene wurden anschließend mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation dieser YAC-Klone konnte über eine Datei, in der die chromosomalen Positionen aufgelistet sind, ermittelt werden (Tab.3).



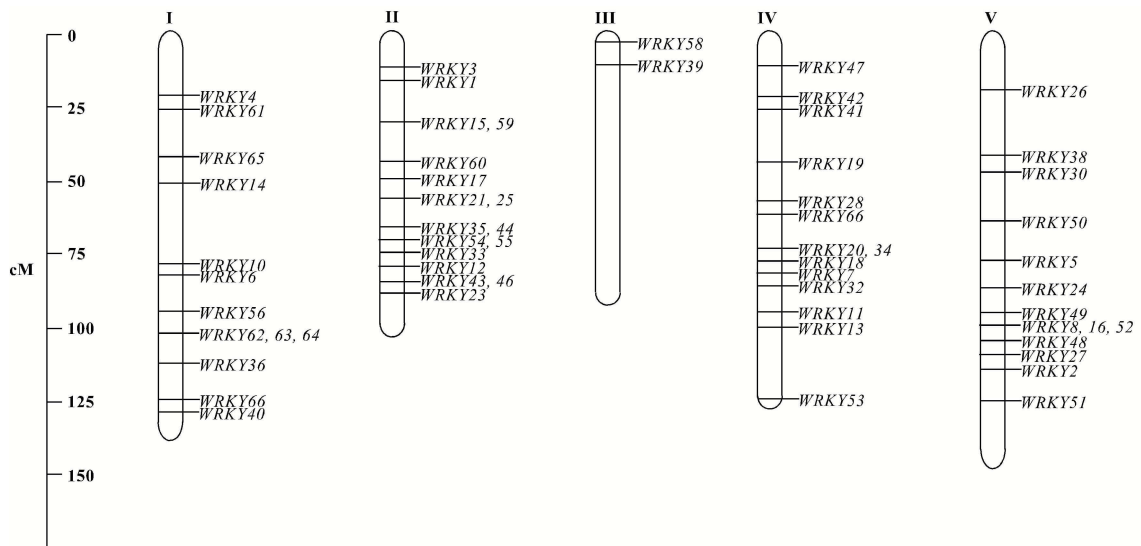
**Tab.3:** Chromosomale Lokalisationen von *AtWRKY2*, *3*, *4*, *7*, *11* und *20*. Die Position von *AtWRKY6* ist den Datenbanken entnommen (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/maps/SEQmap>).

<i>AtWRKY</i>	YAC-Klone	Chromosom	Lokalisation/Marker
<b>2</b>	CIC6C7	V	m233
	CIC5C7 (n.a.)		
<b>3</b>	CIC9D8	II	m246
<b>4</b>	CIC3G6	I	ve129, m219
<b>6</b>	-	I	mi304
<b>7</b>	CIC1G9	IV	ve030, abi1, mi422
	CIC1E5		
	CIC9A7		
	CIC9C5		
<b>11</b>	CIC11C6	IV	Ve119, g8300
<b>20</b>	CIC12B3	IV	abi1, m600

(n.a. = nicht geankert)

Die aus den Kartierungs-Experimenten abgeleiteten chromosomalen Lokalisationen der *WRKY*-Gene ließen sich dann im Verlauf dieser Arbeit durch neue Informationen aus dem *Arabidopsis*-Genom-Sequenzierungsprojekt bestätigen. Alle Daten zusammengenommen ergeben dann insgesamt das Bild einer Genfamilie, die im Genom über alle Chromosomen verteilt ist (Abb.6). Es sind zwar ein paar ‘hot-spot’-Regionen zu erkennen, aber die *AtWRKY*-Multigenfamilie bildet keine grossen ‘cluster’ im Genom. Die geringe Anzahl der auf Chromosom III lokalisierten *WRKY*-Faktoren ist durch bisher nicht zugängliche Sequenzinformationen in den Datenbanken bedingt.

Die Kenntnis der chromosomalen Lokalisation der sieben *WRKY*-Faktoren zusammen mit Informationen über die chromosomale Satturierung von Transposon-Insertionen der für das Suchen nach *WRKY*-Null-Mutanten zur Verfügung stehenden *Arabidopsis* Insertions-Population stellte einen weiteren Faktor zur Auswahl eines Kandidaten für eine funktionelle Charakterisierung eines *WRKY*-Faktors dar.



**Abb.6:** Übersicht zur Verteilung von *WRKY*-Genen im Genom von *Arabidopsis thaliana*. Die Ergebnisse der Kartierungs-Experimente und Informationen aus Datenbanken (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/maps/SEQmap>) sind hier schematisch zusammengefasst.

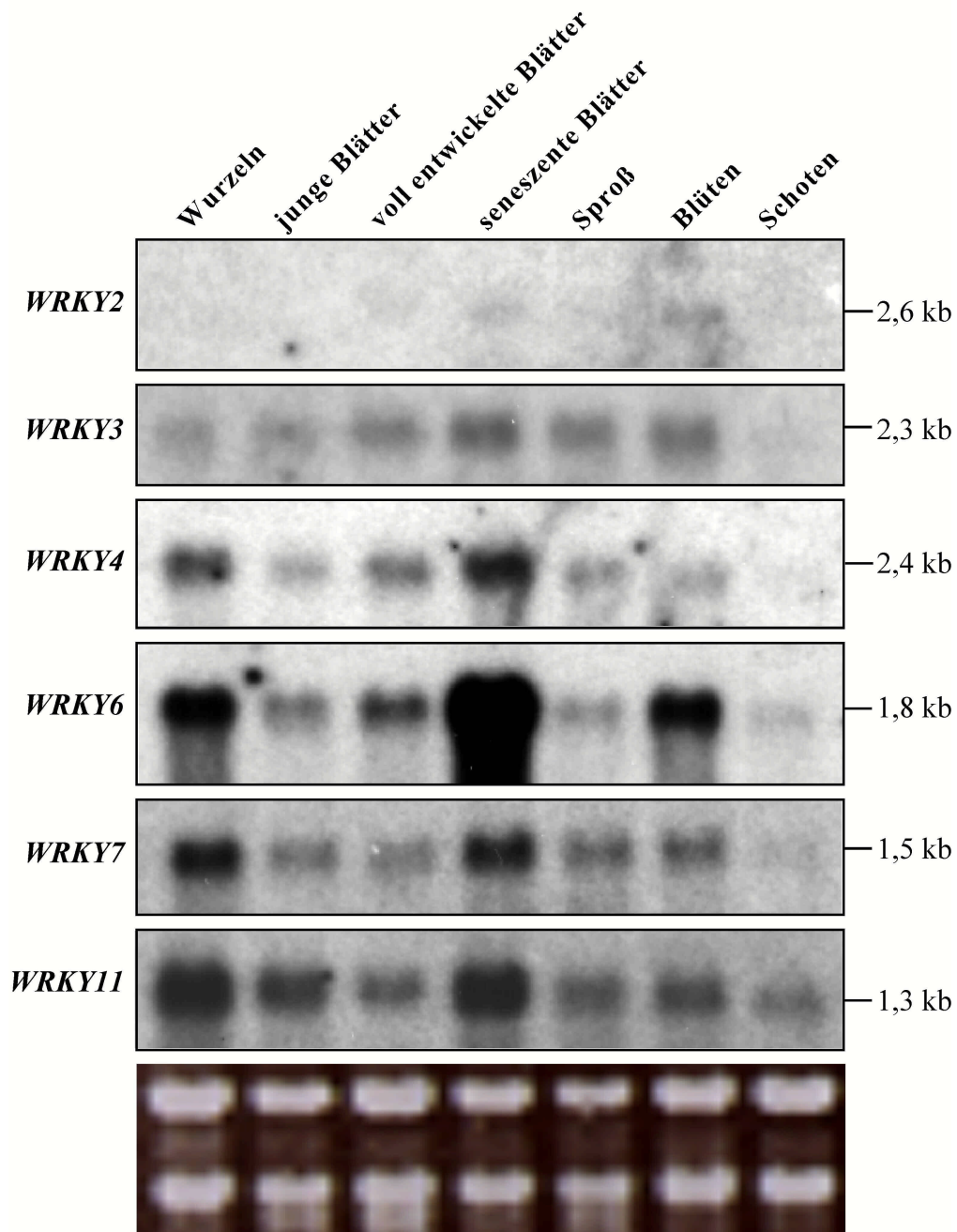
### 1.3 Expressionsmuster

Neben eher 'praktischen' Voraussetzungen wie das Vorliegen von Einzel-Kopie-Genen (Abb.3) zusammen mit deren chromosomalen Lokalisationen (Abb.6) ist es für das Suchen von *WRKY*-Null-Mutanten in einer geeigneten Insertionspopulation ebenfalls wichtig, Informationen über das Expressionsverhalten der *WRKY*-Gene zu erhalten. Das Expressionsmuster eines *WRKY*-Gens kann es als besonders interessanten Kandidaten für eine nachfolgende funktionelle Analyse erscheinen lassen. Auch im Hinblick auf anschließende phänotypische Charakterisierungen von isolierten Null-Mutanten ist das Expressionsmuster des entsprechenden Gens von Bedeutung.

Zunächst wurde das Expressionsmuster der sieben *WRKY*-Gene in verschiedenen Organen und Geweben, auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Dabei wurden die Transkriptgrößen der korrespondierenden Gene ermittelt, die mit der Länge der kodierenden Regionen übereinstimmen (Abb.7).

Die getesteten *WRKY*-Gene waren grundsätzlich in nahezu allen Geweben, aber in unterschiedlicher Stärke exprimiert. Einerseits wies jedes *WRKY*-Gen ein individuelles Expressionsmuster auf, andererseits waren aber auch einige Gemeinsamkeiten zu erkennen (Abb.7). So zeigte sich, dass bei allen das Signal mit der geringsten Stärke in Schoten vorkommt. Weiterhin waren alle in seneszenten Blättern und Blüten exprimiert. Während dies aber bei dem äußerst gering exprimierten *WRKY2* die einzigen erkennbaren Signale sind, zählten sie bei *WRKY6* zu den stärksten Signalen überhaupt. In Wurzeln wurde bei *WRKY6* wie

auch bei *WRKY4*, *7* und *11* ebenfalls ein sehr starkes Signal deutlich. Herausragend waren aber vor allem die hohen Transkriptmengen, die in seneszenten Blättern detektiert wurden. Das Expressionsmuster von *WRKY6* erschien daher von besonderem Interesse.



**Abb.7:** Expression von *WRKY*-Genen in verschiedenen Pflanzenteilen von *Arabidopsis thaliana* Col-0. Pro Spur waren je 10 µg Gesamt-RNA, die aus den angegebenen Geweben isoliert wurden, geladen. Bei den Hybridisierungen wurden die korrespondierenden EST-Klone als Sonden eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente die Ethidiumbromid-Färbung des Gels.

Das Expressionsniveau von *WRKY20* war so gering, dass es mittels Northern-Blots nicht zu analysieren war. Diese Tatsache wurde noch darin bestärkt, dass bis Ende der Arbeit kein entsprechender EST-Klon in den Datenbanken vorhanden war. Aber in semi-quantitativen RT-

PCR-Experimenten war ersichtlich, dass *WRKY20* seneszenten Blättern und in Sprossen deutlich erkennbar sowie in Wurzeln, Blüten und Schoten stärker exprimiert war (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu dieser Gewebe-bezogenen Expressionsanalyse wurde das Expressionsverhalten der sieben *WRKY*-Gene nach Behandlungen mit verschiedenen Stimulantien untersucht. Dazu wurden Pflanzenhormone wie Auxin, Cytokinin, Gibberellin, Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen, Brassinosteroid und auch Salze wie NaCl und CuSO<sub>4</sub> in Versuchssystemen mit abgeschnittenen Blättern und Keimlingen verwendet. Es konnten allerdings keine Veränderungen in der Expression der einzelnen Gene im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde eine Erhöhung der Transkriptmengen von *WRKY6*, *7* und *11* zwischen den Behandlungen inklusive der Kontrolle und den völlig unbehandelten Ansätzen sichtbar, was auf eine Responsivität nach Verwundung hindeutete. Möglicherweise waren dadurch evtl. vorhandene Effekte der unterschiedlichen Behandlungen überlagert.

Frühere Expressiondaten deuteten auf eine Induzierbarkeit der *WRKY3*, *7* und *11* Gene durch Elizitor hin (I.E. Somssich & P.J. Rushton, persl. Mitteilung). Dies ließ sich in wiederholten Experimenten mit *Pmg*-Elizitor-behandelter *Arabidopsis*-Zellkultur (Hahlbrock *et al.*, 1981) jedoch nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt), was sich durch mögliche Veränderungen der Zellkultur über einen längeren Zeitraum erklären ließe. In Übereinstimmung mit einer möglichen Elizitor-Induzierbarkeit hingegen steht, dass die Transkriptmenge von *WRKY7* nach Infiltration von Blättern mit dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* sowie von *WRKY11* nach Infektion von Keimlingen mit dem Oomyceten-Pathogen *Peronospora parasitica* erhöht war (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ließen die Informationen über das Expressionsverhalten der sieben *WRKY*-Gene besonders *WRKY6*, aber auch *WRKY3*, *7* und *11* als interessante Kandidaten für weitere funktionelle Charakterisierungen per Null-Mutanten erscheinen.

#### 1.4 Null-Mutanten

Einer funktionellen Analyse von *WRKY*-Faktoren sollten hier Charakterisierungen möglicher mutanter Phänotypen von Null-Pflanzen als Grundlage dienen. Zusätzlich stellten Null-Mutanten von Transkriptionsfaktoren wie den *WRKY*-Faktoren ein Werkzeug für die Identifikation putativer Zielgene dar.

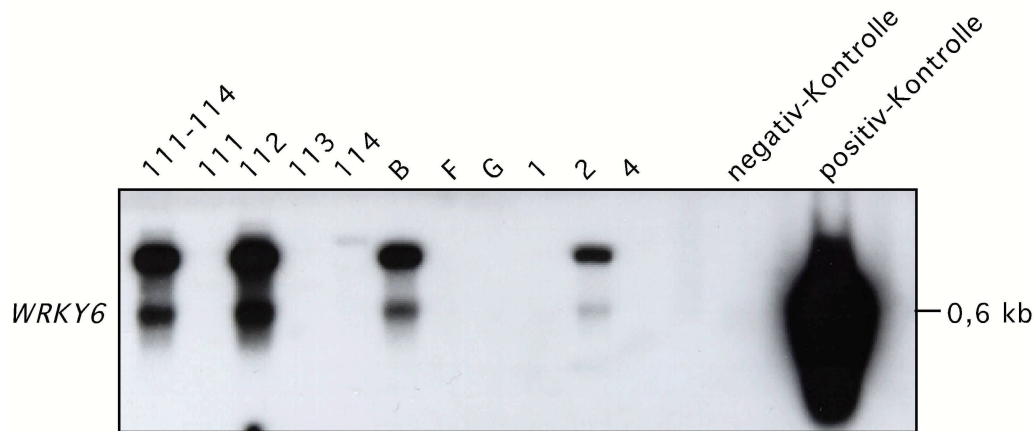
Als Insertions-Population für ein Suchen nach *WRKY* Null-Mutanten stand die sogenannte AMAZE-Population (Cardon *et al.*, 1993; Wisman *et al.*, 1998) zur Verfügung. Diese Population basiert auf Insertionen des autonomen *En-1* Transposons aus Mais in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Col-0. Sie bietet eine Möglichkeit zum Studium von Genfunktionen über reverse Genetik, aber auch zur Isolierung der betroffenen Gene von Mutanten (Yephremov *et al.*, 1999). Da es sich bei dem *En-1* Element um ein Transposon mit hoher autonomer Aktivität handelt, ist eine Saturierung des Genoms schon bei einer relativ geringen Grösse der Population zu erreichen. Die *En-1* Insertionen sind über alle Chromosome verteilt.

Allerdings war in dem Stadium der Population, in der sie sich zu Beginn der Arbeit befand, nur eine sehr ungenügende Saturierung des Chromosoms IV vorhanden. Die Mehrheit der *En-1* Insertionen wurde auf Chromosom I und V lokalisiert (E. Wisman, persl. Mitteilung). Die Generation 5, die hier genutzt wurde, bestand aus 7600 Linien mit etwa 50000 Insertionen des *En-1* Transposons. Eine individuelle Linie wies dabei eine durchschnittliche Kopienzahl des *En-1* Elementes von sechs bis zehn auf. Es traten aber auch Linien mit annähernd 20 Insertionen auf (E. Wisman, persl. Mitteilung). Die doch relativ hohe Kopienzahl pro Linie bedingte einige Rückkreuzungen in *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp, um eine Eliminierung unerwünschter sogenannter Hintergrund-Insertionen zu erreichen.

Die Insertionen des *En-1* Elementes sind nicht stabil, da es sich hier um ein autonom agierendes Insertionssystem im Gegensatz zu z.B. Zwei-Komponenten-Systemen handelt (Speulmann *et al.*, 1999; Tissier *et al.*, 1999), bei denen die Transposase-Aktivität von den transponierbaren Elementen abgekoppelt wurde. Allerdings hinterlässt das *En-1* Transposon bei der Excision in der Regel 'footprints', die dann zu stabilen Null-Mutanten führen können. Bei Excisionen ohne 'footprint', die etwa in einem von 1000 Fällen auftreten (E. Wisman, persl. Mitteilung), können dann durch daraus resultierende Revertanten mögliche Funktionen des zuvor betroffenen Gens bestätigt werden.

Aufgrund seines Expressionsmusters (Abb.7) sowie seiner Lokalisation auf Chromosom I (Abb.6) war *WRKY6* nicht nur ein in mehrfacher Hinsicht interessanter, sondern vor allem auch ein äusserst Erfolg versprechender Kandidat für das Suchen einer Null-Mutante in der AMAZE-Population. Als ein ebenfalls vielversprechender Kandidat wurde *WRKY2* angesehen, da es mit seiner Lokalisation auf Chromosom V (Abb.6), ähnlich wie *WRKY6*, auf einem der beiden Chromosomen mit den meisten *En-1* Insertionen liegt. Weiterhin wurden noch *WRKY3* und 7 wegen ihres Expressionsmusters ausgewählt, obwohl sich *WRKY7* auf dem mit der geringsten Zahl an *En-1* Insertionen versehenen Chromosom IV befindet (Abb.6). Die auf PCR und Southern-Hybridisierungen basierenden 'screenings' der in mehreren DNA-'pools' zusammengefassten Population verlief nach beiden Runden für *WRKY2* und 3 negativ und für

*WRKY6* (Abb.8) und 7 (Daten nicht gezeigt) zunächst positiv. Auf diesem Wege konnten für *WRKY6* die Linie 6AAK<sub>67</sub> und für *WRKY7* die Linie 6AX<sub>146</sub> identifiziert werden.



**Abb.8:** Ergebnis der zweiten ‘screening’-Runde der AMAZE-Population für *AtWRKY6*. Der in der ersten Runde als positiv identifizierte ‘4-Tray-Pool’ (111-114) wurde in die jeweiligen ‘1-Tray-Pools’ (111, 112, 113 und 114), Reihen (B, F und G) und Spalten (1, 2 und 4) aufgeteilt und erneut einer PCR mit je einem *EnI*- und *AtWRKY6*-spezifischen Primern sowie anschließender Hybridisierung mit dem mit *AtWRKY6* korrespondierenden EST-Klon unterzogen. Als Negativ-Kontrolle wurde eine PCR in der gleichen Primer-Kombination mit genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 durchgeführt. Eine PCR mit zwei *AtWRKY6* spezifischen Primern diente als Positiv-Kontrolle. Über die drei Dimensionen erfolgte dann die Identifizierung der potentiellen Null-Linie.

Die Tochtergenerationen der jeweiligen potentiellen Null-Linien für *WRKY6* und 7 wurden dann hinsichtlich einer *EnI* Insertion in den jeweiligen Genen anhand genomischer Southern-Analysen untersucht. Sie zeigten allerdings bei den potentiellen Null-Pflanzen für *WRKY7* keine durch die Integration des *EnI* Elementes verursachte Verschiebung der Wildtyp-Bande. Eine Excision des Transposons und damit verbundene mögliche ‘footprints’ lagen auch nicht vor, wie eine Sequenzierung von genomischen PCR-Produkten mit den für das ‘screening’ benutzten Primern ergab. Eine Prüfung von Pflanzen der ursprünglich für das ‘screening’ verwendeten Generation sowie ein erneutes Suchen von *WRKY7* Null-Mutanten in der AMAZE-Population zu einem späteren Zeitpunkt stellten sich jeweils als negativ heraus (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu gelang die Isolierung einer *WRKY6* Null-Linie (Abb.24, s. S.74). Im weiteren wurden daher detaillierte Untersuchungen zu *WRKY6* vorgenommen, um Informationen über mögliche Funktionen dieses Faktors in Erfahrung zu bringen.

## 2. FUNKTIONELLE DOMÄNEN VON *AtWRKY6*

In Übereinstimmung mit einer Funktion als Transkriptionsfaktor besitzen WRKY-Faktoren eine DNA-bindende Region, welche die WRKY-Domäne mit ihrer Zink-Finger-ähnlichen Struktur darstellt, und Transkriptionsregulationsdomänen, die Transaktivierungen bewirken können (Eulgem *et al.*, 1999). Hinzu zählen aber auch basische Regionen, die potentielle Kernlokalisierungs-Signale (NLS) beinhalten, und Dimerisierungsdomänen wie Leuzinzipper-Motive (Eulgem *et al.*, 2000). Tatsächlich zeigen einige WRKY-Faktoren eine Lokalisierung im Zellkern (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000). Ebenso findet eine effiziente DNA-Bindung von Leuzinzipper-WRKY-Faktoren beim Fehlen von Protein-Protein-Interaktionen nicht mehr statt (Cormack *et al.*, eingereicht).

*WRKY6* hat mit 553 Aminosäuren ein berechnetes Molekulargewicht von 64 kDa und zählt zu den Gruppe II-Faktoren mit einer einzelnen WRKY-Domäne (Abb.9). Die WRKY-Domäne umfasst das hochkonservierte Peptid 'WRKYGQK' noch unbekannter Funktion und 13 Aminosäuren darauffolgend das Zink-Finger-Motiv C-n<sub>5</sub>-C-n<sub>23</sub>-H-n<sub>1</sub>-H als DNA-Binde-Region. Diese ist durch veränderte Abstände und Art der Aminosäurereste zwischen den mutmaßlichen Zink-Liganden eine Variation des klassischen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zink-Fingers (Liu *et al.*, 1999). *WRKY6* fällt aufgrund der Sequenz der WRKY-Domäne in die Subgruppe IIb, die WRKY-Faktoren mit Leuzinzipper-Motiven, dem Motiv 2 (EEPExKRRKxE) und dem Motiv A als N-terminale Extension der WRKY Domäne (<sup>K</sup>/REPRVAV<sup>Q</sup>/<sub>K</sub>T<sup>K</sup>/<sub>v</sub>SEVD<sup>I</sup>/<sub>v</sub>L) sowie korrespondierenden *WRKY*-Genen mit einer anderen Position des konservierten Introns in der kodierenden Region der WRKY-Domäne umfasst (Eulgem *et al.*, 2000).

1 MDRGWSGLTLDSSSLDLLNPNRISHKNHRRFSNPLAMSRIDEEDDQKTRI  
 51 STNGSEFRFPVSLSGIRDREDEDFSSGVAGDNDREVPGEVDFFSD**KKSRV**  
 101 **CREDDEGFRVKK**EEQDDRTDVNTGLNLRTTGN**TKSDESMIDDGESSEMED**  
 151 **KRAKNE**LVK**LQDELKKMTMDNQK**RELLTQVSNSYTS**LQMHVSLM**QOOO  
 201 **QQ**NNKVIEAAEKPEETIVPRQFIDLGPTRAVGEAEDV**SNSSEDRTRSGG**  
 251 **SSAAE****RRSNGKR**LGREESPETESNKIQKVNSTPTPTFDQTAEATM**RKARV**  
 301 SVRARSEAPMISDGCQWRKYGQMAKGNPCPRAYYRCTMATGCPVRKQVQ  
 351 **RCAEDRSILITTYEGNH**HPLPPAAVAMASTTTAAANMLLSGSMSSHGDM  
 401 MNPTNLLARAVLPCSTSMATISASAPFPTVTLDLTH**SPPPPNGSNPSSSA**  
 451 ATNNNHNSLM**QRPQQQQQ**MTNLPPGMLPHVIGQALYNQSKFSGLQFSGG  
 501 SPSTAAFSQSHAVADTITALTADPNFTAALAAVISSMINGTNHHDGEGNN  
 551 KNQ

**Abb.9:** Aminosäuresequenz von *AtWRKY6*. Funktionelle Domänen sind wie folgt durch Boxen hervorgehoben: WRKY-Domäne (schwarz), NLS-Konsensus-Motiv (grün), potentielle NLS-Motive (blau), Leucizipper-Motiv (orange) und potentielle Transkriptionsregulations-Domänen (rot). Durch Unterstreichen sind das Motiv 2 (- - -) und das Motiv A (—) hervorgehoben (Eulgem *et al.*, 2000). Die für die Einengung der funktionellen NLS-Region verwendeten Protein-Bereiche sind mit t1, t2, t3 und t4 gekennzeichnet.

## 2.1 Kernimportsignale

Typische NLS-Sequenzen lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen (Hicks *et al.*, 1995). Zunächst werden sogenannte ‘monopartite’ von ‘bipartite’ Motiven unterschieden. Als ‘bipartite’ NLS werden zwei kurze basische Domänen, die durch mehrere Aminosäuren getrennt sind, bezeichnet. Die ‘monopartite’ NLS liegen in zwei verschiedenen Formen vor: entweder als kurzes ‘cluster’ mindestens vier basischer Aminosäuren oder als eine Kombination aus hydrophoben Aminosäuren mit mindestens zwei basischen Aminosäuren. Allerdings gibt es auch funktionelle NLS-Motive, die keiner der drei Klassen zugeordnet werden können (Grebek *et al.*, 1997). Verschiedene NLS-Sequenzen sind unter anderem auch aus pflanzlichen Transkriptionsfaktoren identifiziert worden.

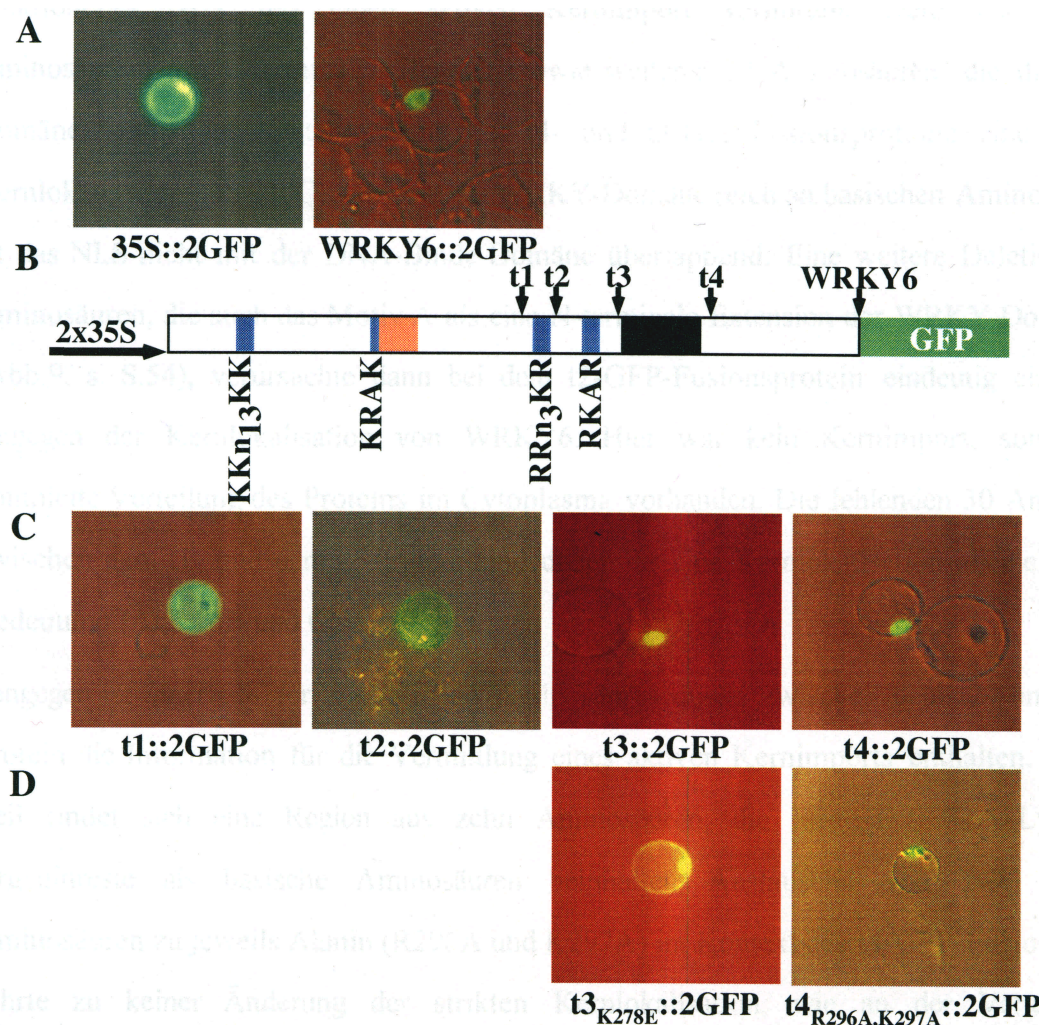


Eine subzelluläre Lokalisierung im Zellkern ist schon für zwei WRKY-Faktoren gezeigt worden (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000), allerdings nicht für einen Vertreter der WRKY-Multigenfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Für WRKY6 war ebenfalls eine solche Lokalisation anzunehmen. Einer der beiden Kern-lokalisierten Faktoren zählt wie WRKY6 zu den WRKY-Faktoren der Gruppe II mit Leucinzipper-Motiv (Hara *et al.*, 2000). In der Primärstruktur von WRKY6 waren basische Regionen potentieller NLS-Funktion zu erkennen, was alles für eine subzelluläre Lokalisation im Zellkern sprach. Aber ob es sich wie im Falle der beiden Kern-lokalisierten WRKY-Faktoren ebenfalls um einen Signalweg-unabhängigen Kernimport handelte, war im Voraus nicht abzuschätzen.

In Experimenten mit WRKY6-GFP-Fusionsproteinen wurde die subzelluläre Lokalisation von WRKY6 in *Arabidopsis* Protoplasten beobachtet. GFP selbst weist keine NLS-Motive auf und ist daher im gesamten Cytoplasma zu finden. Aufgrund seines geringen Molekulargewichts von 26 kDa kann es aber auch frei über die Kernporenkomplexe in den Zellkern diffundieren. Daher ist die Analyse einer subzellulären Lokalisation im Zellkern mittels GFP-Fusionen eine geeignete Technik (Grebenok *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zur Kontrolle, bei der die GFP-Fluoreszenz im gesamten Cytoplasma und im Zellkern vorhanden war, zeigte sie sich bei den WRKY6-GFP-Fusionen ausschliesslich auf den Zellkern begrenzt (Abb.10A). Die Kernlokalisierung von WRKY6 war hier konstitutiv und unter den gegebenen Bedingungen nicht an einen bestimmten Signalweg gekoppelt.

Unter mehreren basischen Motiven mit potentiellen NLS-Funktionen sind bei WRKY6 zwei Regionen besonders auffällig. Die der Aminosäure 97 folgende Sequenz KK-n<sub>13</sub>-KK stimmt mit dem Konsensus der 'bipartite' NLS-Motive überein (PSORT). Direkt vor dem Leucinzipper-Motiv befindet sich mit dem Motiv 2 eine basische Region mit Sequenzhomologien zu anderen Vertretern der Subgruppe IIb, aber an einer anderen Position auch zu den Gruppe I-Faktoren (Eulgem *et al.*, 2000). Diese Region ist möglicherweise für den Kernimport von WRKY-Faktoren verantwortlich (Eulgem *et al.*, 1999). Ob diese Regionen oder aber andere für die Kernlokalisierung von WRKY6 verantwortlich sind, wurde durch GFP-Fusionsproteinen mit verschiedenen verkürzten Formen des WRKY6 Proteins (t1-4) untersucht (Abb.10B und Abb.9, s. S.54).



**Abb.10:** Analyse der transienten Expression der verschiedenen *AtWRKY6*-GFP-Fusionsproteine in *Arabidopsis* Protoplasten unter UV-Licht-Bestrahlung 18h nach der Transfektion. Die Expression aller Proteine wurde durch einen doppelten *CaMV35S*-Promotor vermittelt. **A** Subzelluläre Lokalisation von *AtWRKY6*. Die *AtWRKY6*-GFP-Konstrukte (rechts) beinhalten jeweils das komplette *AtWRKY6* Protein C-terminal fusioniert an ein doppeltes GFP-Protein. Als Kontrolle (links) wurde das isolierte doppel-GFP-Protein verwendet **B** Einengung des funktionellen NLS-Motivs von *AtWRKY6*. Dargestellt sind die verschiedenen C-terminalen Deletionskonstrukte t1, t2, t3 und t4 von *AtWRKY6* C-terminal fusioniert an Doppel-GFP mit Kennzeichnungen potentieller 'monopartite' und 'bipartite' NLS-Motive (blau), Leucinzipper-Motiv (orange) und WRKY-Domäne (schwarz). **C** Analyse der Expression der einzelnen C-terminalen *AtWRKY6* Deletions-GFP-Fusionsproteine und **D** der mutierten *AtWRKY6* Deletions-GFP-Fusionsproteine.

Da in Einfach-GFP-Fusionen des t1-Proteins aufgrund seines geringen Molekulargewichts eine durch Diffusion ermöglichte teilweise Kernlokalisierung festzustellen war (Daten nicht gezeigt), wurde dies im folgenden über eine Vergrößerung der Proteine mit Doppel-GFP-Fusionen unterbunden. Entgegen der Annahme war bei dem t1-GFP-Fusionsprotein, welches beide zuvor hervorgehobenen basische Regionen potentieller NLS-Funktion umfasst, eine Lokalisation im gesamten Cytoplasma zu beobachten (Abb.10C). Demnach befindet sich innerhalb dieses 237 Aminosäuren grossen N-terminalen Bereichs von WRKY6 kein

funktionelles NLS, das einen aktiven Kernimport vermittelt. Deletionen von 177 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs sowie weiteren 64 Aminosäuren, die die WRKY-Domäne beinhalten, zeigten anhand der t4- und t3-GFP-Fusionsproteine eine eindeutige Kernlokalisation (Abb.10C). Obwohl die WRKY-Domäne reich an basischen Aminosäuren ist, ist das NLS nicht mit der DNA-Binde-Domäne überlappend. Eine weitere Deletion von 47 Aminosäuren, die auch das Motiv A als eine N-terminale Extension der WRKY-Domäne trägt (Abb.9, s. S.54), verursachte dann bei dem t2-GFP-Fusionsprotein eindeutig einen Effekt entgegen der Kernlokalisation von WRKY6. Hier war kein Kernimport, sondern eine komplette Verteilung des Proteins im Cytoplasma vorhanden. Die fehlenden 30 Aminosäuren zwischen dem t1- und dem t2-Protein sind daher für eine Kernlokalisation alleine nicht von Bedeutung (Abb.10B und C).

Hingegen ist innerhalb der zusätzlichen Aminosäuresequenz zwischen dem t2- und dem t3-Protein die Information für die Vermittlung eines aktiven Kernimports enthalten. In diesem Teil findet sich eine Region aus zehn Aminosäuren, die insgesamt fünf Lysin- und Argininreste als basische Aminosäuren beinhaltet. Austausch von zwei basischen Aminosäuren zu jeweils Alanin (R296A und K297A) im Kontext des t4-GFP-Fusionsproteins führte zu keiner Änderung der strikten Kernlokalisation, wie an der Verteilung des t4<sub>R296A,K297A</sub>-GFP-Fusionsproteins zu erkennen war (Abb.10D). Dagegen beeinflusste der Austausch eines einzelnen Lysins in den N-terminal vor dieser basischen Region liegenden 30 Aminosäuren (K278E) im Kontext des t3-GFP-Fusionsproteins die ausschliessliche Kernlokalisation. Neben einer Lokalisation im Zellkern ist bei dem t3<sub>K278E</sub>-GFP-Fusionsprotein auch noch eine geringe cytoplasmatische Lokalisation sichtbar.

Da dieser Bereich, isoliert betrachtet, nicht als basische Region zu bezeichnen ist, kann die Veränderung des strikten Kernimports auch aus einer durch diesen Aminosäureaustausch hervorgerufene Konformationsänderung des Proteins begründet sein. In einer gemeinsamen Betrachtung mit Aminosäuresequenzen des C-terminalen Bereichs des t2-Proteins kristallisiert sich aber doch eine überlappende basische Region aus 18 Aminosäuren zwischen dem t2- und dem t3-Protein mit insgesamt fünf Arginin- und Lysinresten heraus. Möglicherweise dient dem WRKY6 Protein diese Region als funktionelles NLS (KRLGREESPETESNKIQK), welches für einen aktiven Import in den Zellkern verantwortlich ist. Dieser Bereich ist aber weder mit dem NLS-Motiv (KKSRCREDDEGFRVKK), welches dem 'bipartite' Konsensus perfekt entspricht, noch mit dem Motiv 2 (SEMEDKRAKNE), das als basische Region mit potentieller NLS-Funktion für WRKY-Faktoren der Subgruppe IIb vorhergesagt wurde (Eulgem *et al.*, 2000), identisch.

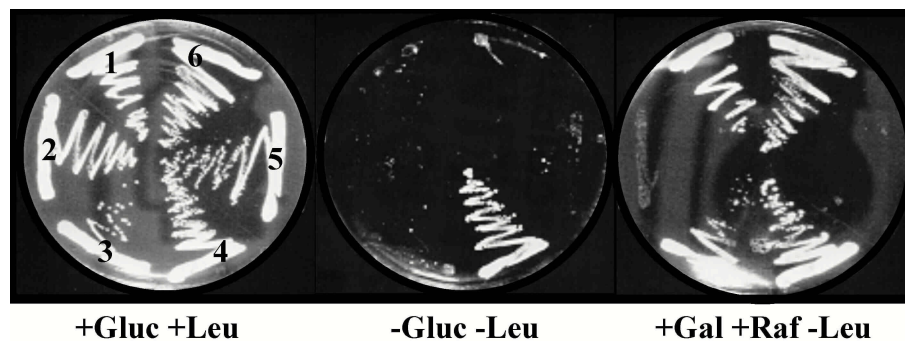
## 2.2 Dimerisierungsdomäne

Neben Vorhersagen über funktionelle Domänen in der Primärstruktur von WRKY6, welche natürlich die DNA-Binde-Domäne mit ihrer Zink-Finger-ähnlichen Struktur und darüber hinaus potentielle NLS-Motive betreffen, konnte auch eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne identifiziert werden. In dem N-terminalen Bereich zwischen Aminosäure 135 und Aminosäure 205 (Abb.9, s. S.54) wurde die Ausbildung eines sogenannten 'coiled-coil'-Motivs (Cohen & Parry, 1994) mit einer hohen Wahrscheinlichkeit errechnet (CIOLSCAN, GCG Paket). Auch die als Leucinzipper bekannte Struktur bildet einen parallelen, zwei-strängigen  $\alpha$ -helicalen 'coiled-coil' (Landschulz *et al.*, 1988; Alber, 1992). Tatsächlich findet sich innerhalb des 'coiled-coil'-Motivs von WRKY6 ein für Leucinzipper charakteristisches Aminosäuremuster. 'Coiled-coils' bestehen aus einem '7-pattern', in welchem die Positionen 1 und 7 von hydrophoben Aminosäuren eingenommen werden. Im Falle des Leucinzipper ist die Position 7 mit einem Leucin besetzt, welches nach drei Aminosäuren von einem weiteren hydrophoben Aminosäurerest gefolgt ist (Alber, 1992). Die Dimerisierungen, die über Leucinzipper vermittelt werden, werden durch hydrophobe Interaktionen zwischen den 'coiled-coils' stabilisiert.

Durch das Vorhandensein einer so offensichtlichen Protein-Protein-Interaktionsdomäne in der Primärstruktur von WRKY6, war anzunehmen, dass WRKY6 nicht als Monomer, sondern eher als Dimer agiert. Bisher gab es allerdings keine genauen Daten zu einer Homo- oder Heterodimerisierung von WRKY-Faktoren. Im Hinblick eines möglichen mutanten Phänotyps transgener Pflanzen, die WRKY6 ektopisch überexprimieren, wäre zumindest eine Teilfunktion von WRKY6 als Homodimer Voraussetzung. In einem kleinen Experiment wurde dieser Frage nachgegangen.

Für die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet (Fields & Song, 1989). Aus verschiedenen solcher genetischer Systeme wurde das sogenannte LexA-System ausgewählt, das eine auf Transkription basierende Selektion von Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Gyuris *et al.*, 1993; Estojak *et al.*, 1995). Mögliche Protein-Protein-Interaktionen können dann über das Wachstum der transformierten Hefen auf bestimmten selektiven Medien verfolgt werden. Das Studium von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System ist bei Transkriptionsfaktoren nicht unproblematisch. In ihrer Eigenschaft Genexpression zu stimulieren, können Transkriptionsfaktoren als 'bait' ein Hefe-Wachstum auch ohne Protein-Protein-Interaktion mit einem geeigneten Partner bewirken. Eine solche transaktivierende Fähigkeit konnte schon für zwei WRKY-Faktoren gezeigt werden (de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Dies ist ein

störender Effekt bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren. Daher wurde die Untersuchung einer mutmaßlichen Dimerisierung von WRKY6 auf Interaktionen des isolierten Leucinzippers (E137 bis Q197) eingeschränkt, der auf beiden Seiten unmittelbar von potentiellen transaktivierenden Domänen flankiert ist (Abb.9, s. S.54).

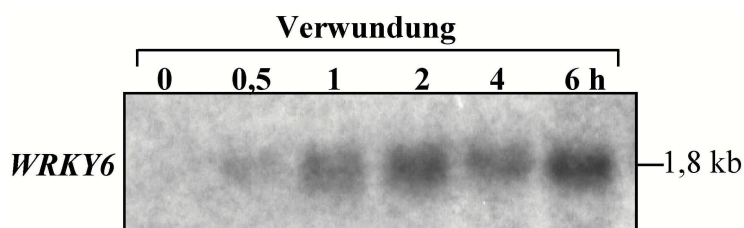


**Abb.11:** Interaktionen des isolierten Leucinzippers von *AtWRKY6*. Als positive Kontrolle diente die Interaktion der GAL4-Aktivierungs-Region mit dem 'prey'-Vektor (4), die unter allen Bedingungen Hefewachstum zulässt. Als negative Kontrollen wurden die Interaktionen des 'bait'-Vektors mit dem Leucinzipper-Fusionsprotein als 'prey' (2) sowie des Leucinzipper-Fusionsprotein als 'bait' mit dem 'prey'-Vektor (3) verwendet, die in Abwesenheit von Leucin kein Hefe-Wachstum ermöglichen. Die Interaktionen des Leucinzipper-Fusionsproteins als 'bait' wurde in Kombinationen mit sich selbst (1) und mit anderen Proteinen (5=GDI; 6=ROP) als 'prey' getestet, die typische Interaktionsdomänen besitzen (Bischoff *et al.*, 2000). Das Wachstum von Hefezellen, die Leucinzipper-Fusionsproteine exprimieren, wurde unter Kontroll- (links), unter nicht-induzierenden (mitte) und unter induzierenden (rechts) Bedingungen des *LEU2* Reportergens, welches ein Leucin-unabhängiges Wachstum vermittelt, verfolgt.

Die bei WRKY6 zuvor als Leucinzipper identifizierte Region von etwa 50 Aminosäuren war schon alleine zur Transaktivierung des Systems fähig (Abb.11, s. 3 rechts). Deshalb ist eine Aussage über mutmaßliche Interaktionen nur sehr eingeschränkt möglich. Die Transaktivierung fiel aber doch eher schwach aus (Abb.11, s. 5 rechts). Daher sind aufgrund des Hefewachstums in den getesteten Interaktionen Dimerisierungen in Form von Homo- und Heterodimeren zu vermuten (Abb.11, s. 1 und 6 rechts).

### 3. EXPRESSIONSSTUDIEN ZU *AtWRKY6*

Für eine intensive Charakterisierung potentieller mutanter Phänotypen von Null- und ektopisch überexprimierenden Pflanzen war es notwendig, das genaue Expressionsmuster des entsprechenden Gens zu kennen. Das Expressionsmuster selbst lieferte aber auch schon Hinweise über funktionelle Prozesse, in denen ein Gen involviert ist. Aus den vorangegangenen Northern-Analysen war über *WRKY6* bekannt, dass es in den Geweben Wurzel und Blüte hoch exprimiert war (Abb.7, s. S.49). Die grösste Transkriptmenge von *WRKY6* war während der Blattentwicklung in seneszenten Blättern festzustellen. In sich entwickelnden bis voll entfaltenen grünen Blättern, Spross- und Schoten-Geweben waren nur geringe Signale detektierbar. Neben diesen Gewebe- und Entwicklungs-spezifischen Expressionssignalen akkumulierte *WRKY6* mRNA auch nach Verwundung von Blättern, was in einer Verwundungskinetik mit abgeschnittenen Blättern bestätigt wurde (Abb.12).



**Abb.12:** Expressionsmuster von *AtWRKY6* in einer Verwundungskinetik. Abgeschnittene Blätter von *Arabidopsis thaliana* Col-0 wurden mehrfach eingeschnitten und über einen Zeitraum von insgesamt 6 h in MS-Medium bei RT inkubiert (Ehltling *et al.*, 1999). Pro Spur wurden je 10 µg Gesamt-RNA geladen. Als Sonde wurde der korrespondierende EST-Klon für *WRKY6* verwendet.

#### 3.1 Promoter-Reporter-Studien

Promotor-Reporter-Studien erforderten zunächst einige Kenntnisse über die Promotorregion des entsprechenden Gens. In 5'-RACE Experimenten konnte die mutmaßliche Transkriptionsstartstelle von *WRKY6* ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Anhand der Informationen aus dem BAC-Klon F19K23 waren Sequenzen der Promotorregion von *WRKY6* bekannt (Tab.2, s. S.43). Ein etwa 1,3 kb großes Fragment, das 1,2 kb Promotorsequenz inklusive 127 bp 5'-nicht-translatierter mRNA sowie 20 bp kodierende Sequenz beinhaltet, wurde translational an das Reportergen GUS fusioniert (Abb.13).



```

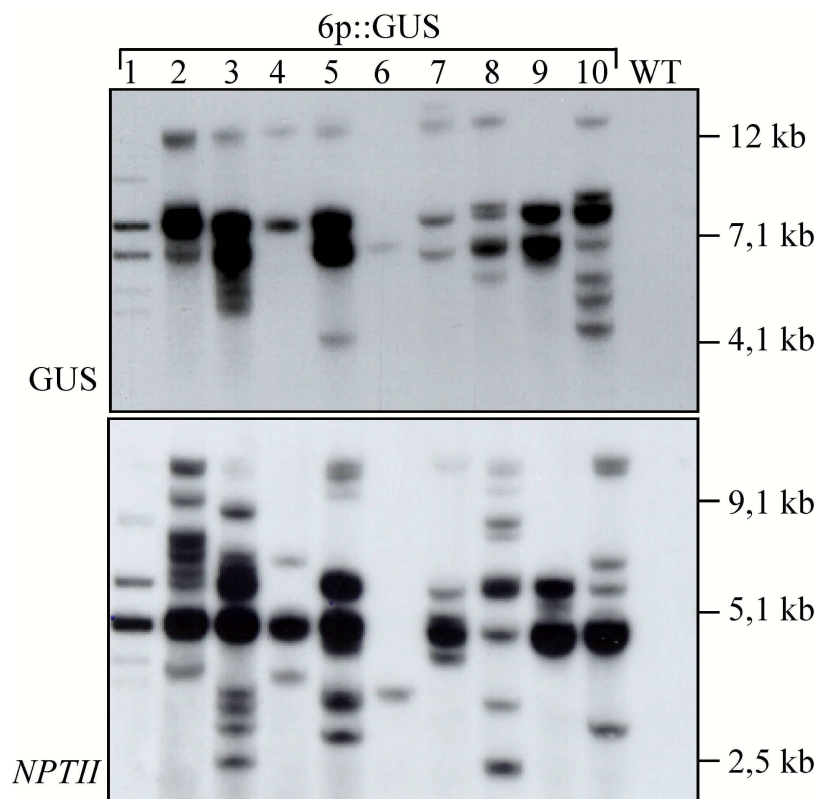
-1188 TCACGTGGAACGCGCCGCGAGTAAACGGAGCGGTGGATCAAACCTTTTCGTC
-1138 CGTTTGATCAAACAGAAGAGAAGTAGTCAATGCTCTTTCTTCATATCACA
 1088 ATTTAATAGTCTCAAGACGATTACGCCACATAACCAATTTTCTCGTGATTT
-1030 CGACATCAAATTTAATAAAAAGGAACTGATTGATTGGTCATCATGTTACA
 -988 AGTGTCAAATGAGCTAATCCGTTTTACAGTGGCAGTATTACGATCAATT
 -938 TACAAATTTTTGGTTTTATAACATACTTGTAGTTAAAACCTATTTATAAGC
 -888 TATTTATAGTGAGTTAGCTTATAAAACCCCTATTCTTTTATCTAAAATTAT
 -838 GTTTTGACTCGTTTCATGATAAAATTTTATCCTTTTCATCGGAATAAAAA
 -788 ACTTTATTATTTATTTGGCAAATAATTGGTGTAAAAATTATGTATATGT
 -738 TAATAACAAAAATATTAATCTGATTCATAATCTTAAAAAGAAAAATTT
 -688 CTTGAAATAAACTTTAGACATTGTAAATAAAAAAACATTATTTTTATATA
 -638 ATGGGATGTTTATATGTAATTTTTTATAAAAAAATAAAAGTTGTTACTA
 -588 GTAATCCGATTGGCTTTAACTATCGTCGCCAAAAGAATAATGTAGAACTG
 -538 ACTTTGAGGTAAAACATAAAGAAATTTGTAAGATAATAGTCACATTAAT
 -488 GCTAAAATTAATACATACTGATATATCGTATAAAATTTATGAAAACATA
 -438 CCTTAACCTGAATCATACTGTAATAAAAAAACAATTTATATATAAAC
 -388 CCTAAAACATAATCATAAATCCCAAACGGTGTACTCTCTATTAGCTTTGA
 -338 AAGGATTGCCCAATTGTTTGTAAAAATTTCTAATAAATAGTACAATGTTT
 -288 TGTTTCATTTTTCCTTTTCGTCAACCTGTTACCCAATAGCAAATGAAGTT
 -238 TTTATGTGTGTGTGTGTGTGTGGAATTTCCATGAAAATGAAACGGGCTTAG
 -188 AATCCCGGTGTATTATGGGTGCGGTGTAACCGGGCAATGACGCAGGATC
 -138 TGACGTAAAACCTCCAAGAATTTTTTTAAAAAGTCTCCGGAAAAATAAAT
  -88 CAAAGTTCATTAACCTAAAAAGAAAAACAATTCGGTCCACGTCCAAA
  -38 CCCTTTTTATAGGAGAGTCTTATGTTCTGGCAGAAGACTTCACAGACTCT
+12 TTCTTAATCTCTCTCTCTTTCAACCAAACCCCTAAACAAAAAAAATAC
+62 ATTTTCTGATCTCTCTAAAAATCTTTCTCCTTCGTTAATCTCGTGATCTC
+112 TTTCTTTTTCTATATATGGACAGAGGATGGTCTGGT GUS

```

**Abb.13:** *AtWRKY6* Promotor::GUS-Fusionskonstrukt. In der *AtWRKY6* Promotorsequenz sind der Translationsstart (ATG), die mutmaßliche Transkriptionsstartstelle (+1), die sich aus dem längsten 5'-RACE-Klon ergibt, und daraus folgend mutmaßliche Bereiche der Transkriptionsiniation und der TATA-Box durch Unterstreichen hervorgehoben. Zusätzlich sind Sequenzbereiche mit Ähnlichkeiten zu bekannten *cis*-Elementen aus Promotoren anderer Gene (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>; Keller & Baumgartner, 1991; Zabaleta *et al.*, 1998; Rushton & Somssich, 1998) in einer Farbkodierung wie folgt gekennzeichnet: Amy-Box (violett), Antheren/Pollen-spezifisches Element (purpur), *as1*-Elemente (blau), G-Box (rot), GT1-Motiv (gelb), I-Box (orange), Myb-Motiv (grün), Seneszenz-spezifisches Element (hellgrün), SPBF-Bindestelle (rosa), W-Box (dunkelblau), Wurzel-spezifische Region (hellblau). Die in den Promotor-Deletionen verwendeten Konstrukte sind mit 6p2, 6p3, 6p4 und 6p5 vermerkt.

Solche Promotor-vermittelten Expressionen von Reportergenen wie GUS sind hoch empfindliche Systeme, die eine genaue zeitliche und räumliche Auflösung von Expressionsmustern zulassen (Jefferson *et al.*, 1987). Allerdings sind einige artifizielle Expressionen des Promotor-GUS-Systems beobachtet worden (Mascarenhas & Hamilton, 1992). Neben der Herstellung von Positiv- und Negativ-Kontrollpflanzen wurde daher in den nachfolgenden Charakterisierungen besonders auf eine Übereinstimmung mit den Daten der Northern-Analysen geachtet.

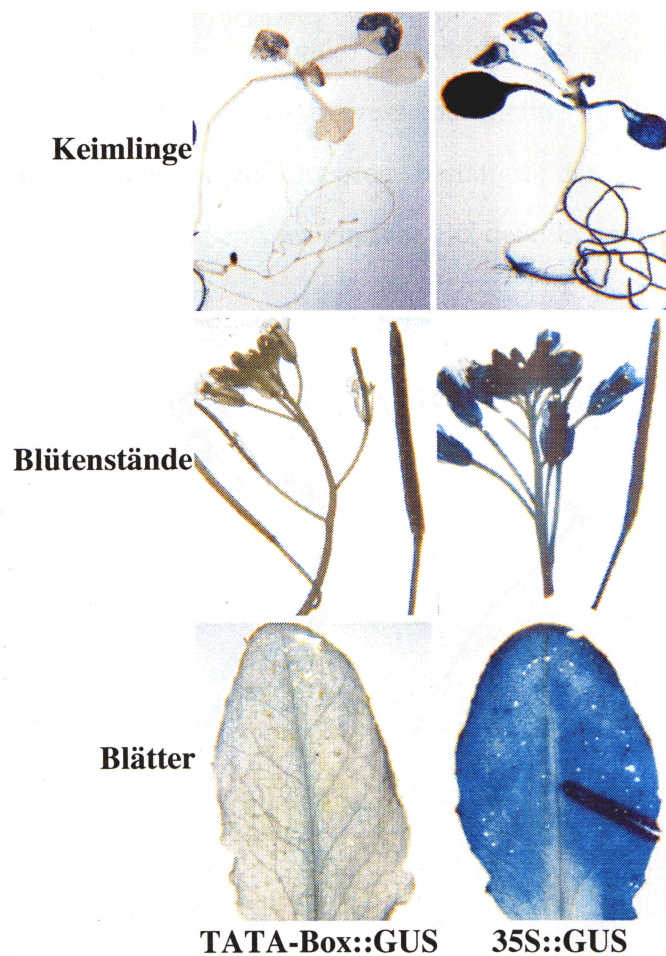
Mit dem *WRKY6* Promoter::*GUS*-Fusionskonstrukt (Abb.13), das in einen entsprechenden T-DNA-Vektor (Becker *et al.*, 1992) kloniert war, wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen über *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation gewonnen (Bechthold *et al.*, 1993). Nach einer Selektion über die Kanamycin-Resistenz, die der Vektor ebenfalls trägt, wurden zehn unabhängige Transformanden isoliert. Über genomische Southern-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich um unabhängige Integrationen der T-DNA handelt (Abb.14). Daneben wiesen die meisten Linien multiple, von drei bis maximal acht, Integrationen auf. Allerdings konnte auch eine Linie (6) mit einer Einzel-Integration identifiziert werden.



**Abb.14:** Genomische Southern-Analysen der Primärtransformanden 1 bis 10 mit dem *AtWRKY6* Promoter::*GUS*-Fusionskonstrukt. Für die Restriktionsverdauung mit *Hind*III, welches im Polylinker des T-DNA Plasmids schneidet und damit den Bereich des Reportergens *GUS* von dem Kanamycinresistenzgen *NPTII* teilt, wurden jeweils 0,5 bis 1 µg genomische DNA eingesetzt. Zum Kontrollvergleich wurde genomische DNA aus Wildtyppflanzen verwendet. Als Sonden wurden cDNA-Fragmente für **A** *GUS* sowie **B** *NPTII* eingesetzt.



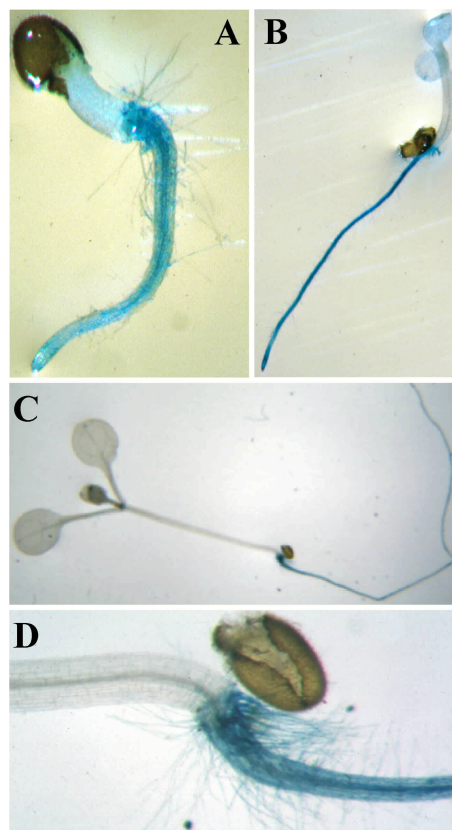
Die *WRKY6* Promotor-Aktivität wurde durch Infiltrationen der transgenen Pflanzen mit dem entsprechenden Substrat für den GUS-Reporter verfolgt. Als positive und negative Kontrollen wurden zusätzlich transgene Pflanzen hergestellt, die den Reporter zum einen durch den 35S-Promoter ektopisch und konstitutiv exprimieren und zum anderen durch keinen Promotor, bis auf eine isolierte TATA-Box, treiben. Anhand von Infiltrationen der Positiv-Kontrollpflanzen wurde die Zugänglichkeit des GUS-Substrates in den verschiedenen Geweben beurteilt. Die Negativ-Kontrollpflanzen nutzten der Analyse der Hintergrund-Expression, die durch den Reporter alleine verursacht wurde.



**Abb.15:** Expression des GUS-Reporters in Kontrollpflanzen. Die Negativ-Kontrollpflanzen beinhalten einen bis auf eine einzelne TATA-Box durch keinen Promotor getriebenen GUS-Reporter. Die Positiv-Kontrollpflanzen tragen einen durch den *CaMV35S*-Promoter getriebenen GUS-Reporter. Die Keimlinge wurden 2 Wochen auf selektivem MS-Medium im Kurztag (KT), danach bis zu adulten Pflanzen in Erde unter Gewächshausbedingungen angezogen. Die Keimlinge sowie verschiedene Gewebe der adulten Pflanzen wurden dann einer GUS-Färbung unterzogen.

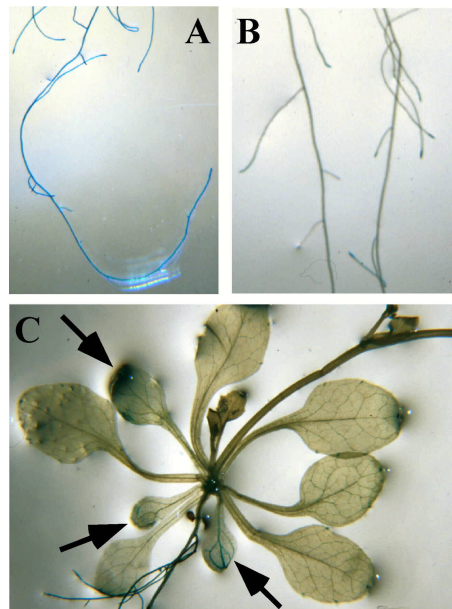
Bei den Positiv-Kontrollpflanzen wurde anhand der starken Blaufärbung in allen Geweben, mit der Einschränkung von Hypokotyl- und Sproßgeweben, eine konstitutive ektopische Expression des GUS-Reportergens zusammen mit einer guten Zugänglichkeit des GUS-Substrates festgestellt. Eine schwache Hintergrund-Expression in den Negativ-Kontrollpflanzen wurde nur in den Mittelrippen der Blätter sichtbar. Eine stärkere Expression zeigte sich hier ausschließlich in den Hydathoden der Keimlinge (Abb.15).

Die *WRKY6* Promotor-Reporter-Studien wurden zunächst an allen zehn Linien in der  $F_1$ -Generation durchgeführt. Mit Ausnahme einer einzelnen Linie, welche eher eine konstitutive GUS-Expression zeigte, ergab sich bei allen anderen Linien ein einheitliches Bild bezüglich des Expressionsmusters. Bei nachfolgenden Analysen in der  $F_2$ -Generation wurden dann nur transgene Pflanzen der Linien 3, 5, und 7 in Betracht gezogen, da sie alle als representative Vertreter zur Analyse des *WRKY6* Expressionsverhaltens betrachtet werden konnten. Die *WRKY6* vermittelte Reporterexpression bestätigte die Ergebnisse aus den Northern-Analysen (Abb.7, s. S.49) und entwarf ein sehr viel detaillierteres Muster.



**Abb.16:** *AtWRKY6* Promoter-vermittelte GUS-Expression in Keimlingen. Die  $6p::GUS$  Keimlinge wurden **A** nach 2 Tagen, **B** 4 Tagen und **C** 2 Wochen (**D** Ausschnittsvergrößerung von C) Wachstum auf MS-Medium im Langtag (LT) einer GUS-Färbung unterzogen.

In Keimlingen war eine äusserst starke GUS-Expression im gesamten Bereich der Wurzel vorhanden (Abb.16). Schon in jungen, 2-Tage alten Keimlingen war eine hohe GUS-Expression in der Wurzel sichtbar. Sie betraf offensichtlich alle Zelltypen der Wurzel inklusive der Wurzelhaare. Auch in älteren Keimlingen blieb dieses Bild erhalten. Hier zeigte sich aber noch, dass in grünen vegetativen Geweben wie dem Hypokotyl, den Kotyledonen und den Primärblättern keine GUS-Akkumulation zu detektieren war. Hervorzuheben war dabei die scharfe und deutliche Grenze zwischen starker Expression in der Wurzel und keiner im Hypokotyl. Dies war auch über die weitere Entwicklung bis hin zu Schoten-tragenden 4-Wochen alten Pflanzen zu beobachten (Abb.17). Dabei handelte es sich um eine endogen regulierte Wurzel-spezifische Expression, da Licht und Verwundung als mutmaßliche Induktionsquellen ausgeschlossen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

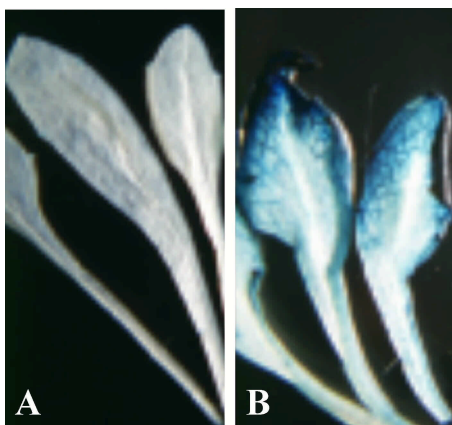


**Abb.17:** *AtWRKY6* Promoter-vermittelte GUS-Expression in adulten Pflanzen. Die 6p::GUS Pflanzen wurden nach 4 Wochen Wachstum auf MS-Medium im LT einer GUS-Färbung unterzogen. Anschließend wurde ein Ansatz **A** mit Wurzeln wie gewöhnlich über Nacht bei 37°C inkubiert und **B** ein anderer sofort nach der Infiltration entfärbt. **C** Bei der wie in A behandelten Rosette adulter Pflanzen sind die GUS-Expressionen in seneszenten Blättern durch Pfeile gekennzeichnet.

Bei den Wurzeln voll entwickelter Pflanzen zeigte sich eine deutliche GUS-Expression über alle Entwicklungszonen verteilt (Abb.17A). Auch in den Sekundärwurzeln war eine hohe GUS-Expression zu beobachten. Allerdings war das Bild hier bezüglich der Wurzelspitzen nicht ganz einheitlich. In einigen Fällen war eine GUS-Expression nicht vorhanden. Durch eine Substrat-Infiltration ohne anschließende Inkubation wurde die starke Promoter-Aktivität in

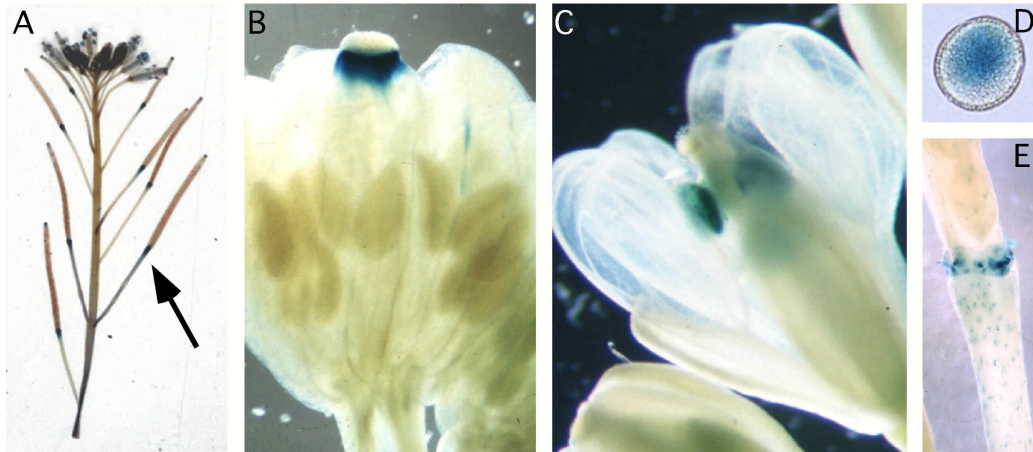
Wurzeln deutlich, denn selbst unter diesen Bedingungen war eine GUS-Expression schon erkennbar (Abb.17B). Sie liegt dabei im Bereich der Wurzelhaarzone.

In den vegetativen grünen Geweben der adulten Pflanzen war keine Promotor-Aktivität bemerkbar. In einigen Fällen wurde aber eine an der Schnittstelle starke und lokal begrenzte GUS-Färbung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies deutete auf eine Responsivität des Promotors bei Verwundung des Blattes, was schon aus den Northern-Analysen bekannt war (Abb.12). An den Rosettenblättern fiel weiterhin eine verstärkte GUS-Expression in den älteren Blättern auf. Der Promotor von *WRKY6* war demnach in seneszenten Blättern aktiv (Abb.17C). Die *WRKY6* Expression folgte dabei sowohl dem Seneszenzverlauf von der Blattspitze bis zum Blattgrund, als auch der sequentiellen Seneszenz der Rosettenblätter (Blecker & Patterson, 1997).



**Abb.18:** A/*WRKY6* Promotor-vermittelte GUS-Expression bei Dunkelheit. Die  $6p::GUS$  Keimlinge wurden 3 Wochen **A** im LT und **B** im Dunkeln in Flüssigkultur gehalten und dann einer GUS-Färbung unterzogen.

Da die *WRKY6* Expression in alten Blättern ebenfalls bei unter sterilen Bedingungen angezogenen Pflanzen gefunden wurde, war eine mögliche Pathogen-Induktion auszuklammern und damit auf eine Seneszenz-spezifische Expression zu schliessen. Darüber hinaus war sie auch bei einer Dunkel-induzierten Seneszenz (Becker & Apel, 1993; Oh *et al.*, 1996) vorhanden (Abb.18B). Bei den in Dunkelheit gehaltenen Keimlingen war weiterhin eine starke Färbung der Wurzeln vorhanden, d.h. die Expression war hier nicht durch Licht beeinflusst. Darüberhinaus war auch eine GUS-Expression im Hauptleitgewebe des Hypokotyls zu sehen (Daten nicht gezeigt). Eine hohe *WRKY6* Promotor-Aktivität trat aber noch in anderen seneszenten Geweben wie den reproduktiven Organen auf.



**Abb.19:** *AtWRKY6* Promotor-vermittelte GUS-Expression in reproduktiven Organen. Die Anzucht der 6p::*GUS* Pflanzen erfolgte hier in Erde unter Gewächshausbedingungen. **A** Komplette Blütenstände wurden einer GUS-Färbung unterzogen, **B** junge Blüte, **C** ältere Blüte, **D** Pollen und **E** Übergang zwischen Stiel und Schote, der in **A** mit einem Pfeil gekennzeichnet ist.

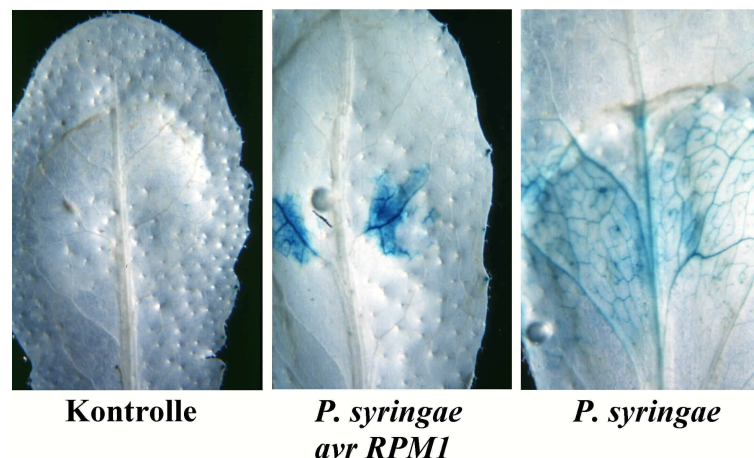
In den Blüten war in jüngeren Stadien eine GUS-Expression im Stigma zu beobachten (Abb.19B). In älteren Entwicklungsstadien war sie dagegen in den Antheren vorhanden (Abb.19C). Die Expression in den Antheren war wahrscheinlich durch eine entsprechende GUS-Akkumulation in den Pollen bedingt (Abb.19D). Da eine solche Expression unter anderem als artifizielle Expression des Promotor-GUS-Reportersystems beschrieben ist (Mascarenhas & Hamilton, 1992), konnte eine *WRKY6* Expression in Pollen nicht vorbehaltlos als Ergebnis festgehalten werden. Dafür sprach, dass in den Northern-Analysen eine starke Expression von *WRKY6* in Blüten detektiert wurde (Abb.7, s. S.49), bei denen allerdings keine Trennung von jünger und älter entwickelten Blüten vorgenommen wurde. Hinzu kam noch, dass in den Negativ-Kontrollpflanzen keine Expression in Pollen beobachtet wurde (Abb.15).

Zusätzlich zu dem Expressionsmuster direkt die reproduktiven Organe betreffend war eine GUS-Expression an den jeweiligen Enden der Schoten zu bemerken. Besonders auffällig war die Expression im Bereich des Übergangs zwischen Stiel und Schote (Abb.19A und E). Die GUS-Expression war dabei in den kollabierten Nektarien in der Abscissionszone der Blütenorgane lokalisiert (Fordham-Skelton *et al.*, 1997). Aufgrund dieser räumlich sehr begrenzten Expression konnte in den Northern-Analysen keine *WRKY6* Transkript-Akkumulation festgestellt werden (Abb.7, s. S.49).

Die transgenen Pflanzen mit der *WRKY6* Promotor::*GUS*-Fusion wurden nicht nur hinsichtlich ihrer Gewebe- und Entwicklungs-spezifischen, sondern auch auf eine induzierbare Expression



untersucht. Viele Seneszenz-assoziierte Gene sind ebenfalls in Prozessen der pflanzlichen Pathogenabwehr involviert (Walter *et al.*, 1996; Hanfrey *et al.*, 1996; Lers *et al.*, 1998; Quirino *et al.*, 1999). Da WRKY-Faktoren schon als mögliche Signalüberträger in der pflanzlichen Pathogenabwehr beschrieben sind (Rushton *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Eulgem *et al.*, 1999; Cormack *et al.*, eingereicht), wurde die *WRKY6* Promotor-Aktivität nach Behandlungen mit einem bakteriellen Pathogen sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion anhand der GUS-Expression verfolgt.

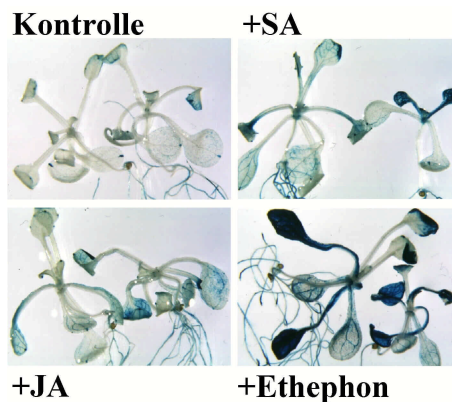


**Abb.20:** *AtWRKY6* Promotor-vermittelte GUS-Expression nach Infiltrationen mit *Pseudomonas syringae*. Voll entwickelte grüne Blätter im KT gezogener 6p::GUS Pflanzen wurden mit MgCl<sub>2</sub> (Kontrolle), mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ohne *avrRPM1* (kompatible Interaktion) und mit *avrRPM1* (inkompatible Interaktion) einer OD=0,2 inokuliert und nach 6 h einer GUS-Färbung unterzogen.

Bei Inokulationen mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* war im Falle der inkompatiblen Interaktion eine starke, aber lokal auf die Infiltrationsstelle begrenzte GUS-Expression zu beobachten (Abb.20). In einer Kinetik war dieses Signal frühestens nach vier Stunden sichtbar. In der kompatiblen Interaktion zeigte sich die GUS-Expression als weniger stark und sehr viel diffuser. Auch war das Signal frühestens nach sechs Stunden deutlich. Bei der Kontrolle war zu keinem untersuchten Zeitpunkt von 15 min bis 6 h eine GUS-Expression erkennbar. Damit übereinstimmend wurde ebenfalls eine erhöhte Promotor-Aktivität nach Behandlungen mit dem aus *Pseudomonas syringae* isolierten Elizitor Flagellin (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez *et al.*, 1999) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bei Infektionen mit dem Oomyceten *Peronospora parasitica* war dagegen keine deutliche GUS-Expression zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser durch ein bakterielles Pathogen bzw. Elizitor induzierten GUS-Expression wurde die *WRKY6* Promoter-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Pflanzenhormonen,

die bei Pathogenabwehrprozessen eine Rolle spielen (Dong, 1998), getestet. Sowohl bei Keimlingen (Abb.21) als auch bei abgeschnittenen Blättern (Daten nicht gezeigt) wurde in grünen vegetativen Geweben eine gesteigerte *WRKY6* Expression durch Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen festgestellt.



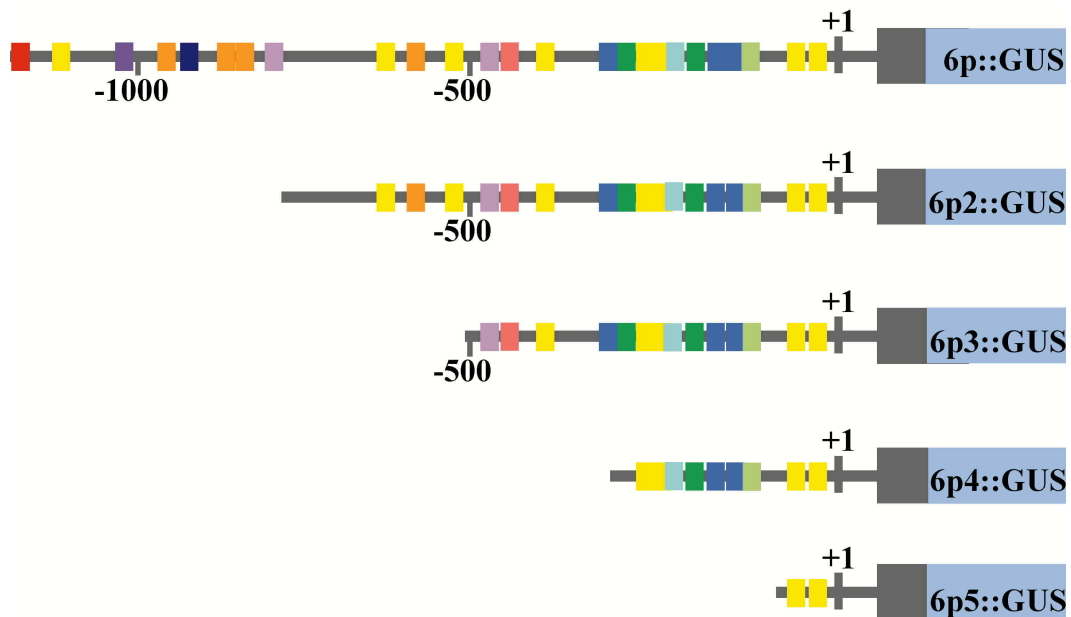
**Abb.21:** *AtWRKY6* Promoter-vermittelte GUS-Expression durch Induktion mit SA, JA und Ethylen. Die 6p::*GUS* Keimlinge wurden 2 Wochen auf MS-Medium im LT angezogen und dann ohne (Kontrolle) und mit 0,1 mM Lösungen der Pflanzenhormone SA (NaSA), JA (MeJA) und Ethylen (Ethephon) (alle in Ethanol vorgelöst) in 0,5 x MS-Medium inkubiert. Nach 24 h im LT wurden sie einer GUS-Färbung unterzogen.

Das komplexe Expressionsbild von *WRKY6* zeigt Gewebe-, Entwicklungs- und Stress-spezifische Komponenten. Dieses sind erste Hinweise auf die pflanzlichen Prozesse, in die *WRKY6* involviert ist. Als solche können Wurzel- und Blütenentwicklung, Blattseneszenz und Abwehrreaktionen bei Verwundung und Pathogenbefall betrachtet werden. Es scheint, als ob *WRKY6* an multifunktionellen Aufgaben im Lebenslauf einer Pflanze beteiligt ist.

### 3.2 Promotor-Deletionen

Der Promotor des *WRKY6* Gens vermittelt nicht nur unterschiedlichste Gewebespezifische und Entwicklungs-abhängige sondern auch Stress-abhängige Expressionen. Ob aber diese Multifunktionalität des *WRKY6* Promotors von einer gemeinsamen, einigen wenigen oder mehreren *cis*-regulatorischen Regionen bedingt ist, wurde anhand von Promotor-Deletionen, fusioniert an das *GUS*-Reportergen, untersucht (Abb.22). Innerhalb der *WRKY6* Promotorsequenz lassen sich Identitäten und Homologien zu bekannten *cis*-Elementen, die in Promotoren anderer Gene charakterisiert wurden, erkennen (Abb.13, s. S.61). Dazu zählen unter anderem Sequenzen sogenannter G-, W-, I- und Amy-Boxen, Myb- und GT1-Kernsequenzen sowie *as1*-Elemente, Antheren/Pollen-, Wurzel- und Seneszenz-spezifische

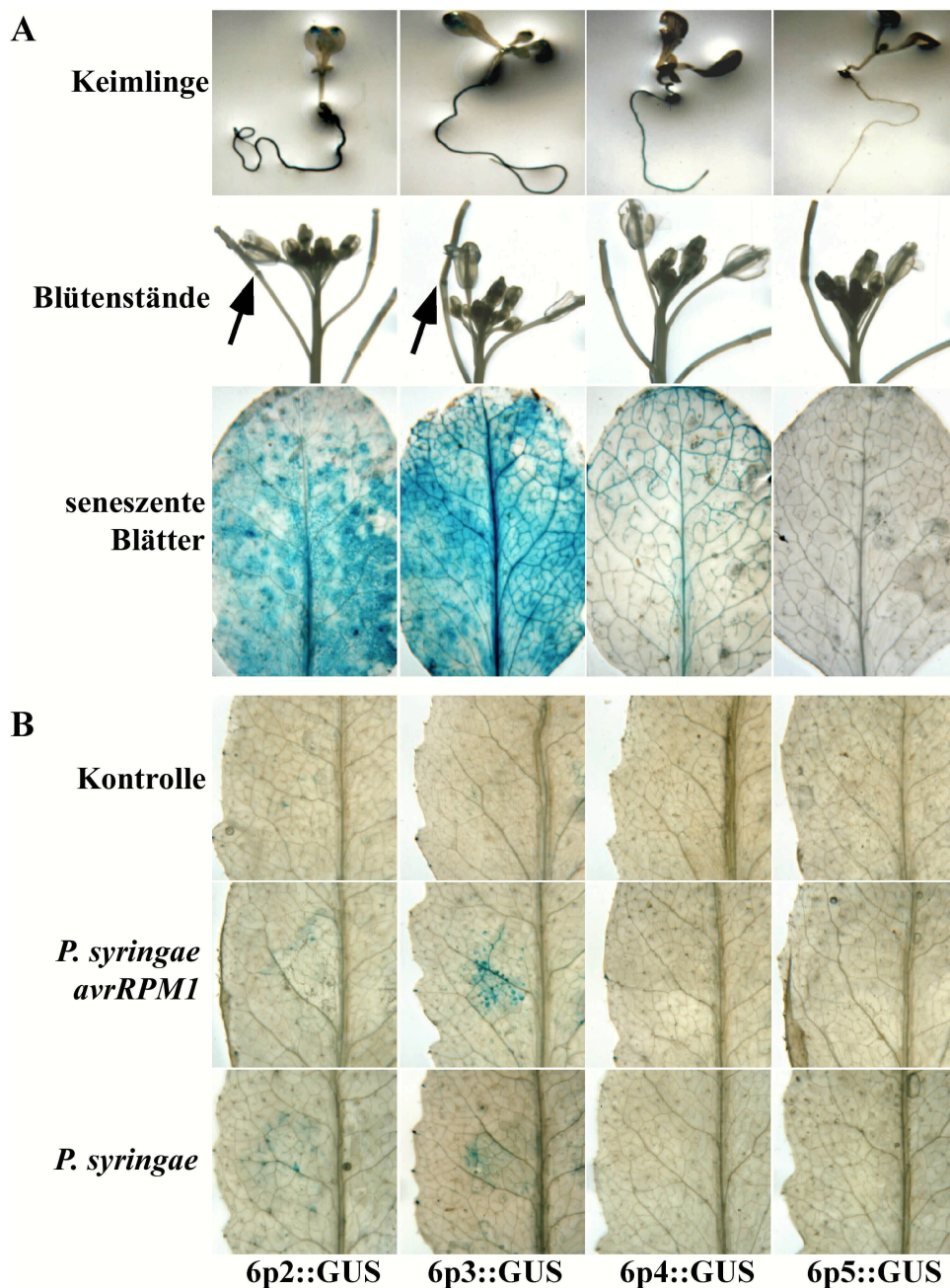
Motive. Besonders auffällig ist ein sogenannter ‘hot spot’ mehrerer mutmaßlicher funktioneller *cis*-Elemente, der sich zwischen -108 bp und -345 bp befindet.



**Abb.22:** Übersicht der *AtWRKY6* Promoter::GUS-Deletionen. Schematische Darstellung der relativen Promotorlängen inklusive einer Kennzeichnung von Regionen mit Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *cis*-Elementen aus anderen Promotoren (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>; Keller & Baumgartner, 1991; Zabaleta *et al.*, 1998; Rushton & Somssich, 1998) wie Amy-Box (violett), Antheren/Pollen-spezifisches Element (purpur), *as1*-Elemente (blau), G-Box (rot), GT1-Motive (gelb), I-Box (orange), Myb-Motive (grün), Seneszenz-spezifisches Element (hellgrün), SPBF-Bindestelle (rosa), W-Box (dunkelblau), Wurzel-spezifische Region (hellblau).

Die GUS-Fusionen der jeweiligen *WRKY6* Promotor-Deletionen wurden in einen geeigneten T-DNA-Vektor (Becker *et al.*, 1992) eingebracht. Über *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation (Clough & Brent, 1998) wurden nach einer Kanamycin-Selektion pro Promotor-Deletion neun unabhängige *Arabidopsis thaliana* Col-0 Transformanten isoliert. Noch liegen keine Southern-Analysen vor, dennoch wurde ein erster Überblick in die Expressionsmuster vorgenommen. Dazu wurden je drei Linien aller Promotor-Deletion::GUS Pflanzen besonders hinsichtlich mutmaßlicher Expressionen in Wurzeln, Blüten, seneszenten Blättern und in voll entwickelten grünen Blättern bei Pathogenbefall charakterisiert.





**Abb.23:** *AtWRKY6* Promotor-Aktivitäten der verschiedenen Deletionskonstrukte. Analysiert wurden jeweils Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generationen von 6p2::GUS und 6p3::GUS sowie die Primärtransformanten von 6p4::GUS und 6p5::GUS. Die Keimlinge wurden 2 Wochen auf Selektionsmedium und danach in Erde zunächst unter KT-, dann LT-Bedingungen angezogen. Dargestellt sind Entwicklungs- und Stress-bezogene Expressionsmuster: **A** Keimlinge, Blütenstände und seneszente Blätter nach erfolgter GUS-Färbereaktion sowie **B** voll entwickelte grüne Blätter, die mit MgCl<sub>2</sub> als Kontrolle und mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (OD=0,2) ohne *avrRPM1* und mit *avrRPM1* entsprechend kompatibler und inkompatibler Interaktion inokuliert und dann nach 6 h gefärbt wurden.

Die ersten vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass einzelne Expressionsmuster durch *cis*-Elemente in verschiedenen Promotorbereichen vermittelt werden. Die kürzeste Deletions-Version 6p5::GUS wies unter allen getesteten Geweben und Bedingungen, mit Ausnahme der Hydathoden, keine GUS-Expression auf (Abb.23), was mit den Negativ-Kontrollpflanzen

vergleichbar ist (Abb.15, s. S.63). Bei allen anderen Versionen waren unterschiedliche Expressionsmuster zu beobachten. Ihnen gemeinsam war eine starke Expression in der Wurzel (Abb.23A). Selbst bei der nur 110 bp längeren Version 6p4::GUS war sie ebenso wie in seneszenten Blättern deutlich zu beobachten. Allerdings war bei dieser Promotor-Deletion, obwohl sie einen grossen Bereich der zuvor als sogenannte 'hot spot'-Region von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *cis*-Elementen umfasst, keine Responsivität im unteren Bereich der Schoten oder nach Pathogenbefall festzustellen. Dies traf dagegen auf die 130 bp längere Version 6p3::GUS zu, die nun die gesamte 'hot spot'-Region beinhaltet. Gleiches galt auch für die Version 6p2::GUS. Jedoch zeigte keine der Promotor-Deletionen inklusive der längsten Version 6p2::GUS eine Expression in Blüten. Bezüglich der Pathogenresponsivität der längeren 6p2::GUS und 6p3::GUS Versionen sind die Resultate nur unter Vorbehalt festzuhalten, da sie zwei bzw. einen Sequenzunterschied im 5'-nicht-translatierten Bereich aufweisen. Im Gegensatz zur Voll-Längen-Version 6p::GUS (Abb.20, s. S.68) wurde bei 6p2::GUS und 6p3::GUS eine schwache Stimulation der Promotor-Aktivität schon bei den Kontrollbehandlungen beobachtet (Abb.23D). Dies könnte sich aber durchaus in dem Fehlen möglicher negativer *cis*-Elemente in diesen Deletionen begründen.

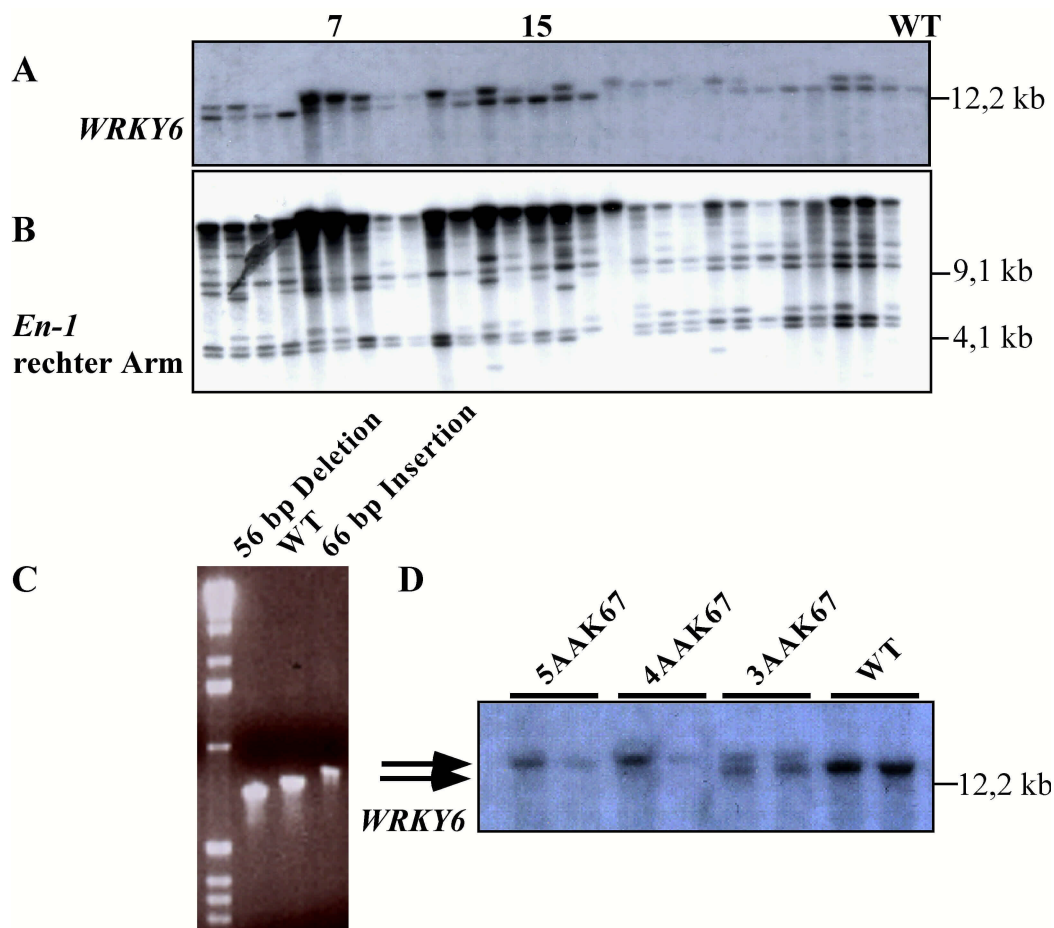
Nachdem sich die meisten Aspekte der *WRKY6* Promotor-Aktivität nur in bestimmten Promotor-Deletionen wiederfinden ließen, konnten einige Promotor-Regionen bezüglich ihrer Responsivität eingengt werden. So war der für die Expression in Wurzeln und seneszenten Blättern verantwortliche Bereich zwischen -108 bp und -218 bp, der für den unteren Bereich der Schoten und für die Pathogenresponsivität zwischen -218 bp und -345 bp und der für die Expression in Blüten zwischen -726 bp und -1188 bp lokalisiert. Allerdings könnte nicht nur eine Abhängigkeit von dem alleinigen Vorhandensein einer bestimmten Sequenz vorliegen. Durch das Fehlen einer einzelnen Sequenz könnte auch ein Zusammenspiel aus mehreren Sequenzbereichen betroffen sein. Aufgrund der Anordnung der potentiellen *cis*-Elemente in der 'hot spot'-Region zwischen -108 bp und -345 bp ist dies hinsichtlich der Pathogenresponsivität zu vermuten. Insgesamt war bisher festzuhalten, dass sich die Multifunktionalität des *WRKY6* Promotors nicht auf eine bestimmte Region begrenzte, sondern auf mehrere Promotor-Bereiche aufteilte. Die *WRKY6* Expression unterlag demnach je nach Gewebe und Stresssituation einer strengen transkriptionellen Kontrolle, die voraussichtlich über Interaktionen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren mit den verschiedenen Promotorbereichen erfolgte.

#### 4. *AtWRKY6* NULL-MUTANTEN

Die Analyse von Null-Mutanten ist ein wesentliches Element bei der funktionellen Charakterisierung von Genprodukten, gerade auch bei Transkriptionsfaktoren. Da durch das Fehlen eines Transkriptionsfaktors ein wichtiges Kontrollelement in der Regulation der Genexpression nicht vorhanden ist, kann es zu Misexpressionen von Genen führen. Dies kann sowohl primäre als auch sekundäre Zielgene betreffen. Darüber kann eine Störung einiger pflanzliche Prozesse stattfinden, die dann in entsprechenden mutanten Phänotypen resultieren (Sawa *et al.*, 1999). Da die meisten Transkriptionsfaktoren Vertreter von Genfamilien sind, müssen zum Teil überlappende Aufgabenbereiche in der transkriptionellen Regulation in Betracht gezogen werden, die dann zu weniger starken mutanten Phänotypen führen (Sessions & Yanofsky, 1999). Diese Tatsache wird auch auf Vertreter der WRKY-Multigenfamilie aus *Arabidopsis thaliana* zutreffen, obwohl sie ausserhalb der hoch konservierten WRKY-Domäne nur schwache Homologien untereinander aufweisen (Eulgem *et al.*, 2000).

Aus der *En-1* Insertionspopulation AMAZE (Wisman *et al.*, 1998) gelang mit der Identifizierung der Linie 6AAK<sub>67</sub> die Isolierung einer weiteren *WRKY* Null-Mutante (Abb.8, s. S.52). Diese *WRKY6* Null-Mutante stand dann im Mittelpunkt intensiver Studien, die einen Einblick in die Funktion von *WRKY6* gewähren sollten. Dazu diente einerseits die Charakterisierung eines mutmaßlichen mutanten Phänotyps. Andererseits war die Null-Mutante das Ausgangsobjekt für die Identifizierung möglicher Zielgene von *WRKY6*.

Zunächst wurde die Tochtergeneration der Linie 6AAK<sub>67</sub> hinsichtlich der Transposon-Insertion in das *WRKY6*-Gen untersucht. Aus den Sequenzen von PCR-Fragmenten, die mit den Primer-Kombinationen der zweiten 'screening'-Runde erhalten wurden, konnte die exakte Position der *En-1* Insertion ermittelt werden. Das *En-1* Element ist im vierten Exon des *WRKY6*-Gens inseriert (Abb.25, s. S.76). Ob es sich dabei nun um heterozygote oder homozygote Pflanzen handelte, wurde in Southern-Analysen zusammen mit der gesamten Anzahl an *En-1* Insertionen im Genom festgestellt.



**Abb.24:** **A** Genomische Southern-Analysen der *En-1* Insertion in das *AtWRKY6*-Gen und **B** Bestimmung der Anzahl von *En-1* Integrationen pro Pflanze. Je 0,5-1 µg genomische DNA der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration (1-29) sowie zum Vergleich *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp wurden in Restriktionsverdau mit *Xho*I, welches weder im Transposon *En-1* noch im *AtWRKY6* Gen schneidet, eingesetzt. Als Sonden wurden der zu *WRKY6* korrespondierende EST-Klon und ein PCR-Fragment des rechten *En-1* Arms verwendet. Die im weiteren verwendeten Linien 7 und 15 sind gekennzeichnet. **C** 'Footprints' im *AtWRKY6*-Gen der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration. Größenvergleich von PCR-Fragmenten zweier Pflanzen der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration (Linie 15 = 56 bp Deletion und Linie 3 = 66 bp Insertion) mit *Arabidopsis thaliana* Col-0, die die ursprüngliche *En-1* Insertionsstelle überspannen. Für die PCR wurden die Primer A6I und A6III verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein 2 % iges Agarosegel. **D** Genomische Southern-Analysen der Muttergenerationen 3, 4 und 5 der 6AAK<sub>67</sub>-Linie. Pro Muttergeneration (5AAK<sub>67</sub>, 4AAK<sub>67</sub> und 3AAK<sub>67</sub>) zusammen mit *Arabidopsis thaliana* Col-0 wurden 0,5-1 µg genomische DNA jeweils zweier Pflanzen mit dem Restriktionsenzym *Xho*I verdaut. Als Sonde wurde der entsprechende EST-Klon zu *WRKY6* eingesetzt.

Im Vergleich zu der 15 kb Bande des *WRKY6*-Gens in Wildtyppflanzen war bei einigen Pflanzen der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration ein grösseres Fragment zu erkennen (Abb.24A). Diese Verschiebung entsprach einer Größe von 8 kb, die durch die Insertion des *En-1* Elementes in das *WRKY6*-Gen verursacht wurde. Insgesamt war dieses die Haupt-Bande bei neun Pflanzen, die damit als homozygot für die *En-1* Insertion betrachtet wurden. Bei acht

Pflanzen war ausschliesslich die Wildtyp-Bande vorhanden, die daher homozygot für das *WRKY6*-Gen waren. Heterozygot für die *En-1* Insertion waren elf Pflanzen, da bei ihnen eine Doppel-Bande zu finden war. Diese Zahlen spiegelten jedoch nicht die Verhältnisse einer segregierenden Population von 1:2:1 wieder.

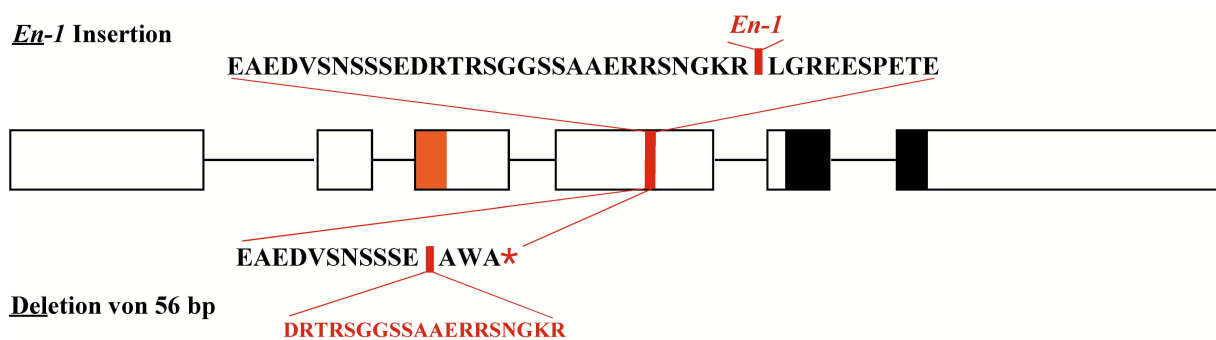
Da das *En-1* Element ein autonomes Transposon ist (Cardon *et al.*, 1993), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den Wildtyp-Banden um nachträgliche Excisionsereignisse des Transposons handelte. Dies wurde in allen Fällen anhand der Sequenzen von PCR-Fragmenten, die den Bereich der *En-1* Insertion überspannen, bestätigt. In allen waren Änderungen in der *WRKY6* Sequenz an der ursprünglichen Insertionsstelle des *En-1* Elementes zu finden (Daten nicht gezeigt). Bei der Excision hatte das *En-1* Transposon verschiedene ‘footprints’ hinterlassen, die von Deletionen und Insertionen einzelner Basen bis ganzer Regionen von rund 60 bp reichten (Abb.24C). Daraus folgte, dass zumindest schon eine frühere Generation der 6AAK<sub>67</sub>-Linie homozygot für die *En-1* Insertion im *WRKY6*-Gen war. Zusammen mit weiteren Muttergenerationen der 6AAK<sub>67</sub>-Linie konnte dies in Southern-Analysen bestätigt werden (Abb.24D). Die Muttergenerationen 5AAK<sub>67</sub> und 4AAK<sub>67</sub> waren jeweils schon homozygot, erst die Muttergeneration 3AAK<sub>67</sub> erwies sich als heterozygot für die *En-1* Insertion im *WRKY6*-Gen.

Die Excisions-Aktivität des *En-1* Elementes war auch bei homozygoten Pflanzen mit dominierenden *En-1* Insertions-Banden in das *WRKY6*-Gen anhand zusätzlich auftretender schwacher Wildtyp-Banden zu sehen (Abb.24A). Diese Wildtyp-Banden waren aber nicht vererbbar und rührten aus sogenannten somatischen Sektoren her, die einzelne Zellen bis ganze Teile von Geweben und Organen einnehmen. Neben der *En-1* Insertion im *WRKY6*-Gen besaßen die Pflanzen der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration noch durchschnittlich zehn weitere *En-1* Insertionen im Genom (Abb.24B). Zur Verringerung dieser Zahl unerwünschter Insertionen, die bei einer ausführlichen Charakterisierung möglicherweise stören könnten, wurden sogenannte Rückkreuzungen zu *Arabidopsis thaliana* Col-0 durchgeführt. Dazu wurden aus der 6AAK<sub>67</sub>-Tochtergeneration die Pflanzen 7 mit etwa zehn und 15 mit etwa acht *En-1* Insertionen im Genom verwendet. Bei 7 war die *En-1* Insertion im *WRKY6*-Gen homozygot, dagegen lag bei 15 ein ‘footprint’ vor.

#### 4.1 EN und DEL

Ausgehend von der 6AAK<sub>67</sub>-Linie wurden alle folgenden intensiven Analysen mit den *WRKY6* Null-Linien 7 und 15 durchgeführt (Abb.24, s. S.74). Bei der Linie 7 handelte es sich um eine homozygote Insertion des *En-1* Elementes in das vierte Exon des *WRKY6* Gens. Durch Sequenzierungen von PCR-Fragmenten, die aus Kombinationen von *En-1*- und *WRKY6*-Gen-spezifischen Primern gewonnen wurden, konnten sowohl die Orientierung des *En-1* Elementes als auch die exakte Insertionsstelle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das *En-1* Element ist in Bezug zum *WRKY6*-Gen 5'-3' orientiert und zwischen den Kodons für die Aminosäuren 263 und 264 inseriert (Abb.25).

Da das *En-1* Element ein autonomes Transposon ist, handelte es sich bei dieser Linie um eine instabile *WRKY6* Null-Linie, die daher im weiteren als EN-Linie bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu war die Linie 15 eine stabile *WRKY6* Null-Linie. Sequenzierungen von PCR-Fragmenten, die mit zwei der *En-1* Insertionsstelle flankierenden *WRKY6*-Gen-spezifischen Primern gewonnen wurden, ergaben, dass das Transposon nach seiner Excision einen 'footprint' hinterlassen hat (Abb.24C, s. S.74). An der ursprünglichen *En-1* Insertionsstelle lag eine Deletion von exakt 56 bp vor, die zu einem Verlust von 19 Kodons und einer Verschiebung des Leserahmens führten (Abb.25). Letzteres hatte dann nach drei Kodons ein Stopp-Kodon zur Folge und verhinderte somit eine vollständige Translation der *WRKY6* mRNA. Diese stabile *WRKY6* Null-Linie wird im folgenden mit DEL bezeichnet.

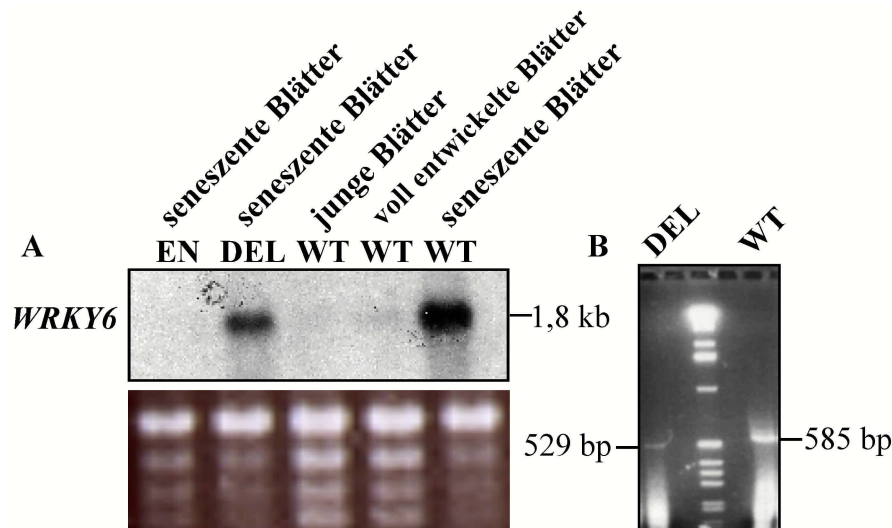


**Abb.25:** Schema der *AtWRKY6* Null-Linien EN und DEL. Das *WRKY6*-Gen ist in seiner Exon-Intron-Struktur zusammen mit einer Ausweisung der WRKY-Domäne (schwarz) und des Leucinzippers (orange) unter Angabe der Insertionsstelle des *En-1* Transposons in EN sowie der Deletion in DEL dargestellt. Intronbereiche sind durch Striche gekennzeichnet.

Eine nun folgende eingehende Charakterisierung der *WRKY6* Null-Linien EN und DEL betraf die Bestimmung von möglichen *WRKY6* Transkripten. In Northern-Analysen mit seneszenten



Blattgeweben, bei denen in Wildtyppflanzen hohe Transkriptmengen vorliegen (Abb.7, s. S.49), wurde eine mögliche Akkumulation *WRKY6* mRNA in den Linien EN und DEL untersucht.



**Abb.26: A** *AtWRKY6* Expression in seneszenten Blättern der Linien EN und DEL. Pro Spur wurden je 10  $\mu$ g Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern von Pflanzen der Linien EN und DEL, die im Gewächshaus angezogen wurden, zusammen mit je 10  $\mu$ g Gesamt-RNA aus jungen, voll entwickelten grünen und seneszenten Blättern von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyppflanzen aufgetragen. Als Sonde wurde der zu *WRKY6* korrespondierende EST-Klon verwendet. Zur Ladungskontrolle wurde die Ethidiumbromid-Färbung des Gels genutzt. **B** Größenbestimmung von RT-PCR-Fragmenten der DEL-Linie im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* Col-0. Für die RT-PCR-Reaktionen wurden Gesamt-RNA Präparationen aus jeweils seneszenten Blättern der DEL- und der Wildtyppflanzen in einer Primerkombination von A6I und A6III verwendet. Die Fragmente wurden zusammen mit der 1 kb-Leiter über ein 2 % iges Agarosegel aufgetrennt.

Durch die Insertion des etwa 8 kb grossen *En-1* Transposons war bei der EN-Linie offensichtlich keine vollständige Transkription des *WRKY6*-Gens möglich. Bei der EN-Linie war keine *WRKY6* mRNA Akkumulation festzustellen (Abb.26A), und selbst nach zehntägiger Exposition war immer noch kein *WRKY6* Transkript zu detektieren. Dies kann zusätzlich als Beweis gesehen werden, dass es unter den angewendeten Hybridisierungsbedingungen nicht zu sogenannten Kreuzreaktionen kam und mögliche zu *WRKY6* Sequenz-ähnliche Transkripte fälschlicher Weise aufleuchten.

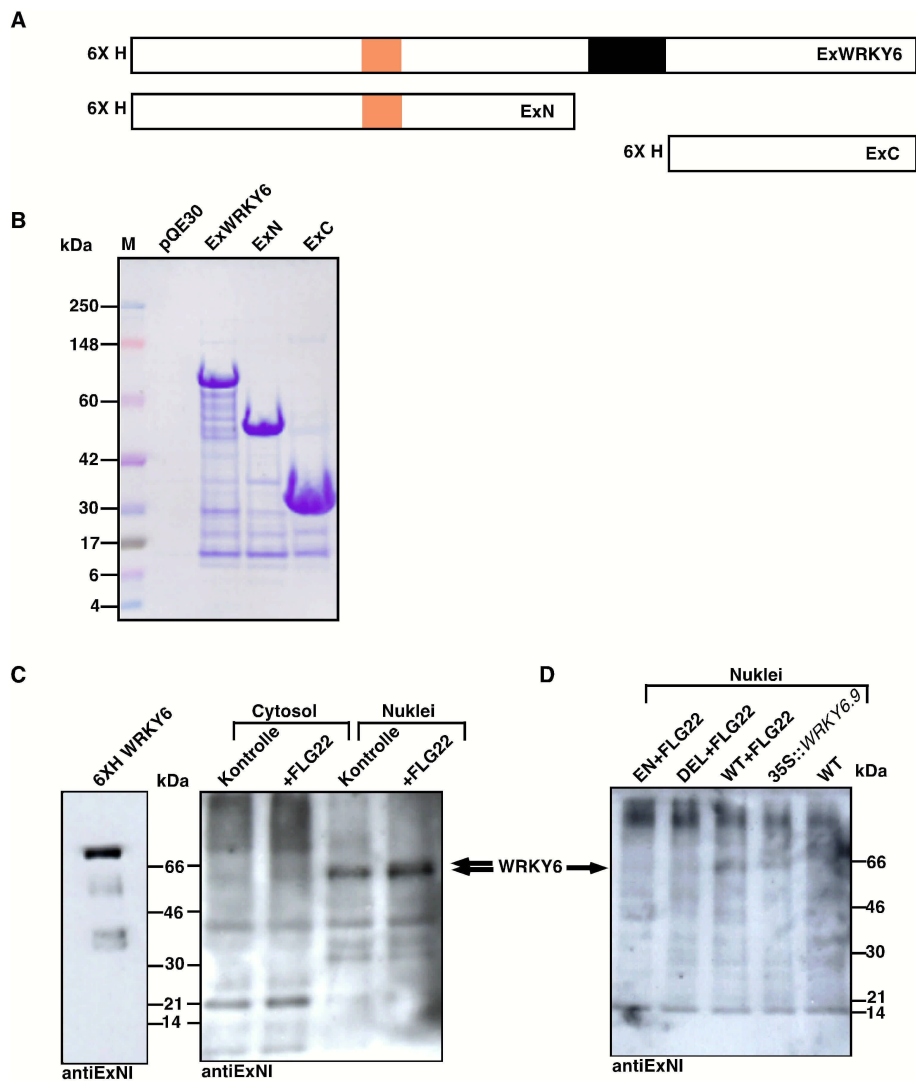
Dagegen zeigte sich, dass die Transkription sowie Akkumulation bei der DEL-Linie nicht durch die Verschiebung des Leserahmens beeinflusst war. Es war eine deutliche *WRKY6* mRNA Akkumulation zu erkennen, die die entsprechende Größe des Wildtyp-Transkripts aufwies (Abb.26A). Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer Prüfung, ob es sich bei dem 'footprint' nun um ein homozygoten oder aber um ein somatisches Ereignis handelte. Anhand

von RT-PCR-Fragmenten, die mit der Deletion flankierenden *WRKY6*-Gen-spezifischen Primern gewonnen wurden, wurde dieser Frage nachgegangen. Eine Größenbestimmung der RT-PCR-Fragmente zeigte ein eindeutig kleineres Fragment von etwa 50 bp bei DEL-Pflanzen im Vergleich zu der Bande bei Wildtyppflanzen (Abb.26B). Direkte Sequenzierungen lieferten einheitliche Resultate und ergaben, dass die RT-PCR-Fragmente aus den DEL-Pflanzen den zuvor beschriebenen 'footprint' der 56 bp Deletion tragen (Daten nicht gezeigt). Diese Sequenzergebnisse ließen den Schluss zu, dass bei der DEL-Linie keinesfalls ein somatisches Ereignis, sondern tatsächlich ein homozygoter 'footprint' vorlag.

Eine weitere Charakterisierung gerade dieser Linie war hinsichtlich einer möglichen Translation des *WRKY6* DEL-Transkripts von grosser Bedeutung, da es sich hier um eine stabile Null-Mutante handelte. Die Deletion verursachte eine Verschiebung des Leserahmens, der dann nach drei Aminosäuren in einem Stoppkodon endet (Abb.25, s. S.76). Dies hat zur Folge, dass bei der Translation eine verkürzte Version des *WRKY6*-Proteins entsteht. Dieses N-terminale Teilprotein von *WRKY6* trägt zwar noch einige funktionelle Domänen wie den Leucinzipper und potentielle Transkriptionsregulationsdomänen. Ihm fehlt aber sowohl die *WRKY*-Domäne als DNA-Binde-Domäne als auch die Region der NLS-Funktion. Dennoch könnte dieses Protein über mögliche Dimerisierungen mit anderen Faktoren auf verschiedenste pflanzliche Prozesse einwirken. Ob es aber tatsächlich zu einer Akkumulation dieses Proteins kommt, sollte in Western-Analysen geprüft werden.

Für eine Generierung von *WRKY6*-spezifischen Antikörpern wurden drei verschiedene Versionen des *WRKY6*-Proteins zu Immunisierungen verwendet. Einerseits wurden das Wildtyp-*WRKY6*-Protein und andererseits eine N-terminale aus 296 Aminosäuren (M1 bis R296, 34 kDa) und eine C-terminale aus 153 Aminosäuren (M394 bis G546, 16 kDa), jeweils ohne *WRKY*-Domäne, bestehende Kurz-Version (Abb.27A) als rekombinante His-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert und anschliessend gereinigt (Abb.27B). Die Kurz-Versionen wurden zusätzlich gewählt, um eine mögliche Kreuzreaktivität der späteren Antikörper bezüglich der *WRKY*-Domäne zu unterbinden und somit eine erhöhte Spezifität zu bewirken.





**Abb.27:** Heterologe Expression dreier Versionen des *AtWRKY6* Proteins. **A** Schematische Darstellung der Expressionsproteine ExWRKY6, ExN und ExC mit N-terminalen 6xHis-Fusionen. Gekennzeichnet sind der Leucinzipper (orange) und die WRKY-Domäne (schwarz). **B** Die Fusionsproteine wurden zusammen mit einer Vektorkontrolle (pQE30) heterolog in *E. coli* exprimiert. Je 18  $\mu$ l der jeweiligen Eluate 1 nach der Reinigung über Ni-Agarose unter denaturierenden Bedingungen wurden in einem SDS-Gradientengel aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. **C** Western-Analysen mit dem Antiserum gegen ExN. Der Antikörper antiExN1 (Kaninchen N68) wurde sowohl mit 0,5  $\mu$ g gereinigtem *AtWRKY6* His-Fusionsprotein (rechts) als auch mit 10  $\mu$ g cytosolischen Extrakten und Kernextrakten unbehandelter (Kontrolle) und 8 h mit Flagellin behandelter (+Flg22) *Arabidopsis*-Zellkultur (links) getestet. **D** Analyse der WRKY6-Proteingehalte in den *AtWRKY6* Null-Mutanten EN und DEL mit dem Antikörper antiExN1. Je 10  $\mu$ g Kernextrakte aus Keimlingen, die 2 Wochen in Flüssigkultur gezogen wurden, wurden aufgetragen. Die Keimlinge der EN- und DEL-Mutanten zusammen mit *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp wurden 8 h mit dem Elizitor Flagellin inkubiert (+Flg22). Als Vergleich wurden Kernextrakte aus Keimlingen unbehandelten Wildtyps und der F<sub>1</sub>-Generation der 35S::*WRKY6* Linie 9 verwendet.

Die Höhe der Hauptbanden der gereinigten Eluate korrelierten jeweils mit den errechneten Größen der Fusionsproteine (Abb.27B). Trotz Reinigung enthielten die Eluate auch noch andere Proteine. Da in der Kontrolle keine Proteine aufgereinigt wurden, handelte es sich

wahrscheinlich um mit den Fusionsproteinen interagierenden bakterielle Proteine. Zur Immunisierung wurden daher die nachträglich aus den jeweils ausgeschnittenen Hauptbanden eluierten Proteine verwendet. Pro Fusionsprotein wurden je zwei verschiedene Antiseren gewonnen. Alle Antiseren der jeweils dritten Blutung wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu Erkennung des WRKY6-Proteins getestet.

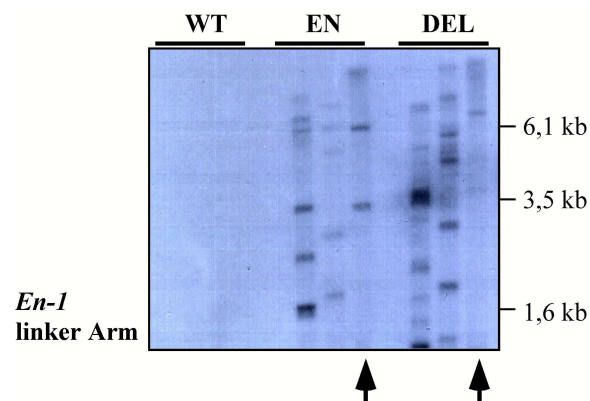
In Western-Analysen mit Gesamt-Zellextrakten der *Arabidopsis*-Zellkultur zeigte sich bei allen Prä-Immunsereen keine wesentliche Detektion pflanzlicher Proteine (Daten nicht gezeigt). Darüberhinaus waren alle Antiseren in der Lage, rekombinantes WRKY6 His-Fusionsprotein sowohl in bakteriellen Rohextrakten als auch in gereinigter Form zu erkennen (Daten nicht gezeigt). In Gesamt-Zellextrakten der *Arabidopsis*-Zellkultur konnte jedoch keine Hauptbande mit einer zu WRKY6 entsprechenden Grösse detektiert werden. Da WRKY6 aber ein Kern-lokalisiertes Protein ist (Abb.10, s. S.56), wurden im weiteren cytosolische Extrakte und Kernextrakte getrennt voneinander betrachtet. Diese Extrakte wurden aus unbehandelter und mit dem bakteriellen Elizitor Flagellin behandelter *Arabidopsis*-Zellkultur gewonnen. Diese sollten nun einen hohen Gehalt an WRKY6-Protein tragen, da die *WRKY6* Expression durch die Wurzel-ähnliche Charakteristik der Zellkultur und besonders durch den Elizitor stimuliert wurde. In diesen Western-Analysen stellte sich heraus, dass eines der Antiseren gegen die N-terminale Kurz-Version ExN für eine WRKY6 Detektion geeignet war.

Der Antikörper antiExNI detektierte in den Kernextrakten der *Arabidopsis*-Zellkultur eine eindeutige Hauptbande, deren Höhe von knapp unter 66 kDa dem errechneten Molekulargewicht für WRKY6 von 64 kDa entspricht (Abb.27C). Ein Vergleich mit der Bande des rekombinanten Proteins zeigte zwar, dass diese deutlich über 66 kDa lag, sich aber durch die His-Fusion erklärte. In den cytosolischen Extrakten war kein Hauptsignal dieser Grösse zu erkennen. Bei den Kernextrakten aus der mit Elizitor behandelten *Arabidopsis*-Zellkultur war im Vergleich mit der unbehandelten Zellkultur neben einer stärkeren Hauptbande auch eine neu auftretende minimal grössere Bande vorhanden. Dies könnte als Hinweis auf eine post-translationale Modifikation z.B. Phosphorylierung gelten. Ein entsprechendes Muster, allerdings in schlechterer Qualität, wurde auch unter Verwendung der Antikörper antiExNII, antiExWK6I und antiExWK6II beobachtet. Mit den Antikörpern antiExCI und antiExCII konnte dagegen keine deutliche mit dem Molekulargewicht von WRKY6 korrelierende Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die EN- und DEL-Mutanten wurden nun in Western-Analysen mit dem Antikörper antiExNI hinsichtlich ihres WRKY6-Proteingehalts untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit Elizitor behandelte Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*. Bei Kernextrakten der elizitierten Keimlinge wurde eine Bande von etwa 66 kDa deutlich, die bei unbehandelten Keimlingen

fehlte (Abb.27D). Diese Bande war auch bei den Kernextrakten der mit Elizitor behandelten Keimlingen der EN- und DEL-Mutanten abwesend. Allerdings war sie bei den *WRKY6* ektopisch überexprimierenden Keimlingen der Linie 35S::*WRKY6.9* auch ohne Elizitor-Behandlung zu erkennen. Trotz des zuvor als geeignet getesteten Antikörpers antiExNI war die Qualität der Western-Analyse gering. Immerhin ist dennoch die Schlussfolgerung zulässig, dass in beiden *WRKY6* Null-Mutanten EN und DEL selbst unter stimulierenden Bedingungen für die *WRKY6* Expression keine Akkumulation des *WRKY6*-Proteins erfolgte. Allerdings ist für die DEL-Mutante keine Aussage bezüglich der evtl. vorhandenen verkürzten Form des *WRKY6*-Proteins möglich.

Insgesamt konnten die Linien EN und DEL als sogenannte echte *WRKY6* Null-Mutanten betrachtet werden. Bei der EN-Mutante war weder ein *WRKY6*-Transkript noch *WRKY6*-Protein zu detektieren. Trotzdem könnte dies in einigen begrenzten Regionen von somatischen Sektoren der Fall sein, da es sich hier um einen instabilen ‘knock-out’ handelte. Die stabile *WRKY6* Null-Linie DEL zeigte zwar eine Transkript-, aber keine *WRKY6*-Proteinakkumulation.



**Abb.28:** Genomische Southern-Analysen zur Bestimmung der *En-1* Anzahl in den *AtWRKY6* Null-Mutanten EN und DEL nach erfolgten Rückkreuzungen. Pro Spur waren je 0,5 bis 1 µg genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyppflanzen sowie der EN- und DEL-Mutanten nach Restriktionsverdau mit *EcoRV* (links), *SacI* (mitte) und *XhoI* (rechts) aufgetragen. Als Sonde wurde ein PCR-Fragment des linken *En-1* Arms verwendet.

Im Laufe der Arbeit wurden beide Linien zu Rückkreuzungen mit *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyppflanzen verwendet. Dies diente vor allem einer Verringerung der Kopienzahl des *En-1* Elementes. Damit sollte eine eindeutigere Korrelation eines mutanten Phänotyps zu dem *WRKY6* ‘knock-out’ ermöglicht sein. Beide Linien wurden insgesamt zweimal mit Wildtyppflanzen gekreuzt und dann wieder geselbstet. Der jeweilige mutante *WRKY6* Locus wurde anhand von Southern-Analysen und PCR-Fragmenten verfolgt (Daten nicht gezeigt).

Die Zahl der *En-1* Elemente in den EN- und DEL-Mutanten konnte so auf drei bzw. vier verringert werden (Abb.28).

In ausführlichen phänotypischen Charakterisierungen der EN- und DEL-Mutante war kein offensichtlicher Effekt in Wachstums- und Entwicklungsprozessen sichtbar. Ein besonderer Augenmerk lag dabei auf Gewebe wie reproduktive Organe und Wurzeln sowie Entwicklungsstadien wie Blattalterung, da dies Orte einer hohen *WRKY6* Expression sind (Abb.7, s. S.49). Es zeigte sich weder dort noch in Stresssituationen nach Pathogenbefall ein mutanter Phänotyp. Als einziger mutmaßlicher mutanter Phänotyp fiel eine schwache Veränderung in der Wurzelentwicklung auf. Dieser nicht sehr eindeutige mutante Phänotyp bezog sich auf Unregelmässigkeiten in der Wurzelhaarentwicklung (Daten nicht gezeigt). Da es sich aber um einen äusserst schwer greifbaren und subtilen mutanten Phänotyp handelte, bedarf diese Beobachtung weitere Bestätigungen. Im weiteren wird dazu überwiegend die stabile DEL-Mutante herangezogen werden. Für folgende vergleichende Analysen stehen vier unabhängige Linien sogenannter Komplementationspflanzen zur Verfügung. Dies sind transgene Pflanzen mit dem DEL Null-Hintergrund, die *WRKY6* ektopisch überexprimieren. Erste Resultate dieser Pflanzen zeigten, dass wenigstens zwei der vier 35S::*WRKY6* DEL-Linien dem Habitus der 35S::*WRKY6* Linien entsprachen (Abb.35, s. S.97).

Da bisher kein eindeutiger mutanter Phänotyp der *WRKY6* Null-Mutanten aufgedeckt wurde, konnten auf diesem Wege keine genaue Erkenntnisse zur Funktion von *WRKY6* gewonnen werden.

## 4.2 RFDD zur Isolierung von Zielgenen

Trotz Abwesenheit eines offensichtlichen mutanten Phänotyps bei EN und DEL könnten dennoch veränderte Genexpressionen vorliegen. Dies könnte einerseits zur Charakterisierung eines molekularen Phänotyps verwendet werden, andererseits aber auch der Identifikation mutmaßlicher Zielgene von *WRKY6* dienen. Als Zielgene sollten zunächst alle Gene zusammengefasst werden, deren Expression in den EN- und DEL-Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen verändert war. Dabei erfolgte keine Klassifizierung in primäre, sekundäre oder nur entfernt beeinflusste Zielgene.

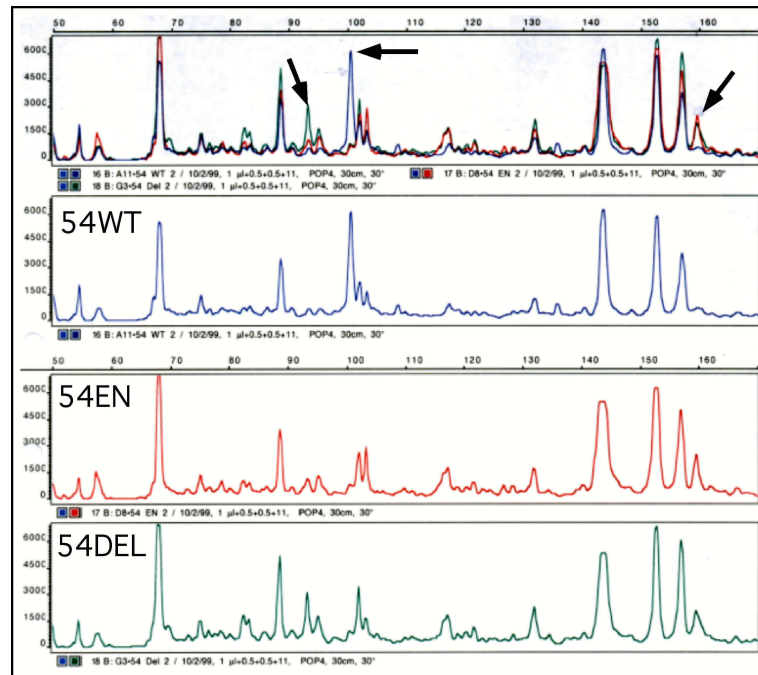
Zur Analyse von kompletten Expressionsprofilen stehen gerade in *Arabidopsis thaliana* neben dem herkömmlichen Gel-basierenden 'differential display' auch neuere DNA Nylon-Filter oder 'microarray' Techniken zur Verfügung (Liang & Pardee, 1992; Ruan *et al.*, 1998). Jede davon weist diverse Vor- und Nachteile auf (Baldwin *et al.*, 1999). Da sich die neueren Techniken

während der Arbeit noch in der Entwicklungsphase befanden, wurde hier auf das ‘differential display’ zurückgegriffen. Das ‘differential display’ ist als anwendbare Methode zur Identifizierung und Klonierung differentiell exprimierter Gene beschrieben (Seehaus & Tenhaken, 1998; Appel *et al.*, 1999). Ein entscheidender Vorteil des ‘differential display’ liegt darin, dass es weder von EST-Datenbanken noch von vorhandenen cDNA-Banken abhängig ist. Bekannte Probleme des ‘differential display’ sind aber Sensitivität, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, erhaltene Sequenzinformationen zu häufig nicht-kodierenden Bereichen von Genen sowie eine hohe Zahl an sogenannten Falsch-Positiven. Eine grosse Verbesserung dieser Technik resultiert aus einer Kombination mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) von cDNA-Fragmenten (Bachem *et al.*, 1996). Daher wurde für die Detektion von Unterschieden in der Genexpression zwischen der EN- und DEL-Mutante und Wildtyppflanzen die Methode des Restriktions-Fragment-‘differential display’ (RFDD) eingesetzt.

Zur Vereinfachung wurde mit einem RFDD-Komplett-Paket gearbeitet (DisplaySystemsBiotech). Als Ausgangsmaterial für das RFDD wurde Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern gewählt, da Änderungen in der Genexpression dort zu erwarten sind, wo eine hohe Expression von *WRKY6* vorliegt (Abb.7, s. S.49). Zunächst wurden für das RFDD verschiedene ‘template’ Präparationen durchgeführt. Dazu wurde aus der Gesamt-RNA cDNA hergestellt, die dann mit dem Restriktionsenzym *TaqI* in kleine Fragmente geteilt wurde. Nach einer Ligation mit zwei unterschiedlichen Adaptoren erfolgten die PCR-Reaktionen mit einem markierten Primer, der sich nur an einen der beiden Adaptoren anlagern kann, und einem zweiten Primer, der neben seiner Analogie zu Sequenzen des zweiten Adaptors auch einen aus drei Basen bestehenden Überhang in die Sequenzen der cDNA-Fragmente besitzt. Auf diesem Wege wurden mehrere Subpopulationen der gesamten Transkriptpopulation amplifiziert. Aufgrund der Art der Adaptoren wurden nahezu ausschliesslich RFDD-Fragmente amplifiziert, die beide Adaptoren tragen. Als Detektionssystem wurde eine Fluoreszenzmarkierte Variante (FAM) zusammen mit einem Sequenzierautomaten (ABI 310) verwendet, wobei die Auftrennung über ein Niedrig-Polymer in Kapillaren erfolgte. Die Daten-Analyse wurde mit einem RFLP-basierenden Programm durchgeführt.

Insgesamt wurden pro EN- und DEL-Mutante und *Arabidopsis thaliana* je zwei unabhängige RFDD-Reaktionen mit je 64 verschiedenen Primern, die statistisch alle potentiellen Transkripte einer eukaryontischen Zelle erfassen sollen, vorgenommen und analysiert. Zur Prüfung des Auftrennungs- und Detektionssystems wurden die Läufe der Doppel-Proben und mehrere Läufe der gleichen Reaktion mit unterschiedlichen Kapillaren verglichen. Da jeweils gleiche Profile vorhanden waren, wurde das System als stabil und reproduzierbar angesehen (Daten

nicht gezeigt). Darauf basierend wurden alle RFDD-Reaktionen zusammen mit internen Längenstandards in diesem System analysiert.



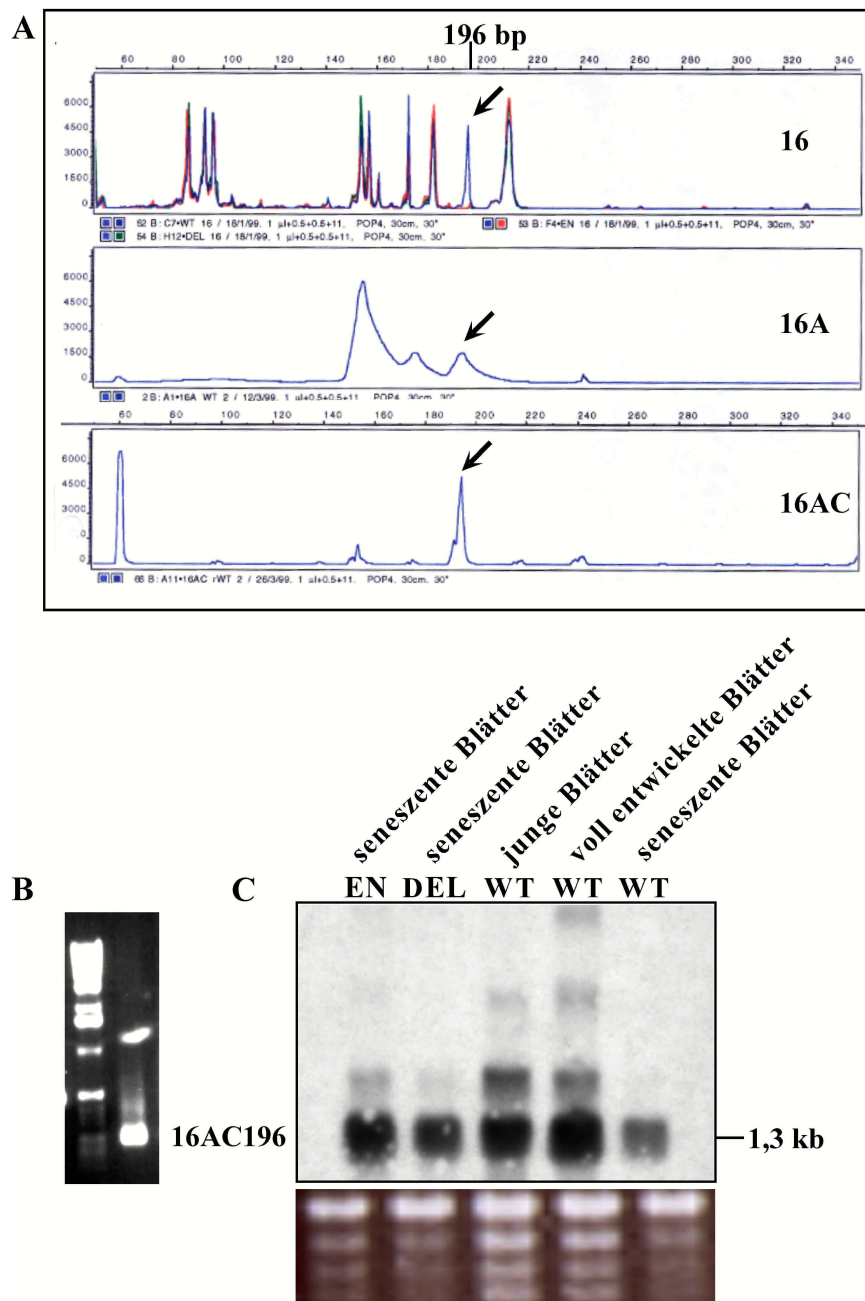
**Abb.29:** Beispiel eines RFDD-Profiles der EN- und DEL-Mutanten zusammen mit *Arabidopsis thaliana* Col-0. Die RFDD-Reaktionen wurden mit je 1 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern der EN- und DEL-Mutanten und *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp durchgeführt. Für die Analyse wurden jeweils 1 µl der insgesamt 20 µl RFDD-Reaktionen eingesetzt. Zusammen mit den Längenstandards GS-Tamra 500 und GS-Rox 1000 wurden die RFDD-Reaktionen in dem Sequenzierautomaten ABI 310 über eine 30 cm Kapillare mit dem Niedrig-Polymer POP4 aufgetrennt. Die Detektionszeit betrug insgesamt 30 min. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des GeneScan-Programms in einem Längen-abhängigen Profil verrechnet. Dargestellt sind Ausschnitte der Profile der Wildtyppflanzen (blau), der EN-Mutante (rot), der DEL-Mutante (grün) sowie einer Überlagerung der Profile (oben), die aus der RFDD-Reaktion mit dem Primer 54 stammen. Unterschiedlich auftretende Peaks sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die x-Achse stellt die Länge der RFDD-Fragmente [bp] dar. Die y-Achse beinhaltet die Fluoreszenzeinheiten der Peaks.

In den erhaltenen Profilen zeigten sich neben einer guten Überlagerung gleicher Peaks auch unterschiedlich auftretende Peaks zwischen EN- und DEL-Mutanten und Wildtyppflanzen (Abb.29). Einige Peaks waren beispielsweise nur bei Wildtyppflanzen und nicht bei den *WRKY6* Null-Mutanten vorhanden. Bei beiden Mutanten waren aber auch Peaks aufgetreten, die den Wildtyppflanzen fehlten. Dabei verhielten sich die EN- und DEL-Mutanten zum Teil gleich, aber auch verschieden. So waren auch Peaks erkennbar, die nur bei einer der beiden Mutanten vorkamen. Darüber hinaus waren auch graduelle Unterschiede in der Peakhöhe zu sehen. Die Auswahl der Peaks für nachfolgende Klonierungen und Sequenzierungen erforderte die Festlegung sogenannter Signifikanz-Grenzen. Darunter fielen nur Peaks ab einer Größe von 90 bp, da die Fragmente nicht überwiegend

Sequenzinformationen der Adaptoren tragen sollten, und mit einer über 1000 liegenden Fluoreszenzintensität. Für die Klonierung interessanter Peaks wurde einer PCR-basierende Strategie entwickelt.

Dazu wurde der in der zuvor erfolgten RFDD-Reaktion verwendete Primer, der den aus drei Basen bestehenden Überhang in die cDNA trägt, am 3'-Ende um eine Base in allen vier Möglichkeiten A, C, G und T verlängert. Mit diesen vier Primern wurde dann erneut eine RFDD-Reaktion mit anschließender Produktanalyse durchgeführt. Der Primer, in dessen RFDD-Reaktion der gewünschte Peak auftrat, wurde in einer zweiten Runde wieder um eine Base in allen vier Möglichkeiten verlängert. Die Analyse der damit erfolgten spezifischeren RFDD-Reaktionen zeigte bei einer deutlichen Anreicherung und Vereinzelung des gewünschten Peaks (Abb.30A). Nach einer Wiederholung dieser spezifischen RFDD-Reaktion mit einem nicht-markierten Primer fand die Auftrennung über ein Agarosegel statt (Abb.30B). Das der Peak-Größe korrespondierende Fragment wurde eluiert und kloniert.

Pro Peak-Fragment wurden dann die Sequenzen zehn unabhängiger Klone ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Fragment-Größenbestimmung aus der RFDD-Analyse äusserst exakt und in allen Fällen um +/- eine Base genau war (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise wurden Klone insgesamt 15 verschiedener Peaks unterschiedlicher Größe (zweite Ziffer [bp]) erhalten: 5WT170, 5WT235, 13WT130, 16WT196, 25WT205, 26WT235, 28WT240, 35WT210, 39WT130, 42WT240, 48WT235, 51WT165, 52WT100, 54WT295 und 54EN160. Sie entstammten RFDD-Reaktionen verschiedener Primer (erste Ziffer) mit RFDD-‘templates’ wildtypischem (WT) oder EN-Ursprungs. In Sequenzvergleichen stellte sich heraus, dass alle aus den Peak-Fragmenten erhaltenen Sequenzen hohe Homologien bis Identitäten zu pflanzlicher, plastidärer oder bakterieller ribosomaler RNA aufwiesen.



**Abb.30:** RFDD-Reaktionen mit erhöhter Spezifität zur Vereinzelung differentieller Paeks. **A** RFDD-Analyse der Reaktionen mit den jeweils um eine Base in allen vier Möglichkeiten verlängerten Primern. In der Überlagerung der RFDD-Reaktionen mit dem Primer 16 (oben) wurde ein differentiell exprimiertes Fragment in Wildtyppflanzen (blau) gegenüber den EN- (rot) und DEL-Mutanten (grün) bei 196 bp deutlich (mit einem Pfeil gekennzeichnet). Nach einer ersten 3'-Verlängerung des Primers 16 konnte dieser Peak in der RFDD-Reaktion mit der Kombination der Base A gefunden werden (mitte). Eine deutliche Vereinzelung dieses Peaks zeigte sich nach der zweiten 3'-Verlängerung des Primers 16 in der RFDD-Reaktion mit der Kombination der Base C (unten). **B** Agarosegel-Auftrennung des 16WT196-Peaks nach wiederholter RFDD-Reaktion mit nicht-markiertem Gegenprimer. Ausschliesslich nicht Fluoreszenz-markierte RFDD-Fragmente konnten nach einer Elution aus dem Gel kloniert werden. Als Marker wurde die 1 kb-Leiter verwendet. **C** Northern-Analyse des 16WT196-RFDD-Fragments. Pro Spur waren je 10 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern der EN- und DEL-Mutanten sowie aus jungen, voll entwickelten grünen und seneszenten Blättern von Wildtyppflanzen aufgetragen. Als Sonde für die Hybridisierung wurde das klonierte 16WT196-Fragment verwendet. Die Ethidiumbromidfärbung des Gels diente als Ladungskontrolle.



Die Northern-Analyse eines auf diese Weise isolierten Klons (16WT196) verlief im Hinblick auf eine mögliche differentielle Expression in seneszenten Blättern zwischen der EN- und DEL-Mutanten und Wildtyppflanzen negativ (Abb.30C). Bei den erhaltenen Sequenzen für ribosomale RNA handelte es sich offensichtlich weniger um potentielle Zielgene von WRKY6. Dies könnte einerseits an dem benutzten Ausgangsmaterial liegen. Da die Pflanzen unter Gewächshausbedingungen gezogen wurden, waren sie möglicherweise an der Blattoberfläche von verschiedenen Mikroorganismen besiedelt oder sogar befallen. Zusätzlich enthalten seneszente Gewebe einen hohen Gehalt an RNasen. Damit ist der Anteil an definierten RNA-Spaltprodukten gegenüber vollständigen RNA-Molekülen erhöht, was sich dann auch in PCR-Amplifikationen wieder spiegelt. Wahrscheinlich spielt die Qualität des RFDD-‘templates’ eine entscheidende Rolle bei der erfolgreichen Durchführung eines RFDD. Diese kann insbesondere durch das Entfernen der ribosomalen RNA erreicht werden.

In darauffolgenden RFDD-Experimenten wurde daher unter sterilen Bedingungen gezogenes Wurzelmaterial eingesetzt. Erst nach einer Isolierung der mRNA wurde die ‘template’-Präparation für das RFDD durchgeführt. Trotz allem waren die Sequenzen der aus diesem RFDD klonierten Peak-Fragmente 17DEL325 und 22DEL200 nahezu identisch zu pflanzlicher ribosomaler RNA.

Obwohl das RFDD eine Methode mit hohem Potential zur Isolierung differentiell exprimierter Gene ist (Bruce *et al.*, 2000), führte es hier nicht zu einer erfolgreichen Identifikation möglicher Zielgene von WRKY6 und ebenso nicht zu einer Charakterisierung eines mutmaßlichen molekularen Phänotyps der EN- und DEL-Mutanten.

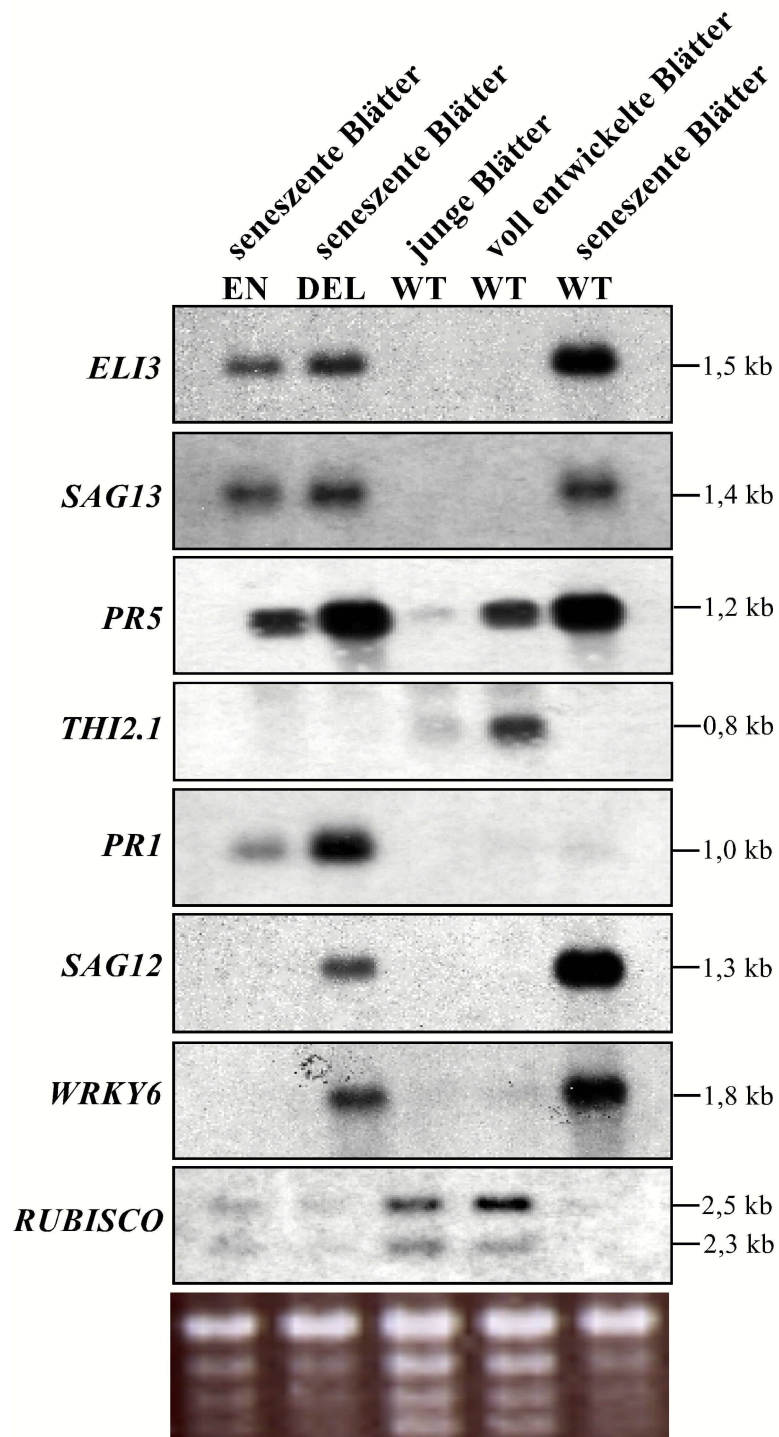
Im positiven Falle eines RFDD und damit der Isolierung differentiell exprimierter Gene in den *WRKY6* Null-Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen wäre dennoch immer offen, ob diese differentiell exprimierten Gene tatsächlich als potentielle Zielgene von WRKY6 bezeichnet werden könnten. Dies sollte durch Wiederholung des RFDD einerseits mit den EN- und DEL-Mutanten, die nach Kreuzungen gegen Wildtyppflanzen eine verringerte Anzahl des *En-1* Transposons enthalten (Abb.28, s. S.81), und andererseits mit verschiedenen Linien sogenannter Komplementationspflanzen bestätigt werden. Für eine Komplementation eines mutmaßlichen Phänotyps der EN- und DEL-Mutanten wurden transgene Linien hergestellt, die eine ektopische und konstitutive *WRKY6* Expression im jeweiligen *WRKY6* Null-Mutanten Hintergrund aufweisen. Darüber hinaus wurden ebenfalls transgene Linien im *WRKY6* Null-Mutanten Hintergrund gewonnen, die eine induzierbare *WRKY6* Expression zulassen. Zu diesem Zweck wurde das Glucocorticoid-vermittelte transkriptionelle Induktions-System verwendet (Aoyama & Chua, 1997; McNellis *et al.*, 1998). Eine Expressionsanalyse zuvor identifizierter potentieller Zielgene von WRKY6 sollte unter einer zeitlich kontrollierten

*WRKY6* Expression in diesen Linien vorgenommen werden. Anhand einer Kinetik sollte dann eine Klassifizierung in eher primäre oder sekundäre Zielgene erfolgen. Weitere RFDD-Analysen solcher Kinetiken könnten zur Identifizierung von unmittelbaren Zielgenen von *WRKY6* führen (Sablowski & Meyerowitz, 1998). Im Laufe der Arbeit wurde dann davon abgesehen, da das Glucocorticoid-induzierbare System alleine die pflanzliche Genexpression besonders die von Pathogen-Abwehrgenen, die Kandidaten für Zielgene von *WRKY6* sind, beeinflusst (Kang *et al.*, 1999).

### 4.3 Expressionsmuster potentieller Zielgene

Parallel zur Identifikation möglicher Zielgene mittels RFDD stand eine mehr zielgerichtete Charakterisierung eines mutmaßlichen molekularen Phänotyps zusammen mit einer definierteren Expressionsanalyse potentieller Zielgene von *WRKY6* in den EN- und DEL-Mutanten. Als potentielle Zielgene sollten hier solche verstanden werden, deren Transkripte ebenso wie *WRKY6* mRNA in Wurzeln, während der Blattseneszenz und der pflanzlichen Pathogenabwehr in hoher Menge akkumulieren. Kandidaten waren dafür sogenannte Seneszenz-assoziierte Gene wie *SAG12* und *13* (Lohmann *et al.*, 1994; Noh & Amasino, 1999) sowie Pathogen-induzierte Gene wie *ELI3* (Trezzini *et al.*, 1993) *PR1*, *PR5* (Ukness *et al.*, 1992) und *THI2.1* (Vignutelli *et al.*, 1998). Ihre Expression wurde in Northern-Analysen mit seneszenten Blättern der EN- und DEL-Mutanten im Vergleich mit Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* in verschiedenen Altersstadien untersucht.

Anhand einer nur schwachen Expression von *RUBISCO* konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem gewählten späten Entwicklungsstadium der Blätter sowohl der EN- und DEL-Mutanten als auch der Wildtyppflanzen um eindeutige Seneszenz handelt (Abb.31). In jungen und voll entwickelten grünen Blättern war hier dagegen eine deutliche Expression sichtbar.



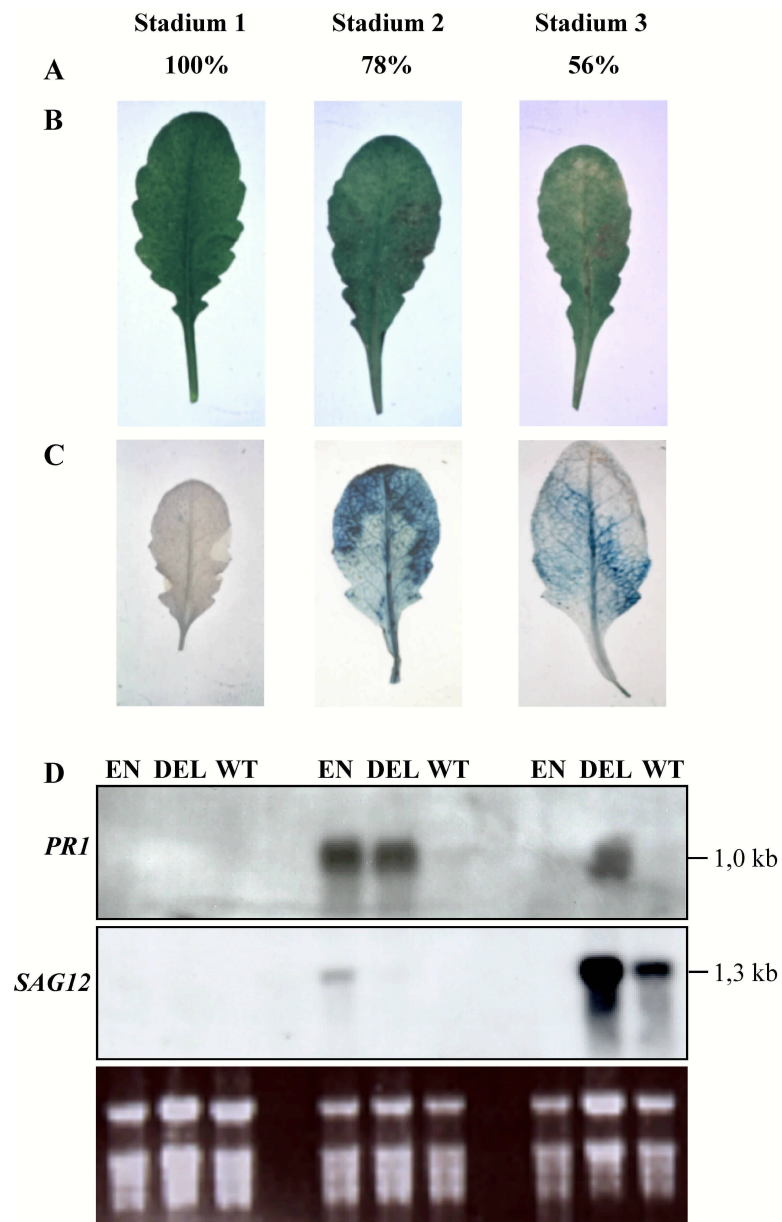
**Abb.31:** Expression potentieller Zielgene von *AtWRKY6* in den EN- und DEL-Mutanten. Pro Spur waren je 10 µg Gesamt-RNA aus seneszenten Blättern der EN- und DEL-Mutanten sowie aus jungen Blättern, voll entwickelten grünen Blättern und seneszenten Blättern von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp aufgetragen. Für die Hybridisierungen wurden die entsprechenden cDNA-Fragmenten für *SAG12* und *13*, *ELI3*, *PR1*, *PR5* und *THI2.1* verwendet. Zu Gunsten der Vollständigkeit und Vergleichbarkeit ist die schon zuvor erfolgte Expressionsanalyse von *WRKY6* mit eingefügt (Abb.26A, s. S.77). Zur Kontrolle der verschiedenen Blattalterungsstadien wurde eine Hybridisierung mit dem EST-Klon M22F19139 durchgeführt, welcher die kodierende Sequenz der grossen Untereinheit von RUBISCO trägt. Als Ladungskontrolle diente die Ethidiumbromid-Färbung des Gels.

In einem Vergleich der Expression zwischen seneszenten Blättern der Wildtyppflanzen, der EN- und DEL-Mutanten zeigte sich bei *SAG13*, *ELI3*, *PR5* und *THI2.1* kein nennenswerter Unterschied, d.h. die Expression dieser Gene war nicht durch den *WRKY6* 'knock-out' beeinflusst. Bei *SAG12* und *PRI* lag jedoch ein anderer Sachverhalt vor. In ihrem Expressionsmuster traten eindeutige Unterschiede auf. Während in Wildtyppflanzen nur ein Hauch einer Transkriptmenge detektierbar war, waren in beiden *WRKY6* Null-Mutanten deutliche Transkriptmengen zu erkennen. Allerdings war die *PRI*-Akkumulation in der DEL-Mutante gegenüber der EN-Mutante sichtlich erhöht. Dieses unterschiedliche Expressionsverhalten potentieller Zielgene in den *WRKY6* Null-Mutanten konnte ebenso bei einem weiteren Kandidaten beobachtet werden. *SAG12* war in seneszenten Blättern von Wildtyppflanzen sehr stark, in der DEL-Mutante deutlich schwächer und in der EN-Mutante gar nicht exprimiert.

Ob die veränderten Expressionen von *SAG12* und *PRI* tatsächlich durch den *WRKY6* 'knock-out' verursacht wurden und damit als potentielle Zielgene von *WRKY6* angesehen werden konnten, bedurfte eingehender Überprüfungen. Die hier verwendeten EN- und DEL-Mutanten wiesen neben dem *WRKY6* 'knock-out' wahrscheinlich auch noch andere auf, da sie acht bzw. zehn weitere *En-1* Insertionen und eine unbekannt Zahl an 'footprints' trugen. Die folgenden Überprüfungen wurden daher mit den nach den Rückkreuzungen erhaltenen EN- und DEL-Mutanten durchgeführt.

Hinzu kam auch noch, dass wirkliche Unterschiede in Genexpressionen eine Vergleichbarkeit der Entwicklungsstadien der verschiedenen Pflanzen voraussetzten. Es ist bekannt, dass die Blattentwicklung ein stetig fortlaufender Prozess ist. Gleiches gilt auch für die Blattseneszenz (Buchanan-Wollaston, 1997; Gan & Amasino, 1997; Nam, 1997). Verschiedene Stadien der Seneszenz können z.B. anhand ihres Chlorophyll-, Protein- und RNA-Gehaltes unterschieden werden. Als frühe Seneszenzstadien werden solche mit über 80% Chlorophyll-Gehalt bezeichnet. Mittlere Stadien weisen etwa 50% des Chlorophyll-Gehalts auf. Zu sehr späten Stadien zählen die mit etwa 20% des Chlorophyll-Gehalts. Das Expressionsmuster sogenannter Seneszenz-induzierter Gene kann während dieser Stadien ganz verschieden sein. Ihr Expressionsverlauf kann schon zu Beginn der Seneszenz ein bestimmtes Niveau erreicht haben, das in allen Stadien gleich bleibt, er kann kontinuierlich oder aber nur in einem bestimmten Stadium kurzzeitig ansteigen. Mit diesem Hintergrund können theoretisch alle Expressionsmuster der getesteten Gene erklärt werden, auch die der potentiellen Zielgene *SAG12* und *PRI* zusammen mit den Unterschieden zwischen den Expressionen in den EN- und DEL-Mutanten. Daher wurde eine Charakterisierung verschiedener Seneszenzstadien anhand

von visuellen Symptomen und Chlorophyllgehalten vorgenommen. Insgesamt wurden drei Stadien definiert.



**Abb.32:** Definition drei verschiedener Blattalterungsstadien. Die drei Stadien wurden **A** nach der Ermittlung der Chlorophyll-Gehalte und **B** anhand visueller Symptome als keine, frühe und mittlere Seneszenz voneinander abgegrenzt. **C** Blätter der 6p::GUS Pflanzen wurden zu allen drei Stadien einer GUS-Färbung unterzogen. Die Analyse der *AtWRKY6* Promotoraktivität diente der Korrelation der *WRKY6* Expression zu den drei Stadien. **D** Drei Blattalterungsstadien und dazu korrespondierende Expressionsmuster potentieller Zielgene. Pro Spur waren je 10 µg Gesamt-RNA der entsprechenden Stadien 1, 2 und 3 aus Blättern der EN- und DEL-Mutanten sowie *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp geladen. Für die Hybridisierungen wurden cDNA-Fragmente der Gene *SAG12* und *PR1* verwendet. Als Ladungskontrolle diente die Ehtidumbromid-Färbung des Gels.

Das Stadium 1 entsprach voll entwickelten grünen Blättern. Das Stadium 2 war dagegen ein frühes Seneszenzstadium, das Stadium 3 ein mittleres. Im Zusammenhang damit wurde die Aktivität des *WRKY6* Promotors in den 6p::GUS Pflanzen untersucht. Hier zeigte sich die höchste Aktivität im Stadium 2 in einem von der Blattspitze beginnenden Gradienten (Abb.32C). Im Stadium 3 war zwar noch eine deutliche Aktivität vorhanden, allerdings schwächer und auf die noch grünen Teile des Blattes begrenzt. In schon voll seneszenten gelben Teilen des Blattes war keine *WRKY6* Promotor-Aktivität mehr zu erkennen. Exakt diese drei Stadien wurden für erweiterte Analysen der *SAG12* und *PRI* Expressionen in den EN- und DEL-Mutanten im Vergleich mit *Arabidopsis thaliana* Wildtyp verwendet.

Prinzipiell konnten zu den vorher ermittelten Expressionsmuster von *SAG12* und *PRI* vergleichbare Resultate gefunden werden. Im Stadium 1 konnte bei beiden Genen kein Transkript detektiert werden (Abb.32D). In den seneszenten Stadien 2 und 3 waren deutliche Transkriptmengen sichtbar. Das zuvor gefundene Expressionsmuster für *SAG12* spiegelte sich im Stadium 3 wieder, das Expressionsmuster für *PRI* dagegen im Stadium 2. In beiden *WRKY6* Null-Mutanten war zu einem frühen Stadium der Seneszenz eine deutliche *PRI* Expression vorhanden, nicht aber in Wildtyppflanzen. Dies war eine Bestätigung der früheren Ergebnisse. Allerdings konnte der Unterschied in der *PRI* Expression zwischen den EN- und DEL-Mutanten nicht wieder beobachtet werden. Zu einem späteren Zeitpunkt, im Stadium 3, zeigten sie aber ein unterschiedliches *PRI* Expressionsverhalten. Während bei der DEL-Mutante immer noch eine starke *PRI* Expression vorlag, fehlte sie bei der EN-Mutante wie auch in Wildtyppflanzen. Für *SAG12* ergab sich ebenfalls eine zumindest teilweise Bestätigung des früheren Expressionsmusters. Im Stadium 3, als ein Stadium hoher Expression von *SAG12* bei der DEL-Mutante und Wildtyppflanzen, war kein Transkript bei der EN-Mutante zu detektieren. Allerdings verhielt sich hier die Menge der Akkumulation von *SAG12* mRNA zwischen DEL-Mutante und Wildtyppflanzen anders. Sie war unter diesen Bedingungen in der DEL-Mutante wesentlich höher. Zusätzlich war bei der EN-Mutante eine schwache *SAG12* Expression in dem frühen Seneszenzstadium 2 zu erkennen.

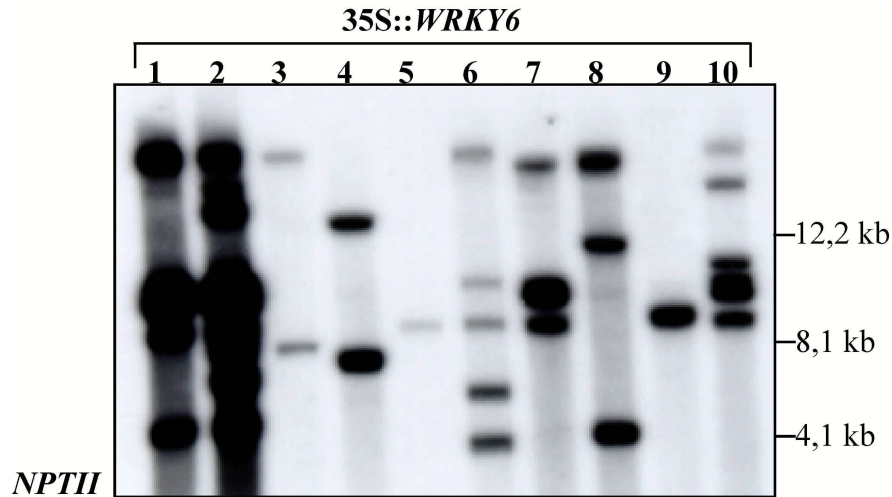
Diese Ergebnisse sind natürlich kein lückenloser Beweis, dass *SAG12* und *PRI* potentielle Zielgene von *WRKY6* sind. Die Expressionsmuster könnten zum Teil von immer noch nicht identischen Blattalterungsstadien abhängen. Hinzu kommt, dass beide *WRKY6* Null-Mutanten keinen wildtypischen genetischen Hintergrund hatten, sondern noch weitere drei bzw. vier *En-1* Elemente zusammen mit einer unbekanntem Zahl möglicher 'footprints' trugen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den EN- und DEL-Mutanten können durch verschiedene Faktoren verursacht sein. Sie können von möglichen Unterschieden in den genetischen Hintergründen der Mutanten abhängen, sie können durch somatische Sektoren der instabilen

EN-Mutante bedingt sein, oder aber sie können durch ein möglicherweise vorhandenes verkürztes WRKY6-Protein in der DEL-Mutante verursacht werden. Trotzdem begründen diese Ergebnisse eine gewisse Glaubwürdigkeit, so dass von einem molekularen Phänotyp der EN- und DEL-Mutanten gesprochen werden kann. Schliesslich sind die Expressionsmuster der *SAG12* und *PRI* Gene in dem *WRKY6* Null-Hintergrund verändert. Dieses kann dann weiter mit Hilfe der Komplementationspflanzen getestet werden.

## 5. EKTOPISCHE EXPRESSION VON *AtWRKY6*

Obwohl viele Sequenzen zu WRKY-Faktoren in den Datenbanken vorhanden sind, existierte im Rahmen dieser Arbeit nur eine bekannte *WRKY* Null-Mutante (Johnson & Smyth, 1998). Darüberhinaus waren noch gar keine Daten zu einer ektopischen Überexpression von WRKY-Faktoren bekannt. Interessante Informationen über die Funktion eines Transkriptionsfaktors können aber nicht nur aus Null-Mutanten-, sondern gerade auch durch eine Analyse von ektopisch überexprimierenden Pflanzen gewonnen werden (Parcy *et al.*, 1998). Dabei tritt hier das Problem der Redundanz nicht so deutlich in den Vordergrund. Bei Null-Mutanten eines einzelnen Vertreters einer Genfamilie sind zumindest teilweise funktionelle Überlappungen zu erwarten, die dann in nur äusserst schwache und subtile mutante Phänotypen resultieren können. Dies kann auch bei einer ektopischen konstitutiven Expression der Fall sein, z.B. wenn der Faktor einer strikten post-transkriptionellen oder –translationalen Kontrolle unterliegt. Ebenfalls kann es durch ein Fehlen möglicher Interaktionspartner des Faktors zu keinem Effekt in der Pflanze kommen. Da aber eine Homodimerisierung von *WRKY6* potentiell möglich ist, ist ein mutanter Phänotyp nach dessen ektopischer Überexpression durchaus in Entwicklungsstadien und Geweben zu erwarten, in denen *WRKY6* sonst nur schwach exprimiert ist (Abb.7, s. S.49).

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung von *WRKY6* wurden daher transgene Pflanzen regeneriert, die *WRKY6* ektopisch und konstitutiv exprimieren. Dazu wurde die komplette *WRKY6* cDNA mit 37 bp N-terminalen und 64 bp C-terminalen Verlängerungen der kodierenden Sequenz hinter den 35S-Promotor und dann gemeinsam in einen geeigneten T-DNA Vektor kloniert. Mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation wurde dieser dann in *Arabidopsis thaliana* Col-0 eingebracht (Bechthold *et al.*, 1993). Nach Selektion über Kanamycin, zu dem das entsprechende Resistenzgen *NPTII* in der T-DNA (Becker *et al.*, 1992) enthalten ist, wurden zehn unabhängige Linien isoliert. Anschließend wurden sie hinsichtlich der Integrationsereignisse untersucht.

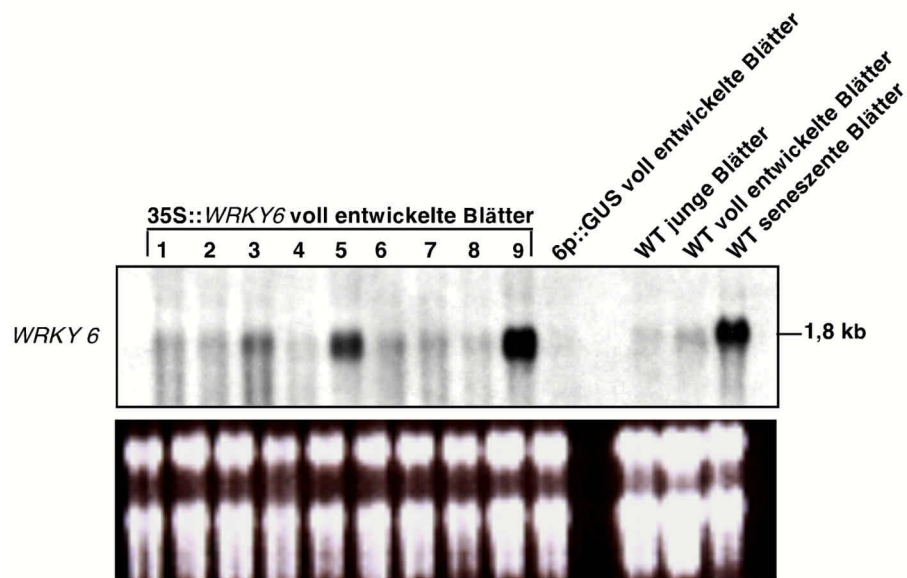


**Abb.33:** Genomische Southern-Analysen der 35S::AtWRKY6 Primärtransformanten. Für die Restriktionsverdauung mit *HindIII*, welches im Polylinker des T-DNA Plasmids und der AtWRKY6-cDNA schneidet und so das Resistenzgen *NPTII* von dem *CaMV35S::AtWRKY6* Konstrukt trennt, wurden jeweils zwischen 0,5 bis 1 µg genomische DNA eingesetzt. Als Sonde wurde ein cDNA-Fragment von *NPTII* verwendet.

Die isolierten Linien wiesen unabhängige Integrationen in unterschiedlicher Zahl auf. Neben einigen Linien mit einfachen (5, 9), zweifachen (3, 4) und dreifachen (7, 8) enthielten manche auch multiple Integrationen (1, 2, 6, 10) (Abb.33). Die F<sub>1</sub>-Generation dieser Linien (Linie 10 ging verloren) wurde anschliessend in Bezug auf die ektopische Überexpression von *WRKY6* charakterisiert. Dazu wurde in Northern-Analysen die Transkriptmenge von *WRKY6* in voll entwickelten grünen Blättern bestimmt, da zu diesem Entwicklungsstadium die Expression des endogenen *WRKY6* Gens sehr schwach ist (Abb.7, s. S.49).

Im Vergleich mit der *WRKY6* Transkriptmenge der als Wildtyp dienenden Kontrollpflanzen einer 6p::GUS Linie, bei denen kein Signal zu erkennen war, war diese bei allen 35S::WRKY6 Linien zumindest leicht erhöht. Die Linien 3, 5 und 9 fielen hier aber besonders auf, da sie eine deutlich höhere Expression zeigten (Abb.34). Diese war bei der Linie 9 am stärksten. Dabei übertraf sie sogar noch das Expressionsniveau, das in seneszenten Blättern detektiert wurde.





**Abb.34:** Expressionsanalyse der 35S::*AtWRKY6* Linien. Die Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation (1-9) wurden zusammen mit als Wildtyp dienenden Kontrollpflanzen einer 6p::GUS Linie 2 Wochen auf Selektionsmedium und dann 3 Wochen in Erde unter LT-Bedingungen angezogen. Pro Spur wurden je 10 µg Gesamt-RNA geladen, die aus voll entwickelten grünen Blättern isoliert wurde. Zum Vergleich wurden noch je 10 µg Gesamt-RNA aus jungen, voll entwickelten und seneszenten Blättern von *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyppflanzen aufgetragen. Als Sonde wurde ein cDNA-Fragment von *AtWRKY6* verwendet. Als Ladungskontrolle diente die Ethidiumbromid-Färbung des Gels.

Zu den deutlich bis stark exprimierenden Linien zählten solche, die einfache oder zweifache Integrationen vorliegen hatten. Dieses bei den mehrfach Integrationen auftretende Phänomen einer äusserst geringen Expression des Transgens ist als sogenannter ‘gene silencing’ Effekt bekannt (Hobbs *et al.*, 1993; Stam *et al.*, 1997; Baulcombe, 1999; Jones *et al.*, 1999). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Kopiezahl und dem Expressionsniveau des Transgens ist jedoch nicht gezeigt. In diesem Fall wurde allerdings ersichtlich, dass die Linien 5 und 9 als Linien mit einfach Integrationen entsprechend sehr starke Expressionsniveaus von *WRKY6* erreichten. Für die nun folgende phänotypische Charakterisierung wurden daher nur die Linien 3 als schwacher, 5 als mittlerer und besonders 9 als starker ‘Expressor’ berücksichtigt.

Eine hohe Transkriptmenge führt nicht zwingend zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration. Dies ist aber die Voraussetzung für veränderte biologische Effekte in der Pflanze und somit für das Auftreten eines mutanten Phänotyps. Deshalb wurde zusätzlich der Gehalt des *WRKY6*-Proteins in Keimlingen der Linie 9 untersucht. In Western-Analysen war eine schwache Bande, die zu dem Molekulargewicht von *WRKY6* korrespondiert, bei unbehandelten Keimlingen der 35S::*WRKY6*.9-Linie zu erkennen (Abb.27D, s. S.79). Eine entsprechende Bande war bei unbehandelten Wildtyp-Keimlingen nicht sichtbar, trat aber nach einer Behandlung mit dem bakteriellen Elizitor Flagellin auf, der die *WRKY6* Promotoraktivität stimuliert. Insgesamt

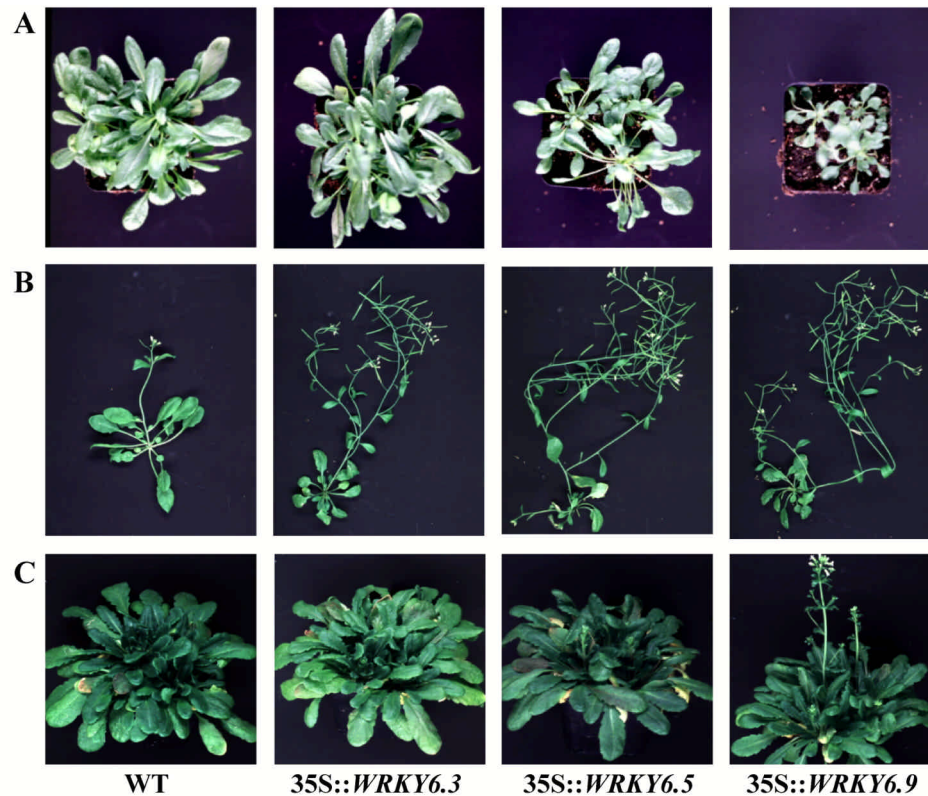
gelang die Herstellung mindestens einer transgenen Linie, die in Entwicklungsphasen einer äusserst schwachen Expression des endogenen *WRKY6*-Gens sowohl ein hohes Niveau an *WRKY6*-mRNA als auch an *WRKY6*-Protein hat.

### 5.1 35S::*AtWRKY6* Phänotyp

Aufgrund einer mutmaßlichen Funktion von *WRKY6* über Homodimerisierungen kann durchaus bei einer ektopischen Überexpression ein deutlicher Eingriff in den pflanzlichen Lebenslauf stattfinden. *WRKY6* kann aber auch in Heterodimerisierungen involviert sein. Daher sind durch eine entsprechend fehlende Konzentration potentieller Interaktionspartner voraussichtlich nur einige Prozesse von Veränderungen betroffen. Nachdem das endogene *WRKY6*-Gen nicht in allen Organen, Geweben und auch nicht während der gesamten pflanzlichen Entwicklung exprimiert wird (Abb.7, s. S.49), waren mögliche mutante Phänotypen der 35S::*WRKY6* Linien an eben diesen Orten und Stadien zu erwarten. Daher wurden gerade diese pflanzlichen Bereiche für eine phänotypische Charakterisierung herangezogen.

Tendenziell wurde bei allen Linien, die *WRKY6* deutlich überexprimieren, ein identischer mutanter Phänotyp beobachtet. Am auffälligsten war zunächst der Habitus der Rosetten bei den 35S::*WRKY6* Linien. Im Vergleich zu Wildtyppflanzen waren sie in ihrer Gesamtheit kleiner (Abb.35A). Auch die einzelnen Blätter waren in ihrer Expansion reduziert und hatten längere Petiolen. Aber es war nicht nur bestimmtes Pflanzenorgan betroffen, sondern ebenso teilweise der Entwicklungsprozess. Die 35S::*WRKY6* Linien blühten schon zu einem Zeitpunkt, in dem sich die Wildtyppflanzen noch im Rosettenstadium befinden. Dies galt sowohl für Pflanzen unter Langtag-, als auch unter Kurztag-Bedingungen (Abb.35B und C). Dabei ist aber die Zahl der Rosettenblätter zu Beginn des Blühens bei den 35S::*WRKY6* Linien und Wildtyppflanzen gleich (9-11), deren Verringerung ein typisches Charakteristikum von sogenannten Frühblühern ist. Deshalb scheint es sich nicht um eine Vorverlegung des Blühzeitpunktes, sondern eher um eine gesamte Beschleunigung der Transition von vegetativer zu reproduktiver Phase zu handeln.

Hinzu kam noch ein Effekt, der die Sprossachse betraf. Sie wies im Gegensatz zu einer meist geraden doch eine mehr mit Krümmungen versehene Wuchsform auf. Als extremster Phänotyp wurde dabei die Bildung kleiner Luftrosetten sowie die Stauchung des Hauptblütenstandes zusammen mit einem Verlust der apikalen Dominanz beobachtet, da Seitenäste der Sekundärblüten über die Hauptachse hinauswuchsen (Daten nicht gezeigt).



**Abb.35:** Entwicklungsbezogene Merkmale des mutanten Phänotyps der 35S::*AtWRKY6* Linien 3, 5 und 9. **A** Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation wurden zusammen mit als Wildtyp dienenden Kontrollpflanzen einer 6p::*GUS* Linie 2 Wochen auf Selektionsmedium und dann 3 Wochen in Erde unter KT-Bedingungen angezogen. **B** Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generation und *Arabidopsis thaliana* Col-0 waren etwa 6 Wochen in Erde im LT oder **C** im KT gewachsen. Die Bilder der Pflanzen einer Reihe wurden jeweils mit dem gleichen Abstand aufgenommen. Evtl. farbliche Differenzen zwischen den Pflanzen in A, B und C sind durch Belichtungsunterschiede bedingt.

Ob diese mutanten Phänotypen direkte oder eher indirekte Effekte der *WRKY6* Überexpression sind, ist offen. In Übereinstimmung mit einem eher direkten Effekt steht, dass Organe wie junge bis voll entwickelte Blätter und Sprossachsen Veränderungen zeigen, bei denen in Wildtyppflanzen keine *WRKY6* Expression vorkommt. In Orten sonst hoher Expression wie Wurzeln und Blüten konnte daher auch kein mutanter Phänotyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich aller drei 35S::*WRKY6* Linien führte zu einer weiteren interessanten Beobachtung. Die Stärke des mutanten Phänotyps war mit der Menge des exprimierten *WRKY6* Transkriptes korrelierbar (Abb.34 und 35). Die Linie 3, die *WRKY6* am geringsten exprimierte, hatte eher einen schwachen bis sogar wildtypischen mutanten Phänotyp. Dagegen zeigte die Linie 9 mit der stärksten *WRKY6* mRNA-Akkumulation auch den stärksten mutanten Phänotyp. Dieser nahm bei der Linie 5 entsprechend einer mittleren *WRKY6* Expressionsstärke

auch eine Mittelstellung ein. Gerade dieser konzentrationsabhängige mutante Phänotyp deutete auf einen direkten Effekt der ektopischen und konstitutiven *WRKY6* Expression hin.

Einige Informationen aus dem Expressionsmuster von *WRKY6* sowie aus der Analyse der *WRKY6* Null-Mutanten EN und DEL legen eine Rolle von *WRKY6* in Prozessen der pflanzlichen Pathogenabwehr nahe. Aus diesem Grund wurden die 35S::*WRKY6* Linien mit dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ohne *avrRPM1* und mit *avrRPM1* infiziert und dann bezüglich auftretender Krankheits- oder Abwehrreaktionssymptome beobachtet. Die sichtbaren Symptome der mit bakteriellen Suspensionen inokulierten Blätter der 35S::*WRKY6* Linien deuteten nach einem Vergleich der Symptome bei Wildtyppflanzen auf eine leicht erhöhte Suszeptibilität in der inkompatiblen Interaktion hin (Daten nicht gezeigt). Bei Wildtyppflanzen war hier eine hypersensitive Reaktion (HR) als Pathogenabwehrreaktion zu beobachten. Dies war bei den 35S::*WRKY6* Linien nicht zu erkennen, sondern eher Krankheitssymptome. Im Gegensatz dazu verhielten sich die 35S::*WRKY6* Linien bei der kompatiblen Interaktion so wie Wildtyppflanzen. Bei der Kontrollbehandlung mit MgCl<sub>2</sub> reagierten sie sensibler als der Wildtyp. Der gleiche Trend dieser Symptome fand sich auch nach Inokulationen der 35S::*WRKY6* Linien mit einer zehnfach höher konzentrierten Bakteriensuspension (Daten nicht gezeigt). Bei Infektionen mit dem Oomyceten *Peronospora parasitica* pv. *Emoy* erwiesen sich Keimlinge der 35S::*WRKY6* Linie 9 ebenfalls mit durchschnittlich 12 Sporangien tendenziell suszeptibler als Wildtyppflanzen mit durchschnittlich 10 Sporangien pro Keimblatt (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt gesehen, bezieht sich der mutante Phänotyp der 35S::*WRKY6* Linien auf mehrere unterschiedliche biologische Prozesse. Einerseits sind die Ausbildungen bestimmter Organe sowie ganzheitliche pflanzliche Entwicklungen und andererseits auch Reaktionen in bestimmten Stresssituationen verändert. Die ektopische Überexpression von *WRKY6* ruft demnach multiple Effekte in der Pflanze hervor.

---

## V DISKUSSION

Für das Verstehen der pflanzlichen Lebensweise ist es notwendig, detailliertes Wissen über Funktionen von Transkriptionsfaktoren und damit über pflanzliche Regulationsprozesse zu erwerben. Die biologischen Aufgaben einiger Vertreter pflanzlicher Transkriptionsfaktor-Familien wurden bereits aufgeklärt. Ihnen konnten ganz unterschiedliche Rollen wie Organidentitäts-, Lebenslauf- und Stressabwehr-Vermittler zugeordnet werden. WRKY-Faktoren wurden bisher überwiegend als Stressabwehr-Vermittler beschrieben (Eulgem *et al.*, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Analyse eines Vertreters der WRKY-Multigenfamilie aus *Arabidopsis* lieferte neue Einblicke in diverse biologische Prozesse, in denen WRKY-Faktoren involviert sein können.

### 1. *At*WRKY6

#### 1.1 Biochemische Charakteristika

WRKY6 zählt mit seiner einzelnen WRKY-Domäne zu den WRKY-Faktoren der Gruppe II (Rushton *et al.*, 1996). Innerhalb der WRKY-Domäne ist, wie auch bei allen anderen WRKY-Faktoren, ein charakteristisches C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Motiv zu finden, welches vermutlich einen sogenannten Zink-Finger ausbildet (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996). Trotz eines neuartigen C-n<sub>4-5</sub>-C-n<sub>22-23</sub>-H-n<sub>1</sub>-H Motivs ist WRKY6 in die grosse Klasse der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren einzuordnen (Takatsuji, 1998). Zink-Finger-Strukturen wurden als DNA-Binde-Domänen sowie als Dimerisierungsdomänen charakterisiert. Bei den WRKY-Domänen wurde eine Funktion bisher nur als DNA-Binde-Domäne nachgewiesen (Eulgem *et al.*, 1999). Dies galt insgesamt für zwei der drei Arten von WRKY-Domänen (Eulgem *et al.*, 2000). Aufgrund von Sequenzverwandtschaften liegt die Funktion der WRKY-Domäne von WRKY6 mit hoher Wahrscheinlichkeit in der DNA-Bindung.

Für nahezu alle publizierten WRKY-Faktoren inklusive *At*WRKY1/ZAP1 als ein Vertreter der WRKY-Multigenfamilie in *Arabidopsis* wurde eine Sequenz-spezifische DNA-Bindung beobachtet und eine hohe Affinität zu W-Box-Motiven nachgewiesen (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Rushton *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999; Eulgem *et al.*, 1999; Cormack *et al.*, eingereicht). Nur bei dem als 'Gründer' der WRKY-Familie zu bezeichnenden SPF1 wurde ein anderes DNA-Binde-Motiv beschrieben (Ishiguro & Nakamura, 1994). Die dabei aus den Binde-Studien gewonnenen Daten waren jedoch nicht

eindeutig schlüssig und könnten durch eine unmittelbar vor den untersuchten Sequenzen liegende W-Box verfälscht worden sein. Da WRKY-Faktoren allgemein als W-Box-bindende Proteine bezeichnet werden können, sind daher W-Box-Motive als Zielsequenzen für WRKY6 zu betrachten.

Aufgrund der Sequenz seiner WRKY-Domäne fällt WRKY6 in die Subgruppe IIb (Eulgem *et al.*, 2000). Diese Subgruppe wird zusätzlich durch drei charakteristische Motive abgegrenzt. Neben einem Leucinzipper werden diese WRKY-Vertreter durch eine N-terminale Extension der WRKY-Domäne und durch ein basisches Motiv gekennzeichnet. Letzteres wird als mutmaßliches funktionelles NLS diskutiert, das die subzelluläre Lokalisation der WRKY-Faktoren im Kern der Zelle bewirkt. Die Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle und eine damit verbundene spezielle Lokalisation von Proteinen ist als unbedingte Voraussetzung für das koordinierte Abläufen biologischer Reaktionen anzusehen. Der Zellkern ist das Kompartiment, in dem die transkriptionelle Regulation der Genexpression stattfindet. Transkriptionsfaktoren zeigen daher eine Kernlokalisierung auf. Diese kann dann entweder konstitutiv sein, oder durch Kopplung an einen bestimmten Signalweg als regulierter Prozess auftreten (Smith & Raikhel, 1999). In Übereinstimmung mit einer Funktion als Transkriptionsfaktor zeigte WRKY6 eine Lokalisierung im Zellkern. Wie auch bei *PcWRKY1* und *NtWIZZ* erschien der Kernimport konstitutiv und unterlag damit nicht einer Regulation in Abhängigkeit einer bestimmten Signalkaskade (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000).

Eine solche Kernlokalisierung ist meist, bedingt durch das Molekulargewicht der betreffenden Proteine, kein Diffusions-, sondern ein aktiver Transportprozess über den Kernporenkomplex. Der Transport über den aus Nukleoporinen bestehenden Kernporenkomplex erfolgt mit Hilfe sogenannter Kern-Transport-Rezeptoren im Zusammenspiel mit kleinen GTPasen (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Kern-Transport-Rezeptoren sind mit dem Kernporenkomplex und dem Cytoskelett assoziiert und pendeln zwischen Cytoplasma und Nukleoplasma (Smith *et al.*, 1997). Sie sind Rezeptoren von NLS und binden NLS-tragende Proteine (Hicks & Raikhel, 1995; Smith & Raikhel, 1999). Ein dann folgender Import wird über NLS-Binde-Stellen im Kernporenkomplex sowie einem GTP Gradienten über die Kernhülle vermittelt. In Pflanzen sind allerdings einige Besonderheiten des Kernimportes zu beobachten. So existiert beispielsweise ein Importin  $\beta$ -unabhängiger Weg. Hinzu kommt ein einzigartiger Mechanismus, der einen Kernimport auch bei niedrigen Temperaturen wie 4°C ermöglicht. Zu den NLS-tragenden und damit Kern-importierten Proteinen zählen Zell-Zyklus-Regulatoren und Transkriptionsfaktoren. NLS sind typischer Weise reich an basischen Aminosäuren wie Argenin und Lysin. Sie sind in der Primärstruktur eines Proteins Positions-unabhängig und werden daher nach einem erfolgten Import auch nicht abgespalten (Smith & Raikhel, 1999). Dabei können sie als Einzel- oder in

mehreren Kopien unterschiedlicher NLS-Sequenzen innerhalb eines Kern-lokalisierten Protein vorliegen. Ein aktiver Kernimport eines Proteins kann durch ein einzelnes oder durch das Zusammenspiel mehrerer NLS-Motive bewirkt sein. Darüberhinaus können NLS auch innerhalb anderer Domänen liegen (Varagona & Raikhel, 1994). Insgesamt zeichnen sie sich durch eine hohe Diversität aus (Nakielny & Dreyfuss, 1999).

Innerhalb der WRKY6 Sequenz finden sich mehrere basische Regionen, die als mögliche funktionelle NLS entweder einzeln oder zusammen fungieren könnten. Der aktive Kernimport von WRKY6 wurde weder durch das für die Subgruppe Iib charakteristische basische Motiv 2 noch durch ein im N-terminalen Bereich des Proteins gelegenes typisches 'bipartite' NLS vermittelt. Das funktionelle NLS von WRKY6 konnte auf einen Bereich vor der N-terminalen Extension der WRKY Domäne eingengt werden. Eine Überlappung des NLS mit anderen funktionellen Bereichen von WRKY6 z.B. mit der DNA-bindenden WRKY-Domäne ist wie bei manchen Transkriptionsfaktoren nicht der Fall (Varagona & Raikhel, 1994). In dem charakterisierten funktionellen NLS-Bereich liegt vermutlich ein neuartige 'bipartite' Sequenz vor, das wie viele andere charakterisierte funktionelle NLS nicht den typischen Konsensus-Sequenzen entspricht (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Für einen Kernimport des WRKY6 Proteins sind wahrscheinlich keine multiplen NLS notwendig.

Typische Charakteristika von Transkriptionsfaktoren sind neben DNA-Binde-Regionen und NLS-Motive auch Dimerisierungs-, Transkriptionsregulations- und Phosphorylierungs-Bereiche. Dimerisierungen zwischen regulatorischen Proteinen haben eine grosse Bedeutung in der Beeinflussung und Kontrolle der transkriptionellen Genregulation. Durch die Bildung von Homodimeren, Heterodimeren oder gar Multimeren kann nicht nur die DNA-Binde-Spezifität, sondern auch die Affinität zu bestimmten *cis*-Elementen in Promotoren sowie der Kernimport verändert werden (Liu *et al.*, 1999). Dabei können die Dimerisierungsdomänen auch bei Faktoren innerhalb einer Genfamilie unterschiedlich sein. Diese grosse Vielseitigkeit lässt ein hohes Maß an kontrollierter Genexpression zu. Als Dimerisierungsdomäne besitzt WRKY6 einen klassischen Leucinzipper mit einer 'coiled-coil'-Struktur. Bisher ist diese Protein-Protein-Interaktionsdomäne ausschliesslich bei WRKY-Faktoren der Gruppe II (Subgruppe Iia und Iib) und der Gruppe III, die jeweils eine einzelne WRKY-Domäne tragen, gefunden worden (Eulgem *et al.*, 2000). Eine Beteiligung von WRKY-Faktoren an Protein-Komplexen konnte auch in Abhängigkeit von Leucinzipper-Motiven beobachtet werden (Cormack *et al.*, eingereicht). Da der isolierte Leucinzipper von WRKY6 zur Vermittlung von Dimerisierungen fähig war, sind für WRKY6 zusätzlich zu einer Einzel-Aktivität Protein-Protein-Wechselwirkungen mit sich selbst, mit anderen WRKY-Faktoren oder mit anderen regulatorischen Proteinen anzunehmen.

Darüber hinaus zeigte sich auch eine schwache transaktivierende Fähigkeit des isolierten Leucinzipfers, was durch eine N-terminale Überlappung einer der mehreren putativen Transkriptionsregulations-Domänen mit dem Leucinzipper-Motiv begründet war. WRKY6 wird daher vermutlich wie auch andere WRKY-Faktoren eine starke Transaktivierung bewirken (de Pater *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). Allerdings können WRKY-Faktoren alleine nicht immer eine Transaktivierung vermitteln (Hara *et al.*, 2000).

Post-translationale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen sind als Beeinflussung von Transkriptionsfaktor-Aktivitäten beschrieben und auch bei WRKY-Faktoren bekannt (Fukuda *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999). Zu einer möglichen Phosphorylierung des WRKY6 Proteins gab es nur den schwachen Hinweis einer nach Elizitor-Stimulation auftretenden Doppel-Bande. Ein solches Protein-Muster konnte aber ebenfalls in entsprechenden Experimenten mit *PcWRKY1* beobachtet werden (F. Turck & I.E. Somssich, persl. Mitteilung).

## 1.2 Transkriptionelle Regulation

WRKY6 unterliegt als typischer Transkriptionsfaktor selbst einer transkriptionellen Regulation. Die Analyse seines Expressionsverhaltens entwarf ein Bild hoher Komplexität, das sowohl räumlich und zeitlich bedingte Gewebe-spezifische Entwicklungen als auch bestimmte Stresssituationen umfasst. Die Vermittlung der transkriptionellen Kontrolle wird nicht von einem multifunktionellen *cis*-Element (Takeda *et al.*, 1999), sondern von multiplen *cis*-Elementen, die in verschiedenen Promotorbereichen von *WRKY6* lokalisiert sind (Gough *et al.*, 1995), getragen.

Der für die Blüten-spezifische Expression verantwortliche Bereich besitzt mit der Sequenz (-932 bp) **TTTTTGGTTTTATA** einen Bereich hoher Homologie zu einem als Antheren/Pollen-spezifisch charakterisierten Element aus dem Promotor des *TYKY* Gens, das für eine 28 kDa Untereinheit des mitochondrialen Komplexes I kodiert (Zabaleta *et al.*, 1998). Für die Antheren/Pollen-spezifische Expression von *WRKY6* könnte sich dieses *cis*-Element verantwortlich zeichnen. Bisher sind jedoch die daran bindenden *trans*-Faktoren unbekannt. Inwieweit die Expression im Stigma ebenfalls durch dieses oder durch ein noch nicht beschriebenes *cis*-Element hervorgerufen wurde, kann nicht beurteilt werden. Daneben enthält dieser Promotorbereich evtl. auch ein negatives *cis*-Element, denn nachfolgende Deletionen zeigten eine erhöhte Wund-Responsivität bei den Kontroll-Infiltrationen.

Auffälligstes Merkmal des Pathogen-responsiven Promotorbereiches sind drei aufeinanderfolgende *as1*-verwandte Elemente (-269bp) **TCGTCAACC** in der reversen



Orientierung sowie (-149bp) **ATGACGCAG** und (-137bp) **CTGACGTAA** (Rushton & Somssich, 1998). Funktionell sind sie mit Responsivitäten zu Auxin, Salicylsäure, Jasmonsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verbunden (Droog *et al.*, 1995; Guevara-García *et al.*, 1998; Chen & Singh, 1999). Eine darüber folgende Aktivierung einiger Pathogen-responsiver Gene legt eine Beteiligung dieses Elementes an der Pathogenabwehrreaktion nahe. In Übereinstimmung damit konnten für den kompletten *WRKY6* Promotor Salicylsäure- und Jasmonsäure-Responsivitäten festgestellt werden. Ob dafür allerdings ebenfalls dieser *asI*-Elemente umspannende Promotorbereich zuständig ist, bleibt offen. Die gleichfalls durch diesen Bereich vermittelte Expression in der Blütenorgan-Abscissionszone könnte an einer potentiellen Auxin-Induktion liegen, da während der Abscission eine Erhöhung der Auxin-Konzentration stattfindet. Als *trans*-Faktoren, die zu *asI*-Elementen binden, wurden bZIP-Faktoren identifiziert (Cheong *et al.*, 1998; Rushton & Somssich, 1998). Interaktionen von bZIP-Faktoren mit *asI*-verwandten Elementen sind an Promotoren Pathogen-responsiver Gene wie *PRI* beschrieben (Zhang *et al.*, 1999).

Der Wurzel- und Seneszenz-responsive Promotorbereich weist mit (-209bp) **ATGAAA-ATGAAA** in reverser Orientierung und als direkte Wiederholung Sequenzhomologien zu einer Wurzel-responsiven Region aus dem Promotor des *GRP1.8* Gens, das für ein Glycin-reiches Zellwand-Protein kodiert, auf (Keller & Baumgartner, 1991). Obwohl sich die Sequenzhomologien nur auf einen kurzen Bereich beschränken, ist es nicht auszuschliessen, dass die Wurzel-spezifische *WRKY6* Expression dadurch bedingt ist. Daran bindende Faktoren sind jedoch nicht bekannt. Daneben sind in dieser Region Sequenzen mit einigen Homologien zu einer als Seneszenz-spezifisch identifizierten Region des *SAG12* Promotors vorhanden (Noh & Amasino, 1999). Eine Funktionalität des Seneszenz-spezifischen Motivs ist jedoch aufgrund der nur sehr schwachen Sequenzhomologie fraglich. In diesem Promotorbereich finden sich aber auch die letzten beiden in Tandem arrangierten *asI*-Elemente (-150bp) **TGACG-n<sub>7</sub>-TGACG** und ein sich direkt daran angrenzendes Auxin-responsives Element. Die *WRKY6* Promotor-Aktivität in Wurzeln und während der Blattseneszenz könnte aufgrund der in diesen Geweben vorliegenden Konzentrationen an Salicylsäure und Auxin durchaus über die *asI*-Elemente vermittelt werden. Die *asI*-Elemente beinhalten aber auch die für W-Boxen typische Kernsequenz TGAC (Rushton & Somssich, 1998). W-Boxen sind funktionell als Elizitor-responsive Elemente charakterisiert. Allerdings benötigen sie für ihre Aktivität entweder eine Hexamer-Sequenz oder aber eine besondere Anordnung als Tandem bzw. als Palindrom, die auch in *WRKY* Promotoren selbst vorkommen kann (Rushton *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Eulgem *et al.*, 1999). Isolierte und multimerisierte W-Box-Elemente vermögen unter anderem eine Wurzel-spezifische Expression hervorzurufen (P.J. Rushton & I.E. Somssich, persl. Mitteilung). Sie sind daher vielleicht für die Wurzel- bzw. Seneszenz-Responsivität, nicht aber

für die Pathogen-Responsivität des *WRKY6* Promotors zuständig. Die an W-Boxen bindenden *trans*-Faktoren sind WRKY-Proteine. Eine Beteiligung von WRKY-Faktoren an der transkriptionellen Kontrolle von WRKY-Faktoren wurde in Form einer Autoregulation identifiziert (Eulgem *et al.*, 1999).

Trotz einer ermittelten Ethylen-Responsivität des *WRKY6* Promotors lassen sich in der Sequenz keine der klassischen GCC-Boxen erkennen, die als Ethylen-responsive *cis*-Elemente funktionell charakterisiert sind und in zahlreichen Ethylen-regulierten Genen vorkommen (Rushton & Somssich, 1998). Soweit untersucht, ist die Ethylen-Induzierbarkeit von *WRKY6* vermutlich nicht durch an GCC-Boxen bindende EREBP-Faktoren bedingt.

Bei der Regulation der *WRKY6* Expression könnten aber auch bisher nicht charakterisierte Gewebe- und Entwicklungs-spezifische *cis*-Elemente eine Rolle spielen. Sie könnte neben vielen unbekanntem Faktoren über Vertreter der bZIP- und evtl. der WRKY-Familie stattfinden. Möglicherweise sind dabei auch GT1-Faktoren, die einen Einfluss auf die Induzierbarkeit der *PR*-Genexpression ausüben, involviert (Buchel *et al.*, 1999). Insgesamt sind in der *WRKY6* Promotorsequenz neun GT1-Bindestellen vorhanden.

### 1.3 Expressionsverhalten

Das Expressionsverhalten ist bisher von wenigen WRKY-Faktoren und nur in Teilen analysiert worden. Dabei waren einige Gemeinsamkeiten mit den aus den *WRKY6* Expressionstudien entnommenen Daten zu vermerken. Besonders auffällig war bei *WRKY6* die starke und konstitutive Organ-spezifische Expression in der Wurzel. Für *WRKY*-Gene war eine Expression in Wurzeln nicht unbekannt, wie für *SPF1* und den *Arabidopsis* Vertreter *AtWRKY1/ZAPI* demonstriert wurde (Ishiguro & Nakamura, 1994; de Pater *et al.*, 1996). Letzterer zeigte auch eine Expression in Blüten. Ob diese aber ebenfalls wie die *WRKY6* Expression entsprechend dem Reifestadium der reproduktiven Organe zunächst in Fruchtblättern und dann in Staubblättern vorhanden war, wurde für *AtWRKY1/ZAPI* nicht näher untersucht. Weitere Blüten-spezifische Expressionen von *WRKY*-Genen sind anhand der in den Datenbanken vorhandenen zahlreichen Sequenzen von WRKY-Faktoren, die aus Ovulen von Tomatenpflanzen isoliert wurden, zu vermuten. Ähnlich dem Alters-abhängigen Expressionsmuster in Blüten verhielt sich die *WRKY6* Expression in der Blattentwicklung. Sie war dort erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt bemerkbar und konnte in eine frühe bis mittlere Phase der Blattseneszenz eingeordnet werden (Pontier *et al.*, 1999). Dabei folgte sie dem typischen Seneszenz-Verlauf einerseits von der Blattspitze zum Blattgrund und

andererseits sequentiell innerhalb der Rosette (Lohmann *et al.*, 1994; Gan & Amasino, 1997). Eine Rolle von WRKY-Faktoren in der Seneszenz war mit SE71 aus Gurke nicht unbekannt, da dieser aus seneszentem Pflanzenmaterial isoliert wurde (Kim *et al.*, 1997). Zusätzlich zu der starken Expression während der Blattseneszenz zeigte sich eine lokal begrenzte Seneszenz-assoziierte *WRKY6* Expression am Übergang Stiel/Schote, wobei es sich um die kollabierten Nektarien in der Abscissionszone der Blütenorgane handelte (Fordham-Skelton *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 2000).

Das Expressionsmuster von *WRKY6* war aber nicht nur bezüglich Entwicklungs- und Gewebespezifitäten, sondern auch bezüglich diverser Induktionsparameter mit Expressionen anderer WRKY-Faktoren vergleichbar. So konnte eine *WRKY6* Expression in grünen vegetativen Geweben wie z.B. Blätter, die normalerweise keine detektierbare *WRKY6*-Transkriptmengen aufwiesen, durch Verwundung induziert werden. Eine Wund-Responsivität wurde ebenfalls für *NtWIZZ* gefunden, die sowohl in lokalen als auch in systemischen Geweben einen sehr transienten Verlauf einnahm (Hara *et al.*, 2000).

Neben diesen beschriebenen Expressionsverhalten von *WRKY*-Genen war die überwiegende Zahl von *WRKY*-Faktoren jedoch aus pflanzlichen Abwehrreaktionen bekannt (Eulgem *et al.*, 2000). Dazu zählten *WRKY*-Vertreter in Abwehr-Prozessen nach Virus- (Yang *et al.*, 1999), Bakterien- (A. Dellagi & P. Birch, persl. Mitteilung) und *Phytophthora sojae*-Infektionen (Eulgem *et al.*, 1999). Bei *WRKY6* zeigte sich ebenfalls eine starke Pathogen-Responsivität. Da sie sowohl durch virulente als auch avirulente bakterielle Pathogene verursacht wurde, war sie von einer Resistenzgen-Avirulenzgen-Interaktion unabhängig. Nach Infektionen in einer inkompatiblen Interaktion war die *WRKY6* Expression durch eine lokale Begrenzung gekennzeichnet, die mit der ehemaligen Inokulationsstelle übereinstimmte. Solche lokale Expressionen entlang einer Infektionsstelle konnten auch bei *PcWRKY1* in einem Nicht-Wirtssystem beobachtet werden (Eulgem *et al.*, 1999). Darüber hinaus waren die Expressionen aller bisher isolierten *PcWRKY*-Faktoren in Behandlungen mit einem Peptid-Elizitor aus *Phytophthora sojae* beeinflusst (Rushton *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, eingereicht). Analog dazu war die *WRKY6* Expression durch einen Peptid-Elizitor aus *Pseudomonas syringae* stimulierbar. Ob die Expression dabei aber, ähnlich denen der *PcWRKY*-Gene, das Muster eines sogenannten früh-responsiven Gens mit einem sehr transienten Verlauf einnahm, bleibt offen. Die stimulierte *WRKY6* Expression in den genannten Prozessen unterlag, soweit analysiert, einer Beteiligung in den Signalwegen von Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen. Salicylsäure war schon als Induktor von *WRKY* Expressionen beschrieben (Yang *et al.*, 1999), dagegen war der Einfluss von Jasmonsäure und Ethylen unbekannt.

Insgesamt wies das recht komplexe Expressionsmuster von *WRKY6* nicht nur zahlreiche Komponenten auf, die ebenfalls bei anderen *WRKY*-Genen gefunden wurden, sondern spiegelte auch zahlreiche Expressions-Charakteristika von *PR*-Genen wieder. Dazu gehörte einerseits die Induktion der Genexpression sowohl durch avirulente als auch virulente Pathogene sowie die schnellere Transkriptakkumulation in der inkompatiblen Interaktion im Vergleich zur kompatiblen (Kombrink & Somssich, 1997). Allerdings konnte im Gegensatz zu vielen typischen *PR*-Genen keine *WRKY6* Expression in systemischen Geweben beobachtet werden (Ward *et al.*, 1991; Ukness *et al.*, 1992). Andererseits stehen *PR*-Genexpressionen häufig in Zusammenhängen mit anderen Stresssituationen. So zeigten Pathogen-responsive Proteine wie Thionine, Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glukanasen ebenfalls eine Wund-Responsivität (Vignutelli *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1993; Büchter *et al.*, 1997; Reymond & Farmer, 1998).

Darüber hinaus sind zahlreiche Seneszenz-assoziierte Proteine typische *PR*-Proteine wie z.B. *PR1*, Chitinasen,  $\beta$ -1,3-Glukanasen und Benzyl-Alkohol-Dehydrogenasen (Buchanan-Wollaston, 1997; Lers *et al.*, 1998; Quirino *et al.*, 1999). Seneszenz-assoziierte Gene sind häufig ebenfalls in Blüten exprimiert (Quirino *et al.*, 1999), da die reifen reproduktiven Organe wie Abscisionszonen zu den seneszenten Geweben gezählt werden (Bleecker & Patterson, 1997). Reproduktive Organe sind neben Wurzeln auch Orte der Expression von *PR*-Genen (Samac & Shah, 1991).

Die Expression vieler *PR*-Gene ist mit den Signalwegen von Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen assoziiert (Dong, 1998; Reymond & Farmer, 1998). Alle drei Hormone sind an Pathogenabwehrreaktionen beteiligt und können eine induzierte Expression von *PR*-Genen vermitteln (Ukness *et al.*, 1992; Vijayan *et al.*, 1998; Pieterse & van Loon, 1999). Diese Signalwege sind darüber hinaus eng mit der Wund-Abwehr verknüpft (Maleck & Dietrich, 1999; Nam, 1997). So ist die Expression einiger Wund-responsiver Gene durch Ethylen bzw. Jasmonsäure stimuliert (O'Donnell *et al.*, 1996; Titarenko *et al.*, 1997). Eine weitere Verbindung dieser Signalwege besteht zu Seneszenz- und Gewebereifungsprozessen (Bleecker & Patterson, 1997). Daher ist die Expression vieler Seneszenz-assoziiierter Gene durch Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen induzierbar (Tucker *et al.*, 1988; Park *et al.*, 1998; Quirino *et al.*, 1999). Wie viele Pathogen-responsive Gene kann *WRKY6* demnach als multiples responsives Gen betrachtet werden, das in miteinander verwandten Prozessen involviert ist.

## 1.4 Biologische Aufgaben

Aufgrund seines Expressionsverhaltens sowie seiner Einbindung in die beschriebenen Signalwege konnte *WRKY6* als typisches Pathogen- und Seneszenz-assoziiertes Gen identifiziert werden. Seneszenz und Pathogenabwehr sind beides mit einem Zelltod verbundenen Prozesse. Der programmierte Zelltod (PCD) ist Teil vieler pflanzlicher Entwicklungsprozesse und Stressabwehrreaktionen. Zu ersterem zählen neben der Entfernung des Aleurons, der Degenerierung des Suspensors, der Differenzierung von Tracheenelementen und der Wurzelhaube vor allem Ausreifung der reproduktiven Organe, Abscission und Seneszenz eines einzelnen Organs bzw. der gesamten Pflanze (Jones & Dangl, 1996; Yen & Yang, 1998; Lam *et al.*, 1999).

Seneszenz ist ein finales Entwicklungsstadium. Der Seneszenzprozess ist ein aktiver, geordneter und kontrollierter Mechanismus (Nam, 1997). Die seneszierenden Zellen weisen zahlreiche Veränderungen ihrer metabolischen Aktivitäten hin zu katabolischen Aktivitäten auf. Ein Anstieg besonders der hydrolytischen Aktivitäten dient in erster Linie der Remobilisierung von Nährstoffen sowie deren Transport in Speichergewebe. Damit einhergehend finden degenerative Prozesse statt, die einen Abbau von Membranen und damit von Organellen zusammen mit einem Verlust der photosynthetischen Aktivität bewirken. Im Fortlaufen der Seneszenz ist dann ein Abbau von Proteinen und RNA sowie eine DNA Fragmentierung zu verzeichnen (Buchanan-Wollaston, 1997; Yen & Yang, 1998; Pérez-Amador *et al.*, 2000). Neben grösseren Mengen an hydrolytischen Enzymen sind vor allem ein Anstieg an PR-Proteinen und bestimmten Sekundärstoffen wie z.B. Antioxidantien zu verzeichnen (Buchanan-Wollaston, 1997). Darüber wird einerseits eine massive Schädigung des seneszierenden Organs durch auftretende reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und damit einhergehend ein Verlust des kontrollierten Seneszenzprogrammes verhindert. Andererseits wird sowohl eine grössere Suszeptibilität des seneszierenden Organs für einen möglichen Pathogenbefall verringert, als auch vor allem eine weitere Ausbreitung des Pathogens in nicht-seneszierende Organe und damit in die gesamte Pflanze unterbunden. Dabei ist die erhöhte *PR*-Genexpression während der Seneszenz von einer Pathogen-Induktion unabhängig (Quririno *et al.*, 1999).

Der Seneszenzverlauf ist durch zahlreiche externe und interne Faktoren beeinflusst. Externe Faktoren sind überwiegend durch Witterung und Standort bestimmt. Als interne Faktoren verursachen Jasmonsäure und Ethylen einen fördernden Seneszenz-Effekt. In der Blütenseneszenz und der Fruchtreifung übernimmt Ethylen einen beschleunigenden Einfluss. Darüber hinaus sind aber gerade in Seneszenzprozessen noch weitere Hormone wie z.B. Cytokinin und Auxin involviert, wobei sie einen verzögernden Effekt auf den Seneszenzverlauf

ausüben (Gan & Amasino, 1995; Gan & Amasino, 1997; Quirino *et al.*, 1999). In den Abscisionszonen liegen dagegen erhöhte Auxingehalte vor. Neben den sogenannten klassischen Pflanzenhormonen kann eine Induktion der Seneszenz und damit die Expression einiger Seneszenz-assoziiierter Gene durch veränderte Zuckergehalte erreicht werden (Oh *et al.*, 1996; Thomas & de Villiers, 1996; Noh & Amasino, 1999; Dai *et al.*, 1999). Als ein zentraler Signalgeber in der Seneszenz ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beschrieben (Huang *et al.*, 1997). Dabei beschleunigen steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalte den Seneszenzprozess.

Als PCD in Stressabwehrreaktionen ist der lokale Zelltod bei der Pathogenabwehr, wie er während der hypersensitiven Reaktion (HR) auftritt, zu nennen (Lam *et al.*, 1999). HR ist an der Infektionsstelle mit einem transienten Anstieg von ROS, einer Expression von *PR*-Genen, einer Akkumulation von Sekundärstoffen (Phytoalexine) und einer Verfestigung der Zellwand verbunden. Darüber hinaus ist HR oft von einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) gegen ein breites Spektrum von Pathogenen begleitet. Der lokale Zelltod der HR ist eine typische Abwehrreaktion bei der Nicht-Wirts- und der 'Gen-für-Gen'-Resistenz, die durch sogenannte Resistenzgene vermittelt wird.

Als interne Faktoren kontrollieren Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen die Prozesse der Abwehrreaktionen und vermitteln eine *PR*-Genexpression (Dong, 1998; Reymond & Farmer, 1998; Glazebrook, 1999). Die Position der zentralen Signalgeber in der Pathogenabwehr und vor allem in der HR wird von  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS eingenommen (Somssich & Hahlbrock, 1998; Alvarez *et al.*, 1998; Scheel, 1998; Bolwell, 1999; Grant & Mansfield, 1999). Bei der Pathogenabwehr sind unter anderem erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme und ein Anstieg von ROS an der Auslösung von Signalkaskaden beteiligt, die eine induzierte Expression von *PR*-Genen hervorrufen. Dagegen sind Prozesse der HR ähnlich wie bei der Seneszenz durch Cytokinine unterdrückbar (Pontier *et al.*, 1999). Darüber hinaus sind Zucker auch als Induktoren der Expression von *PR*-Genen beschrieben (Herbers *et al.*, 1996; Sheen *et al.*, 1999). Eng mit der Pathogenabwehr assoziiert sind auch Wund-Prozesse (Dong *et al.*, 1998), die oft nicht nur durch einfache mechanische Verletzung bedingt, sondern mit Wurm-, Insekten- oder Pilzbefall verbunden sind.

Entwicklungs-spezifischer PCD und Stressabwehr-PCD sind durch einige Gemeinsamkeiten gekennzeichnet. Neben überlappenden Genexpressionen und internen Signalkomponenten zeigt sich makroskopisch in Chlorosis und Austrocknung der betroffenen Gewebe eine Verwandtschaft (Pontier *et al.*, 1999). Dahinter stehen möglicherweise einige gemeinschaftliche Schritte im Ablauf dieser Prozesse. Transkriptionsfaktoren wie WRKY6 lassen anhand ihrer gleichzeitig Seneszenz- und Pathogen-Responsivität regulatorische Beteiligungen in den überlappenden Prozessen des PCD von Seneszenz und Pathogenabwehr

vermuten. Beide PCD-Prozesse werden unter anderem durch Transkriptionsfaktoren kontrolliert (Dietrich *et al.*, 1997; Mayda, *et al.*, 1999).

Trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten sind beide PCD-Prozesse voneinander verschieden. Im Gegensatz zur Seneszenz ist der PCD während der HR ein sehr schneller und lokaler Zelltod. Möglicherweise kann dieser auch einen Seneszenzprozess in den der HR umgebenen Zellen auslösen (Pontier *et al.*, 1999). Darüber hinaus sind neben von einer HR-unabhängigen 'Gen-für-Gen'-Resistenz (Yu *et al.*, 1998) Mutanten bekannt, die HR-verwandte sogenannte spontane Lesionen aufweisen, zu denen aber kein verändertes Seneszenzverhalten beschrieben ist (Dietrich *et al.*, 1994; Rate *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 1999). Auch auf Ebene der Genexpression sind spezifisch Seneszenz-assoziierte und Pathogen-responsive Gene zu unterscheiden (Pontier *et al.*, 1999).

Obwohl *WRKY6* in diversen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen durchaus starke Expressionen zeigte, waren dort in den *WRKY6* Null-Mutanten keine offensichtlichen Aberrationen besonders bezüglich der beschriebenen PCD-Prozesse zu beobachten. Bei den EN- und DEL-Mutanten konnte nur ein äusserst subtiler, schwacher morphologischer mutanter Phänotyp beobachtet werden. In Übereinstimmung mit dem Ort der stärksten Wurzel-spezifischen Expression von *WRKY6*, der in der Wurzelhaarzone zu lokalisieren war, betraf der möglicherweise vorhandene mutante Phänotyp die Wurzelhaarentwicklung. Die Wurzelhaarentwicklung ist sowohl durch Ethylen als auch durch Auxin beeinflusst (Pitts *et al.*, 1998). Ethylen- und Auxin-responsive Mutanten sind in der Anlage und der Ausbildung ihrer Wurzelhaare verändert, was dem mutmaßlichen Phänotyp der EN- und DEL-Mutanten ähnlich ist. Für Ethylen ist gezeigt, dass es einen stimulierenden Effekt auf die *WRKY6* Promotor-Aktivität hat. Eine potentielle Auxin-Responsivität des *WRKY6*-Promotors kann aufgrund einer Expression in Abscisionszonen am Übergang Stiel/Schote sowie mutmaßlicher Auxin-responsiver *as1*-Elemente diskutiert werden.

Die Abwesenheit eines eindeutigen makroskopischen mutanten Phänotyps der *WRKY6* Null-Mutanten wurde vermutlich durch eine genetische/funktionelle Redundanz bedingt. Genetische Redundanz ist auch in Pflanzen ein all gegenwärtiges Phänomen (Scheres, 1998). Zusammen mit der repetitiven Natur vieler Entwicklungsprozesse und Stressabwehrreaktionen erfahren funktionelle Analysen eine erhöhte Komplexität. Dies betrifft besonders die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren. Da sie meist in grossen Multigenfamilien angelegt sind, deutet dies schon auf potentielle genetische Redundanzen einzelner Vertreter hin. Das Ausschalten eines einzelnen Transkriptionsfaktors kann zwar wie bei den Blütenidentitätsgenen einen offensichtlichen morphologischen mutanten Phänotyp verursachen, dennoch ist dies nicht immer die Regel. In einer statistischen Gegenüberstellung zusammen mit einer Bewertung der

Schwere eines 'knock-out' Phänotyps von Genen, deren Produkte bei der Signaltransduktion involviert sind, und Transkriptionsfaktoren wird deutlich, dass Mutanten von Transkriptionsfaktoren in der Regel weniger starke phänotypische Effekte als Mutanten von Signaltransduktionskomponenten bewirken (Doebley & Lukens, 1998). In der Mehrzahl sind bei ersteren keine bis schwach pleiotrope morphologische Phänotypen zu beobachten. Dagegen sind sie bei letzteren mehrheitlich moderat bis stark. Transkriptionsfaktoren sind daher im Laufe der Evolution vermutlich Objekte für Modifikationen.

Bei *WRKY6* handelt es sich um einen Vertreter einer grossen Transkriptionsfaktor-Multigenfamilie. Genetische/funktionelle Redundanz kann daher durchaus als Ursache für keinen offensichtlichen mutanten Phänotyp angesehen werden. Mit *WRKY42* existiert mindestens ein wahrscheinlicher Kandidat, da es in einer phylogenetischen Analyse der *AtWRKY*-Multigenfamilie zusammen mit *WRKY6* aufgrund eines 'bootstrep'-Werts von 100 % ein distinktes Paar bildet (Abb.36, s. S.119). *WRKY42* besitzt nicht nur zu *WRKY6* ähnliche Domänen in der gesamten Aminosäuresequenz, wodurch möglicherweise gleiche Zielgene angesprochen werden könnten. In der Promotorregion von *WRKY42* sind darüber hinaus *asI*-Elemente in einem ähnlichen Arrangement wie bei *WRKY6* vorhanden (Daten nicht gezeigt). Daraus könnten für *WRKY42* überlappende Expressionsmuster mit *WRKY6* resultieren.

Eine solche genetische/funktionelle Redundanz gilt aber nicht zwingend für alle *WRKY*-Faktoren, wie der morphologische Phänotyp der *ttg2/WRKY44* Null-Mutante verdeutlicht (Johnson & Smyth, 1998). Insgesamt sind noch acht weitere *WRKY* Null-Mutanten in *Arabidopsis* bekannt. Diese liegen in *WRKY7* und *11* (B. Lippok & I.E. Somssich, persl. Mitteilung), *WRKY10* und *48* (Tissier *et al.*, 1999), *WRKY47* (Parinov *et al.*, 1999) sowie *WRKY17*, *WRKY27* und in einem weiteren nicht spezifizierten *WRKY*-Gen (S. Kushnir, persl. Mitteilung). Zwei der letzten drei genannten *WRKY* Null-Mutanten sollen mutante Phänotypen zeigen (S. Kushnir, persl. Mitteilung). Allerdings ist die Abwesenheit eines eindeutigen mutanten Phänotyps der *WRKY6* Null-Mutanten keine Ausnahme. So sind auch bei den *WRKY7* und *WRKY11* Null-Mutanten keine offensichtlichen Phänotypen zu finden (B. Lippok & I.E. Somssich). Zu den meisten dieser Null-Mutanten fehlt jedoch eine Beschreibung eines möglichen mutanten Phänotyps.

Gegenüber dem vagen morphologischen Phänotyp der *WRKY6* Null-Mutanten war ein deutlicher mutanter Phänotyp der *35S::WRKY6* Linien sichtbar. Komplikationen bezüglich mutanter Phänotypen liegen bei ektopischen Überexpressionen von Transkriptionsfaktoren nicht in einer genetischen/funktionellen Redundanz, sondern können durch post-translationalen Regulationen bzw. durch fehlende Interaktionspartner bedingt sein, welche einen Effekt auf die



Aktivität eines Transkriptionsfaktors ausüben. Obwohl WRKY6 wahrscheinlich in Dimerisierungen mit anderen Faktoren involviert sein könnte, bewirkte seine alleinige konstitutive und ektopische Expression einen mutanten Phänotyp. Möglicherweise fanden aber unter diesen Bedingungen Protein-Protein-Interaktionen mit Faktoren statt, die in Wildtyppflanzen nicht auftraten.

Der mutante Phänotyp der 35S::*WRKY6* Linien zeigte sich in Gewebe- und Entwicklungsspezifische Stadien, bei denen in Wildtyppflanzen keine *WRKY6* Expression vorliegt, und war dazu noch von der Konzentration des *WRKY6*-Transkripts abhängig. Insgesamt war die volle Entwicklung der Blätter gehemmt, was zu verkleinerten Blättern und Rosetten führte. Inwieweit aber hier von einem typischen 'dwarf'-Phänotyp (Fridbog *et al.*, 1999) gesprochen werden kann, bedarf genauerer morphologischer und statistischer Analysen. Ebenso zeigten diese Pflanzen eine verkürzte vegetative Phase und damit eine Beschleunigung der Transition zur reproduktiven Phase. Da dabei die Anzahl der Rosettenblätter gegenüber Wildtyppflanzen nicht verringert war, handelte es sich nicht um einen klassischen 'early-flowering' Phänotyp (Reeves & Coupland, 2000; Hartmann *et al.* 2000). Daneben konnten in einigen Fällen auch Effekte, die das Sprosswachstum betreffen, beobachtet werden. Übereinstimmend damit waren die entsprechenden morphologischen Phänotypen der Komplementationspflanzen.

Ob nun diese morphologischen Effekte tatsächlich *WRKY6*-Funktionen oder Neben-Effekte anderer durch *WRKY6* verursachte Prozesse sind, ist nicht einfach zu beurteilen. Als Seneszenz-assoziiertes und Pathogen-responsives Gen kann eine Funktion von *WRKY6* in daran anlehnenden Prozessen postuliert werden. In Anlehnung daran verursachte die *WRKY6* Überexpression einen Einfluss auf die pflanzliche Pathogenabwehrreaktion. Bei Infektionen der 35S::*WRKY6* Pflanzen mit avirulenten Pathogenen konnte eine tendenziell erhöhte Suszeptibilität beobachtet werden. Möglicherweise stellte ein durch die *WRKY6* Überexpression hervorgerufenen ständiges Anschalten PCD-assoziiierter Signalwege den pflanzlichen Organismus unter eine dauerhafte Stresssituation. Dieser reagierte dann mit einem verringerten Wachstum sowie einem beschleunigtem Lebenszyklus. Solche Prozesse sind nicht unbekannt. Im Falle der *ssi1* Mutation, die im *npr1* Hintergrund eine konstitutive Expression von *PR*-Genen bewirkte, wurde zusätzlich ein Wachstumsphänotyp hervorrufen (Shah *et al.*, 1999). Als Neben-Effekt zeigte sich ein verringertes Blattwachstum und damit einhergehend eine verkleinerte Rosette. Ein entsprechender Wachstumsphänotyp war auch bei der *acd6* Mutante sichtbar, die in der Kontrolle von PCD-Prozessen inklusive Pathogenabwehr involviert ist (Rate *et al.*, 1999).

## 1.5 Zielgene

Bei den *WRKY6* Null-Mutanten konnte ein potentieller molekularer Phänotyp identifiziert werden. Dieser betraf veränderte Genexpressionen während der Blattseneszenz, bei der in Wildtyppflanzen eine starke *WRKY6* Expression festzustellen war. In den EN- und DEL-Mutanten waren die Expressionsmuster des Seneszenz-assoziierten Gens *SAG12* (Lohmann *et al.*, 1994), das vermutlich für eine Cystein-Protease kodiert, und des Pathogen-responsiven Gens *PRI* (Uknes *et al.*, 1992), noch unbekannter Funktion, verändert.

Das Expressionsmuster von *SAG12* verlief während der Blattseneszenz transient und hatte sein Maximum in mittleren bis fortgeschrittenen Stadien der Seneszenz, die in dieser Arbeit dem Stadium 3 entsprachen (Pontier *et al.*, 1999). In Wildtyppflanzen und in der DEL-Mutante war hier eine deutliche *SAG12* Transkriptakkumulation sichtbar, wobei die Expressionsunterschiede wahrscheinlich durch nicht ganz einheitliche Seneszenzstadien begründet waren. Dagegen war in der EN-Mutante keine *SAG12* Expression zu detektieren. Prinzipiell war aber eine *SAG12* Expression in der EN-Mutante möglich, wie sie an der Transkriptakkumulation im Seneszenzstadium 2 zu erkennen war. Dies könnte einerseits durch die unterschiedlichen genetischen Hintergründe zwischen den EN- und DEL-Mutanten hervorgerufen worden sein. Da die EN-Mutante eine instabile *WRKY6* Null-Mutante war, könnte dies im Falle einer tatsächlichen Beeinflussung des *WRKY6* 'knock-outs' auf die *SAG12* Expression durch sogenannte somatische Sektoren verursacht worden sein. Die ungleiche *SAG12* Expression in den beiden *WRKY6* Null-Mutanten läßt sich aber auch anhand der Art der *WRKY6* 'knock-outs' erklären. Obwohl in beiden Null-Mutanten kein *WRKY6*-Protein zu detektieren war, beruhte diese Gemeinsamkeit jedoch auf unterschiedlichen Ursachen. In der EN-Mutante war eine *WRKY6*-Transkriptakkumulation durch die *En-1* Insertion verhindert. Dies war dagegen in der DEL-Mutante, möglich. Aber durch den hier vorhandenen stabilen 'footprint' entstand ein fehlerhaftes *WRKY6*-Transkript, so dass die Translation nur eines etwa halb so grossen N-terminalen *WRKY6*-Proteins zulässig war. Obwohl ein solches verkürztes und möglicherweise instabiles *WRKY6*-Protein in der DEL-Mutante nicht nachgewiesen werden konnte, war dessen Akkumulation nicht auszuschliessen. Diesem verkürzten *WRKY6*-Protein würde zwar der funktionelle NLS-Bereich und die DNA-bindende *WRKY*-Domäne fehlen, besäße aber noch den Leucizipper. Eine Kernlokalisierung würde einerseits aufgrund seiner geringen Grösse durch einfache Diffusion und andererseits durch Dimerisierungen mit anderen Kern-importierten Faktoren möglich sein. Durch solche Dimerisierungen könnte die *SAG12* Expression in der DEL-Mutante betroffen sein.

Bei der veränderten *PRI* Expression verhielten sich beide *WRKY6* Null-Mutanten gegenüber Wildtyppflanzen gleich. Im Seneszenzstadium 2, das einem Stadium der beginnenden Seneszenz entsprach (Pontier *et al.*, 1999), zeigten die EN- und DEL-Mutanten eine deutliche Transkriptakkumulation von *PRI*, die dagegen bei Wildtyppflanzen nicht vorkam. Die nur in der DEL-Mutante vorhandene *PRI* Expression während des Seneszenzstadiums 3 könnte sich wie bei der *SAG12* Expression entweder auf nicht ganz einheitliche Seneszenzstadien, auf somatische Sektoren in der instabilen EN-Mutante oder aber auf Unterschiede im *WRKY6* 'knock-out' zwischen EN- und DEL-Mutanten begründen.

Diese veränderten Genexpressionen von *SAG12* und *PRI* beschreiben aber nicht nur den molekularen Phänotyp der EN- und DEL-Mutanten, sondern weisen darüber hinaus auf Kandidaten für potentielle Zielgene von *WRKY6* hin. Potentielle Zielgene von *WRKY6* sind durch ein mit der *WRKY6* Expression überlappendes Expressionsmuster gekennzeichnet. Dies trifft für Teile der Expressionsmuster von *SAG12* und *PRI* zu.

*SAG12* war nicht nur während der Blattseneszenz, sondern wie *WRKY6* auch in Blüten exprimiert (Quirino *et al.*, 1999). In Wurzeln war allerdings keine *SAG12* Expression vorhanden. Sie konnte im Gegensatz zur *WRKY6* Expression nicht durch Salicylsäure, Ethylen, Verdunklung, Verwundung und Pathogeninfektion gesteigert werden (Weaver *et al.*, 1998; Quirino *et al.*, 1999; Noh & Amasino, 1999; Pontier *et al.*, 1999). Eine Repression der *SAG12* Expression in seneszenten Blättern konnte durch Behandlungen mit Zucker, Cytokinin oder Auxin erreicht werden. Letzteres steht im Einklang mit einer Reduktion der gesamten Auxin-Konzentration in seneszenten Blättern, obwohl dabei der Anteil der freien Auxin-Konzentration steigt (Quirino *et al.*, 1999). Bezüglich der Blüten- und Seneszenz-spezifischen Expression könnte *SAG12* als mutmaßliches Zielgen von *WRKY6* betrachtet werden.

Als Pathogen-responsives Gen wies das Expressionsmuster von *PRI* viele Gemeinsamkeiten mit dem von *WRKY6* auf. Die *PRI* Expression war nach Infektionen mit avirulenten und virulenten Pathogenen induziert, die Viren, Bakterien und Oomyceten umfassten. Eine Entwicklungs-spezifische Expression während Seneszenzprozessen war nicht vorhanden. Die *PRI* Expression konnte durch Salicylsäure, nicht aber durch Jasmonsäure und Verwundung stimuliert werden (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992; Reymond & Farmer, 1998). Damit könnte *PRI* bezüglich der Pathogen-responsiven Expression durchaus als potentielles Zielgen von *WRKY6* gelten.

Inwieweit es sich aber bei *SAG12* und *PRI* um primäre oder sekundäre Zielgene handelt, ist offen. Da *WRKY*-Faktoren äusserst Sequenz-spezifisch an W-Boxen binden und dies somit ebenfalls für *WRKY6* anzunehmen ist, kann das Vorhandensein von W-Boxen in den entsprechenden Promotoren beider Gene ein Hinweis auf eine direkte Regulation durch

WRKY6 sein. Innerhalb der Promotorsequenz des *SAG12*-Gens lassen sich drei W-Boxen finden. Dabei handelt es sich um ein Palindrom-Motiv in der reversen Orientierung (-1587 bp), um ein Hexamer-Motiv ebenfalls in der reversen Orientierung (-1454 bp) sowie um ein weiteres Hexamer-Motiv (-1263 bp). Allerdings befindet sich keine dieser W-Boxen in dem Promotorbereich von -603 bp bis -571 bp, der sowohl die Seneszenz- als auch die Blüten-spezifische Expression vermittelt (Noh & Amasino, 1999). Daher ist WRKY6 wohl nicht direkt an der *SAG12* Expression während der Seneszenz und in Blüten beteiligt. In der Promotorregion zwischen -1354 bp und -1181 bp, der das Hexamer-Motiv bei -1263 bp trägt, ist aber ein sogenannter 'enhancer'-Bereich lokalisiert. Daher könnte die *SAG12* Expression in ihrer Quantität, nicht aber in ihrer Qualität direkt durch WRKY6 beeinflusst sein.

In der Promotorsequenz des *PR1*-Gens sind ebenfalls W-Boxen vorhanden. Bei -676 bp liegen ein Hexamer- sowie ein Palindrom-Motiv in einer Überlagerung vor. Beide sind funktionell als Salicylsäure-negative *cis*-Elemente charakterisiert. Das Hexamer-Motiv übernahm dabei den wesentlich stärkeren Einfluss (Lebel *et al.*, 1998). Daneben sind im *PR1*-Promotor bei -645 bp und bei -614 bp auch zwei Salicylsäure-positive *cis*-Elemente vorhanden. Das erste ist ein *as1*-Element, zu dem der bZIP-Faktor AHBP-1b bindet (Zhang *et al.*, 1999). Über Interaktionen mit NPR1 erfolgt dann vermutlich die Induktion der *PR1*-Genexpression durch Salicylsäure. Zusätzlich zu dieser NPR1-abhängigen Regulation existiert ein davon unabhängiger Weg über SSI1 (Shah *et al.*, 1999). Als negativer Regulator der *PR1* Expression fungiert SNI1 (Li *et al.*, 1999). SNI1 ist wie NPR1 ein Kern-importierter Faktor ohne offensichtliche DNA-Binde-Domäne. Analog zu NPR1 könnte die negative Regulation bezüglich der Salicylsäure-abhängigen *PR1* Expression über Interaktionen von SNI1 mit anderen Transkriptionsfaktoren erfolgen. Als Interaktionspartner sind dafür ebenfalls bZIP-Faktoren vorgeschlagen (Deprés *et al.*, 2000). Ihre Binde-Region befindet sich jedoch in dem bei -659 bp als sehr schwachem Salicylsäure-negativen identifizierten Element des *PR1*-Promotors (Lebel *et al.*, 1998). Da aber dramatische Effekte auf die Salicylsäure-negative Regulation des *PR1*-Promotors durch die die W-Box enthaltende Region bei -676 bp vermittelt werden, sind wahrscheinlich WRKY-Faktoren die Interaktionspartner von SNI1. Als ein Kandidat dafür könnte WRKY6 in Betracht gezogen werden. Einerseits besitzt WRKY6 eine Dimerisierungsdomäne, andererseits ist die *WRKY6* Expression durch Salicylsäure induzierbar. Darüber hinaus ist WRKY6 bei der negativen Regulation der *PR1*-Expression beteiligt, denn in Abwesenheit einer *WRKY6* Expression ist die von *PR1* stimuliert.

*PR*-Gene sind als potentielle Zielgene von WRKY-Faktoren nicht unbekannt, wobei die beteiligten WRKY-Faktoren im Gegensatz zu WRKY6 als positive Regulatoren beschrieben sind (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999). In diesem Kontext sind auch andere

Pathogen-responsive Gene Kandidaten als Zielgene von WRKY6. Dabei stehen *ELI3*, *THI2.1* und *PR5* zunächst aussen vor, da ihre Expression in den *WRKY6* Null-Mutanten gegenüber Wildtyppflanzen unverändert war. Nicht getestet wurden die Expressionsmuster von  $\beta$ -1,3-Glukanase- und Chitinase-Genen. Letztere bieten sich aber ebenfalls an, da einerseits WRKY-Faktoren an entsprechenden *cis*-Elementen eines korrespondierenden Promotors binden (Yang *et al.*, 1999). Andererseits ist das Expressionsmuster eines Chitinase-Gens dem von *WRKY6* sehr ähnlich, da es in Wurzeln und Antheren exprimiert sowie durch Pathogeninfektion und Salicylsäure induziert ist (Samac & Shah, 1991). Weitere Zielgen-Kandidaten könnten Seneszenz-assoziierte Metallothioneine sein, denn ihr Expressionsmuster umfasst neben PCD-Prozessen in Seneszenz, Verwundung, Pathogenabwehr auch Gewebe-Spezifitäten in Wurzeln und Blüte (Fordham-Skelton *et al.*, 1997; Butt *et al.*, 1998).

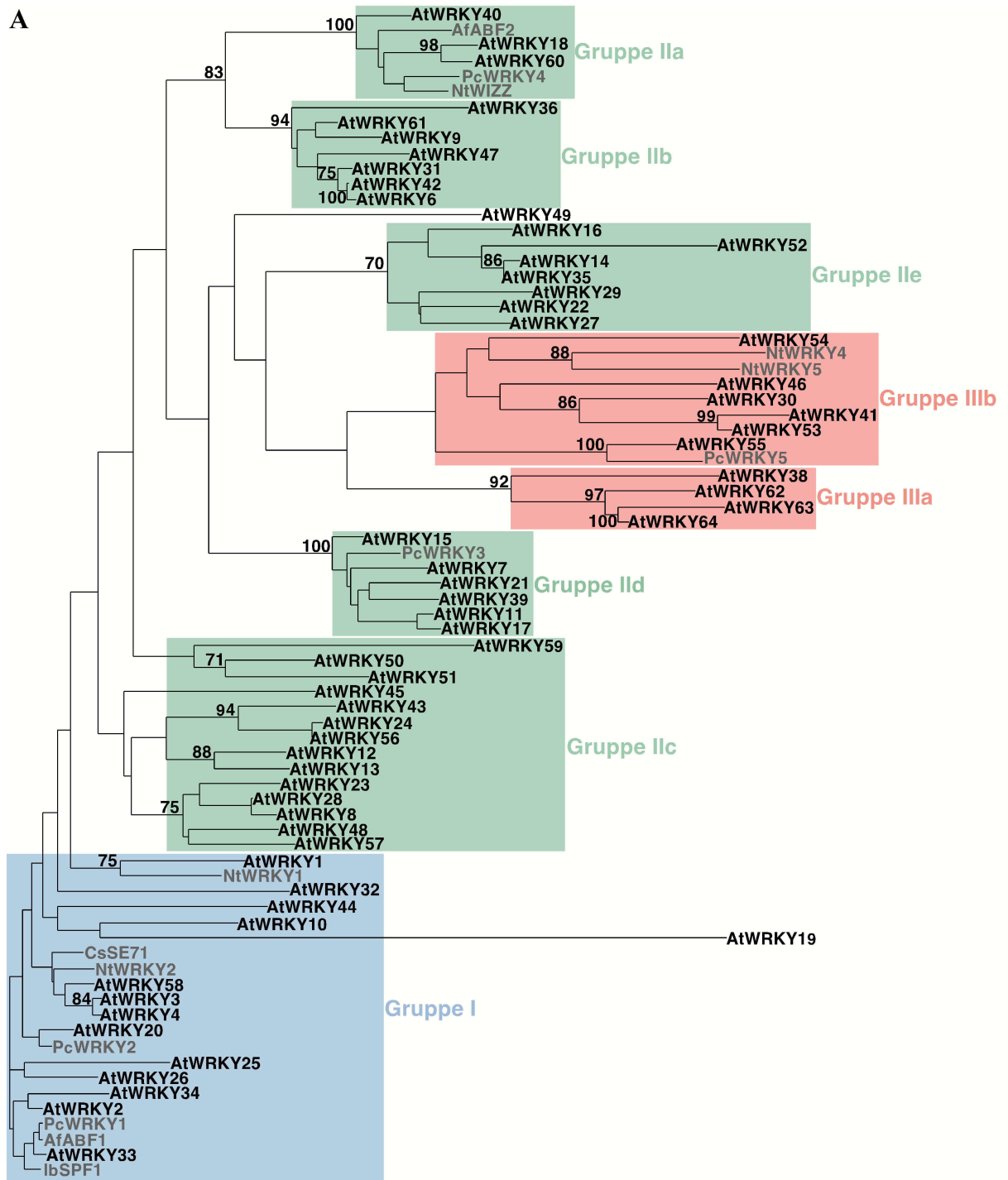
Insgesamt zeichnet sich ab, dass *WRKY6* überwiegend eine Stress-bezogene Funktion einnimmt, die in der Seneszenz und Pathogenabwehr möglicherweise mit PCD-Prozessen verbunden ist. Da die *WRKY6* Expression dem Seneszenzverlauf folgte und sich dabei auf die noch grünen Blattzellen beschränkte sowie bei Pathogeninfektionen in der inkompatiblen Interaktion auf den Bereich der HR begrenzt war, könnte *WRKY6* eine Rolle bei der Determinierung der Zellen, die an der Grenze zum PCD stehen, spielen (Mayda *et al.*, 1999). Vielleicht wurde ja gerade dieser Prozess in den 35S::*WRKY6* Linien gestört, was dann zu einer erhöhten Suszeptibilität führte. *WRKY6* könnte dabei als negativer Regulator fungieren. Daneben vermag *WRKY6* auch Gewebe-spezifische z.B. bezüglich der Wurzelentwicklung Funktionen auszuführen. Die unterschiedlichen Aufgaben von *WRKY6* benötigen neben einer äusserst strikten transkriptionellen Kontrolle auch Änderungsmöglichkeiten der Aktivität und Spezifität im Hinblick auf die unterschiedlichen potentiellen Zielgene. Dazu könnten einerseits Dimerisierungen mit verschiedenen Partnern führen. Andererseits könnten aber auch verschiedene post-translationale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen in Betracht gezogen werden, was aufgrund der unterschiedlichen *WRKY6*-Proteinmuster zwischen der Wurzel-charakteristischen *Arabidopsis*-Zellkultur ohne und mit Elizitor-Behandlung vermutet werden könnte.

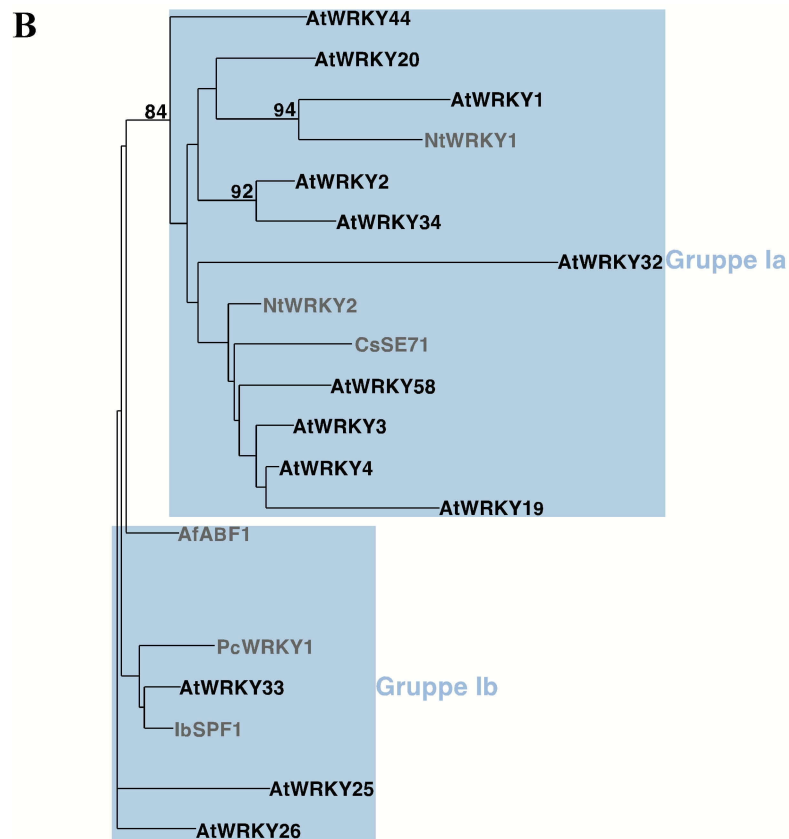
## 2. *AtWRKY*-MULTIGENFAMILIE

Die *AtWRKY*-Multigenfamilie umfasst schätzungsweise 100 Vertreter, von denen bisher 66 in Sequenz bekannt (Tab.4, s. S.151), meistens jedoch in Funktion unbekannt sind. Wie viele Genfamilien von Transkriptionsfaktoren sind sich die Sequenzen der einzelnen

Vertreter in ihrer DNA-Binde-Domäne sehr ähnlich, allerdings ausserhalb davon sehr verschieden (Liu *et al.*, 1999). Dennoch lassen trotz des hoch konservierten 'WRKYGQK' Peptids auftretende geringe Unterschiede in der WRKY-Domäne, die sowohl die komplette Sequenz, die Genstruktur als auch das Zink-Finger-Motiv einschliessen, Subgruppierungen der WRKY-Faktoren zu. Analysen zur Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Vertretern einer Multigenfamilie können zu funktionellen Charakterisierungen einzelner Faktoren beitragen.

In einer Phylogenie-Rekonstruktion basierend auf der einzelnen bzw. der C-terminalen WRKY-Domäne wurden Aufspaltungen der *At*WRKY-Multigenfamilie in diverse Subgruppen deutlich (Abb.36A). Dabei konnten die zuvor identifizierten Gruppierungen tendenziell bestätigt und weiter abgesichert werden (Eulgem *et al.*, 2000). Dazu gehörten insbesondere die Subgruppen IIa, IIb, IIc und IIe. Die Zuordnung von *At*WRKY49 in die Subgruppe IIc wurde in diesem Fall nicht gefunden. Desweiteren konnte eine Aufspaltung der Gruppe III in die zwei Subgruppen a und b festgehalten werden. Eine hier nicht weitere Untergliederung der Gruppe I wurde aber nach einer Betrachtung ihrer N-terminalen WRKY-Domänen möglich. In der Phylogenie-Rekonstruktion basierend auf den N-terminalen WRKY-Domänen war eine eindeutige Aufspaltung in zwei Subgruppen vorhanden (Abb.36B).





**Abb.36:** Phylogenetische Rekonstruktion der *AtWRKY*-Multigenfamilie (schwarz) inklusive publizierter WRKY-Faktoren (grau). **A** Rekonstruktion basierend auf den einzelnen WRKY-Domänen der Gruppe II und III sowie den C-terminalen WRKY-Domäne der Gruppe I. **B** Rekonstruktion der Gruppe I basierend auf den N-terminalen WRKY-Domänen. Grundlage für die Rekonstruktionen waren Sequenz-‘alignments’, die mit dem Programm PILEUP (‘default’ Parameter) aus dem GCG Paket Version 10.0 erstellt wurden. Die Rekonstruktionen wurden mit dem PHYLIP Programmpaket Version 3.55c (‘default’ Parameter, PAT1-Deyhoff Protein-Distanz Matrix) unter Benutzung des NEIGHBOR-JOINING Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) durchgeführt. Dabei erfolgten je 100 ‘bootstrep’-Replica. Die Darstellung wurde über das TREEVIEW Programm Versoin 4.5.1 (experimentell) gewonnen. Darin wurden signifikante ‘bootstrep’-Werte ab 70% eingefügt. Auftretende Subgruppierungen sind farblich unterlegt.

## 2.1 Biologische Aufgaben

Da WRKY Faktoren bisher ausschliesslich in Pflanzen bekannt sind, übernehmen sie vermutlich regulatorische Funktionen vor allem in rein Pflanzen-spezifischen Prozessen. Dabei legt die Mehrheit der funktionellen Analysen zu WRKY-Faktoren den Schluss nahe, dass sie Schlüsselpositionen in der pflanzlichen Pathogenabwehr einnehmen (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999; Cormack *et al.*, eingereicht; Wang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999). Sie sind aber auch in anderen Stresssituationen wie mechanischer Stress oder Verwundung involviert (Gus-Mayer *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2000). Dieses sind wie z.B. auch die



Degeneration der Aleuronschicht, die Ausreifung reproduktiver Organe, sowie Abscission und Seneszenz eng mit PCD verknüpfte Prozesse (Jones & Dangl, 1996; Lam *et al.*, 1999), in denen ebenfalls WRKY-Faktoren involviert sind (Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997).

WRKY6 ist als Vertreter der *AtWRKY*-Multigenfamilie mit seiner PCD-assoziierten Funktion keine Ausnahme. Eine Reihe von *AtWRKY*-Genen haben ein zu *WRKY6* vergleichbares Expressionsverhalten. So zeigten mit *AtWRKY2*, *3*, *4*, *7* und *11* weitere Vertreter der *AtWRKY*-Multigenfamilie eine Seneszenz-stimulierte Expression. Darüber hinaus waren die Expressionen von *AtWRKY3*, *7* und *11* vermutlich ebenfalls bei Pathogeninfektionen induziert. Zusätzlich dazu wiesen *AtWRKY4*, *7* und *11* auch gesteigerte Expressionen in Wurzeln auf. Eine Blüten-spezifische Expression war daneben ebenfalls bei *AtWRKY2* zu beobachten. Bei *AtWRKY20* war dagegen eine eher Schoten-spezifische Expression vorhanden.

In dem Sinne als Stress- und PCD-assoziierte Faktoren sind die mutmaßlichen Zielgene von WRKY-Faktoren gleichfalls in diesen Prozessen involviert. Darunter fallen *aAmy2* sowie *PR*-Gene wie *PcPRI*, *NtCHN50*, *NtPRI*, *HvLox1* und *StPRI10* (Rushton *et al.*, 1995; Rushton *et al.*, 1996; Lovegrove & Hooley, 2000; Eulgem *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Pappaioannou *et al.*, 1999; Rouster *et al.*, 1997; Després *et al.*, 1995). Solche primäre Zielgene von WRKY-Faktoren beinhalten in ihren Promotoren W-Boxen, an die WRKY-Faktoren Sequenz-spezifisch binden (Rushton & Somssich, 1998). Eine statistische Häufung von W-Boxen lässt sich in den Promotoren Pathogen-responsiver Gene aus *Arabidopsis* feststellen (J. Dangl & R.A. Dietrich, persl. Mitteilung). Gene, die analog mit *AtPRI* exprimiert werden, weisen durchschnittlich vier W-Boxen innerhalb den ersten 1 kb Promotorsequenz auf. Dagegen besitzen Gene, die diesem Expressionsmuster nicht folgen, durchschnittlich nur zwei W-Boxen. Erstere sind somit Kandidaten für potentielle Zielgene der *AtWRKY*-Multigenfamilie. Neben einer Funktion als Transkriptionsfaktoren von *PR*-Genen fallen *WRKY*-Gene wie z.B. *WRKY19* auf, die typische Charakteristika von Resistenzgenen aufweisen (Ellis & Jones, 1998; Gassmann *et al.*, 1999; Meyers *et al.*, 1999; Martin, 1999) und eine dementsprechende Rolle vermuten lassen.

Die Funktion von WRKY-Faktoren aber als eine generelle Beteiligung in Abwehrreaktionen zu betrachten, ist nicht angemessen. Immerhin existiert mit *ttg2* eine *AtWRKY* Null-Mutante, die durch einen eindeutigen Entwicklungs-spezifischen Phänotyp gekennzeichnet ist (Johnson & Smyth, 1998). Dieser mutante Phänotyp ist dem der *ttg1* Null-Mutante analog, die eine defekten WD40 'repeat' Faktor trägt (Walker *et al.*, 1999). Die Funktion von TTG1 liegt sowohl in der Differenzierung der Trichome als auch in der Festlegung des Trichom-Musters sowie in der Biosynthese von Anthocyanen. Dies wird durch ein Zusammenspiel mit GL1

erreicht, das dann die Faktoren TRY und CPC kontrolliert (Schnittger *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 1997). Möglicherweise nimmt TTG2/*AtWRKY44* daran Teil oder aber initiiert einen parallelen Mechanismus.

Dennoch steht momentan überwiegend die Stress-assoziierte Rolle der WRKY-Funktionen im Mittelpunkt. Dies führt zu der Annahme, dass die *AtWRKY*-Multigenfamilie schwerpunktmäßig in pflanzlichen Stressabwehrreaktionen involviert ist, obwohl die meisten funktionellen Daten WRKY-Faktoren aus anderen Pflanzenarten betreffen. Eine funktionelle Analyse der kompletten *AtWRKY*-Multigenfamilie wird diese These näher beleuchten. Die Identifizierung der biologischen Relevanz einzelner Vertreter sowie der gesamten *AtWRKY*-Multigenfamilie bedarf allerdings geeigneter Methoden. Ein erster Schritt wird dabei die Erstellung von Expressionsprofilen sein. Dies kann über traditionelle Northern-Techniken erfolgen (Kranz *et al.*, 1998). Entsprechendere Methoden wären aber die Analyse von Expressionsprofilen mittels RFDD (Fischer *et al.*, 1995) oder die Anwendung von 'high density filter' bzw. 'microarray' Techniken (Baldwin *et al.*, 1999). Diese können dann über Promotor-Reporter-Studien intensiviert werden. Identifikationen von *AtWRKY* Null-Mutanten mittels reverser Genetik sowie Herstellungen von *AtWRKY* überexprimierenden Linien ist ein weiterer Schritt. Über die intensive Charakterisierung solcher Pflanzen werden dann Einblicke in die biologischen Aufgaben von *AtWRKY* Faktoren gewonnen. Ein wichtiger Punkt bei der funktionellen Analyse von Transkriptionsfaktoren ist die Identifizierung von Zielgenen. Dies kann über vergleichende Analysen der *AtWRKY* Expressionsmuster mit 'gene trap enhancer' Linien geschehen (Sundaresan *et al.*, 1995) oder der Transkriptpopulationen von Null-Mutanten bzw. überexprimierenden Linien mit Wildtyppflanzen geschehen. Dazu bieten sich auch induzierbare Expressionssysteme an (Aoyama & Chua, 1997), die eine Differenzierung in primäre und sekundäre Zielgene ermöglichen (Sablowski & Meyerowitz, 1998; Bruce *et al.*, 2000). Ein alternativer Weg zur Identifizierung primärer Zielgene wäre auch die direkte Reinigung von Protein-DNA-Komplexen (Gould *et al.*, 1990; Grandori *et al.*, 1996; Orlando *et al.*, 1997).

Im Vergleich mit anderen Multigenfamilien von Transkriptionsfaktoren werden einige besondere Merkmale der *AtWRKY*-Multigenfamilie deutlich. Die *AtWRKY*-Multigenfamilie besticht durch die ausserordentlich hohe Konserviertheit eines Heptamer-Peptids, das der DNA-Binde-Struktur unmittelbar vorangestellt ist. Etwas Analoges taucht auch bei der Multigenfamilie der AP2/EREBP-Faktoren auf (Riechmann & Meyerowitz, 1998). Die DNA-Binde-Domänen der AP2/EREBP-Familie sind in zwei konservierte Bereiche aufgeteilt, von denen der C-terminale für die Ausbildung einer DNA-Binde-Struktur verantwortlich sein könnte. Eine solche Funktion ist bei den WRKY-Faktoren durch die Formierung des Zink-

Fingers ebenfalls im C-terminalen Bereich der DNA-Binde-Domäne abgedeckt. Der N-terminale Bereich der AP2/EREBP-Domäne könnte bei der direkten Kontaktaufnahme mit der DNA involviert sein. Möglicherweise gilt dies ebenfalls für das 'WRKYGQK' Peptid.

Zusammen mit der Multigenfamilie der AP2/EREBP-Faktoren ist auch bei den WRKY-Faktoren eine hohe Konserviertheit der *cis*-Elemente, an die diese Faktoren binden, bemerkenswert. WRKY-Faktoren zeigen eine hohe Sequenz-Spezifität zu W-Boxen (Rushton & Somssich, 1998). Dabei ist keine Bindung zu den *asI*-Elementen, die wie die W-Boxen das Sequenzkernmotiv TGAC tragen, festzustellen (Hara *et al.*, 2000). Ähnlich binden EREBP-Faktoren Sequenz-spezifisch an GCC-Boxen (Yamamoto *et al.*, 1999; Menke *et al.*, 1999). Innerhalb der EREBP-Subfamilie finden sich die CBF-Faktoren (Riechmann & Meryerowitz, 1998), die an DRE-Elemente binden (Stockinger *et al.*, 1997; Gilmour *et al.*, 1998). Beide *cis*-Elemente tragen ein CCG-Motiv, das bei ersteren in die Sequenz GCCGCC und bei letzteren in die Sequenz CCGAC eingebettet ist. Über Binde-Motive von Faktoren der AP2-Subfamilie ist bisher nichts bekannt. Die hohe Konserviertheit der W- und GCC-Boxen ist mit einer hohen Sequenz-spezifischen Bindung durch WRKY- bzw. EREBP-Faktoren verbunden. Die Vermittlung dieser Prozesse ist auf der anderen Seite durch eine hohe Konserviertheit in den jeweiligen DNA-Binde-Domänen begleitet. Dafür käme bei den EREBP-Faktoren der N-terminale Bereich der DNA-Binde-Domäne in Frage. Bei den WRKY-Faktoren ist die Sequenz-spezifische Bindung an die hoch konservierten W-Box möglicherweise durch das hoch konservierte 'WRKYGQK' Peptid bedingt. Vielleicht ist also das namensgebende Motiv der WRKY-Faktoren an einem Sequenz-spezifischen Kontakt zu DNA beteiligt.

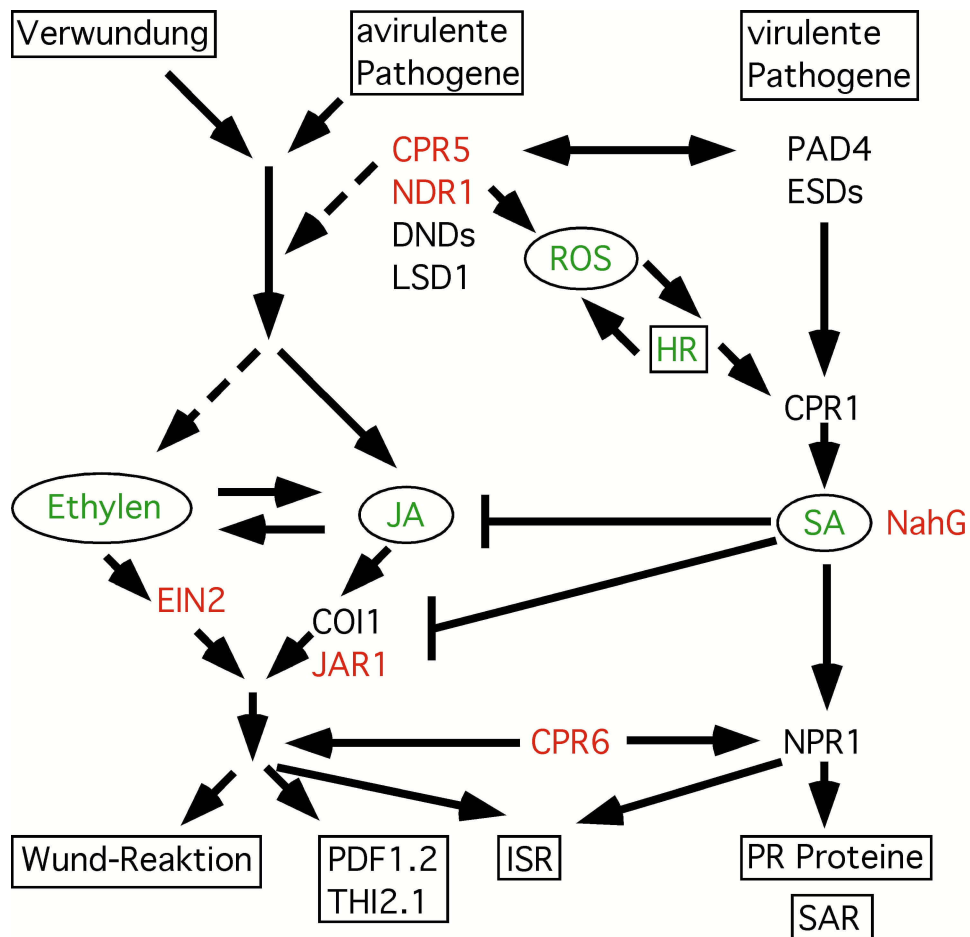
Eine ähnlich hohe Konserviertheit findet sich auch bei den Interaktionen von Faktoren der ARF-Multigenfamilie mit den Auxin-responsiven Elementen TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind die DNA-Binde-Motive der MYB-Faktoren sehr viel heterogener (Martin & Paz-Ares, 1997). Entsprechend ist die Art der Konserviertheit der DNA-Binde-Domäne angelegt, die eher auf ein bestimmtes Muster an konservierten Aminosäuren gewichtet ist. Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Funktionen der einzelnen MYB-Faktoren wieder. Die MYB-Multigenfamilie zeichnet sich insgesamt durch eine grosse Multifunktionalität aus (Jin & Martin, 1999). Dagegen können die Aufgaben der AP2/EREBP-Multigenfamilie in der Regel zwei verschiedenen Bereichen zugeordnet werden, was sich auch in einem strukturellen Unterschied wieder findet (Riechmann & Meyerowitz, 1998). Die AP2-Subfamilie, die Faktoren mit zwei DNA-Binde-Domänen umfasst, ist in der Entwicklung bestimmter Gewebe involviert. Die EREBP-Subfamilie, in der Faktoren mit einer einzelnen DNA-Binde-Domäne zusammengefasst sind, spielt eine Rolle bei der Stressabwehr. Inwieweit die WRKY-Multigenfamilie nun eine multifunktionelle Genfamilie ist oder doch nur ganz

bestimmte Funktionen übernimmt, wird die Zukunft aufdecken. Tendenziell ist ihre Funktion bisher aber als 'Stressabwehr-Genfamilie' zu bezeichnen. Vielleicht werden dann bestimmte Funktionen von einzelnen Subgruppen der WRKY-Superfamilie ähnlich wie bei der AP2/EREBP-Multigenfamilie getragen.

### 3. AUSBLICK

Die bisher vorliegenden Resultate bedürfen erweiterter und eingehender fortführender Experimente, die zum grossen Teil schon initiiert sind. Dies betrifft auf der einen Seite die transkriptionelle Regulation des *WRKY6*-Gens und auf der anderen Seite die Funktion des *WRKY6*-Faktors. Insgesamt ist dabei eine Bestätigung bisheriger sowie das Erlangen weiterer Ergebnisse angestrebt.

Anhand der Promotor-Deletionen konnten mindestens drei Bereiche voneinander getrennt werden, die verschiedene Expressionen des *WRKY6*-Gens vermitteln. Da es sich dabei aber um vorläufige Ergebnisse handelt, ist eine Wiederholung und Erweiterung dieser Analysen, die dann auch die Signalkomponenten Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen einschliesst, notwendig. Insbesondere sind aber auch Untersuchungen eines möglichen Auxin-Effektes auf die *WRKY6* Promotor-Aktivität angestrebt. Weitere detailliertere Promotor-Deletionen könnten dann zur Auflösung der 'hot spot'-Region und damit zur Identifizierung definierter *cis*-Elemente dienen. Daneben wird eine Einordnung von *WRKY6* in bekannte Signalwege der Pathogenabwehr erfolgen. Aufschluss wird darüber die Analyse der *WRKY6* Promotor-Aktivitäten von 6p::GUS, 6p3::GUS und 6p5::GUS in verschiedenen genetischen Hintergründen geben, die entweder einen Effekt auf Resistenz oder auf einen bestimmten Hormonsignalweg ausüben (B. Lippok & I.E. Somssich, persl. Mitteilung). Dafür wurden die Resistenz-Mutanten *ndr1* (Century *et al.*, 1995), *cpr5* und *cpr6* (Bowling *et al.*, 1994), und *npr1* (Delaney *et al.*, 1995) sowie die Ethylen-Mutante *ein2* (Alonso *et al.*, 1999), die Jasmonsäure-Mutante *jar1* (Staswick *et al.*, 1992) und die Salicylsäure-defizienten *nahG*-transgene Pflanzen (Gaffney *et al.*, 1993) ausgewählt, die eine großzügige Abdeckung der zum Teil parallelen und zum Teil miteinander vernetzten Signalwege in der Pathogenabwehr erlauben (Abb.37).



**Abb. 37:** Model der verschiedenen parallelen und miteinander verknüpften Signalwege in der pflanzlichen Pathogenabwehr (in Anlehnung an Dong, 1998). In Rot sind ausgewählte Mutanten zur Analyse der Signalwege, in denen *AtWRKY6* involviert ist, hervorgehoben.

Die *WRKY6* Funktion als möglicher direkter oder indirekter Regulator der Expressionen von *SAG12* und *PRI* und damit des molekularen Phänotyps der *WRKY6* Null-Mutanten EN und DEL bedarf einer Bestätigung. Anhand von analogen Expressionsanalysen der Komplementationspflanzen wird dieses geprüft werden. Für eine Verstärkung des morphologischen Phänotyps der *WRKY6* Null-Mutanten werden Doppel-‘knock-outs’ mit *WRKY42* in Betracht durchgeführt werden.

Darüber hinaus wird *PRI* als potentielles Zielgen von *WRKY6* näher beleuchtet werden. Dies findet anhand von Analysen der *PRI* Promotor-Aktivität in den genetischen Hintergründen der EN- und DEL-Mutanten sowie der 35S::*WRKY6* Pflanzen statt. Zusätzlich wird dabei der Effekt des *WRKY6* ‘knock-outs’ auf das Salicylsäure-negative Element des *PRI* Promotors untersucht. Im Mittelpunkt des Interesses stehen daher die *PRI* Promotor-Deletionen und – Mutationen 6D::*GUS*, -621::*GUS*, LS4::*GUS* und LS5::*GUS* (Lebel *et al.*, 1998). In Übereinstimmung damit wird auch eine mögliche Interaktion von *WRKY6* mit SNI, das in der negativen Regulation der *PRI* Genexpression involviert ist, getestet (X. Dong, persl.

Mitteilung). Da eine Autoregulation von WRKY-Faktoren bekannt ist (Eulgem *et al.*, 1999), wird ebenfalls die 6p::GUS Expression in den entsprechenden genetischen Hintergründen analysiert.

Weiterhin wird eine ausführlichere Charakterisierung des mutanten Phänotyps der 35S::WRKY6 Linien stattfinden. Dies wird sowohl einige statistische Auswertungen zur Absicherung des morphologischen Phänotyps als auch erneute Untersuchungen des Stress-Phänotyps nach Pathogeninfektionen inklusive einiger Genexpressionsanalysen umfassen. Die Suche nach potentiellen Zielgenen von WRKY6 wird dann durch eine vergleichende Transkriptanalyse von 35S::WRKY6 Linien und Wildtyppflanzen fortgesetzt werden.

Dazu wird trotz bisherigen Mißerfolgs wieder auf die RFDD-Technik zurück gegriffen werden. Verbesserungen und Optimierungen sind durchaus lohnenswert, da sie in ähnlichen Experimenten für das Erstellen von Expressionsprofilen und zur Identifizierung neuer Gene erfolgreich angewendet wurde (Bruce *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird die RFDD-Technik durch geringfügige Veränderungen ein neues Anwendungsgebiet erschliessen. Sie wird auf die Analyse Familien-spezifischer Expressionsprofile erweitert werden (Fischer *et al.*, 1995). Die Kombination mit WRKY-Domän-spezifischen Primern wird eine WRKY-Familien-spezifische Amplifikation erreichen. Nachträgliche Identifikation der Restriktionsfragmente und Zuordnung zu den korrespondierenden WRKY-Faktoren wird eine nahezu komplette Expressionsanalyse der WRKY-Familie ermöglichen. Solche WRKY-Familien-spezifischen Expressionsprofile können dann unter den verschiedensten Bedingungen erstellt werden.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

WRKY-Proteine bilden eine Pflanzen-spezifische Multigenfamilie von Transkriptionsfaktoren, deren Zahl in *Arabidopsis* gegenwärtig bei 66 identifizierten Vertretern liegt und schätzungsweise etwa 100 Vertreter insgesamt betragen wird. Alle Vertreter sind strukturell bis auf ihre hoch konservierte WRKY-Domäne sehr voneinander verschieden. Die WRKY-Domäne besteht als DNA-Binde-Domäne in ihrem C-terminalen Teil aus einem C-C-H-(H/C) Zink-Finger und ist in ihrem N-terminalen Teil durch das hoch konservierte und namensgebende Motiv 'WRKYGQK' noch unbekannter Funktion gekennzeichnet. WRKY-Faktoren binden Sequenz-spezifisch an W-Boxen. Funktionell sind Vertreter der WRKY-Multigenfamilie bei der Regulation diverser pflanzlicher Prozesse beteiligt. Dieses sind unter anderem Stress-assoziierte Prozesse in der Pathogenabwehr und Verwundung sowie Entwicklungs-spezifische Prozesse in der Trichom-Differenzierung und Samenkeimung. Obwohl zahlreiche Faktoren der *AtWRKY*-Multigenfamilie identifiziert sind, betreffen die bisher vorliegenden funktionellen Daten überwiegend Vertreter aus anderen Pflanzenarten. Insbesondere fehlt eine Kenntnis über die primären Zielgene von WRKY-Faktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diesen Fragen anhand eines Vertreters der *AtWRKY*-Multigenfamilie nachgegangen. Dabei konnten neue Informationen über Regulation und Funktion von WRKY6 gewonnen werden.

*WRKY6* ist in seiner genomischen Sequenz von 2,27 kb aus sechs Exons und fünf Introns zusammengesetzt. Es liegt im Genom als Einzel-Kopie-Gen vor und ist auf Chromosom I bei etwa 84 cM kartiert. Das korrespondierende Protein besteht aus 553 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 64 kDa. Als WRKY-Protein der Gruppe II besitzt es eine einzelne WRKY-Domäne, aufgrund deren Sequenz und Genstruktur eine Zuordnung in die Subgruppe IIb erfolgte. Im Konsens mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zeigte WRKY6 eine konstitutive Lokalisierung im Zellkern. Der für den Kernimport verantwortliche Bereich befindet sich N-terminal zur WRKY-Domäne und stellt ein neuartiges 'bipartite' NLS dar. Wie einige andere WRKY-Faktoren mit einer einzelnen WRKY-Domäne ist bei WRKY6 ein Leucinzipper-Motiv vorhanden, das zur Vermittlung von Dimerisierungen fähig war. Weiterhin wurden transaktivierende Eigenschaften von WRKY6 beobachtet. Darüber hinaus konnte ein Hinweis zur Regulation auf post-translationaler Ebene in Form von Phosphorylierungen gewonnen werden.

Dennoch liegt das Hauptgewicht bei der Regulation von WRKY6 auf der transkriptionellen Ebene. Die Expression von *WRKY6* zeichnet sich durch eine recht hohe Komplexität aus. Ein

etwa 1,2 kb grosses Promotor-Fragment war für die Vermittlung des kompletten Expressionsmusters ausreichend. In Promotor-Reporter-gen-Studien wurden Entwicklungsspezifische Expressionen in Wurzeln, im Stigma und Antheren/Pollen der Blüten, in kollabierten Nektarien an der Abscissionszone der Blütenorgane sowie während der sequentiellen Blattseneszenz deutlich. Stress-spezifische Expressionen waren nach Verwundung und Infektionen mit bakteriellen Pathogenen sowohl in der inkompatiblen als auch in der kompatiblen Interaktion zu beobachten. In den beiden ersten Prozessen war die Expression auf die betroffenen Stellen begrenzt. In Übereinstimmung mit diesem Expressionsmuster war die *WRKY6* Promotor-Aktivität durch einen bakteriellen Elizitor sowie durch die Signalkomponenten Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen induzierbar. Insgesamt war die *WRKY6* Expression überwiegend mit Zelltod-Prozessen assoziiert.

Die Multifunktionalität des *WRKY6* Promotors ist durch mehrere *cis*-Elemente bedingt, die in verschiedenen Bereichen des Promotors lokalisiert sind. Von besonderem Interesse sind dabei ein als Antheren/Pollen-spezifisch identifiziertes Element und eine als Wurzel-spezifisch charakterisierte Region. Beide liegen in den Promotor-Bereichen, die für die Vermittlung der entsprechenden Expressionen ausreichend sind. Daneben sind drei *as1*-Elemente einer 'hot spot' Region des *WRKY6* Promotors in den Blickpunkt gerückt, die bei den Stress-spezifischen Expressionen beteiligt sein könnten.

Für *WRKY6* konnten zwei unterschiedliche Null-Mutanten isoliert werden. In beiden Null-Mutanten war kein *WRKY6*-Protein zu detektieren, was bei einer der Mutanten durch die fehlende Akkumulation des *WRKY6* Transkripts begründet war. Dagegen war in der zweiten Mutante eine *WRKY6* Transkriptakkumulation festzustellen. Dabei handelte es sich jedoch um ein fehlerhaftes Transkript, das durch eine Verschiebung des Leserahmens theoretisch nur eine Translation eines N-terminalen *WRKY6*-Proteins der halben Grösse zulässt. Die *WRKY6* Null-Mutanten zeigten nur bezüglich der Wurzelmorphologie einen vagen mutanten Phänotyp. Daneben konnte aber ein mutmaßlicher molekularer Phänotyp für beide Mutanten identifiziert werden. Dieser betraf die Seneszenz-abhängige Expression zweier Gene, *SAG12* und *PRI*. Da sich in einem als 'Salicylsäure-negativ' identifizierten Element des *PRI* Promotors eine *W*-Box befindet, nimmt *WRKY6* möglicherweise an einer negativen Regulation der *PRI* Expression teil. Damit käme *PRI* auch als primäres Zielgen von *WRKY6* in Frage.

Gegenüber einem nur mutmaßlichen molekularen Phänotyp der *WRKY6* Null-Mutanten zeigten *WRKY6* Überexpressoren einen von der *WRKY6* Expression Konzentrations-abhängigen morphologischen mutanten Phänotyp. Dieser zeichnete sich vor allem durch kleinere Blätter und damit auch reduzierte Rosetten aus. Obwohl diese Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen die Transition von der vegetativen zur reproduktiven Phase zu einem früheren Zeitpunkt



erreichten, sind sie nicht als 'early flowering' Mutanten zu bezeichnen. Es hat eher den Anschein, dass dies Neben-Effekte einer ständigen Stresssituation der Pflanzen sind. Analog dazu war bei *WRKY6* Überexpressoren im Falle einer Infektion mit avirulenten Pathogenen eine erhöhte Tendenz hin zur Suszeptibilität festzustellen.

Abschliessend lässt sich formulieren, dass *WRKY6* sehr wahrscheinlich sowohl in Entwicklungs-spezifischen als auch in Stressabwehr-Prozessen der Pflanze involviert, dabei aber überwiegend an Zelltod-assoziierten Prozessen beteiligt ist. Damit gliedert sich *WRKY6* als Vertreter der *AtWRKY*-Multigenfamilie in die Reihe der aus anderen Pflanzen bekannten *WRKY*-Faktoren ein, die regulatorische Funktionen in diversen pflanzlichen Stressabwehrreaktionen ausüben.

---

## VII LITERATURVERZEICHNIS

- Alber, T. (1992) Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 2, 205-210.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284, 2148-2152.
- Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M. (1992) pBluescriptII: Multifunctional cloning and mapping vectors. *Meth. Enzymol.* 216, 483-508.
- Altschul, S.F. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Aoyama, T. and Chua, N.-H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11, 605-612.
- Appel, M., Bellstedt, D.U. and Gresshoff, P.M. (1999) Differential display of eukaryotic mRNA: meeting the demands of the new millennium. *J. Plant Physiol.* 154, 561-570.
- Ayers, A.R., Ebel, J., Valente, B. and Albersheim, P. (1976) Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57, 760-765.
- Bachem, C.W.B., van der Hoeven R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. and Vissier, R.G.F. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753.
- Baldwin, D., Crane, V. and Rice, D. (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 96-103.
- Barton K. and Scheres, B. (2000) Growth and development - Plants from genes: towards the information network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 13-16
- Baulcombe, D.C. (1999) RNA makes RNA makes no protein. *Curr. Biol.* 9, 599-601.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol. Biol. Genet.* 316, 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) New plant binary vector with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20, 1195-1197.

- Becker, W. and Apel, K. (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 189, 74-79.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W., Van Staveren, M., Stiekema, W., Drost, L., Ridley, P., Hudson, S.A., Patel, K., Murphy, G., Piffanelli, P., Wedler, H., Wedler, E., Wambutt, R., Weitzenegger, T. (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391, 485-488.
- Bischoff, F., Vahlkamp, L., Molendijk, A. and Palme, K. (2000) Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 42, 515-530.
- Biggin, M.M. and Tjian, R. (1989) A purified Drosophila homeodomain protein represses transcription *in vitro*. *Cell* 58, 433-440.
- Bleecker, A. and Patterson, S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *Plant Cell* 9, 1169-1179.
- Bodeau, J.P. and Walbot, V. (1992) Regulated transcription of the maize *Bronze-2* promoter in electroporated protoplasts requires the *Cl* and *R* gene products. *Mol. Gen. Genet.* 233, 379-387.
- Bolwell, G.P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 287-294.
- Bombliès, K., Dagenais, N. and Weigel, D. (1999) Redundant enhancers mediate transcriptional repression of AGAMOUS by APETALA2. *Developmental Biol.* 216, 260-264.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. and Dong, X.I. (1994) A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1845-1857.
- Bowman, J.L. (2000) The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 17-22.
- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B. and Bowen, B. (2000) Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *Plant Cell* 12, 65-79.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48, 181-199.
- Buchel, A.S., Brederode, F.T., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. (1999) Mutation of GT-1 binding sites in the *Pr-IA* promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. *Plant Mol. Biol.* 40, 387-396.
- Büchter, R., Strömberg, A., Schmelzer, E. and Kombrink E. (1997) Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol. Biol.* 35, 749-761.

- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J.T. and Buchanan-Wollaston, V. (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 16, 209-221.
- Cardon, G.H., Frey, M., Saedler, H. and Gierl, A. (1993) Mobility of the maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3, 773-784.
- Century, K.S., Holub, E.B. and Staskawicz, B.J. (1995) *NDR1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6597-6601.
- Chen, C. and Chen, Z. (2000) Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42, 387-396.
- Chen, W. and Singh, K.B. (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis GST6* promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J.* 19, 667-677.
- Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Park, J.M., Ryu, G.R., Goekjian, V.H., Nagao, R.T., Key, J.L., Cho, M.J. and Hong, J.C. (1998) STF1 is a novel TGACG-binding factor with a zinc-finger motif and a bZIP domain which heterodimerizes with GBF proteins. *Plant J.* 15, 199-209.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cockell, M. and Gasser, S.M. (1999) Nuclear compartments and gene regulation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 9, 199-205.
- Cohen, C. and Parry, D.A.D. (1994)  $\alpha$ -helical coiled-coils: more facts and better predictions. *Science* 263, 488-489.
- Comelli, P., König, J. and Werr, W. (1999) Alternative splicing of two leading exons partitions promoter activity between the coding regions of the maize homeobox gene *Zmhox1a* and *Trap* (transposon-associated protein). *Plant Mol. Biol.* 41, 615-625.
- Consonni, G., Geuna, F., Gavazzi, G. and Tonelli, C. (1993) Molecular homology among members of the *R* gene family in maize. *Plant J.* 3, 335-346.
- Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Köchner, P., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (2000) A novel type of WRKY protein widens the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. Eingereicht.
- Creusot, F., Fouilloux, E., Dron, M., Lafleurriel, J., Picard, G., Billault, A., Le Paslier, D., Cohen, D., Chaboue, M.D., Durr, A. et al. (1995) The CIC library: a large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8, 763-770.

- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A. and Granot, D. (1999) Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11, 1253-1266.
- Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H. and Schwarz-Sommer, Z. (1999) *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two Antirrhinum MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18, 4023-4034.
- de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J. and Kijne, J. (1996) Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 24, 4624-4631.
- Dehesh, K., Smith, L.G., Teppermann, J.M. and Quail, P.H. (1995) Twin autonomous bipartite nuclear localization signals direct nuclear import of GT-2. *Plant J.* 8, 25-36.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. and Ryals, J.A. (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6602-6606.
- Dellagi, A., Avrova, A., Heilbronn, J., Montesano, M., Toth, I., Lyon, G. and Birch, P. (1999) Isolation and characterisation of signaling genes induced by *Erwinia carotovora* in potato. *Abstract, 9<sup>th</sup> International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*, Amsterdam, NL 97.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. and Fobert, P.R. (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12, 279-290.
- Després, C., Subramaniam, R., Matton, D.P. and Brisson, N. (1995) The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* 7, 589-598.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A. and Dangl, J.L. (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77, 565-577.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C. and Dangl, J.L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88, 685-694.
- Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4, 394-400.
- Doebley, J. and Lukens, L. (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* 10, 1075-1082.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.

- Droog, F., Spek, A., van der Kooy, A., de Ruyter, A., Hoge, H., Libbenga, K., Hooykaas, P. and van der Zaal, B. (1995) Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes *Nt103-1* and *Nt103-35*. *Plant Mol. Biol.* 29, 413-429.
- Ehltling, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. and Kombrink, E. (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* 19, 9-20.
- Ellis, J. and Jones, D. (1998) Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 288-293.
- Estojak, J., Brent, R. and Golemis, E.A. (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5820-5829.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5, 199-206.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1999) Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18, 4689-4699.
- Farabaugh, P.J. (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274, 765-769.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265-276.
- Fernandez, D.E., Heck, G.R., Perry, S.E., Patterson, S.E., Bleecker, A.B. and Fang, S.-C. (2000) The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically: inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12, 183-197.
- Fischer, A., Saedler, H. and Theissen, G. (1995) Restriction fragment length polymorphism-coupled domain-directed differential display: a highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5331-5335.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fordham-Skelton, A.P., Lilley, C., Urwin, P.E. and Robinson, N.J. (1997) GUS expression in *Arabidopsis* directed by 5' regions of the pea metallothionein-like gene *PsMTA*. *Plant Mol. Biol.* 34, 659-668.
- Foster, T., Yamaguchi, J., Wong, B.C., Veit, B. and Hake, S. (1999) *Gnarley1* is a dominant mutation in the *knox4* homeobox gene affecting cell shape and identity. *Plant Cell* 11, 1239-1252.

- Fridborg, I., Kuusk, S., Moritz, T. and Sundberg, E. (1999) The Arabidopsis dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* 11, 1019-1031.
- Fromm, H., Katagiri, F. and Chua, N.-H. (1989) An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts. *Plant Cell* 1, 977-984.
- Fukuda, Y. (1997) Interaction of tobacco nuclear proteins with an elicitor-responsive element in the promoter of a basic class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.* 34, 81-87.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Gan, S. and Amasino, R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.
- Gan, S. and Amasino, R.M. (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113, 313-319.
- Gassmann, W., Hinsch, M.E. and Staskawicz, B.J. (1999) The Arabidopsis *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the *TIR-NBS-LRR* family of disease-resistance genes. *Plant J.* 20, 265-277.
- Gellon, G. and McGinnis, W. (1998) Shaping animal body plans in developmental and evolution by modulation of *Hox* expression patterns. *BioEssays* 20, 116-125.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M. and Thomashow, M.F. (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J.* 16, 433-442.
- Glazebrook, J. (1999) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286.
- Golz, J.F. and Hudson, A. (1999) Plant development: YABBYs claw to the fore. *Curr. Biol.* 9, R861-R863.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 277-284.
- Gough, C., Hemon, P., Tronchet, M., Lacomme, C., Marco, Y. and Roby, D. (1995) Developmental and pathogen-induced activation of an *msr* gene, *str 246C*, from tobacco involves multiple regulatory elements. *Mol. Gen. Genet.* 247, 323-337.
- Gould, A.P., Brookman, J.J., Strutt, D.I. and White, R.A.H. (1990) Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature* 348, 308-312.

- Grandori, C., Siëbelt, F., Ayer, D.E. and Eisenman, R.N. (1996) Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. *EMBO J.* 15, 4344-4357.
- Grant, M. and Mansfield, J. (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 312-319.
- Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.-C., Afonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C. and Galbraith, D.W. (1997) Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.* 11, 573-586.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M.A. and Gagliano, W.B. (1998) Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science* 280, 446-450.
- Guevara-García, A., López-Ochoa, L., López-Bucio, J., Simpson, J. and Herrera-Estrella, L. (1998) A 42 bp fragment of the *pmas1'* promoter containing an *ocs*-like element confers a developmental, wound- and chemically inducible expression pattern. *Plant Mol. Biol.* 38, 743-753.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K. and Schmelzer, E. (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8398-8403.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chetkov, H. and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803.
- Hahlbrock, K., Lamb, C.J., Purwin, C., Ebel, J., Fautz, E. and Schäfer, E. (1981) Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Induction of enzymes of general phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiol.* 67, 768-773.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557.
- Hanfrey, C., Fife, M. and Buchanan-Wollaston, V. (1996) Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 30, 597-609.
- Hara, K., Yagi, M., Kusano, T. and Sano, H. (2000) Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor on wounding. *Mol. Gen. Genet.* 263, 30-37.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. and Huijser, P. (2000) Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.* 21, 351-360.
- Hempel, F.D., Welch, D.R. and Feldmann, L.J. (2000) Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends Plant Sci.* 5, 17-21.
- Herbers, K., Meuwly, P., Métraux, J.-P. and Sonnewald, U. (1996) Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Letters* 397, 239-244.



- Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (1995) Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 734-738.
- Hicks, G.R., Smith, H.M.S., Shieh, M. and Raikhel, N.V. (1995) Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol.* 107, 1055-1058.
- Hobbs, S.L.A., Warkentin, T.D. and Delong, C.M.O. (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* 21, 17-26.
- Hobo, T., Kowyama, Y. and Hattori, T. (1999) A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15348-15353.
- Hoecker, U., Vasil, I. and McCarty, D.R. (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of *Viviparous-1* of maize. *Genes Dev.* 9, 2459-2469.
- Huang, F.-Y., Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Callaham, D.A., Sabato, R., Zelcer, A. and Hepler, P.K. (1997) Increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. *Plant Physiol.* 115, 51-60.
- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y. and Ma, H. (1996) DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* 8, 81-94.
- Ishiguro, S. and Nakamura, K. (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 244, 563-571.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- Jin, H. and Martin, C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* 41, 577-585.
- Johnson, C.S. and Smyth, D.R. (1998) The *TTG2* gene of Arabidopsis encodes a WRKY family transcription factor that regulates trichome development and the production of pigment and mucilage in seed coats. *Abstract, 9<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research*, June 24 - 28, 1998; Madison, WI, USA 186.
- Jones, A.M. and Dangl, J.L. (1996) Logjam at the styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* 1, 114-119.
- Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11, 2291-2301.
- Kang, H.-G., Fang, Y. and Singh, K.B. (1999) A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *Plant J.* 20, 127-133.

- Kang, H.-G. and Singh, K.B. (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, Arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.* 21, 329-339.
- Ke, S.-H. and Madison, E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucl. Acids Res.* 25, 3371-3372.
- Keller, B. and Baumgartner, C. (1991) Vascular-specific expression of the bean *Grp-1.8* gene is negatively regulated. *Plant Cell* 3, 1051-1061.
- Kim, D.-J., Smith, S.M. and Leaver, C.J. (1997) cDNA encoding a putative SPF1-type DNA-binding protein from cucumber. *Gene* 185, 265-269.
- Kombrink, E. and Hahlbrock, K. (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.* 81, 216-221.
- Kombrink, E. and Somssich, I.E. (1997) Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *The Mycota Part A, Plant Relationships*, V (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds). Berlin: Springer-Verlag, 107-128.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986) The promoter of *TL-DNA* gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Korfhage, U., Trezzini, G.F., Meier, I., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6, 695-708.
- Kornberg, R.D. (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol.* 9, M46-M49.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. and Weisshaar, B. (1998) Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 263-276.
- Kubo, H., Peeters, A.J.M., Aarts, M.G.M., Pereira, A. and Koorneef, M. (1999) *ANTHOCYANINLESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 1217-1226.
- Kunst, L., Lenz, J.E., Martinez-Zapater, J. and Haughn, G.W. (1989) *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 1, 1195-1208.
- Lam E., Pontier, D. and del Pozo, O. (1999) Die and let live - programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 502-507.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.

- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. and Ward, E. (1998) Functional analysis of the regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* 16, 223-233.
- Lee, M.M. and Schiefelbein, J. (1999) *WEREWOLF*, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 99, 473-483.
- Lers, A., Jiang, W.B., Lomaniec, E. and Aharoni, N. (1998) Proteins functionally and immunogenically related to pathogenesis-related proteins are induced during parsley leaf senescence. *Physiol. Plant.* 103, 497-502.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y. and Dong, X. (1999) Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, *SNII*, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* 98, 329-339.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Liebecq, C., ed. (1978) Biochemical nomenclature and related documents. *International Union for Biochemistry*. The biochemical Society, London.
- Liu, L., White, M.J. and MacRae, T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 262, 247-257.
- Lohmann, K.N., Gan, S., John, M.C. and Amasino, R.M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92, 322-328.
- Lovegrove A. and Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5, 102-110.
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. and Chaudhury, A.M. (1999) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 296-301.
- Maleck, K. and Dietrich, R.A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215-219.
- Martin, C. and Paz-Ares, J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* 13, 67-73.
- Martin, G.B. (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 273-279.
- Mascarenhas, J.P. and Hamilton, D.A. (1992) Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a *CaMV* 35S-GUS construct. *Plant J.* 2, 405-408.
- Mayda, E., Tornero, P., Conejero, V. and Vera, P. (1999) A tomato homeobox gene (*HD-ZIP*) is involved in limiting the spread of programmed cell death. *Plant J.* 20, 591-600.

- McCarty, D., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M. and Vasil, I.K. (1991) The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66, 895-905.
- McClure, B.A. and Guilfoyle, T. (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol. Biol.* 9, 611-623.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.-H. and Staskawicz, B. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic Arabidopsis induces hypersensitive cell death. *Plant J.* 14, 247-257.
- Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H.D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeeckens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulmann, E., Tissier, A.F., Bouchez, D., Jones, J.J.D., Pereira, A., Wismann, E. and Bevan, M. (1999) Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* 11, 1827-1840.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W. and Memelink, J. (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* 18, 4455-4463.
- Meyerowitz, E. (1999) Plants, animals and the logic of development. *TCB, TIBS, TIG* Millennium issue, M65-M68.
- Meyers, B.C., Dickermann, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W. and Young, N.D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20, 317-332.
- Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11, 949-956.
- Molina, A., Volrath, S., Guyer, D., Maleck, K., Ryals, J. and Ward, E. (1999) Inhibition of protoporphyrinogen oxidase expression in Arabidopsis causes a lesion-mimic phenotype that induces systemic acquired resistance. *Plant J.* 17, 667-678.
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99, 677-690.
- Nam, H.G. (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 200-207.
- Naya, F.J., Wu, C., Richardson, J.A., Overbeek, P. and Olson, E. (1999) Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development* 126, 2045-2052.

- Noh, Y.-S. and Amasino, R.M. (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Mol. Biol.* 41, 181-194.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J. (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274, 1914-1917.
- Oh, S.A., Lee, S.Y., Chung, I.K., Lee, C.-H. and Nam, H.G. (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 30, 739-754.
- Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (1999) Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11, 407-415.
- Orlando, V., Strutt, H. and Paro, R. (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods, Companion Methods Enzymol.* 11, 205-214.
- Pappaioannou, D., Pino, P., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. (1999) Characterization of transcription factors involved in the expression of the *PR-IA* gene of tobacco. *Abstract, 9<sup>th</sup> International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*, Amsterdam, NL 95-96.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. and Weigel, D. (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395, 561-566.
- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W.-C., Kumaran, M. and Sundaresan, V. (1999) Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2263-2270.
- Park, J.-H., Oh, S.A., Kim, Y.H., Woo, H.R. and Nam, H.G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 37, 445-454.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D. and Harberd, N.P. (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400, 256-261.
- Pérez-Amador, M.A., Abler, M.L., De Rocher, E.J., Thompson, D.M., van Hoof, A., LeBrasseur, N.D., Lers, A. and Green, P.J. (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122, 169-179.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52-58.

- Pirotta, V. (1998) Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* 93, 333-336.
- Pitts, R.J., Cernac, A. and Estelle, M. (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *Plant J.* 16, 553-560.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D. and Lam, E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.* 39, 1243-1255.
- Quirino, B.F., Normanly, J. and Amasino, R.A. (1999) Diverse range of gene activity during Arabidopsis thaliana leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* 40, 267-278.
- Ramachandran, S., Hiratsuka, K. and Chua, N.-H. (1994) Transcription factors in plant growth and development. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4, 642-646.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S. and Greenberg, J.T. (1999) The gain-of-function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11, 1695-1708.
- Reeves P.H. and Coupland, G. (2000) Responses of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 37-42.
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. and Maas, C. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5888-5893.
- Reindl, A., Schöffl, F., Schell, J., Koncz, C. and Bakó, L. (1997) Phosphorylation by a cyclin-dependent kinase modulates DNA binding of the Arabidopsis heat-shock transcription factor HSF1 *in vitro*. *Plant Physiol.* 115, 93-100.
- Reymond, P. and Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404-411.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol.Chem.* 379, 633-646.
- Rouster, J., Leah, R., Mundy, J. and Cameron-Mills, V. (1997) Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J.* 11, 513-523.
- Ruan, Y., Gilmore, J. and Conner, T. (1998) Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J.* 15, 821-833.

- Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M. and Hooley, R. (1995) Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis*-element in the promoters of  $\alpha$ -Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* 29, 691-702.
- Rushton, P.J. and Somssich, I.E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 311-315.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PRI* genes. *EMBO J.* 15, 5690-5700.
- Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92, 93-103.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Samac, D.A. and Shah, D.M. (1991) Developmental and pathogen-induced activation of the Arabidopsis acidic chitinase promoter. *Plant Cell* 3, 1063-1072.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H. and Okada, K. (1999) *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes & Development* 13, 1079-1088.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310.
- Scheres, B. (1998) A LEAFY link from outer space. *Nature* 395, 545-546.
- Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (1999) Generation of a spacing pattern: the role of *TRYPTYCHON* in trichome patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 1105-1116.
- Schwechheimer, C. and Bevan, M. (1998) Regulation of transcription factor activity in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 378-383.
- Seehaus, K. and Tenhaken, R. (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Mol. Biol.* 38, 1225-1234.
- Sessions, A. and Yanofsky, M.F. (1999) Dorsoventral patterning in plants. *Genes & Development* 13, 1051-1054.

- Shah, J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (1999) The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.
- Sheen, J., Zhou, L. and Jang, J.-C. (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 410-418.
- Smith, H.M.S., Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (1997) Importin  $\alpha$  from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114, 411-417.
- Smith, H.M.S. and Raikhel, N.V. (1999) Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants? *Plant Physiol.* 119, 1157-1163.
- Somerville, C. and Somerville S. (1999) Plant functional genomics. *Science* 285, 380-383.
- Somssich, I.E. and Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.
- Somssich, I.E., Wernert, P., Kiedrowski, S. and Hahlbrock, K. (1996) *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14199-14203.
- Speulmann, E., Metz, P.L.J., van Arkel, G., Hekkert, B., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1999) A two-component enhancer-inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* 11, 1853-1866.
- Spicer D.B., Rhee, J., Cheung, W.L. and Lassar, A.B. (1996) Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein twist. *Science* 272, 1476-1480.
- Sprenger, M. (1997) Transkriptionsregulierende Eigenschaften DNA-bindender Faktoren des Chalkonsynthasepromotors aus *P. crispum* und *A. thaliana*. *Dissertation*, Universität zu Köln.
- Stam, M., Mol, J.N.M. and Kooter, J.M. (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79, 3-12.
- Staswick, P.E., W., S. and Howell, S. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6837-6840.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1035-1040.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R. (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Development* 9, 1797-1810.



- Takatsuji, H. (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 582-596.
- Takatsuji, H. (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol. Biol.* 39, 1073-1078.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H. and Hirochika, H. (1999) A 13-bp cis-regulatory element in the *LTR* promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J.* 18, 383-393.
- Thomas, H. and de Villiers, L. (1996) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senescence by nutrient deprivation. *J. Exp. Bot.* 47, 1845-1852.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G. and Jones, J.D.G. (1999) Multiple independent defective suppressor-mutant transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* 11, 1841-1852.
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J. and Sánchez-Serrano, J.J. (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 817-826.
- Trezzini, G.F., Horrichs, A. and Somssich, I.E. (1993) Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol. Biol.* 21, 385-389.
- Tucker, M.L., Sexton, R., del Campillo, E. and Lewis, L.N. (1988) Bean abscission cellulase. *Plant Physiol.* 88, 1257-1262.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-1868.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5844-5849.
- Ulmasov, T., Liu, Z.-B., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1995) Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611-1623.
- van de Löcht, U., Meier, I., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1990) A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. *EMBO J.* 9, 2945-2950.
- van Labereke, N., Engler, G., Hosters, M., van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schillperoot, R.A. and Schell, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.

- Varagona, M.J. and Raikhel, N. (1994) The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J.* 5, 207-214.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. and Bohlmann, H. (1998) Systemic and local induction of an *Arabidopsis thionin* gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14, 285-295.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, A.C., Cook, J.R. and Browse, J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7209-7214.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, *CPC*. *Science* 277, 1113-1116.
- Wagner, D., Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1999) Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* 285, 582-584.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, D.M. and Gray, J.C. (1999) The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11, 1337-1349.
- Walter, M.H., Liu, J.-W., Wünn, J. and Hess, D. (1996) Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* 239, 281-293.
- Wang, Z., Yang, P., Fan, B. and Chen, Z. (1998) An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with plant defense. *Plant J.* 16, 515-522.
- Wang, Z.-Y. and Tobin, E.M. (1998) Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93, 1207-1217.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. and Ryals, J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R.M. (1998) A comparison of expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37, 455-469.
- Weigel, D. and Meyerowitz, E.M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78, 203-209.
- Wellmer, F., Kircher, S., Rugner, A., Frohnmeier, H., Schafer, E. and Harter, K. (1999) Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. *J. Biol. Chem.* 274, 29476-29482.

- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F. and Staskawicz, B.J. (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell* 3, 49-59.
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P. and Saedler, H. (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* 37, 989-999.
- Yamamoto, S., Suzuki, K. and Shinshi, H. (1999) Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant J.* 20, 571-579.
- Yanagisawa, S. and Sheen, J. (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10, 75-89.
- Yang, P., Wang, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z. (1999) A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* 18, 141-149.
- Yang, W.-C., Ye, D., Xu, J. and Sundaresan, V. (1999) The *SPOROCTELESS* gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes & Development* 13, 2108-2117.
- Yen, C.-H. and Yang, C.-H. (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol.* 39, 922-927.
- Yepremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K. and Saedler, H. (1999) Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* 11, 2187-2201.
- Yu, I.-C., Parker, J. and Bent, A.F. (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis *dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7819-7824.
- Zabaleta, E., Heiser, V., Grohmann, L. and Brennicke, A. (1998) Promoters of nuclear-encoded respiratory chain Complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J.* 15, 49-59.
- Zhang, B. and Singh, K.B. (1994) ocs element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2507-2511.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. and Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PRI-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6523-6528.

---

Zhou, D.-X. (1999) Regulatory mechanisms of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci.* 4, 210-214.

Zhou, J., Tang, X. and Martin, G. (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* 16, 3207-3218.

Zhu, Q., Doerner, P.W. and Lamb, C.J. (1993) Stress induction and developmental regulation of a rice chitinase promoter in transgenic tobacco. *Plant J.* 3, 203-212.

## VIII ANHANG

1. *AtWRKY6* GENOMISCHE SEQUENZ

1 TCACGTGGAA CGCGCCGCAG TAAACGGAGC GGTGGATCAA ACTTTTCGTC  
 51 CGTTTGATCA AACAGAAGAG AACTAGTCAA TGCTCTTTCT TCATATCACA  
 101 ATTTAATAGT CTCAAGACGA TTACGCCACA TAACCATTTT CTCGTGATTT  
 151 CGACATCAAA ATTTAATAAA AGGAACTGAT TGATTGGTCA TCATGTTACA  
 201 AGTGTCAAAT GAGCTAATCC GTTTTACAGT GGCATAGTTT ACGATCAATT  
 251 TACAAATTTT TGGTTTTATA ACATACTTGT AGTTAAACT ATTTATAAGC  
 301 TATTTATAGT GAGTTAGCTT ATAAAACCTT ATTCTTTTAT CTAAAATTAT  
 351 GTTTTGACTC GTTTCATGAT AAAATTTTAT CCTTTTCATC GGAATAAAAA  
 401 ACTTTATTAT TTATTTGGCA AAATAATTGG TGTA AAAAATT ATGTATATGT  
 451 TAATAACAAA AAATATTAAT CTGATTCATA ATCTTAAAAA AGAAAAATTT  
 501 CTTGAAATAA ACTTTAGACA TTGTAAATAA AAAAACATTA TTTTATATA  
 551 ATGGGATGTT TATATGTAAT TTTTATAAAA AAAATAAAAAG TTGTTTACTA  
 601 GTAATCCGAT TGGCTTTAAC TATCGTCGCC AAAAGAATAA TGTAGAACTG  
 651 ACTTTGAGGT AAAACTAAAA GAAATTTGTA AGATAATAGT CACATTAAT  
 701 GCTAAAATTA ATACATACTG ATATATCGTA TAAAATTTAT GAAAAC TACA  
 751 CCTTAACCTG AATCATAACAC TGTAATAAAA AAAACAAATT ATATATAAAC  
 801 CCTAAAAC T AATCATAAAT CCCAAACGGT GTACTCTCTA TTAGCTTTGA  
 851 AAGGATTGCC CAATTGTTTG TTA AAAAATTT CTAATAATAG TACAATGTTT  
 901 TGTTTCATTT TTCCTTTTCG TCAACCTGTT ACCCAATAGC AAATGAAGTT  
 951 TTTATGTGTG TGTGTGTGTG TGAATTTCCA TGAAAATGAA ACGGGCTTAG  
 1001 AATCCCGGTG TATTATGGGT CGGGTCGTAA CCGGGCAATG ACGCAGGATC  
 1051 TGACGTAAAA CTCCAAGAA TTTTTTTAAA AAGTCTCCGG AAAATAAAAT  
 1101 CAAAGTTCAT TAACTTAAAA AGAAAAACA AAATCGGTCC ACGTCCCAA  
 1151 CCCTTTTAT AGGAGAGTCT TATGTTCTGG CAGAAGACTT CACAGACTCT  
 1201 TTCTTAATCT CTCTCTCTTT CAACCAAACC CCTAAACAAA AAAAAATAC  
 1251 ATTTTCTGAT CTCTCTAAAA ATCTTTCTCC TTCGTTAATC TCGTGATCTC  
 1301 TTTCTTTTTC TATATATGGA CAGAGGATGG TCTGGTCTCA CTCTTGATTC  
 1351 ATCTTCTCTT GATCTTTTAA ACCCTAATCG TATTTCTCAT AAGAATCACC  
 1401 GACGTTTCTC AAATCCTTTG GCGATGTCTA GAATTGACGA AGAAGATGAT  
 1451 CAGAAGACGA GAATATCAAC CAACGGTAGT GAATTTAGGT TTCCGGTGAG  
 1501 TCTCTCAGGT ATTCGTGATC GTGAAGATGA AGATTTTTC A TCTGGCGTTG

1551 CTGGAGATAA TGACCGTGAA GTTCCCGGCG AAGTGGATTT CTTCTCCGAC  
1601 AAGAAATCTA GGGTTTGTCG TGAAGACGAC GAAGGATTTT GTGTGAAGAA  
1651 GGAAGAACAA GATGATCGAA CGGACGTAAA TGTAAGTACG ACTTTTTCGAT  
1701 AAATCATATG AAATACAATT TTCTTACTAA TGGTTTGTAT TAGTGTGGAC  
1751 GTGTCATAAT TTGGTTTACA TTTGAAATAT CAAATAAAAA TACCAAATTT  
1801 TGTTTCATTT TTTTTTTTTT GATAAAGGTA TCATATTTTG TTTTCTTACA  
1851 AAATGATTTT TAAATTTGAA TTTTAATTTG TTATAGACCG GTTTGAATCT  
1901 TCGAACAACT GGTAATACAA AGAGTGATGA GTCAATGATC GATGATGGAG  
1951 AATCTTCCGA AATGGAAGAT AAGCGTGCGA AAAATGAGGT AAGTTTAGTT  
2001 TGATTTTACA TTAGTAATAT TTAATAGATG AATAATTTGA ACCGGTTTGA  
2051 TTAATATTTT GATTTTTTTT TGTTTATCAC AGTTGGTGAA ATTACAAGAT  
2101 GAGTTGAAGA AAATGACAAT GGATAATCAA AAGCTTAGAG AATTGCTTAC  
2151 ACAAGTTAGC AACAGTTACA CTTCACCTCA GATGCATCTT GTTTCACTAA  
2201 TGCAGCAACA GCAACAACAG AACAAATAAGG TAAATAATTA TTAGATTGAT  
2251 CAACCACAAG TAAATGGAAT TTACCCTACA TGAATAGGCA ATTAATTTTG  
2301 GTGAACCTAT ATGATTAGGT AATAGAAGCT GCTGAGAAGC CTGAGGAGAC  
2351 GATAGTACCA AGGCAATTTA TTGATTTAGG CCCTACGAGA GCAGTAGGTG  
2401 AGGCCGAGGA TGTGTCAAAT TCTTCATCCG AAGATAGAAC TCGTTCGGGG  
2451 GGTTCCTCTG CAGCCGAGAG GCGTAGTAAC GGGAAGAGAC TTGGGCGTGA  
2501 AGAAAGCCCC GAAACTGAGT CCAACAAAAT TCAGAAGGTG AATTCTACTA  
2551 CCCCAGACGAC ATTTGATCAA ACCGCTGAAG CTACGATGAG GAAAGCCCGT  
2601 GTCTCCGTTT GTGCCCGATC GGAAGCTCCG ATGGTAAGTT GATTTATTAG  
2651 ATACTAATAC TTATAAGACT ATATAAAAAA TAAACTATGT GCTTTAGAGA  
2701 TTAATTATCT TTGTACTTTA TGTTTCTATA GATAAGCGAT GGATGTCAAT  
2751 GGAGAAAATA TGGCCAGAAG ATGGCCAAAG GGAATCCTTG TCCGCGGGCA  
2801 TATTACCGCT GCACGATGGC CACGGGCTGT CCCGTTGCA AACAASTAAG  
2851 ATTTAAAAGA TTTAACCATT GACTAAAAG ATTCTTGTTG TAAAAACATT  
2901 AGAGATTTCA ATGTATATAT GTTTGCGTGA TTGGCTAATA CGTTCGGTCC  
2951 GAAATGATAT TTATAGTTTC AACGTTGCGC GGAAGACAGA TCAATTCTGA  
3001 TTACAACCTA CGAGGGAAC CATAACCATC CGTTGCCGCC AGCCGCGGTA

```

3051  GCCATGGCTT CTACCACCAC GCGGGCGGCT AACATGTTGC TATCCGGGTC
3101  AATGTCTAGT CACGACGGGA TGATGAACCC TACAAATTTA CTAGCTAGGG
3151  CTGTTCTTCC TTGCTCCACA AGCATGGCAA CAATCTCAGC CTCCGCGCCG
3201  TTTCCAACCG TCACATTAGA CCTCACCCAC TCACCTCCGC CTCCTAATGG
3251  TTCCAATCCT TCCTCTTCCG CGGCTACCAA CAACAACCAC AACTCACTGA
3301  TGCAGCGGCC GCAACAACAA CAACAGCAA TGACGAACTT ACCTCCGGGA
3351  ATGCTACCTC ATGTAATAGG CCAGGCATTG TATAACCAAT CCAAGTTCTC
3401  GGGGCTGCAG TTCTCTGGTG GCTCTCCCTC GACGGCAGCG TTTTCTCAGT
3451  CACACGCGGT GGCTGATACA ATAACGGCAC TCACAGCTGA CCCGAATTTT
3501  ACGGCGGCTC TTGCAGCCGT TATTTCTTCT ATGATCAATG GTACGAACCA
3551  CCACGACGGC GAAGGAAACA ACAAAAATCA ATAGAAAAAT ATTACATTTT
3601  TTTTTTGGGT ATCTACATTT TTTTTCCAAC TGGGTTATAG GAAACAGAGA
3651  GTTTATTTCA TTGATTCACA TTTGTTCTGT TTCGTACCAA AATCCCAGTA
3701  AATATACAAA AGCAAACATAT ACTCAAGTTC ATATTCGTAA AACTATATAA
3751  TAGTTACGTA ACTTAATTAG CATTGCCTTT AAAGCTTTAA TATTTGATAT
3801  TTCTTTTGAG TGGTATATTA AATACTTCAC ATGTGAGCGC CGATACAAAC
3851  CTAATAGTTT GGCCGTACCT TCAATAAGAT AATGAGATAT CATCAAATAA
3901  GTGTCCTACA TAATGACACT TAATTATTGA ACTTTTAATA ACCTTTTTAT
3951  ATATATTTAA CAATTGCAAC

```

**Abb.38:** Genomische Sequenz von *AtWRKY6*. Der Bereich der kodierenden Regionen (grau) inklusive WRKY-Domäne (rot) sowie Start- und Stopp-Kodon (schwarz) sind gekennzeichnet.

2. *AtWRKY* REFERENZENTab.4: Auflistung aller bisher identifizierter Faktoren der *AtWRKY*-Multigenfamilie (Eulgem *et al.*, 2000).

<i>AtWRKY</i>	Gruppe	Chr. <sup>a</sup>	EST <sup>b</sup>	GEN <sup>b</sup>	BAC.ORF <sup>c</sup>	<i>AtWRKY</i>	Gruppe	Chr. <sup>a</sup>	EST <sup>b</sup>	GEN <sup>b</sup>	BAC.ORF <sup>c</sup>
1	I	2	X92976/ZAP1	AC007211	F1013.1	22	II	4	T04811	AF007269	IG002N01.6
			AI995838	AC006955	F2818	23	II	2	F14417	AC002337	T08113.10
			T44598	AB026656	MXK23				F14438		
			AA395490			24	I	5		AB005233	MBK23
			N37131			25	I	2	T42934	AC002338	T9D9.6
3	I	2	T45479	AC006284	T4M8.23					AC004165	T27E13.1
			AI099874	B77849	T29F22-end					AL093076	T10P21-end
			AI993164	AL080571	F1G15-end	26	I	5	AA585811	B09174	T30A11-end
				AL096246	T16K23-end				T22092	AB010697	M0J9.24
				AC007576	F7A19.5					AI995443	
4	I	1	T22085			27		5		AB009055	MXC20.3
			W43265			28	II	4	AV440897	AL021713	T9A21.10
			AA585810			29	II	4		AL035394	F9D19.20
5		5	H77044	AB011485	MXH1.P3	30	III	5		AB010696	MLE8.2
			H77050			31	II	4		AL022140	F1N20.170
			H77051			32	I	4		AL022198	F618.160
			AI995170			33	I	2		AC004683	T19C21.4
			AA605512							AC005499	T6A23.33
6	II	1	U75592	AC000375	F19K23.22	34	I	4		AL022223	M3E9.130
			AA650675			35	II	2		AC004238	F19I3.6
			H77127			36	II	1		AC010675	T17F3.16
			AA394951							AC010852	T12P18
			AA650826			37				B23309	F28C5-end
			AI992388			38	?	5		AB012244	MJQ16.9
7	II	4	N37775	AC005861	F23B24	39	II	3		AC011437	F7O18.30
			T20578	AL078637	T22A6.70	40	II	1	AV441124	AC011713	F23A5
			R30038			41	III	4		AF080120	F2P3.16
			AI992658							AL049876	T22B4.50
8	II	5		AB010698	MPL12.9	42	II	4		AF076243	T26N6.6
9			AI998645	AQ011596	F24A12TRC-end	43		2		AC005397	T3F17.22
			B98122		F24A12TRB-end	44	I	2		AC005896	F3G5.5
10	II	1		AC002328	F20N2	45		1/3?		ATU63815	AT.124-4
11	II	4	F64846	AL080283	F3L17.120					AC010797	IGF-F28J7
			T88086							AC011664	F5A18
			R30283							AC011624	T18B3
			AI998936			46	III	2		AC006526	F11C10.9
			T22071			47	II	4	AV442457	AF104919	T15B16.12
			T42669			48		5		AB023033	K6M13
			Z29806			49		5		AB017070	MNL12
			Z29805			50		5		AC005965	T19G15
12		2		AC003672	F16B22	51		5		AB019236	MXK3
13			F14100			52	III?	5		AB020744	K9E15
14	II	4	D88748	AL078620	F23K16.40	53	III	4		AL078468	T32A16
			T20672	AC007060	T5I8.10					AL035394	F9D16.280
15	II	2	Z25667	AC002391	T20D16.5	54	III	2		AC007660	T7D17.7
			T04430			55	III	2		AC007660	T7D17.8
			T43675			56		1		AC007764	F22C12
			T21472			57				AL080748	F1L14-end
			H36048			58	I	3		AC008261	T4P13
			AI993841			59	II	2		AC007019	F7D8.22
16	II	5	AA042185	AB010693	K21C13.P1	60	II	2		AC006585	F27C12.8
			AA395309	B27842	T19B7-end	61	II	1		AC011809	F6A14
17		2	AA712348	AC006954	F25P17.13	62	III	1		AC013288	T12I7
			R90490			63	III	1		AC013288	T12I7
			AA067545			64	III	1		AC013288	T12I7
			AI100579			65	II	1		AC021043	F28N24
18	II	4	U74179	AL031004	F28M20.10	66	III	1		AC018848	F5I6
				AL049607	F11C18	67	III	5		AL162351	T20L15.170
19		4		AL049638	F16J13.90	68	II	3		AL162507	T12C14.40
				AL091613	T8E18-end						
20	I	4		AL078465	T15N24.90	69	II	3		AL353032	T20N10.60
21	II	2	AA586133	U93215	T06B20.6						
			T20410	AQ010529	F24C8-end						
			AI992739								

<sup>a</sup>Chromosom<sup>b</sup>GenBank Accession Nummern<sup>c</sup>ORF=offener Leserahmen

? keine eindeutige Gruppierung oder unbekannte Lokalisation



---

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1997 bis April 2000 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. K. Hahlbrock angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. K. Hahlbrock für seine Betreuung und Begutachtung, Prof. Dr. U.-I. Flügge für die Übernahme des Zweit-Gutachtens, Prof. Dr. W. Werr für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission, Dr. C. Kirsch für die Übernahme des Beisitzes sowie Dr. I.E. Somssich für seine stetige Unterstützung.

Desweiteren möchte ich folgenden Personen danken: sämtlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Somssich - besonders A. Reinstädler, P. Köchner, I. Herrmann, Dr. P.J. Rushton, Dr. B. Lippok und Dr. F. Turck -, den Mitarbeitern der Abteilung Biochemie - besonders Dr. B. Weisshaar, Dr. E. Schmelzer, Dr. E. Kombrink und Dr. J. Ehlting -, den Kollegiaten des Graduiertenkollegs 'Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen' - besonders Dr. K. Hausühl und A. Becker -, weiteren Mitarbeitern des MPI für Züchtungsforschung - besonders L. Vahlkamp - sowie meinen Eltern, meiner Schwester und Thomas.

---

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

Die Bestimmungen der gültigen Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. K. Hahlbrock betreut worden.

Teilpublikationen:

Eulgem, T., Rushton, P.J., **Robatzek, S.** and Somssich, I.E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206

**Robatzek, S.** and Somssich I.E. (eingereicht) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defense-related processes.

**Robatzek, S.** and Somssich I.E. (in Vorbereitung) The *Arabidopsis* WRKY6 transcription factor acts as bifunctional regulator of senescence and pathogen defense.

---

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

Familienname      Robatzek  
Vorname            Silke  
Geburtsdatum      09.09.71  
Geburtsort         Uelzen

## AUSBILDUNG

Schule              Grundschule in Munster, 1978-1982  
                         Orientierungsstufe in Munster, 1982-1984  
                         Gymnasium in Munster, 1984-1991  
                         Abschluß Abitur, Durchschnittsnote 1.8

Hochschulstudium    Biologie, Diplom  
                         Georg-August-Universität Göttingen, 1991-1997  
                         Diplomarbeit bei Prof. J.E. Graebe, Ph.D., 1995-1997, zu dem Thema  
                         'Klonierung einer 3 $\beta$ -Hydroxylase aus *Cucurbita maxima* L. Endosperm'  
                         Abschluß Diplom, Gesamtnote 'Sehr Gut'

                         Biologie, Promotion  
                         Universität zu Köln, 1997-2000  
                         Doktorarbeit bei Prof. Dr. K. Hahlbrock, 1997-2000