

**Die WRKY-Transkriptionsfaktorfamilie
in *Arabidopsis thaliana*:**

**Untersuchungen zur Spezifität der Bindung an W-Box-Elemente und
weiterführende Analyse von drei ausgewählten Vertretern**

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

vorgelegt von
Ingo Ciolkowski
aus Wuppertal

Köln 2003

Berichtersteller:

Prof. Dr. Klaus Hahlbrock
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

2. Februar 2004

Abkürzungsverzeichnis

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

ACC	1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CTD	C-terminale Domäne
Col-0	Ökotyp Columbia-0
cpm	counts per minute
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
flg22	Flagellin22
Gent	Gentamycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glukuronidase
JA	Methyljasmonat
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
Kan	kanamycin
KT	Kurztag
LT	Langtag
MeJA	Methylasmonat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
M _r	relatives Molekulargewicht
NaOH	Natronlauge
NLS	Kernlokalisierungssignal
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTD	N-terminale Domäne
OD	optische Dichte
<i>Pc</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur;

SA	Salicylsäure
U	Unit
UV	Ultraviolett(es Licht)
Wt	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -glukoronsäure

Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode, Dreibuchstabencode)

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

Abkürzungen für Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Tymidin
K	Guanin und Tymidin
M	Adenin und Cytosin
R	Adenin und Guanin
Y	Cytosin und Tymidin
W	Adenin und Tymidin
B	Guanin, Cytosin und Tymidin
D	Adenin, Guanin und Tymidin
H	Adenin, Cytosin, und Tymidin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Pflanzliche Transkriptionsfaktoren.....	6
1.2	Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren	9
1.3	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	15
2.2	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	15
2.3	Deoxynukleotide	15
2.4	Bakterienstämme und Plasmide	18
2.5	Pflanzen und Pflanzenanzucht	19
2.5.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	19
2.5.2	<i>A. thaliana</i> WRKY-Mutanten:.....	19
2.5.2.1	Identifikation und Isolierung	19
2.5.2.2	Morphologische Untersuchungen	20
2.6	Molekularbiologische Standardmethoden.....	21
2.6.1	Restriktions-Endonukleaseverdau	21
2.6.2	Ligation	21
2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.6.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	22
2.6.5	Isolierung von Plasmid-DNA.....	22
2.6.6	Transformation	22
2.6.6.1	Transformation mit DH5 α und DB3.1	22
2.6.6.2	Transformation des Expressionsstammes BL21(DE3).....	22
2.6.7	DNA-Sequenzierung und Auswertung	22
2.6.8	Isolierung von Gesamt-RNA.....	23
2.6.9	Isolierung genomischer DNA.....	23
2.6.10	Expressionsanalysen mittels Slot Blot	24
2.6.10.1	Herstellung der Filter.....	24
2.6.10.2	Herstellung der Sonde	24
2.6.10.3	Hybridisierung.....	24
2.6.10.4	Auswertung.....	25
2.6.11	RT-PCR zur Gewinnung von WRKY-cDNA	25
2.6.12	Klonieren mittels GATEWAY [®] -Technologie	26
2.6.13	Herstellung der Expressionsvektoren	26
2.6.13.1	Klonierungen in den Vektor pQE30 mit N-terminalem 6xHis-Epitop (Qiagen)	26
2.6.13.2	Klonierungen in den Vektor pGEX2Tm-GW mit C-terminalem 6xHis-Epitop und N-terminaler GST-Fusion	26
2.6.13.3	Klonierungen in den Vektor pASK-gwy (IBA) mit N-terminalem Strep-Epitop	27
2.6.13.4	Erzeugung und Klonierung von WRKY 11 CTD Mutationskonstrukten	27

2.6.14	Expression der Proteine	27
2.6.15	Herstellung von Proteinextrakten.....	28
2.6.16	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine	28
2.6.16.1	Aufreinigung über Nickel-NTA-Agarose Säulen	28
2.6.16.2	Aufreinigung über Kobalt Affinitäts-Chromatographie.....	28
2.6.17	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.6.18	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	29
2.6.19	Coomassie-Färbung	29
2.6.20	Protein-Blot-Analyse.....	29
2.6.21	Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA).....	30
2.6.21.1	Hybridisierung (Annealing) der komplementären Oligonukleotide	30
2.6.21.2	Markierung von DNA mit der End-labeling-Methode	30
2.6.21.3	Bindereaktion.....	31
2.6.21.4	Gellauf	31
2.6.22	Aufarbeitung von pflanzlichem Gewebe.....	31
2.6.23	Herstellung und Analyse transgener Pflanzen	32
2.6.23.1	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.6.23.2	Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i>	32
2.6.23.3	Analyse transgener Pflanzen	33
2.6.24	Promotor-Reporter-Analysen.....	33
2.6.25	Ektopische Überexpression.....	34
2.6.26	Analyse subzellulärer Lokalisation.....	34
2.6.27	Klonieren von Oligonukleotiden	34
2.6.28	Biolistische Transformation mittels Partikelbeschuss.....	35
2.6.29	Rechnergestützte Sequenzanalyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Untersuchung der WRKY-W-Box-Interaktion.....	37
3.1.1	Die Bindung von WRKY-Proteinen an DNA-Sequenzen ist W-Box-spezifisch	37
3.1.2	Analyse der Interaktion von ausgewählten WRKY-Proteinen mit dem W2-Element.....	42
3.1.3	Analyse der Interaktion des WRKY11-Proteins mit W-Boxen beinhaltenden Fragmenten aus nativen Promotoren.....	47
3.1.4	Untersuchung des Einfluss von inversen W-Boxen auf die Bindung.....	54
3.1.5	Ist eine Prognose der Bindungsstärke mit den bisher gewonnenen Erkenntnissen möglich?.....	55
3.1.6	Die <i>in vitro</i> Bindung von WRKY-Proteinen an W-Boxen des <i>SIRK</i> -Promotors kann mit der Bindung und Reportergergenaktivierung <i>in vivo</i> korreliert werden	59
3.1.7	Analyse der gut bzw. schlecht gebundenen Elemente mit dem Motif Mapper Programm.....	63
3.1.8	Bestimmung der notwendigen Länge einer W-Box zur Interaktion mit WRKY-Faktoren	67
3.1.9	Untersuchung von kombinierten W-Boxen.....	70
3.1.9.1	Bindung von WRKY-Proteinen an W-Boxen in verschiedenen Abständen	70

3.1.9.2	Untersuchung der Häufigkeit des Auftretens der kombinierten W-Boxen im <i>A. thaliana</i> -Genom mit dem Motif Mapper Programm.....	72
3.1.10	<i>In vivo</i> Interaktion der WRKY-Proteine mit 1xW2-Konstrukten.....	74
3.1.11	Der Einfluss von konservierten Aminosäuren in WRKY11-CTD auf die Bindung an W-Boxen.....	76
3.2	Untersuchung ausgewählter Vertreter der WRKY-Familie	84
3.2.1	Vergleich der Proteinsequenzen mittels computergestützter Analysen.....	84
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation.....	88
3.2.3	Untersuchung der Expression der WRKY-Gene.....	90
3.2.3.1	Untersuchung der Promotorstruktur.....	90
3.2.3.2	Untersuchungen zur Expression mittels Promotor::GUS-Fusionen.....	92
3.2.3.3	Untersuchen der Expression mittels Filter-Hybridisierungs-Experimenten	97
4	Diskussion	100
4.1	Biochemische Merkmale von WRKY-Proteinen.....	100
4.2	Vergleich der WRKY-Faktoren mit bekannten Zinkfinger-Proteinen.....	102
4.3	Die W-Box als regulatorisches cis-Element.....	107
4.4	Regulation von Genexpression über W-Boxen.....	113
4.5	Ausblick.....	124
5	Zusammenfassung	127
6	Literaturverzeichnis.....	130
7	Anhang	145

1 Einleitung

Im Laufe ihrer Entwicklung müssen Pflanzen viele gewebe-, differenzierungs- und umweltspezifische Prozesse steuern und integrieren. Pflanzen als sessile Organismen haben zusätzlich nicht die Möglichkeit, in einer ungünstigen Lebensphase abzuwandern, oder bei Gefahr Schutz zu suchen. Deshalb muss jede Pflanze in der Lage sein, auf biotische und abiotische Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. Abiotische Stressfaktoren (Regen, Hagel), aber auch biotische Faktoren, wie beispielsweise Insekten, verwunden Pflanzen und verursachen so nicht nur physikalische Zerstörung von Gewebe, sondern stellen auch Eintrittswege für Pathogene bereit. Co-Regulation und Crosstalk (Quervernetzung) zwischen verschiedenen Verteidigungs-Signalwegen wird die Pflanzen wahrscheinlich in die Lage versetzen, sich gegen eine Vielzahl von Pathogeninfektionen und Stresssituationen zur Wehr zu setzen (Glazebrook, 2001). An Verwundungs- und auch Pathogensignalwegen sind die Hormone Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen beteiligt und es wird diskutiert, dass zwischen Pathogenerkennung und Verwundungsantwort ein Netzwerk zur Kommunikation vorhanden ist (Schenk *et al.*, 2000, Cheong *et al.*, 2002, Dong, 1998, Rojo *et al.*, 1999). Verwundung reguliert Sekundärmetaboliten-Signalwege, die in Abwehrantworten eingebunden sind, aber auch die Regulation von Zellwand-Biosynthese- und Modifizierungs-Gene. Jasmonsäure als Wundhormon akkumuliert in verwundeten Pflanzen und aktiviert die Expression von z.B. dem Proteinase-Inhibitor Thionin, und Enzymen des Sekundärmetabolismus (Creelman & Mullet, 1997). Pathogenresponsive Proteine wie Chitinasen und β -1,3-Glucanasen zeigen ebenfalls eine Wundresponsivität (Vignuteli *et al.*, 1998, Zhu *et al.*, 1993, Büchter *et al.*, 1997, Reymond & Farmer, 1998). Die Expression einiger wundresponsiver Gene kann auch durch Ethylen stimuliert werden (O'Donell *et al.*, 1996, Titarenko *et al.*, 1997) und viele *PR*-Gene sind weiterhin mit den Signalwegen von Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen assoziiert (Dong, 1998, Reymond & Farmer, 1998, Ukness *et al.*, 1992, Vijayan *et al.*, 1998, Pieterse & van Loon, 1999). Diese Signalwege sind, wie bereits beschrieben, eng mit der Wund-Abwehr verknüpft (Maleck & Dietrich, 1999, Nam, 1997). Verwundung kann aber auch Trockenstress- und Kältestress-Gene aktivieren (Cheong *et al.*, 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass viele Trockenstress-Gene auch durch Kältestress induziert werden (Seki *et al.* 2001), was eine Vernetzung von weiteren Signalwegen aufzeigt.

Der Aufbau der Netzwerke und deren Interaktion ist also hochkomplex. Eine mögliche Schnittstelle für einige Signalkaskaden könnte dadurch vorhanden sein, dass verschiedene Umwelteinflüsse wie Kälte, Ozon, Pathogen und UV-Strahlung jeweils zur Bildung von Reaktiven Sauerstoff-Verbindungen (ROS, „reactive oxygen species“) führen. Der Erhöhte ROS-Level wiederum verlangt, dass zusätzliche Abwehrmaßnahmen aktiviert werden (Doke, 1997, Scandalios, 1997). Wenn diese ROS nicht schnell genug beseitigt werden, führen sie zu Schäden an Membranen und zu zellulären Fehlfunktion. Dies führt letztendlich zum Zelltod, der sich durch das Auftauchen von Nekrotischen Läsionen manifestiert (Mudd, 1997). Dieser Zelltod benötigt Signalmoleküle wie SA (Rao & Davis, 1999). Stromabwärts von ROS werden auch hier SA, JA und Ethylen als Hauptregulatoren diskutiert (Dong, 1998, Glazebrook, 1999). Obwohl diese Moleküle

verschiedene Signalwege aktivieren, kommunizieren sie untereinander zur Regulation der jeweils anderen Signalkaskaden (Seo *et al.*, 1997, Shah *et al.*, 1999).

Bei einer Infektion ist die unmittelbare Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze für deren Verlauf entscheidend (Staskawicz *et al.*, 2001). So werden z.B. bei inkompatiblen Interaktionen, bei der der Wirt den Eindringling erkennt und abtötet, zwischen Pathogen und Wirtspflanze biochemische Komponenten (Elizitoren) vom Pathogen übertragen, die von Rezeptoren der Wirtspflanze erkannt werden und die Expression von Abwehr-assoziierten Genen aktivieren (Nürnberg *et al.*, 1994, Tang *et al.*, 1996, Nürnberg, 1999). Außer an den Eintrittsstellen des Krankheitserregers kommt es auch in der gesamten Pflanze zu einer verzögerten, systemischen Aktivierung von Genen, die zu erhöhtem Schutz gegen Pathogene führen (Ryals *et al.*, 1996). Eine frühe, sichtbare Reaktion der Pflanze auf Pathogenbefall ist meist die Bildung von nekrotischen Läsionen durch aktiven, lokalen Zelltod. Der aktive Sterbeprozess der Zellen beginnt schon wenige Stunden nach der Infektion und ist von Transkription und Translation begleitet (Yang *et al.*, 1993, He *et al.*, 1994). Diese Läsionen treten im Bereich um die Infektionsstelle auf und man spricht dabei von der HR (Hypersensitive Reaktion, Matthews, 1991). Bei der Ausbildung der HR kommt es zu biochemischen und molekularen Veränderungen beim Stoffwechsel, wie etwa zur Verstärkung der Zellwand, zur Aktivierung von abwehrbezogenen Genen und zur Bildung von antimikrobiell wirksamen Phytoalexinen (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Der Ablauf des programmierten Zelltodes bei der HR unterliegt einer Kontrolle auf genetischer Ebene. Einen Beweis dafür liefern Mutanten, die in Abwesenheit von Krankheitserregern spontan Läsionen bilden, die makroskopisch den HR-Läsionen ähneln (Hunt & Ryals, 1996).

Interne und externe systemische Stimuli lösen also das Umprogrammieren der zellulären Funktionen aus, das sich in einer komplexen Änderungen der Genexpression äußert. Solchen Prozessen ist eine Vielzahl von Genen unterworfen, wobei deren Aktivität definierten zeitlichen und räumlichen Mustern folgt (Batz *et al.*, 1998, Iyer *et al.*, 1999). Für die Umprogrammierung des Metabolismus nach Pathogenerkennung kommt Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle zu. Sie liegen stromabwärts in Signalkaskaden und wirken direkt auf die Genexpression (Hill & Treisman, 1995). Ihre Wirkung auf die Expression von Genen üben sie durch Bindung an kurze DNA-Abschnitte definierter Sequenz, den sogenannten *cis*-Elementen, aus (Tjian, 1995). Dadurch stehen Pathogen-induzierbare Promotoren und die vorhandenen *cis*-Elemente im Mittelpunkt des Abwehrmechanismus. Die Ursache unterschiedlicher Genexpressionsmuster bei Pflanzen während einer Infektion liegt in den meisten Fällen in der Promotor-Architektur der jeweiligen Gene (Yuh *et al.*, 1998). Die Promotoren unterscheiden sich in der Art und Anzahl der auftretenden pathogenresponsiven Elemente und stehen somit am Ende einer oder mehrerer Signalkaskaden (Rushton & Somssich, 1998). Die eintreffenden Signale werden dabei über komplexe Netzwerke miteinander wechselwirkender Transkriptionsfaktoren in eine spezifische und differenzielle Veränderung der Genexpression von Zielgenen umgesetzt.

Untersuchungen an artifiziellen Promotorkonstrukten, die jeweils ein definiertes *cis*-Element vor einem Reportergen tragen, liefern einen Einblick in die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren und ihren spezifischen Bindungselementen (Rushton *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Elemente das Reportergen nach Pathogenbefall oder Verwundung aktivieren können. Es wurden verschiedene Klassen von *cis*-Elementen aus verschiedenen Pflanzenarten in *Arabidopsis thaliana* getestet. Darunter befanden sich W-Boxen (WRKY-Bindestellen) und GCC-ähnliche Boxen (ERF/EREBP-Bindestellen) (Rushton *et al.*, 2002). Bemerkenswert ist die Möglichkeit, sehr ähnliche *cis*-Elemente, die vermutlich von derselben Klasse Transkriptionsfaktoren gebunden werden, aufgrund ihrer spezifischen Reportergen-Aktivität unterscheiden zu können. So sind die GCC-Box (AGCCGCC) und die S-Box (AGCCACC) bis auf ein Nukleotid identische *cis*-Elemente. Jedoch vermittelt die GCC-Box deutlich stärkere Reportergenaktivität nach Verwundung und nach Ethylen-Behandlung, wohingegen das S-Box-Element kaum verwundungsresponsiv, aber ähnlich pathogenresponsiv und nicht ethylenresponsiv ist (Rushton *et al.*, 2002). Verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren können dabei durch einen gemeinsamen Stimulus aktiviert werden und später über verschiedene *cis*-Elemente die Transkription der (gleichen) Zielgene kontrollieren. So werden die Reaktionen auf biotischen oder abiotischen Stress durch viele unterschiedliche Signalübertragungswege reguliert; trotzdem ist es möglich, dass die erhaltenen Expressionsmuster nach verschiedenen Stimuli sehr ähnlich sind (Durrant *et al.*, 2000, Schenk *et al.*, 2000, Seki *et al.*, 2001). Dies ergibt sich aus der schon erwähnten Quervernetzung und Kommunikation zwischen den Signalnetzwerken.

1.1 Pflanzliche Transkriptionsfaktoren

Die ERF-Proteine sind eine Subfamilie der pflanzenspezifischen APETALA2(AP2)/EREBP („Ethylen-Responsive-Element-Binding-Protein“) Transkriptionsfaktoren und besitzen in *A. thaliana* etwa 124 Mitglieder (Riechmann *et al.*, 2000). Bei Wechselwirkungen zwischen Wirtspflanze und Pathogen nimmt die Ethylen-Biosynthese sehr schnell zu. Dies führt zur Synthese von EREBPs, die an den GCC-Boxen in der Promotorsequenz ihrer Zielgene binden und dadurch die Genregulation übernehmen (Rushton and Somssich, 1998). Stressbedingte Induktion von einigen EREBPs kann jedoch auch unabhängig von Ethylen-Biosyntheseverläufen sein (Ohme-Takagi *et al.*, 2000, Fujimoto *et al.*, 2000). Alle ERF-Proteine besitzen die charakteristische 58 bis 68 Aminosäuren große ERF-Domäne, die eine spezifische Bindung zu den GCC-Box-ähnlichen und DRE- („Dehydration-Responsive-Element“-)Box-ähnlichen DNA-Motiven vermittelt. Möglicherweise bildet die ERF-Domäne eine amphipatische α -Helix, über die der Kontakt zur DNA hergestellt wird (Liu *et al.*, 1999). Die Anzahl der in einem Protein auftretenden DNA-Binde-Domänen dient der Gliederung der AP2/EREBP-Familie. Vertreter mit einer einzelnen AP2-Domäne werden in der ERF/EREBP-Subfamilie zusammengefasst, wohingegen Faktoren mit zwei Domänen zur AP2-Subfamilie gezählt werden. Diese strukturelle Aufteilung findet sich 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 Kälte, Trockenheit und Pathogenbefall involviert (Zhou *et al.*, 1997, Stockinger *et al.*, 1997, Gilmour *et al.*, 1998, Menke *et al.*, 1999).

Die bZIP („basic leucin-zipper“)-Multigenfamilie besitzt etwa 74 Mitglieder in *A. thaliana* (Jacoby *et al.*, 2002). Vertreter dieser Transkriptionsfaktorfamilie binden an *cis*-Elemente mit dem Konsensus ACGT, wie er in A-, C- und G-Boxen gefunden werden kann (Ramachandran *et al.*, 1994, Williams *et al.*, 1992). Durch ihre Leucin-Zipper bilden bZIP-Faktoren Homo- oder Heterodimere und können in diesem Zustand effizienter an ihre Zielsequenz binden (Büttner & Singh, 1997, Niggeweg *et al.*, 2000). Einige Gene der bZIP-Transkriptionsfaktoren werden lichtabhängig reguliert, andere werden durch Phytohormone wie Abscisinsäure, Auxin oder Salizylsäure beeinflusst. Die von bZIP-Faktoren gebundenen DNA-Motive liegen oft in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen *cis*-Elementen und es wird diskutiert, dass kooperative Bindung und Wechselwirkung mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren für die Aktivität dieser Proteine eine erhebliche Rolle spielen (Jupin & Chua, 1996, Faktor *et al.*, 1997, Chandrasekharan *et al.*, 2003). Eine andere Klasse von ähnlichen *cis*-Elementen stellen die *activation sequence* (*as*)-1-Elemente (CTGACGTAAGGGATGACGCAC) dar. Die *as*-1-Elemente werden durch Salizylsäure, Auxin, Jasmonat und Peroxide induziert und gehören dadurch auch zu den regulierenden Faktoren der Pathogenabwehr bei Pflanzen (Ellis *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1997). Neben G-Boxen sind auch die *as*-1-Elemente Bindestellen für bZIP-Transkriptionsfaktoren.

Die Bindung der beschriebenen Transkriptionsfaktoren erfolgt oft innerhalb weniger Minuten nach Perzeption eines Stimulus, wie beispielsweise Salizylsäure, und löst infolgedessen die Aktivierung „unmittelbar-früher“ oder primär-responsiver Gene aus („immediate-early genes“, Herschmann, 1991, Abel *et al.*, 1996). Die Aktivierung dieser Gene wird oft durch präformierte Signalkomponenten vermittelt und bedarf keiner *de novo* Proteinbiosynthese. Eine Gruppe solcher unmittelbar-früher Gene sind manche Transkriptionsfaktoren. Deren Aktivierung wiederum scheint notwendig für die nachfolgende Aktivierung sekundär-responsiver Gene zu sein (Herschmann, 1991, Rouse *et al.*, 1998).

Die Initiierung der Transkription ist ein Hauptebene, auf dem Genexpression reguliert wird, und dies reflektiert den Prozentsatz des Genoms, der in Pflanzen und anderen Eukaryoten für Transkriptionsfaktoren codiert. So sind etwa 15% der Gene mit vorhergesagten oder bekannten Funktionen in Transkription involviert, ein Prozentsatz, der auch bereits in anderen Eukaryoten gefunden wurde (Bevan *et al.*, 1998).

Genomische DNA ist zur platzsparenden Verpackung mit Proteinen komplexiert und bildet Chromatin, dessen Struktur zu einer generellen Unterdrückung von Genaktivität führt. Chromatin in der Umgebung von Genen muss erst umgestaltet werden, um den Zugang für Transkriptionsfaktoren und die Rekrutierung des Polymerase-Komplexes zu ermöglichen. Der schrittweise Zusammenbau der basalen Transkriptionsmaschinerie bietet dann vielfältige Ansatzpunkte für regulatorische Interventionen (Roeder, 1996, Verrijzer & Tjian, 1996). Die gleichzeitige Bindung von mehreren Transkriptionsfaktoren in Promotoren führt dabei oft zu verbesserter Aktivierung. Es wird vermutet, dass durch die lokale Anreicherung von multiplen Bindestellen eine sättigende Konzentration der Transkriptionsfaktoren erzielt wird und so deren maximale Funktionalität erreicht wird (Singh, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Vertreter der Transkriptionsfaktorfamilien sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription eines bestimmten Zielgens

wirken können (Schwechheimer & Bevan, 1998). Ein einzelner Transkriptionsfaktor kann sogar je nach Kontext als Aktivator oder Repressor auf die Expression von unterschiedlichen Zielgenen wirken (McCarty *et al.*, 1991, Hoecker *et al.*, 1995). In der Regel werden Transkriptionsfaktoren auf Grund ihrer DNA-bindenden Domäne in verschiedene Genfamilien eingeteilt, die dann wiederum strukturell oder funktionell in Untergruppen sortiert werden. Solche Multigenfamilien können im Genom entweder in sogenannten „Clustern“ vorliegen oder gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt sein (Takatsuji, 1998). Für Multigenfamilien wird angenommen, dass sie durch Genduplikation mit einer anschließenden Diversifikation entstanden sind und Veränderungen an der gesamten Pflanze zur Folge hatten (Meyerowitz, 1999, Wolfe, 2001). Die häufigsten Vertreter von Transkriptionsfaktorfamilien in Pflanzen stellen die bHLH-, die Homöobox-, die MYB-, die MADS-Box-, die bZIP- und die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren dar (Riechmann *et al.*, 2000).

Alle Zinkfinger-Proteine haben die Fähigkeit gemeinsam, Zink zu komplexieren, wodurch die Tertiärstruktur stabilisiert wird und so zum einen Kontakte zu DNA, zum anderen aber auch Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht werden (Takatsuji, 1998). Die Familie der Zinkfinger-Proteine kann in Abhängigkeit von den an dem Zinkfinger-Motiv beteiligten Cystein- und Histidin-Resten in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Liu *et al.*, 1999). Neben dem klassischen Zinkfinger-Motiv C₂H₂ existieren noch weitere Cystein/Histidin-Strukturen. Dazu zählen das C₃H- sowie das C₄-Motiv des sogenannten GATA-Fingers, das C₃HC₄-Motiv, welches unter dem Begriff RING-Finger bekannt ist und das C₂HC₅-Motiv, das als LIM-Finger bezeichnet wird. Es ist faszinierend, dass sich die große Vielfalt an Zinkfinger-Proteinen mit verschiedenen Bindesequenzen aus einer kleinen Zahl an Grundfaltungsprinzipien ergibt. Diese stellen einen umfassenden und exakten Rahmen für Interaktionen dar, um eine große Anzahl an biologischen Funktionen in einer Zelle auszufüllen (Thornton *et al.*, 1999).

Vertreter aller Zinkfinger-Klassen sind in pflanzlichen wie in tierischen Organismen zu finden. Allerdings gibt es trotz gleicher Motive, wie dem klassischen C₂H₂-Zinkfinger, grundlegende Unterschiede in der Art der DNA-Bindung (Takatsuji, 1999, Isernia *et al.*, 2003). Die Heterogenität der Familie der Zinkfinger-Faktoren spiegelt sich in ihren vielschichtigen Funktionen bei der pflanzlichen Entwicklung wieder. Zinkfinger-Faktoren sind beispielsweise notwendig für die richtige räumliche Entwicklung von reproduktivem Blütengewebe (Sakai *et al.*, 1995). 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).

Die Zinkfinger-Motive einiger pflanzlicher Transkriptionsfaktoren weisen gegenüber den beschriebenen Zinkfingern Abwandlungen in ihrem Cystein-Histidin-Muster auf. Solche pflanzenspezifischen Zinkfinger-Motive treten bei Vertretern der Dof-Familie oder der WRKY-Familie auf (Takatsuji, 1998). Auf letztgenannte Familie wird später detaillierter eingegangen. Eine Besonderheit der Dof-Familie ist das Vorhandensein eines einzelnen Fingers, der dem der GATA-Klasse ähnlich ist, aber veränderte Abständen zwischen den Cysteinen aufweist. Vertreter der Dof-Familie zeigen eine durch Auxin und Salizylsäure beeinflusste Expression bzw. vermitteln eine Licht-regulierte und gewebespezifische Expression ihrer Zielgene (Kang & Singh, 2000, Yanagisawa & Sheen, 1998). Neben funktionellen Motiven pflanzlicher Transkriptionsfaktoren, die genauso in tierischen

Organismen konserviert sind, weisen einige Genfamilien von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren 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 GGWAAWW. GT-Elemente kommen meist als Tandem-Wiederholungen in Promotoren von überwiegend lichtregulierten Pflanzengen vor. Somit kann vermutet werden, dass GT-Faktoren an der Kontrolle von Licht-regulierter Genexpression beteiligt sind (Dehesh *et al.*, 1995, Zhou, 1999). Die bereits erwähnte AP2/EREBP-Multigenfamilie ist durch die sogenannte AP2-Domäne gekennzeichnet und bisher ausschließlich bei Pflanzen bekannt (Riechmann & Meyerowitz, 1998).

Die Expression von Genen ist sowohl transkriptionell (Wagner *et al.*, 1999) als auch posttranskriptionell (Comelli *et al.*, 1999) reguliert. Die Aktivität ihrer Proteine kann posttranslational 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 und gewebespezifische Abhängigkeit berücksichtigt, so ergibt sich ein regulatorisches System beachtlicher Komplexität (Hempel *et al.*, 2000). Die Aktivität oder Spezifität solcher regulatorischer Proteine kann große Effekte in der Pflanze hervorrufen und in Änderungen im Expressionsmuster resultieren. So beeinflusst die Veränderung der Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren die Stresstoleranz von Pflanzen. Die Überexpression von zwei Arabidopsis AP2/EREBP-Genen CBF1/DREB1B and DREB1A führt zu erhöhter Toleranz gegenüber Trockenheit, Salz und Kälte (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998, Kasuga *et al.*, 1999).

Die Kontrolle der Genexpression durch eine Vielzahl funktionell und strukturell verschiedener Transkriptionsfaktoren ist somit ein wesentlicher Prozess, der zu der äußerst komplexen Regulation von Zielgenen beiträgt.

1.2 Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren

Die pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren werden zu den klassischen Zinkfinger-Proteinen gezählt und repräsentieren eine Multigenfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Sie wurden zunächst als sequenzspezifisch an DNA bindende Proteine aus einer Reihe verschiedener Pflanzen wie Süßkartoffel (SPF1), Gurke (SE71), Hafer (ABF1,2), Petersilie (WRKY1,2,3), Tabak (WRKY1,2, WIZZ) und *Arabidopsis* (ZAP1, TTG2) isoliert (Ishiguro & Nakamura, 1994, Kim *et al.*, 1997, Rushton *et al.*, 1995, Rushton *et al.*, 1996, Cormack *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1999; Chen & Chen, 2000, Hara *et al.*, 2000, de Pater *et al.*, 1996, Johnson *et al.*, 2002).

Kennzeichen dieser Proteinfamilie ist die WRKY-Domäne, bestehend aus 60 bis 80 Aminosäuren mit dem folgenden Konsensus: D-X₂-WRKYGQK-X₇-PR-YY-C-X₄₋₇-C-X₂₂₋₂₃-(₂₆)-H-X-(H/C) (Eulgem *et al.*, 2000). Diese Domäne beinhaltet neben dem

namensgebenden Motiv WRKYGQK auch konservierte Cysteine und Histidine, die sehr wahrscheinlich eine neuartige Zinkfinger-Struktur ausbilden (Liu *et al.*, 1999, Takatsuji, 1998). Gestützt wird diese Annahme durch die Inhibition der DNA-Bindung mittels chelatierenden Agenzien wie EDTA oder 1,10-o-Phenanthrolin (Rushton *et al.*, 1995, de Pater *et al.*, 1996, Hara *et al.*, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass Zugabe von Zinkionen diese Bindung wieder herstellt, nicht jedoch Magnesium-, Kupfer- oder Eisenionen (Maeo *et al.*, 2001). Gemeinsam ist allen WRKY-Proteinen zusätzlich die Bindung mit hoher Affinität an ein bestimmtes DNA-Motiv, das W-Box-Element (TTGACC, Rushton *et al.*, 1995; de Pater *et al.*, 1996, Hara *et al.*, 2000, Chen & Chen, 2000, Yang *et al.*, 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die putative Zinkfinger-Struktur essentiell für die Bindung ist (de Pater *et al.*, 1996, Ishiguro & Nakamura, 1994, Maeo *et al.*, 2001), genauso wie das invariante WRKYGQK-Aminosäure-Motiv (Maeo *et al.*, 2001).

Alle bisher untersuchten WRKY-Proteine zeigen *in vitro* eine spezifische Bindung an W-Box-beinhaltende Sequenzen. Ausnahmen sind von Ishiguro & Nakamura (1994) und Sun *et al.* (2003) beschrieben worden. Es konnte jeweils Bindeaktivität an DNA-Sequenzen ohne W-Boxen gezeigt werden. Es muss sich jedoch nicht, wie von Sun *et al.* diskutiert, um eine neue Erkennungssequenz für WRKY-Proteine handeln, sondern aufgrund der schwachen Bindung an eine AT-reiche Sequenz kann die Interaktion auch unspezifischer Natur sein.

Anhand der Anzahl und Art von WRKY-Domänen werden die einzelnen Vertreter dieser Proteinfamilie einer von drei Gruppen zugeordnet. WRKY-Proteine der Gruppe I tragen zwei WRKY-Domänen und Mitglieder der Gruppen II und III jeweils eine. Vertreter der Gruppe III unterscheiden sich von denen der Gruppen I und II in ihrer Zinkfinger-ähnlichen Struktur. Anstelle eines C₂H₂-Musters besitzt ihre WRKY-Domäne ein C₂HC-Motiv (C-X₇-C-X₂₃-H-X-C). Außerdem ist der Abstand zwischen den ersten zwei Cysteinen um zwei Aminosäuren größer. Von den zwei WRKY-Domänen von Vertretern der Gruppe I zeigt die C-terminale Domäne mehr Ähnlichkeit zu den einzelnen Domänen von Gruppe II und III als die N-terminale Domäne. Damit übereinstimmend ist die C-terminale Domäne von WRKY-Proteinen aus Gruppe I alleine ausreichend für eine DNA-Bindung (Ishiguro & Nakamura, 1994, de Pater *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 1999). Die Funktion der N-terminalen Domäne ist noch unklar. Als schwache DNA-bindende Domäne oder auch als mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne könnte sie einer Erhöhung der Affinität oder der Spezifität bei der DNA-Bindung dienen. Es ist gezeigt worden, dass sie die Fähigkeit der C-terminalen Domäne zur DNA-Bindung positiv beeinflusst (de Pater *et al.*, 1996, Ishiguro & Nakamura, 1994) und auch bei der Aktivierung eines Reportergens zu erhöhter Expression beitrug (Eulgem *et al.*, 1999).

Eine detailliertere Gliederung der WRKY-Faktoren ist anhand der Sequenzhomologien in ihrer DNA bindenden WRKY-Domäne möglich. Die weitere Unterteilung wird durch das Vorhandensein zusätzlicher konservierter Kurzmotive, wie z.B. der HARF-Domäne (GHARFRR), sowie ein bestimmtes Arrangement dieser Motive unterstützt, so dass sich neben den drei Hauptgruppen weitere Subgruppen ergeben (Eulgem *et al.*, 2000). Alle Gliederungsmerkmale können für die Analyse dieser Multigenfamilie von großer Bedeutung sein, vor allem im Hinblick auf mögliche überlappende Expressionsmuster und der Kontrolle von Zielgenen, aber zusätzlich weil z.B. die konservierte HARF-Domäne auch in anderen Pflanzen bis hin zu Moosen zu finden ist.

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

Ähnlich gering ist die Anzahl bekannter Zielgene für WRKY-Proteine. So wird eine Rolle von WRKY-Proteinen bei der Regulation von *NPR1*-Expression (Yu *et al.*, 2001) und der Induzierbarkeit der Rezeptor-ähnlichen-Kinase 4 (*RLK4*, Du & Chen, 2000) in *A. thaliana* durch Bindung an W-Boxen in den entsprechenden Promotoren diskutiert. Von Robatzek und Somssich (2002) wurde die Seneszenz-induzierte Rezeptor-Kinase (*SIRK*) als Zielgen in einem *AtWRKY6*-abhängigen, alterungsbedingten Signalübertragungsweg bestimmt. Für diese Kinase wurde auch ein flg22-abhängiger Signalübertragungsweg beschrieben (*FRK1*, Asai *et al.*, 2002), der allerdings unabhängig von *WRKY6* ist. In einem Transfektionsexperiment mit Mesophyll-Protoplasten aus *A. thaliana* konnte die Erkennung des Elizitors flg22 durch *FLAGELLIN SENSITIVE2 (FLS2)*, einer Rezeptor-ähnlichen Proteinkinase (Gomez-Gomez *et al.*, 1999) und die Signaltransduktion über eine MAP-Kinase-Kaskade gezeigt werden. Das FLS2-Protein ist Teil des Flagellin-Rezeptor-Komplexes (Gómez-Gómez & Boller, 2000, Gómez-Gómez *et al.*, 2001), über den schließlich die Expression der *WRKY*-Gene *AtWRKY22* und *AtWRKY29* induziert wird (Asai *et al.*, 2002). Somit laufen in *SIRK/FRK1* sowohl pathogen- als auch seneszenzabhängige Prozesse zusammen, die durch verschiedene Transkriptionsfaktoren derselben Multigenfamilie gesteuert werden (Singh *et al.*, 2002). Da bei einigen Genen eine erhöhte Expression sowohl in seneszenten Blättern als auch bei der Pathogenabwehr bekannt ist, ist anzunehmen, dass diese beiden physiologischen Prozesse teilweise durch einen gemeinsamen Mechanismus reguliert werden (Quirino *et al.*, 1999, Robatzek & Somssich, 2001).

Expressionsstudien mit *WRKY*-Genen deuten gegenwärtig darauf hin, dass viele *WRKY*-Proteine eine regulatorische Aufgabe bei vielen biotischen und abiotischen Stress-Situationen übernehmen. So konnte bei einigen *WRKY*-Genen eine mRNA-Akkumulation nach einer Infektion mit Pathogenen wie Viren (Wang *et al.*, 1998), Bakterien (Dellagi *et al.*, 2000) und Oomyceten (Eulgem *et al.*, 1999) festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch durch Verwundung (Robatzek & Somssich, 2001) oder Salizylsäure-Behandlung (Yang *et al.*, 1999, Dong *et al.*, 2003) *WRKY*-Gene induziert werden können. Die Akkumulation der *WRKY*-mRNA verläuft dabei oft sehr schnell und transient und scheint von einer *de novo* Protein-Synthese unabhängig zu sein (Cormack *et al.*, 2002).

Das korrespondierende *cis*-Element der *WRKY*-Proteine ist das als W-Box bezeichnete und in einer Reihe von Pathogen-, Salizylsäure- und anderen stressresponsiven Promotoren gefundene Motiv (Rushton & Somssich, 1998, Maleck *et al.*, 2000, Dong *et al.*, 2003). In „random binding site selection“-Versuchen wurde für ZAP1 CGTTGACCGAG als Bindungssequenz bestimmt, das die W-Box einschließt (de Pater *et al.*, 1996). Des weiteren zeigen verschiedene Kombinationen aus W-Boxen oder W-Box-ähnlichen Motiven funktionelle Unterschiede. Eulgem *et al.* (1999) konnten eine schnelle und

transiente Genexpression auf eine palindromische Anordnung von zwei W-Boxen zurückführen. Pathogen- und Salizylsäure-induzierbare WRKY-Proteine konnten an ein elizitorresponsives Element, bestehend aus einem TGAC-X₃-TGAC-Tandem, binden und die Expression eines Chitinase-Gens aus *Nicotiana tabacum* aktivieren (Yang *et al.*, 1999). Änderungen des Abstandes der beiden TGAC-Kernsequenzen führten zum Verlust von Bindung. Dies zeigt, dass es für W-Boxen nicht nur eine sequenzspezifische Komponente bei der Erkennung gibt, sondern dass es durch die Kombination von W-Boxen eine weitere Ebene der Regulation gibt. Das häufige Vorkommen von W-Boxen in Promotoren von Genen, die ebenfalls während biotischen und abiotischen Stress-Situationen exprimiert werden, lässt vermuten, dass deren Regulation durch Wechselwirkung zwischen WRKY-Proteinen und W-Boxen in ihrem Promotor verläuft (Maleck *et al.*, 2000, Dong *et al.*, 2003).

In *A. thaliana* gibt es 74 Mitglieder der WRKY-Familie, und obwohl deren Beteiligung an sehr vielen verschiedenen Prozessen, wie z.B. Pathogenabwehr, Verwundung, Seneszenz und Pflanzenentwicklung deutlich gemacht wurde (Maleck *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002, Eulgem *et al.*, 2000, Rushton & Somssich 1998, Robatzek & Somssich, 2001, Robatzek & Somssich, 2002, Johnson *et al.*, 2002), ist der genaue Wirkmechanismus weiterhin unbekannt. Es ist lediglich bekannt, dass WRKY-Proteine ihre Funktion über die Bindung an die W-Box (TTGACC/T) ausüben. Dabei ist das Kernmotiv TGAC invariabel. Es kann durch Bindung von WRKY-Proteinen sowohl zur Genaktivierung als auch zur Genreprimierung kommen (Eulgem *et al.*, 2000, Robatzek & Somssich, 2001, Robatzek & Somssich, 2002). Die regulierte Aktivierung der GUS-Expression ist dabei abhängig von funktionellen W-Boxen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation der W-Box zum Verlust der Genaktivierung führt (Eulgem *et al.*, 2000, Kirsch *et al.*, 2001, Robatzek & Somssich, 2002) und zu einer starken Reduktion bis hin zum Verlust der Bindung von Proteinen aus Petersilie-Kernextrakten führen (Rushton *et al.*, 1996). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression des *Chitinase50*-Gens aus Tabak (Fukuda *et al.*, 1997), sowie von *PR1-1* und *PR1-2* aus Petersilie (Rushton *et al.*, 1996) durch derartige Interaktionen reguliert wird. Der Promotor von *SIRK* enthält neun W-Boxen und das *SIRK*-Gen wird bei Überexpression von *WRKY6* in adulten Blättern sehr stark induziert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass mindestens eine der W-Boxen im *SIRK*-Promotor eine Zielsequenz für das *WRKY6*-Protein darstellt (Robatzek & Somssich, 2002). Es ist verlockend anzunehmen, dass die Regulation mittels WRKY-Proteinen aus unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen W-Boxen resultiert. So kann beispielsweise *WRKY15* über die am weitesten vom ATG aus stromaufwärts gelegene W-Box im Promotor von *SIRK*-Reporter-genaktivität induzieren, wohingegen *WRKY6* die GUS-Expression über eine W-Box sehr nahe am ATG reguliert (Aifen Zhou, persl. Mitteilung). W-Boxen sind also trotz gleicher TTGACT-Sequenz verschieden, und es gibt signifikante Unterschiede bei der W-Box-abhängigen Genaktivierung durch WRKY-Faktoren.

1.3 Ziele der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Untersuchung der Bindung unterschiedlicher WRKY-Proteine an W-Box-Sequenzen. Es wird mittels

elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) getestet, welche Faktoren die Interaktionen von WRKY-Proteinen aus verschiedenen Untergruppen an W-Boxen beeinflussen. Es soll geklärt werden, ob es in DNA-Sequenzen spezifische Unterschiede in der Bindung durch WRKY-Proteine gibt, die beispielsweise die differenzielle Bindung von WRKY15 und WRKY6 im *SIRK*-Promotor ermöglichen. Dies soll zum besseren Verständnis der Interaktion von WRKY-Proteinen mit W-Boxen führen und Licht in die Spezifitätsbildung der Wechselwirkung bringen. Es gibt über 70 WRKY-Proteine, die vermutlich alle an sehr ähnliche *cis*-Elemente binden. Die Unterscheidung von Bindesequenzen durch flankierende Sequenzen ist bereits nahegelegt worden (Kirsch *et al.*, 2001, Rushton *et al.*, 2002). Die Veränderung der Bindung aufgrund von Basenänderungen in einer W-Box-Sequenz soll anhand verschiedener WRKY-Proteine aus den drei Hauptgruppen verglichen werden. Da in dieser Arbeit die Interaktion mit der W-Box genauer untersucht werden soll, ist es zum besseren Verständnis notwendig, die im Folgenden verwendeten Begriffe kurz zu erläutern. Bei einer W-Box-Sequenz handelt es sich um die W-Box TTGACY mit einigen flankierenden Basen im 5'- und 3'-Bereich. Erwähnung der W-Box allein bezieht sich auf die sechs Basen TTGACY, und wenn von der Kernsequenz die Rede ist, sind die vier Basen TGAC in der Mitte dieses Elementes bezeichnet.

Ausgewählte WRKY-Proteine sollen in einem heterologen System exprimiert werden und in Bindeversuchen den Einfluss bestimmter Basen an definierten Positionen von W-Box-Sequenzen aufzeigen. Wünschenswert ist die Erweiterung der bisherigen W-Box-Definition über die Sequenz TTGACY hinaus. Wie viele flankierende Basen und inwieweit diese an der Bindung involviert sind, soll ebenfalls untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist eine Analyse der gesamtgenomischen Verteilung der W-Box-Elemente sinnvoll. Dazu wird das kürzlich von D. Wanke und K. Berendzen (MPIZ, 2003) entwickelte Motif Mapper Programm zum Einsatz kommen.

Zusätzlich zu den *in vitro* Bindungen werden biolistische Partikelbeschuss-Experimente mit *Arabidopsis*-Blättern durchgeführt. Mit Hilfe artifizieller Promotor-Reportergen-Konstrukten sollte eine funktionelle Charakterisierung der *in vivo* Interaktion mit WRKY-Proteinen möglich sein. Verschiedene Parameter, wie Komplexität oder topologische Form des Transformationsvektors, können für den Transformationserfolg und die Zugänglichkeit der extrachromosomal vorliegenden DNA für Transkriptionsfaktoren entscheidend sein (Weintraub *et al.*, 1985, Ballas *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu Studien an stabil im Genom integrierten Genkonstrukten, ist die Expression der eingeführten Fremd-DNA im transienten System schon nach wenigen Stunden messbar. Konstrukte können deshalb sehr schnell analysiert werden und somit der umständliche und langwierige Prozess der Herstellung transgener Pflanzen umgangen werden. Damit ist das transiente System die bevorzugte Methode zur *in vivo* Charakterisierung der Interaktion von WRKY-Proteinen mit verschiedenen W-Box-Sequenzen. In diesen Versuchen gefundene interessante W-Box-Variationen können dann langfristig für weitere Analysen stabil in Pflanzen integriert werden und beispielsweise auf veränderte Induktion durch bestimmte Pathogene oder Stresssituationen untersucht werden.

Viele Fragen nach der biologischen Funktion der einzelnen WRKY-Faktoren oder Subgruppen von WRKY-Faktoren sind noch unbeantwortet. Die Komplexität der Multigenfamilie stellt einen hohen Anspruch an das experimentelle System. *A. thaliana* ist

als Modellorganismus einer höheren Pflanze für molekularbiologische und genetische Studien etabliert. Zusammen mit der Tatsache, dass *A. thaliana* ein kleines Genom von rund 120 Megabasen mit einer hohen Gendichte von etwa 25500 Genen hat (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), ist es der ideale Organismus für die Analyse einer pflanzlichen Familie von Transkriptionsfaktoren wie der WRKY-Faktoren. Dabei können Untersuchungen von Expressionsmustern mittels Promotor::Reporter-Gen-Pflanzen und Analysen von Null- und Überexpressions-Mutanten auf die Spur der Funktion eines unbekanntes Proteins führen und mögliche Rollen in den verschiedenen biologischen Prozessen einer Pflanze aufweisen. Anhand von Kurz-Charakterisierungen von drei WRKY-Proteinen soll deshalb Fragen zur Bedeutung der WRKY-Faktoren als Regulatorproteine nachgegangen werden. Jede zusätzliche Information kann das Bild der WRKY-Familie ergänzen, weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion geben und Ansatzpunkte für folgende Untersuchungen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Alle Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet. Sie wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck (Darmstadt). Das Substrat „Anhydro“ Tetracyclin lieferte die Firma IBA, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) und X-GLUC (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure) wurden von der Firma Biomol (Hamburg) verwendet. Chemikalien für die Herstellung von Kulturmedien lieferten die Firmen Difco Lab (Detroit, USA), GibcoBRL (Paesley, GB) und Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, DNaseI, RNase, Lysozym sowie DNA-, RNA- und Protein-Größenmarker lieferten die Firmen Amersham (Buckinghamshire, UK), Roche (Mannheim), GibcoBRL (Paesley, GB), New England Biolabs (New England, USA) und Serva (Heidelberg). Hersteller des eingesetzten Radioisotops $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) war die Firma Amersham (Buckinghamshire, UK). Das für die Reinigung radioaktiv markierter Sonden verwendete Säulenmaterial Sephadex G-25 bzw. G-50 superfine wurde von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Röntgenfilme lieferte die Firma Kodak (Rochester, NY, USA). Die zur Proteinreinigung verwendeten Kobalt oder Ni-NTA-Säulen wurden von Clontech (Heidelberg) und von Pierce (Rockford, USA) geliefert.

2.2 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Alle Lösungen wurden mit hoch entionisiertem Millipore-Wasser angesetzt. Die meisten Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

2.3 Deoxynukleotide

Alle Deoxynukleotide wurden von Invitrogen (Heidelberg) oder Operon/Qiagen (Köln/Hilden) synthetisiert. Die Sequenzen der Primer sind in 5' \rightarrow 3' Richtung angegeben. Gateway[®]-Technologie kompatible Extensionen werden mit (GWF) und (GWR) abgekürzt. Dabei steht (GWF) für eine "Sinn"-orientierte attB₁- und (GWR) für eine "Gegensinn"-orientierte attB₂-Extension. Diese Oligonukleotide wurden ausschließlich von der Firma Invitrogen, Heidelberg, bezogen. Der Zusatz CTD in Primernamen steht für C-terminale Domäne.

WRKY 6 spezifische Primer

W6ExN-Bam

GAACCGGATCCATGGACAGAGGATGGTCTGGT

W6ExN- <i>Kpn</i>	GAACCGGTACCCCTCATCGTAGCTTCAGCGGTTT
W6ExC- <i>Bam</i>	GAACCGGATCCATGTCTAGTCACGACGGGATG
atW6-s1(CTD)	GAACCGGATCCGGAAAGCCCGTGTCTCCGTTCCG
atW6s1a	GAACCGGATCCATGAGGAAAGCCCGTGTCTCCG

WRKY 11 spezifische Primer

atW11-s2	CGCGGATCCATGGCCGTCGATCTAATGCGT
atW11-s3(CTD)	CGCGGATCCATGAAGAGAACCGTGAGAG
atW11-s3(CTD)GW	(GWF)ATGAAGAGAACCGTGAGAG
atW11-a2	CGGGGTACCAGCCGAGGCAAACACTAAATC
atW11-a4(NTD)	CGGGGTACCCTTGCAATGGCACTTTCCGTAGG
atW11-a5(CTDm1WRKY)	CCGATCGCCCCAACGAATATTCGTCCGGTGG
atW11-a6(CTDm2WRKY)	CCGTACGCCCCCACGAATATTCGTCCGGTGG
atW11-a7(CTDm3zf)	CGCTGGACCTCCTCTGAATGTACTIONGAC
atW11s5-CTD-GW	(GWF)TCATGAAGAGAACCGTGAGAG
atW11a11_CTDm4	CCG TAC TTC CCC CAC GAA TAT TCG TCC GGT GG
atW11a13_CTDm5	GTCCGTACCTCTTCCACGAATATTCGTGTC
atW11a14_CTDm6	GTCCGAACTTCCTCCACGAATATTCGTGTC
atW11a15_CTDm7	CGTCCGGTGGAATTTCCGGCG
atW11a16_CTDm8	GTGGTGAGCCCCTGATCGG
atW11a17_CTDm9	GTAGTAACCATGTGGGTGTG
atW11a18_m10	GTAGAAACCACGTGGGTGTG
atW11a19_m11	GCTCGTTCCACGTGTCTCCTC
atW11a20_m12	GCTCGTTCCAAGTGTTTCCTC
atW11a21_m13	GCTTTTTCCACGTGTTTCCTC
atW11a22_m17	GTCCGTACTTCCTCCACGAATATCCGTGTC
atW11a23_m18	GTCCGTACTTCCTCCAAGTATATTCGTGTC
atW11a24_m19	GTAGTAACTACGTGGGTGTG
atW11a25_m20	GCTCGTTCCACGTGTTTCCTC
atW11a26_m21	TAGATGGTCCAGCGATGC
atW11s6_m14	TAGATGAGCCAGCGATGC
atW11s7_m15	GTGCCATACGAAGGAGAG
atW11s8_m16	GTGACATTCGAAGGAGAG

WRKY 26 spezifische Primer

atW26s3	GAACCGGATCCGAGGCCAAGAGATGGAAAAGAG
atW26s3(CTD)GW	(GWF)GAGGCCAAGAGATGGAAAAGAG
atW26s4- <i>Bam</i> HI	GAACCGGATCCATGGCTCTTTTGATCGCCAAAGAGCT GTTCCG
atW26a2	GAACCGGTACCTCCAAGTAACCTTAAACTGGACC
atW26a3	GAACCGGTACCCTCTTTTCCATCTCTTGGCCTC
atW26p_s2kb_GW	(GWF)GATATATAATGTAAAGGGCGC
atW26a6_GW	(GWR)CCGGAACAGCTCTTTGGCG

WRKY 38 spezifische Primer

atW38s3- <i>Eco</i> RI	GAACCGAATTCATGAACTCCCCACACGAAAAGGCGG
atW38s4- <i>Sal</i> I	GAACCGTGCACATGAACTCCCCACACGAAAAGGCGG

atW38a1	GAACCGGTACCATCCCACGAGTCTGGGTTGTC
atW38a2_Sall	GAACCGTCGACATCCCACGAGTCTGGGTTGTC
atW38p_s2kb_GW	(GWF)GAACAAAATACATGTGGGC
atW38a4_GW	(GWR)CCCGCCTTTTCGTGTGGGG

WRKY 43 spezifische Primer

atW43p_s2kb_GW	(GWF)CCACTGCAGAAAGGTCCAGCC
atW43a1_GW	(GWR)CCTTTGTGCGAAACGAAAATCGCGG
43p_W1s	TAATTTGTTTCATTGACACAAAATCTTGTA
43p_W1a	TACAAGATTTTGTGTCAATGAAACAAATTA
43p_W2s	CCTGACTAGAGCTTGACTCGTAGGTACCAA
43p_W2a	TTGGTACCTACGAGTCAAGCTCTAGTCAGG

Vektor spezifische Primer

pGEX-s2	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX-a2	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG
pQE34-s2	GAGCGGATAACAATTTACACAC
pQEre-a2	GTTCTGAGGTCATTACTGGATC
0524-NOS-Pro-a	GTGCAATCCATCTTGTTCAATC
0525-GUS-94bp-a	CTGATCAATTCCACAGTTTTTCG

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

<i>E. coli</i>-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
DH5 α	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)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> λ (DE3)	Stratagene
OneShot	F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>tonA</i>	Invitrogen
DB3.1:	F ⁻ <i>gyrA462</i> <i>endA1</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>supE44</i>	Invitrogen
<i>Agrobacterium</i>-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
GV3101	mit pMP90-Virulenz Plasmid, C59C1, Rif ^R	(Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
Plasmide	wesentliche Merkmale	Referenz
pQE30	T5-Promotor, 2x <i>Lac</i> Op, RBSII, MCS, 6xHis, Amp ^R	Qiagen
pTOPO 2.1 PCR cloning	pCR2.1-TOPO <i>f1 ori</i> , <i>lacZ</i> α , T7-Promotor, pUC <i>ori</i> , Kan ^R , Amp ^R	Invitrogen
pGEX2Tm-GW	modifizierter pGEX2T Vektor GST N-terminal, 6xHis Tag C-terminal	Pharmacia
pASKgwy	basiert auf pASK5, N-terminaler Strep Tag,	IBA, Gateway-Kompatibilität von Marc Jakoby (MPIZ) erstellt
pDONR201	Donorvektor für PCR-Produkte mit Gateway-Verlängerung, Kan ^R	Invitrogen
pDONR207	Donorvektor für PCR-Produkte mit Gateway-Verlängerung, Gen ^R	Invitrogen
pJawohl11	Bestimmungsvektor für Gateway System, β -GUS, Kan ^R ,	Bekir Uelker, MPIZ
p35S-GFP-GW	Bestimmungsvektor für Gateway System pAM-PAT basiert, Kan ^R in Pflanzen, Amp in <i>E.coli</i> , Rif ^R /Gen ^R /Kan ^R in Agro, C-terminales GFP	Franziska Turck, MPIZ
pMS23	Amp ^R , Minimalpromotor vor β -GUS-Gen	Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000

2.5 Pflanzen und Pflanzenanzucht

2.5.1 Kultivierung von *A. thaliana*

Für alle Analysen wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Ökotyps *Col-0* oder *Ler* 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 anschließend im Gewächshaus unter Langtag (LT) Bedingungen. Die Samen wurden bei 4°C gelagert und so zur verbesserten Keimung einer Vernalisation ausgesetzt. Gesunde Organe (Wurzel, Blätter, Sprossachsen, Blüten und Schoten) wurden geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Wurzeln von in Erde angezogenen Pflanzen wurden durch vorsichtiges Waschen von der Erde befreit.

Die Anzucht von transgenen Pflanzen erfolgte nach folgendem Protokoll: Samen wurden auf ½ MS-Salz, 0,6% Agar, 1xVitamin-Mix, ohne Saccharose über Nacht bei 4°C inkubiert und dann unter Langtag-Bedingungen (18 h Licht, 6 h Dunkelheit, 20°C) in einem Lichtschrank (Kühllichtbrutschrank KBK/LS 4300, Firma BioTron, Hilden) angezogen. Nach 10-14 Tagen wurden die Keimlinge in Erde pikiert und nach einer Übergangsphase von 2 Tagen unter einer transparenten Schutzhaube im Gewächshaus unter standardisierten Bedingungen (LT, UV-haltiges kaltes Weißlicht, 60% rel. Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) kultiviert. Die Samenbildung setzte nach etwa 6-8 Wochen ein, die Samenreifung war nach etwa 12 Wochen vollständig abgeschlossen. Die trockenen Schoten wurden geerntet, die reifen Samen abgetrennt und in Papiertüten bei RT gelagert.

Für diverse Behandlungen mit Hormonen und abiotischen Stresssituationen wurden etwa ein und zwei Wochen alte Keimlinge, die unter sterilen Bedingungen auf Platten (½ x MS-Medium, 1% Saccharose, 0,6% Agar, 500 µl/l Gamborgs Vitamine) angezogen wurden, und voll entwickelte Blätter von etwa 4 Wochen alten, auf Erde und im Gewächshaus kultivierten Pflanzen verwendet. Verwundungen wurden nur an voll entwickelten Blättern von 4-5 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

2.5.2 *A. thaliana* WRKY-Mutanten:

2.5.2.1 Identifikation und Isolierung

Herkunft der verwendeten Linien

Die untersuchten Null-Mutantenlinien von *AtWRKY26* und *AtWKRY43* stammen aus den sogenannten „Enhancer Trap Linien“ aus dem Labor von Robert Martienssen (Cold Spring Harbour Laboratory, Arabidopsis Gene Trap Stock Center) und enthalten die Integration einer T-DNA mit Selektionsmarker und dem offenen Leseraster der *E. coli uidA*, die für die β-Glucuronidase (GUS) kodiert. Bei den Pflanzen handelt es sich um *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps *Landsberg erecta* (*Ler*).

Bestätigung der Integration und Bestimmung homozygoter Pflanzen

Die erhaltenen Samen wurden zunächst zur Vermehrung der vorhandenen Samen in Erde ausgebracht und zur Keimung gebracht. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter LT-Bedingungen bis zur vollständigen Reifung der Samen angezogen. Die Samen der einzelnen Pflanzen wurden getrennt geerntet und als getrennte Linien aufbewahrt.

Samen der einzelnen Linien wurden anschließend unter sterilen Bedingungen auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten ausgesät. Zur Bestätigung mutmaßlich positiver Insertionsereignisse wurden PCR-Reaktionen in 50 μ l Ansätzen mit Primer-Kombinationen aus jeweils einem *AtWRKY*-spezifischen Primer (Gen1) und einem T-DNA spezifischen Primer (T-DNA1) oder zwei *AtWRKY* spezifischen Primern (Gen1, Gen2) durchgeführt. Die Integration der T-DNA führt dazu, dass mit den Gen spezifischen Primern wegen des zu langen Fragmentes kein PCR-Produkt amplifiziert werden kann. Nur mit T-DNA1 und Gen1 als Primer sollte sich bei homozygoten, transgenen Pflanzen ein Produkt ergeben. Bei heterozygoten Pflanzen sollten beide Primer-Kombinationen jeweils ein PCR-Produkt ergeben. So kann die Hetero- und Homozygotie einfach überprüft werden.

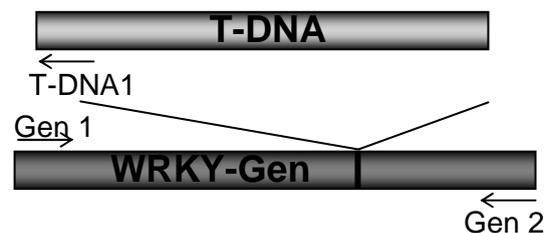


Abbildung M1: Nachweis einer T-DNA Integration im untersuchten Gen mittels PCR. Gen1 und Gen2 sind gen-spezifische Oligonukleotide, T-DNA1 ist ein T-DNA spezifischer Primer. Durch die Integration wird das Gen unterbrochen, gen-spezifische Primer ergaben in diesem Fall der PCR kein Signal, die Insertion ließ sich durch Reaktionen der Gen spezifischen, kombiniert mit den Insertions- spezifischen Primern nachweisen.

Zur schnellen Präparation genomischer pflanzlicher DNA wurde 10 - 100 mg Pflanzengewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 50 - 500 μ l Extraktions-Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 M NaCl) versetzt und mit einem kleinen Pistil zerstoßen. Es wurden entweder Blätter von jungen Pflanzen oder ganze Keimlinge aufgeschossen und 1 μ l dieses Extraktes in der PCR-Reaktion verwendet. Zur Stabilisierung der DNA erfolgte der Vorgang auf Eis. Die unlöslichen Pflanzenteile wurden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (10 min bei 2000 Upm) sedimentiert. Der Überstand konnte sofort für die PCR verwendet werden (modifiziert nach persl. Mitteilung, Kenneth Berendzen, MPIZ-Köln, 2003).

Alle PCR-Amplifikate wurden in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzliche Bestätigung der Homozygotie oder Heterozygotie erfolgte durch Beobachten des Auftrennungsmusters der Keimlinge auf Selektionsplatten ($\frac{1}{2}$ x MS, 50 μ g/ml Kanamycin). Dabei müssen von homozygoten Linien alle Pflanzen wachsen und überleben, wohingegen bei Wildtyp-Pflanzen alle Keimlinge sterben und bei heterozygoten Linien etwa $\frac{1}{4}$ der Pflanzen.

Alle analysierten Linien wurden in der nachfolgenden Generation durch Segregationsanalyse bzw. PCR erneut überprüft.

2.5.2.2 Morphologische Untersuchungen

Es wurden verschiedene Linien der Mutanten parallel mit Wildtyp ausgesät und auf Segregation überprüft. Für die weitere Untersuchung erfolgte die parallele Anzucht von je neun Wildtyp- und Mutantepflanzen (zwei verschiedene Linien von der WRKY43 Mutante, drei verschiedene Linien von der WRKY26 Mutante), einmal unter LT- und

einmal unter KT-Bedingungen. Zur Vergleichbarkeit wurden alle Samen in einer Schale mit 6x9 Feldern ausgebracht, so dass pro Feld eine Pflanze angezogen wurde.

2.6 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle verwendeten gängigen molekularbiologischen Methoden, die in Laborhandbüchern wie z.B. in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben sind, sind hier nicht näher aufgeführt.

2.6.1 Restriktions-Endonukleaseverdau

Die Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurde mit passenden Puffern nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20-50 μ l. Eine ggf. folgende Dephosphorylierung mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 1 U alkalischer Phosphatase für 10 Minuten bei 37°C mit anschließender Inaktivierung durch 10-minütiges Inkubieren bei 70°C.

2.6.2 Ligation

Ligationen wurden in 10 oder 20 μ l Gesamtvolumen nach der beschriebenen Methode (Sambrook *et al.*, 1989) mit 1 U T4-DNA-Ligase und dem zugehörigen Puffer angesetzt. Die Inkubationen erfolgten über Nacht bei 16°C oder 2 h bei RT.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden unter Zugabe von Gen-spezifischen Primern (Endkonzentration jeweils 0,5 μ M), 50-100 ng genomischer DNA oder 10-50 ng Plasmid-DNA als Matrize, 0,2 mM eines dNTP-Mixes, 5U Taq- oder 2,5 U *Pfu*-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in entsprechendem 1x PCR-Puffer angesetzt. In einem MJ-Research 225PTC-Peltiercycler-Gerät wurde die Amplifizierung in der Regel nach folgendem Schema durchgeführt:

94°C	5 min	30-35 Wiederholungen
94°C	45 s	
58-62°C	60 s	
72°C	1 min/1kb	
72°C	8 min	

Grundsätzlich wurde der Block zunächst auf die Denaturierungstemperatur gebracht, bevor die Proben geladen wurden, um unspezifische Amplifikation fehlgebundener Oligonukleotide zu verhindern. 15 μ l der entstandenen Produkte wurden in 1% TAE-Agarosegelen aufgetrennt und die Banden mittels Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die ungerichtete Klonierung von PCR-Produkten

erfolgte unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning Kits der Firma Invitrogen (Groningen, NL). Die vom Hersteller angegebenen Mengen wurden dabei auf die Hälfte reduziert.

2.6.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „Nukleospin Extraction Kit“ der Firma Macherey Nagel (Düren) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Elution der Proben erfolgte immer mit 30 µl sterilem H₂O.

2.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierungen von Plasmiden aus Bakterien wurden im Mini-Maßstab mit dem Nukleospin Plasmid-Kit der Firma Macherey & Nagel (Düren) durchgeführt. Elution der Plasmide erfolgte zweimal mit 50 µl sterilem H₂O. Plasmide, die in größeren Mengen benötigt wurden, wurden mit dem „Plasmid Maxi-Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.6.6 Transformation

2.6.6.1 Transformation mit DH5α und DB3.1

Die Transformationen mit Plasmid-DNA oder Ligationsprodukten, von denen jeweils 4 µl 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 vektorspezifische Primer zusammen mit einigen Zellen der Kolonien eingesetzt wurden.

2.6.6.2 Transformation des Expressionsstammes BL21(DE3)

Das Protokoll ist optimiert für die Verwendung von 15 ml Falcon-Röhrchen.

Zu 100 µl kompetenten Zellen werden auf Eis 2 µl β-Mercaptoethanol (140 mM) gegeben und 10 Minuten unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von etwa 100 ng Plasmid-DNA werden die Zellen weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgt durch Hitzeschock bei 42°C für 20 Sekunden und einer anschließenden 2- bis 3-minütigen Abkühlung der Zellen auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl vorgewärmtem SOC (10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 2,4 g MgSO₄, 20 mM Glucose, ad 1l) und Regeneration bei 37°C für eine Stunde werden etwa 200 µl der Kultur auf einer LB-Platte mit Antibiotikum zur Selektion ausplattiert.

2.6.7 DNA-Sequenzierung und Auswertung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe ADIS des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung mit Hilfe eines automatischen Verfahrens der Firma Applied Biosystems nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit den Programmen der Unix-basierenden Software GCG bestfit, gap und pileup (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA) ausgewertet. Sequenzvergleiche und Datenbankrecherchen wurden im Internet mit den Programmen BlastN und BlastX durchgeführt (Altschul, 1997).

2.6.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA ausgehend von etwa 500 mg Pflanzenmaterial wurde der „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Pflanzenmaterial wurde im gekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und eine dem Pflanzenmaterial entsprechende Menge QRL-Puffer zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

Alternativ kam die vorgemischte Phenol-Lösung RNAWiz (Ambion, Austin USA) zum Einsatz. Die Isolierung wurde mit 500 mg Pflanzenmaterial nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.9 Isolierung genomischer DNA

Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurde mit dem NucleonPhytopure Kit der Firma Amersham in Anlehnung an die Vorschrift durchgeführt. Die wichtigsten Änderungen beinhalten die im Folgenden beschriebenen Details.

Zwischen 25 und 50 mg Gewebe wurde frisch in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen und mittels Silicabeads (Durchmesser 0,5 mm, Firma Roth, Karlsruhe) im BeadBeater (BioSpec Products, Oklahoma) für 30 sec bei RT homogenisiert. Nach Zugabe von 600 µl Puffer 1 wurde das Homogenat durchmischt und mit weiteren 200 µl Puffer 2 versetzt für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach 20 min auf Eis wurden 75 µl der Suspension (PhytoPure DNA extraction resin suspension) und 500 µl Chloroform zupipettiert und die Proben für 30 min auf einem Überkopfschüttler gemischt. Im Anschluss wurden die Phasen durch Zentrifugation (0,8 g, Eppendorf Tischzentrifuge) getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde nach Abtrennung mit 10 µl RNase Lösung (10 mg/ml) versetzt und erneuter Zentrifugation (15.000 Upm, 30 min, RT, Heraeus Biofuge Primo R) unterworfen. Der klare Überstand wurde nach Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation (15.000 Upm, 30 min, RT, Heraeus Biofuge Primo R) pelletiert. Im Anschluss an einen Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 35 µl 10 mM Tris/HCl pH8 resuspendiert. Quantifikation und Bestimmung der Reinheit wurde im Eppendorf BioPhotometers in UV-durchlässigen Küvetten durchgeführt. Diese quantifizierten Lösungen dienten als Template bei PCR-basierenden Experimenten zur Bestimmung des Genotyps individueller Pflanzen.

2.6.10 Expressionsanalysen mittels Slot Blot

2.6.10.1 Herstellung der Filter

Bis auf WRKY 5, 16, 23, 55 und 66 die als spezifische genomische Fragmente in den Topo-TA-Vektor kloniert wurden, befinden sich alle cDNAs im Gateway-Vektor pDONR201. Es wurden 72 WRKY cDNAs zur Herstellung der Filter eingesetzt, d.h. von den 74 WRKY-Genen in *Arabidopsis* sind WRKY72 und WRKY73 nicht auf dem Filter enthalten.

Die Plasmid-DNA wurde durch Verdau mit *Nru*I linearisiert, die Konzentration auf 200ng/µl eingestellt und nach Auftrennung in einem 1% Agarose Gel mittels Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator kontrolliert. Vor Transfer der DNA auf eine neutrale Nylon Membran (Nytran-N 0,45, Schleicher&Schuell) wurden 50 µl linearisierte Plasmid DNA mit 5 µl NaOH (10 N) versetzt, 10 Minuten bei 80°C erhitzt, anschließend zur Neutralisierung 50 µl NH₄Ac (2 M) zugegeben und die Proben bis zum Auftragen in die dafür vorgesehenen Taschen der Slot Blot Apparatur (Slot Blot II, Schleicher&Schuell) auf Eis aufbewahrt. Zunächst wurde die aufgetragene Plasmidprobe 2 h bei RT inkubiert, um langsames Einziehen zu ermöglichen, danach wurde die DNA zur Beschleunigung des Vorganges durch ein leichtes Vakuum auf die Membran gesaugt. Waschen erfolgte durch zweimalige Zugabe von 150 µl NH₄Ac (1 M) unter Vakuum. Nach dem Trocknen der Filter wurde die DNA durch Crosslinken (Stratalinker2400, Stratagene) auf der Membran fixiert.

2.6.10.2 Herstellung der Sonde

Zur cDNA-Synthese wurde mit Hilfe eines oligo-dT-Primers (T₁₅₋₁₈) und dem Enzym Reverse-Transkriptase (Superscript II; Invitrogen, Heidelberg) eine Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt. Aufgrund der Spezifität des oligo-dT-Primers wurden nur die polyadenylierten mRNAs als Matrize für die cDNA-Synthese verwendet. 25 µg bis 30 µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit 1µg oligo-dT-Primer in einem Volumen von 25 µl für 10 min bei 70°C denaturiert, für weitere 10 min bei RT abgekühlt und anschließend auf Eis gelagert. Dann wurden die vorgemischten, übrigen Reaktionsbestandteile (10 mM A/T/GTP und 0,1 mM CTP, Puffer, 20 U Reverse Transkriptase, 0,1 M DTT, 50 µCi ³²PdCTP, 5 U RNase Inhibitor) entsprechend zugegeben, so dass der Reaktionsansatz ein Volumen von 50 µl erreichte. Der Ansatz wird zur reversen Transkription für 1,5 h bis 2 h bei 42°C inkubiert. Es folgte Zugabe von 1% SDS, 0,5 M EDTA, 10M NaOH und eine Inkubation zunächst bei 65°C für 30 Minuten und anschließend bei RT für 15 Minuten. Zur Neutralisierung wurde 1 M Tris/HCl 8,3, 2N HCl zugegeben. Vor der Fällung mit 70 µl Isopropanol (30 Minuten bei -20°C) erfolgt die Zugabe von 3 M NaAc, pH 5,3 und tRNA (50 µg) und die Entnahme von 1 µl Lösung. Zur Pelletierung der gefällten DNA wird der Ansatz bei RT für 30 Minuten zentrifugiert, in 68 µl H₂O resuspendiert und wieder 1 µl der Lösung zur Bestimmung der Einbaurate entnommen. Wenn die Einbaurate größer als 40% war und insgesamt mehr als 50 Millionen Counts pro Minute (cpm) gezählt wurden, wurde die Sonde zur Hybridisierung verwendet.

2.6.10.3 Hybridisierung

Die Hybridisierungen erfolgten in Röhren in einem Rollinkubator bei 65°C in Church-Puffer (0,5 M NaPO₄ pH7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA). Nach mindestens 60 min Prähybridisierung wurde die Sonde (mindestens 50 Mio. cpm) hinzugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Membranen wurden danach 4 x 30

Minuten bei 65°C in 0,2 x SSC, 0,5% SDS gewaschen, anschließend in Folie eingeschweißt und auf einem Phosphorimage-Screen bei RT exponiert.

2.6.10.4 Auswertung

Nach fünf Tagen erfolgte das Auslesen des Phosphorimage-Screens mit dem Typhoon Scanner und die Auswertung der Bilder mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyval, USA). Für jedes Feld der über den Bildausschnitt gelegten roten Tabelle (siehe Beispielfilter in Abbildung M2) wird mit ImageQuant die Signalstärke berechnet und in einer Excel-Tabelle dargestellt.

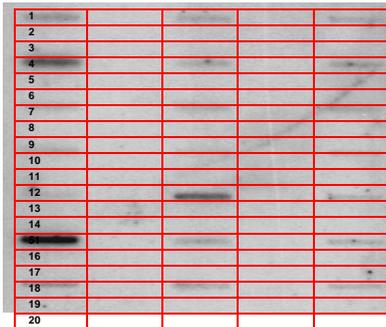


Abbildung M2: Ausschnitt eines Filters mit darüber gelegter Tabelle zur Bestimmung der Signalstärke.

Das Programm ImageQuant berechnet für jede Zelle einen Wert, der der durchschnittlichen Signalintensität dieses Feldes entspricht und stellt diesen in einer Excel Tabelle dar. Die weitere Auswertung erfolgt mit dem Programm Excel.

Die durchschnittliche Hintergrundintensität der beiden ober- und unterhalb einer Bande liegenden freien Felder wurde von dem Signal der WRKY-cDNA subtrahiert ($\text{Feld4} - (\text{Feld2} + \text{Feld3} + \text{Feld5} + \text{Feld6})/4$), um so filterinterne Unterschiede in der Hybridisierung auszugleichen. Dadurch ergab sich eine Anpassung der Filter aus verschiedenen Hybridisierungen, da stärkere Signale meist auch einen stärkeren Hintergrund zur Folge haben.

Zur Normalisierung wurden WRKY-Gene verwendet, von denen aus Northern-Experimenten bekannt ist, dass sie unter bestimmten Bedingungen nicht induziert sind, wie z.B. WRKY1 bei Salizylsäure-Behandlung.

2.6.11 RT-PCR zur Gewinnung von WRKY-cDNA

Zur Amplifizierung der WRKY-spezifischen cDNA aus Gesamt-RNA Extrakten wurde der „OneStep RT-PCR Kit“ von Qiagen zusammen mit genspezifischen Primern nach Herstellerangaben verwendet. Beide Primer enthalten eine *Bam*HI bzw. eine *Kpn*I Schnittstelle als 5'-Verlängerung. Die eingesetzte Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* Blüten wurde photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers (Eppendorf) quantifiziert und für jede Reaktion 0,5 µg eingesetzt. Das Pipettieren erfolgte auf Eis, und erst nach Vorheizen des Heizblockes der PCR-Maschine wurden die Proben in den Block gesetzt.

PCR

Reverse Transkription	50°C, 30 min	
Abstoppen der Transkription	95°C, 15 min	
Denaturierung	94°C, 45 s	} 35 Zyklen
Oligonukleotidbindung	58°C, 45 s	
Oligonukleotidverlängerung	72°C, 90 s	
Abschließende Verlängerung	72°C, 10 min	

Die entstandenen Produkte wurden in 1% TAE-Agarosegelen aufgetrennt und die Banden mittels Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Banden der richtigen Größe wurden ausgeschnitten, eluiert, mit *Bam*HI und *Kpn*I verdaut und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Kpn*I geöffneten Vektor (pQE30) ligiert. Bei Klonierungsproblemen wurden die PCR Fragmente nach Herstellerangaben ungerichtet in den Topo-TA Vektor (Invitrogen) ligiert und erst dann Fragmente mittels Verdau gewonnen und in den gespaltenen Expressionsvektor ligiert.

2.6.12 Klonieren mittels GATEWAY® -Technologie

Das Verwenden der GATEWAY®-Technologie, die mittels Clonasen® die spezifische Rekombination zwischen att-Regionen katalysiert, sowie das Erstellen von GATEWAY® -Technologie-kompatiblen Oligonukleotiden oder Vektoren erfolgte nach Angaben des Herstellers Invitrogen, Heidelberg, wobei das Reaktionsvolumen jedoch auf 5 µl reduziert wurde.

PCR Produkte wurden in pDONR201 (Kan 75mg/ml) oder pDONR207 (Gen 15mg/ml) über BP-Reaktion kloniert: 0,5 µl Donorvektor (etwa 100 ng), 0,5 µl BP-Clonase, 1 µl BP Puffer und 1-3 µl gereinigtes PCR-Produkt. Kontrolle einiger Kolonien erfolgte mittels PCR-Produkt- oder Vektor-spezifischer Primer und anschließender Sequenzierung. Wenn keine Fehler in der Sequenz auftraten, wurden 0,25 µl des pDONR-Klons, 0,25 µl (50-100 ng) Zielvektor, 1 µl LR-Puffer, 0,5 µl LR-Clonase und 2,5 µl H₂O als LR-Reaktion über Nacht bei 16°C inkubiert. Es folgte die Transformation des gesamten Reaktionsansatzes in DH5α-Zellen und die Selektion positiver Klone mittels Antibiotika-Resistenz und Kolonie-PCR.

2.6.13 Herstellung der Expressionsvektoren

2.6.13.1 Klonierungen in den Vektor pQE30 mit N-terminalem 6xHis-Epitop (Qiagen)

Der Expressionsvektor pQE30 wurde bereits für die heterologe Expression von *WRKY*-Genen erfolgreich eingesetzt. Analog sollten die kodierenden Bereiche von *WRKY*26, *WRKY*38 und *WRKY*43 ausgehend von RT-PCR-amplifizierter cDNA in die *Bam*HI/*Kpn*I Restriktionsschnittstellen des Vektors kloniert werden. Die Fragmente wurden inklusive des endogenen Startkodons aber ohne Stopkodon amplifiziert und nach entsprechenden Restriktions-Endonuklease-Behandlungen aus Subklonierungsvektoren (pTOPO, Invitrogen) in den geöffneten Expressionsvektor transferiert. Die Kontrolle der Klone erfolgte über PCR mit einer Oligonukleotid-Kombination spezifisch für *WRKY*-cDNA, den Vektor oder einer Restriktions-Endonukleasebehandlung. Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von IPTG.

2.6.13.2 Klonierungen in den Vektor pGEX2Tm-GW mit C-terminalem 6xHis-Epitop und N-terminaler GST-Fusion

Zur Verbesserung der Löslichkeit der exprimierten Proteine wurden die *WRKY*-cDNAs in den zum Gateway System kompatiblen Vektor pGEX2Tm-GW (basierend auf pGEX2T, Amersham) kloniert. Dazu wurden mittels PCR die flankierenden att-B Rekombinationssequenzen eingefügt und das PCR-Produkt anschließend mit den entsprechenden Clonasen zuerst in den Donorvektor pDONR201 und dann in den

gewünschten Expressionsvektor kloniert. Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von IPTG.

2.6.13.3 Klonierungen in den Vektor pASK-gwy (IBA) mit N-terminalem Strep-Epitop

Das pASK-System von IBA zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde von Marc Jakoby in ein zur Gateway-Technologie kompatibles System umgewandelt. Unter der Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994) wird das *tet*-Repressor-Gen konstitutiv exprimiert und die heterologe Expression des klonierten Gens in der Zelle ausschließlich durch die Zugabe von (Anhydro)-Tetracyclin induziert. Plasmid-Instabilität durch potentiell toxische Effekte der exprimierten Proteine wird so vermieden. Die Kontrolle der Klone erfolgte über PCR mit einer Oligonukleotid-Kombination, die spezifisch für WRKY 11 CTD und den Vektor ist, bzw. mit einem Restriktionsverdau. Die Induktion erfolgte mit Anhydro-Tetracyclin, das weniger toxisch als Tetracyclin ist und daher in höherer Konzentration zur verbesserten Induktion eingesetzt werden kann.

2.6.13.4 Erzeugung und Klonierung von WRKY 11 CTD Mutationskonstrukten

Für die Analyse des Einflusses von konservierten Aminosäuren auf die Bindung von WRKY-Proteinen an DNA wurden durch die sogenannte Megaprimer-Methode (Ke & Madison, 1997) verschiedene Aminosäure-Austausche in WRKY11-CTD eingefügt. Das durch eine PCR-Reaktion mit den Primern A und B gewonnene Fragment wurde als Megaprimer in einer erneuten PCR-Reaktion mit dem Primer C eingesetzt. Dabei wurde in einem Triplett entweder in Primer A oder Primer B ein oder zwei Basen so geändert, dass es bei der Translation zum Einbau einer anderen AS führt. Die Konstrukte wurden in die *Bam*HI/*Kpn*I Schnittstelle des pQE-Vektors oder in den pASK-gwy-Vektor kloniert.

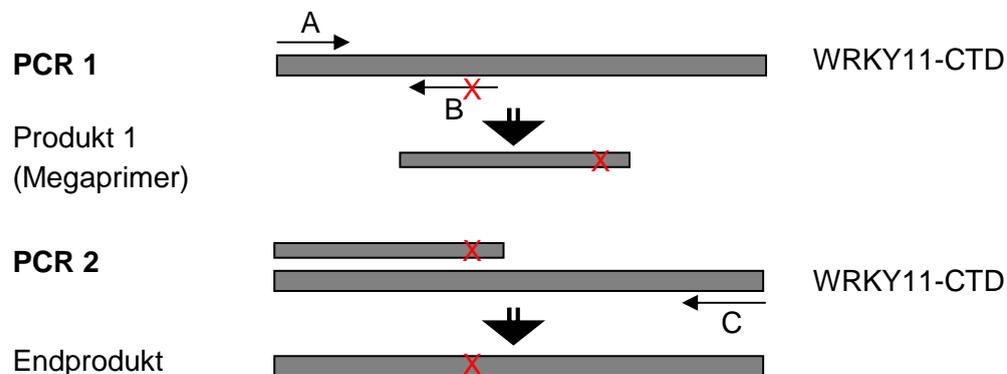


Abbildung 2: Schema zur Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen mittels Megaprimer PCR

Mit den Primern A und B wird in der ersten PCR das Megaprimer-Fragment erzeugt, das in diesem Fall die mit dem Primer B eingeführte(n) Mutation(en) (X) trägt. In einer weiteren PCR wird mit dem Megaprimer und dem Primer C die Mutation auf das Zielgen (Endprodukt) übertragen.

2.6.14 Expression der Proteine

Nach Transformation des rekombinanten Expressionsplasmids in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) wurden separate Kolonien in 10 ml LB Starterkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Nach einer Wachstumsphase von etwa 16 h

wurde das Zellpellet in 1 l frisches Medium überführt und weitere 3-4 h bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Durch Zugabe von IPTG in der Endkonzentration von 1 mM bzw. 100 µl Tetracyclin (2µg/µl) sollte die Expression des heterologen Proteins induziert werden. Nach erneuten 4 h wurden die Kulturen durch Zentrifugieren bei 4°C pelletiert. Eine separate Probe von 1 ml diente jeweils der Überprüfung erfolgreicher Induktion mittels eines SDS-PAGE und Färbung der Proteinbanden mit Bio-Coomassie (BioRad). Je nach weiterem Vorgehen wurden die Pellets in verschiedenen Puffern resuspendiert oder bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Die Inkubation aller Bakterienkulturen erfolgte bei 37°C und 220 Upm in LB-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt wurde.

2.6.15 Herstellung von Proteinextrakten

Rohextrakte von Bakterien zur Überprüfung der Expression wurden durch Resuspension der sedimentierten Bakterien (6000g, 10 min, 4°C) in 1× Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) Glycerin, 2,5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,0005% (w/v) Bromphenolblau) hergestellt (Laemmli, 1970).

Für eine native Aufreinigung der löslichen Proteine für die Bindestudien wurden die sedimentierten Bakterien in dem Puffer B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) auf Eis resuspendiert, die DNA durch Zugabe von DNaseI degradiert und die Mischung für mindestens 4 Stunden bis über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Zur Reduzierung von Proteindegradierung wurden die Protease-Inhibitoren PMSF (100 µM), Leupeptin (10 µM), Antipain (10 µM) und Aprotinin (1 µM) hinzugefügt. Die extrahierten löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation (2 h, 4000 Upm, 4°C) von Zelltrümmern getrennt und in kleinen Aliquots (50 µl) bei -80°C gelagert.

Der Aufschluss unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mit Harnstoff Puffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0). Das Zellpellet wurde resuspendiert, 1 h bei RT und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (4000 Upm, 1 h, 4°C) folgte eine mindestens 6-stündige Dialyse (25mM HEPES pH 7,6, 40mM KCl, 10% Glycerol, 0,1mM EDTA, 100mM PMSF, 1mM DTT) bei 4°C zur Renaturierung der Proteine.

2.6.16 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

2.6.16.1 Aufreinigung über Nickel-NTA-Agarose Säulen

Der C-Terminus an das WRKY-Protein fusionierte 6xHis-tag ermöglichte eine Aufreinigung über Nickel-NTA-Agarose. Die Affinitäts-Chromatographie erfolgte unter nativen Bedingungen unter Verwendung des B-PER 6xHis Spin Purification Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben. Je 10 µl der einzelnen aufgefundenen Fraktionen wurden in einem 15%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

2.6.16.2 Aufreinigung über Kobalt Affinitäts-Chromatographie

Das TALON®-Harz von Clontech basiert auf Kobalt anstelle von Nickel und ermöglicht die Elution der gebundenen Proteine unter mildereren Bedingungen bzw. mit weniger Imidazol

und bindet deutlich weniger unspezifische Proteine. Bei der Aufreinigung von WRKY-Proteinen erwies sich die Arbeit mit diesen Säulen als vorteilhaft, da somit unter nativen Bedingungen gereinigt werden konnte und die Renaturierung mittels Dialyse entfiel. Des Weiteren war die Ausbeute deutlich besser, und zumindest für WRKY11-CTD konnte in einer Western-Analyse gereinigtes Protein detektiert werden. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll bei 4°C.

2.6.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an Bradford (1976). Von der zu quantifizierenden Proteinlösung wurde ein Aliquot (1-10 µl) mit einer 1:4 (v/v) Mischung Wasser und Farbstofflösung (*Dye Reagent*, Biorad, München) versetzt. Die Messung der OD₅₉₅ (Cary 50 Bio UV/Vis Spektrophotometer mit der Cary WIN-UV Software) erfolgte innerhalb der nächsten Stunde; die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve (BSA) ermittelt.

2.6.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 6%-igen Sammelgel (0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 6% (w/v) Polyacrylamid, 0,025% (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1% (v/v) TEMED) und einem 12%-igen Trenngel (0,4 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 12% (w/v) Polyacrylamid, 0,025% (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1% (v/v) TEMED) (Laemmli, 1970).

Die Proteine wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 1×Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) Glycerin, 2,5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,0005% (w/v) Bromphenolblau) gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und bis zur Auftragung auf Eis gehalten. Nach dem Gellauf bei 150-200 Volt für 45 bis 60 Minuten erfolgte die Färbung mit Coomassie oder der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.

2.6.19 Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine 10 min in Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250) unter leichtem Schwenken gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) bis zu einem klaren Hintergrund entfärbt. Das Gel wurde dann auf 3MM Whatman-Papier transferiert und unter Vakuum und Hitze im Gel Trockner (Gel Dryer Model 583, BioRad) getrocknet.

2.6.20 Protein-Blot-Analyse

Die Western-Analysen erfolgten in der Regel in einem semi-trockenen Blot-Verfahren mit der *Blotting*-Apparatur TRANS-BLOT SD *Semi-Dry Transfer Cell* von BioRad. Dem Transferpuffer (48 mM Tris HCl, 39 mM Glycin, 10-20% MeOH) wurde bei Bedarf zur

Verbesserung des Transfers geringere SDS Mengen (0,05% (w/v)) zugegeben. Der Transfer erfolgte 1 h bei 20 Volt auf PVDF-Membranen der Firma Sartorius (Göttingen), die zuvor in MeOH aktiviert wurden. Zur Reduktion des Hintergrunds wurde die PVDF-Membran mit Blockpuffer (5%-ige (w/v) Suspension von fettarmem Milchpulver in TBS (50 mM Tris/HCl pH7,8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) abgesättigt (30-60 min Schütteln, RT). Nach einem Austausch gegen 20ml frischen Block-Puffer wurde der Primärantikörper in einer 1:5000 Verdünnung hinzugegeben und entweder 2-3 h bei RT oder bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss an drei bis vier Wasch-Schritte von je 10-15 min in je 20 ml Wasch-Puffer (TBS mit 0,1% Tween20) folgte bei Bedarf die Zugabe des zweiten Antikörpers, der gegen den primären Maus-Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase oder alkalischen Phosphatase gekoppelt war. Der sekundäre Antikörper wurde in einer 1:4000-Verdünnung in 20 ml TBS-Tween-Puffer unter Schütteln für 2-3 h bei RT inkubiert. Die erneute Durchführung von 4 Wasch-Schritten von je 10-15 min in 20 ml Wasch-Puffer wurde im Falle des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpers von einer weiteren Kurzin Kubation in RxN-Puffer (100 mM TrisHCl pH 9,7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) abgeschlossen. Zur Entwicklung des Western-Blots wurde einerseits das „ECL Western Blotting Detection Reagent“ der Firma Amersham (Freiburg) und andererseits das alkalische Phosphatase-Substrat NBT/BCIP-„Sigma-Fast™“ von Sigma verwendet.

2.6.21 Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA)

Bei der Elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) handelt es sich um einen einfachen und sehr sensitiven Test zur Identifizierung von DNA-Protein-Wechselwirkungen. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Protein-Komplexes geringer ist als die der entsprechenden freien DNA.

2.6.21.1 Hybridisierung (Annealing) der komplementären Oligonukleotide

Um die Oligonukleotide in den Gel-Shift-Experimenten verwenden zu können, mussten zunächst jeweils Sinn- und Gegensinn-Fragment miteinander hybridisiert werden. Dazu wurden von den Oligonukleotiden gleiche Mengen (1 µg) im Annealingpuffer (40 mM TrisHCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) für 5 Minuten bei 95°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend bei ausgeschaltetem Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um so die optimale Hybridisierung der beiden DNA-Stränge zu ermöglichen.

2.6.21.2 Markierung von DNA mit der End-labeling-Methode

Im Anschluss an das Annealing erfolgte die radioaktive Endmarkierung mit dem Enzym „Terminaler Desoxynucleotidyl-Transferase (Terminale Transferase)“, welches α -³²P-dCTP-Moleküle (10 mCi/ml) an die zu markierende DNA anhängt. Die Markierung von etwa 150ng DNA erfolgte mit 5 U Terminaler Transferase und 20 µCi dCTP in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Der Reaktionsansatz wurde für 45-60 Minuten bei 37°C inkubiert und das Enzym durch anschließendes Erhitzen für 10 Minuten auf 70°C inaktiviert. Um das Hantieren mit der radioaktiven Lösung zu erleichtern und Verluste bei Reinigungsschritten zu vermindern, wurde der Reaktionsansatz zunächst mit 75 µl

Wasser versetzt. Es erfolgte die Reinigung der DNA mit Phenol/Chloroform und Abtrennen von nicht-eingebauten Nukleotiden mit G-25 MicroSpin-Säulen von Pharmacia-Amersham.

Die Strahlungsintensität der radioaktiv markierten Sonde wurde in einem Szintillationszähler bestimmt. Für den Einsatz in Gel-Shift-Experimenten wurde die Sonde derart verdünnt, dass sie eine Strahlung von 5000 cpm/ μ l aufwies.

2.6.21.3 Bindereaktion

Der Reaktionsansatz zur Bindung von Proteinen an DNA setzte sich aus 5 μ l 4x Bindepuffer (100 mM HEPES/KOH, pH7,5, 120 mM KCl, 0.4 mM EDTA, 40% Glycerin), 1 μ g Poly(dIdC) zur Absättigung der unspezifischen DNA-Protein Wechselwirkung, 3 μ l der markierten Sonde (5000 cpm/ μ l), 0,5 μ l BSA (10 μ g/ μ l) und 25 μ g der Proteinlösung aus *E. coli*-Zellen zusammen. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde mit deionisiertem Wasser auf 20 μ l eingestellt. Die Zugabe der Proteine erfolgte zuletzt. Die Bindereaktion selbst wurde 20-25 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden 18 μ l der Ansätze auf das Gel aufgetragen.

Wenn beim Gellauf ein sogenannter Kompetitions-Test durchgeführt wurde, d.h. die spezifische Bindung des Proteins an die DNA durch einen Überschuss an unmarkierter DNA titriert werden sollte, wurde die Vorgehensweise modifiziert: In den Probenansatz kam vor Zugabe der radioaktiven DNA-Sonde die unmarkierte DNA und das Protein. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, nach je 5 Minuten gemischt, und dann erst erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Sonde. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 15 Minuten bei RT inkubiert und das Gel dann mit 18 μ l der Proben beladen.

2.6.21.4 Gellauf

Noch vor dem Start der Bindereaktion erfolgte der Vorlauf des nativen Acrylamid-Gels (7-8% Acrylamid (w/v) in 0,5x TBE (frisch verdünnt aus 10xTBE: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA) für mindestens 30 Minuten bei 200 Volt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Die Taschen des Gels wurden unter Spannung mit den Proben beladen. Danach wurde die Spannung auf 230 Volt erhöht und für etwa zweieinhalb bis drei Stunden beibehalten. Der Vorlauf des Gels und die Auftrennung der Proben wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel auf 3 MM Whatman-Papier übertragen, im Vakuum und bei Wärme getrocknet (Gel Dryer Model 583 von BioRad, Vakuumpumpe und Kühlfalle VaporTrap von BioRad) und über Nacht bei -80°C (mindestens 16 h) in einer Röntgen-Kassette mit Verstärker-Folie autoradiographiert (MS-Röntgenfilm von Kodak).

2.6.22 Aufarbeitung von pflanzlichem Gewebe

A. thaliana-Gewebe (Pflanzenorgane) wurde nach der Ernte direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Alle *A. thaliana*-Organe wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Kleine Mengen an Gewebe wurden in gefrorenem Zustand mit dem BeadBeater (BioSpec Products, Oklahoma) und Silicabeads (0,5 mm Durchmesser, Firma Roth, Karlsruhe) für 30 sec homogenisiert.

Homogenisiertes Gewebe wurde bei -80°C gelagert.

2.6.23 Herstellung und Analyse transgener Pflanzen

2.6.23.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Überprüfung der korrekten Integration des Inserts wurden die Plasmide vor Verwendung zur Transformation von beiden Seiten ansequenziert. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) erfolgte durch Elektroporation.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 100 ml YEB-Medium (5 g Fleischextrakt, 1 g Hefeextrakt, 5 g Pepton 140, 5 g Saccharose, pH 7,2, ad 1 l) mit 5 ml einer stationären Übernachtskultur des Stamms *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz & Schell, 1986) inokuliert und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Die Zellen wurden in einem Zentrifugationsschritt pelletiert und in 50 ml 1 mM HEPES-Puffer pH 7,5, 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einer weiteren Pelletierung der Zellen wurden die Zellen erneut in 1mM HEPES-Puffer aufgenommen. Einer erneuten Pelletierung folgte die Aufnahme der Zellen in 800 µl 1mM HEPES, 10% Glycerin, pH 7,5, eine Aliquotierung in je 50 µl, Schockfrieren in flüssigen Stickstoff und eine Lagerung bei -80°C.

Zu 50 µl elektrokompenten Agrobakterien wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät der Firma BioRad erfolgte die Transformation (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω). Nach direkter Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Zellen bei 28°C für 2h inkubiert, schließlich auf YEB Kan, Rif, Gent-Platten ausplattiert und für etwa zwei Tage bei 28°C inkubiert. Einzelkolonien wurden dann auf die Anwesenheit des Plasmids in PCR-Reaktionen mit entsprechenden gen- und vektorspezifischen Primern getestet.

2.6.23.2 Stabile Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation erfolgt mit der *Floral-Dip*-Methode (Clough and Bent, 1998). Die Anzucht der *A. thaliana*-Pflanzen (Ökotyp Col-0, jeweils 5 Pflanzen in einem Topf, Ø 7 cm) erfolgte für drei bis fünf Wochen in Phytokammern unter Kurztagbedingungen und zur anschließenden Blüteninduktion für weitere zwei bis drei Wochen unter Langtagbedingungen. Um eine vermehrte Bildung von Sekundär-Infloreszenzen anzuregen, wurde die Primär-Infloreszenz abgeschnitten. Die Transformation erfolgte, solange die Mehrzahl der Blüten noch geschlossen waren. Agrobakterien können nur innerhalb eines kurzen Zeitraums der Blütenentwicklung (bis zur Schließung des Lokulus) die Eianlagen transformieren (Bent, 2000).

Von den transformierten Agrobakterien wurde von der Platte eine Kolonie in 500 ml YEB-Medium (Gentamycin: 25 µg/ml, Rifampicin: 100 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml) überimpft und 1 bis 2 Tage bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Im Falle von schlecht oder gar nicht wachsenden Kulturen wurde eine kleinere Vorkultur mit weniger Antibiotika angesetzt, diese Kultur dann in ein großes Volumen angeimpft und über Nacht inkubiert.

Diese Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (20 min, 6000 Upm, 10°C) und in einer 5%igen Saccharose-Lösung resuspendiert. Zu 400 ml dieser Bakterien-Suspension wurden 200 µl Silwet L-77 (Union Carbide) als Detergenz hinzugefügt (Whalen *et al.*, 1991). Die Töpfe mit den *A. thaliana*-Pflanzen wurden in diese Suspension getaucht, so dass die Infloreszenzen vollständig eintauchten, kurz geschwenkt und zum Trocknen

horizontal auf Tücher gelegt. Bis zur Samenreife wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt, wobei sie in den ersten zwei Tagen nach der Transformation mit einer Haube bedeckt wurden.

2.6.23.3 Analyse transgener Pflanzen

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden oberflächensterilisiert (1 min 70% Ethanol, 1 min 100% Ethanol) und auf Selektionsplatten ($1/2$ MS-Salz (Sigma), 1× Vitamin-Mix, 250 µg/ml Claforan (Cefotaxim-Natrium, Hoechst AG), 50 µg/ml Kanamycin und 0,8% Agar) ausgesät. Die kanamycinresistenten Pflanzen wurden als Primärtransformanden bezeichnet. Die aus einer Selbstung dieser Pflanze hervorgegangenen Samen bildeten die T1-Generation. Bei einer Einfach-Integration des Transgens wurde in vielen Fällen nach Kanamycin-Selektion auch die erwartete 1:2:1 Aufspaltung näherungsweise beobachtet. Transgene Pflanzen mit einer Mehrfach-Integration können auch in der T2-Generation noch segregieren.

2.6.24 Promotor-Reporter-Analysen

Der Promotorbereich von *AtWRKY26*, *AtWRKY38*, *AtWRKY43* wurde mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Dazu wurde ein Primer etwa 2 kb stromaufwärts vom ATG und ein mindestens acht Aminosäuren über das Startkodon reichender Primer verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mit *Pfu*-Polymerase durchgeführt, das erhaltene Produkt in den Vektor pDONR207 kloniert und sequenziert. Nachdem fehlerfreie Promotoren mittels LR-Clonasen in den Vektor pJawohl11 kloniert und in Agrobakterien transformiert wurden, erfolgte die Herstellung und Identifizierung transgener Pflanzen. Die transgenen Linien wurden dann hinsichtlich einer durch den *AtWRKY*-Promotor-vermittelte GUS-Reporter-Gen-Expression untersucht. Hierzu dienten sowohl einzelne Pflanzenorgane und Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien, als auch Material, das Hormonen oder Stresssituationen ausgesetzt worden war.

Für die Hormonbehandlungen wurden zwei Tage, eine Woche oder zwei Wochen alte, unter sterilen Bedingungen im LT gezogene *A. thaliana*-Pflanzen oder 4 Wochen alte, in Erde und im Gewächshaus angezogene Pflanzen mit Lösungen von Ethylenvorstufe (ACC, 1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan, 100 µM), Methyljasmonat (MeJA, 100 µM), Salizylsäure (SA, 2mM) oder Flagellin22-Elizitor (flg22, 1µM) mit feinem Nebel aus Zerstäubern besprüht. Pflanzen wurden auch abiotischem Stress ausgesetzt (Hitze: 37°C, Kälte: 4°C, UV, Dunkelheit, Dunkelkeimung). Als Trockenstress wurden MS-Platten mit zwei Wochen alten Pflanzen oder Töpfe mit fünf Wochen alten Pflanzen so lange offen inkubiert, bis Symptome von Welken auftraten. Zur Untersuchung von *A. thaliana* unter UV-Stress wurden Pflanzen in einem UV-Crosslinker (UV-Stratalinker 2400, Stratagene) mit UV-Strahlen der Energie 25 mJ oder 50 mJ bestrahlt.

In der Regel wurden die Zeitpunkte 8 h und 25 h gewählt, um Gewebeproben zur Analyse der GUS-Expression zu entnehmen.

Zur GUS-Färbung wurden die Pflanzenteile durch ein 5-10 minütiges Vakuum (DivacMembranpumpe, Neuberger Laboport) in einem Exikator mit X-Gluc-Lösung (100 mM NaPO₄, 2 mM K₃ Fe(CN)₆, 0,1% Triton-X-100, 0,5 mg/ml X-Gluc, pH 7) infiltrierte. Vor allem bei älteren Blättern und Sprossachsen wurde die Vakuuminfiltration mehrfach wiederholt, bis alle Blätter vollständig infiltrierte waren. 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.

2.6.25 Ektopische Überexpression

Die kodierenden Bereiche von *AtWRKY26*, *AtWRKY38*, *AtWRKY43* wurden mittels Gateway-Technologie in den Vektor p35S-GFP-GW kloniert. Dieser wurde dann in *A. tumefaciens* transformiert und für die Herstellung transgener *A. thaliana*-Pflanzen im Wildtyp Col0 verwendet.

Transgene Pflanzen wurden über eine Kanamycin-Resistenz selektiert. Zur phänotypischen Charakterisierung der nachfolgenden Generation der *AtWRKY26*, *AtWRKY38*, *AtWRKY43* Überexpressionslinien wurden Samen in Erde ausgebracht und im Gewächshaus unter LT-Bedingungen angezogen.

2.6.26 Analyse subzellulärer Lokalisation

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von *AtWRKY26*, 38 und 43 wurden die C-terminalen translationalen Fusionen an GFP aus Kapitel 2.6.25 verwendet. Alle WRKY::GFP-Fusions-Konstrukte wurden transient in Zwiebel-Epidermiszellen mittels Goldpartikel-Beschuss eingebracht. Die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Konstrukte wurde 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.

2.6.27 Klonieren von Oligonukleotiden

Oligonukleotide (je 10 pmol) mit einer 5' Verlängerung (CTAG) zur Klonierung in *SpeI*/*XbaI*-Schnittstellen wurden mit Ligationspuffer, 100 mM DTT, 10 mM rATP und 20 U Poly-Nukleotid-Kinase zur Phosphorylierung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Gleiche Mengen komplementärer, phosphorylierter Oligonukleotide wurden in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und anschließend 5 Minuten bei 70°C inkubiert, gefolgt von 30 Minuten auf Eis. Zur Klonierung in den MS23-Vektor wurde dieser mit *SpeI* und *XbaI* verdaut, gereinigt und 2 µl davon zusammen mit 7 µl der annealten, phosphorylierten Oligos (1:10 Verdünnung mit H₂O) und 10 U Ligase (1 µl) über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Transformation wurden 5-8 µl der Ligationsreaktion eingesetzt.

Die erhaltenen Kolonien wurden durch Sequenzierung auf Einzelintegrationen und Orientierung überprüft. Je höher die Menge an eingesetzten Oligonukleotiden in der Ligation, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Integration in den Vektor, es erhöht sich aber auch die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von multiplen Fragmenten in der Schnittstelle.

2.6.28 Biolistische Transformation mittels Partikelbeschuss

Es wurde das *Particle Delivery System* Biolistic-PDS-1000/He des Herstellers BioRad, München, verwendet. Zubehör wurde ausschließlich beim Hersteller des Geräts bezogen. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Bombardierungen wurden „rupture-discs“ von 900 psi, Goldpartikel der Größe 1 µm verwendet. Das Bombardieren von Zwiebel-Epidermiszellen sowie das Bombardieren von *A. thaliana*-Blättern wurde in der Regel mit insgesamt 6 µg auf den Partikeln präzipitierter DNA durchgeführt.

Waschen der „Microcarrier“

Es wurden pro Reaktionsgefäß Goldpartikel für 10 Schüsse vorbereitet: 30 mg Gold wurde abgewogen und zusammen mit 1 ml 70% EtOH energisch 3 bis 5 Minuten geschüttelt (Plattform-Vortex-Gerät 1400-IKA-Vibrax), gefolgt von 15 Minuten Inkubation ohne Schütteln bei RT. Anschließend erfolgte das Pelletieren des Goldes durch 5 Sekunden Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415D) und Resuspendieren in 1 ml sterilem Wasser durch einminütiges Vortexen. Nach einer Inkubation bei RT für eine Minute wurden die Partikel erneut pelletiert (5s) und in 1 ml H₂O resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl steriler Glycerinlösung (50%) aufgenommen. Die so vorbereiteten Goldpartikel können bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert werden.

Beschichten der Goldpartikel mit DNA

Vor der Entnahme von 50 µl Goldpartikeln (unter Schütteln mit dem Plattform-Vortex-Gerät) werden diese 5 Minuten lang geschüttelt, um eine gleichmäßige Suspension ohne Agglomeration von Partikeln zu erhalten. Unter weiterem Vortexen wurden die Lösungen in folgender Reihenfolge zugegeben: 30 µl DNA (3 µg in Co-Bombardments, ansonsten 6 µg), 25 µl CaCl₂ (5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M). Die Goldpartikel wurden durch Zentrifugation (2 s) pelletiert und anschließend in 140 µl 70% EtOH resuspendiert. Es folgt wiederum Vortexen (2 min), Inkubation bei RT (1 min) und Pelletieren durch Zentrifugation (2 s). Das erhaltene Pellet wird in 48 µl 100% EtOH resuspendiert und ist gebrauchsfertig für den Partikelbeschuss.

Vorbereiten des zu transformierenden Gewebes

Gesunde, etwa 4 Wochen alte *A. thaliana*-Blätter wurden mit einer scharfen Schere abgeschnitten, auf einer Saccharose-Platte (10% (w/v), 1% Agar (w/v)) ausgelegt und zur Erholung von diesem Stress mindestens 4 Stunden in einem Lichtschrank inkubiert. Zum Beschuss von Zwiebelepidermiszellen wurden Zwiebelschichten in kleinere Stücke geschnitten und diese mit der Epidermis nach oben auf Agar-Platten gelegt. Eine Regeneration war nicht notwendig, es konnte direkt mit dem Partikelbeschuss begonnen werden.

Partikelbeschuss

Das Überdrucksystem wird mit Helium betrieben; um sicher zu stellen, dass das System richtig funktioniert und der Gasweg vollständig mit Helium gefüllt ist, sollte der erste Schuss ohne Goldpartikel durchgeführt werden. Zur Reinigung wurde die Kammer mit 70% EtOH ausgewaschen.

Auf jedem der sieben „Macrocarrier“ werden unter Vortexen je 6 µl aus dem vorbereiteten Reaktionsgefäß mit den beschichteten Goldpartikeln verteilt. Das Ethanol verflüchtigte sich innerhalb kurzer Zeit; und währenddessen konnte bereits eine mit Isopropanol befeuchtete „rupture-disc“ in die dafür vorgesehene Halterung gebracht und diese wiederum fest in der Kammer verschraubt werden. Anschließend wurden die getrockneten „Macrocarrier“ zusammen mit einem „stopping screen“ unterhalb der „rupture-disc“ in der Kammer eingeführt. Zuletzt wurden entweder Platten mit *A. thaliana*-Blättern oder Zwiebelstücken in der Kammer untergebracht. Dann wurde die Kammer geschlossen, Unterdruck angelegt und bei etwa 900 psi hielt die „rupture-disc“ dem Druck der Gasleitung nicht mehr stand. Nach erfolgreichem Beschuss wurden die Blätter oder Zwiebelstücke wieder auf der Petrischale verteilt und über Nacht bei 20°C inkubiert. Bombardiertes Pflanzenmaterial wurde am folgenden Tag im Mikroskop auf Fluoreszenz der GFP-Konstrukte hin untersucht, bzw. die GUS Expression wurde maximal zwei Tage nach dem Partikelbeschuss ausgewertet.

2.6.29 Rechnergestützte Sequenzanalyse

Erstellung des multiplen Alignments der AWRKY-Domänen

Die Alignments aller zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Proteinsequenzen bzw. der aus den verfügbaren genomischen Daten abgeleiteten Proteinsequenzen wurden mit dem Programm ClustalW erzeugt und manuell optimiert.

Phylogenetische Analysen

Die phylogenetischen Analysen wurden auf der Basis des Alignments der entsprechenden Sequenzen (siehe Erstellung des multiplen Alignments) mit dem Programm ClustalW durchgeführt, da der Schwerpunkt dieser Analyse nicht die Bestimmung der Distanzen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Gruppe zum Ziel hatte, sondern Erzeugung des phylogenetisch kürzesten Baums zur Beschreibung der Verwandtschaftsbeziehungen.

Folgende internetbasierende Programme und Datenbanken wurden bei den Analysen eingesetzt:

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool for comparing gene and protein sequences against others in public databases, Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/, EMBL: www.ebi.ac.uk/fblast2/,
- ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/)
- EMBL European Bioinformatics Institute EBI (www.ebi.ac.uk/)
- Expaty Proteomics tools (<http://us.expasy.org/tools>)
- FASTA (EMBL, www.ebi.ac.uk/fasta33/ und DDBJ: www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html)
- MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences GSF, <http://mips.gsf.de/> *A. thaliana* BACs und Contigs)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov)
- PLACE Datenbank (K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research Vol.27 No.1 pp. 297-300: www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html)

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung unterschiedlicher WRKY-Proteine an die W-Box analysiert werden. Es wird mittels Elektrophoretischer-Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) getestet, welche Faktoren die Interaktion von WRKY-Proteinen aus verschiedenen Untergruppen an W-Boxen beeinflussen und ob es sequenz-spezifische Unterschiede sowohl in der DNA als auch im Protein gibt, die eine differenzielle Bindung von WRKY-Proteinen ermöglichen können.

3.1 Untersuchung der WRKY-W-Box-Interaktion

Zunächst wird in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von Basenaustauschen in einer definierten, W-Box enthaltenden Sequenz auf die Interaktion von WRKY-Proteinen mit der W-Box untersucht. Aufgrund des ermittelten Bindungsverhaltens in EMSA-Experimenten soll letztlich eine W-Box-Sequenz abgeleitet werden, die eine optimale Bindung ermöglicht.

Um einen Einblick in die Bindungseigenschaften zu erhalten, wurden aus den 74 Mitgliedern der WRKY-Proteine in *Arabidopsis* fünf ausgewählt, die stellvertretend für die verschiedenen Subgruppen untersucht wurden:

1. WRKY6, At1g62300 (Gruppe IIb)
2. WRKY11, At4g31550 (Gruppe II d, HARF)
3. WRKY26, At5g07100 (Gruppe I)
4. WRKY38, At5g22570 (Gruppe III)
5. WRKY43, At2g46130 (Gruppe IIc)

Vor dem Hintergrund einer wahrscheinlich monophyletisch entstandenen DNA-bindenden WRKY-Domäne lag es nahe, Proteine zu untersuchen, die sich in ihren Sequenzen möglichst stark unterscheiden. So sollten, falls vorhanden, verschiedene Bindungsaffinitäten zur W-Box mit größerer Wahrscheinlichkeit detektiert werden. Für die Gruppen I und III wurde jeweils ein Vertreter ausgewählt, wohingegen für die deutlich größere Gruppe II drei WRKY-Faktoren aus verschiedenen Subgruppen zur Untersuchung herangezogen wurden.

3.1.1 Die Bindung von WRKY-Proteinen an DNA-Sequenzen ist W-Box-spezifisch

Als W-Box beinhaltende DNA-Sequenz wurde W2 aus dem Promotor von *PR1-1* aus Petersilie gewählt. Die von der W-Box in dieser Sequenz vermittelte schnelle Pathogenresponsivität wurde von Eulgem *et al.* (1999) beschrieben. Außerdem konnte für dieses Element Elizitorresponsivität und die Bindung von WRKY-Faktoren in Kernextrakten aus Petersilie bereits nachgewiesen werden (Rushton *et al.*, 1996). Aus diesen Gründen schien W2 eine geeignete Sequenz, um genauere Bindestudien an weiteren WRKY-Proteinen durchzuführen.

Für die Bindungsversuche wurde die C-terminale Domäne von WRKY11 (WRKY11-CTD) in den pQE30 Vektor mit N-terminalem 6xHis-Epitop kloniert und die Vollängen-Proteine

zur Verbesserung der Löslichkeit in den zum Gateway®(GW)-System kompatiblen, modifizierten pGEX2Tm-GW-Expressionsvektor kloniert. Die Expression der Proteine wurde in *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen durch Zugabe von IPTG induziert. Bei der Expression des Proteins mittels pGEX2Tm-GW wird GST aminoterminal und ein 6xHis-Epitop carboxyterminal an den WRKY-Faktor fusioniert. In allen gezeigten EMSA-Experimenten wurde ein grober Zellextrakt als Proteinlösung verwendet, da sich die Aufreinigung der WRKY-Proteine als problematisch erwies und nur mit der C-terminalen Domäne von WRKY11 erfolgreich durchgeführt werden konnte. Reinigungsversuche für andere WRKY-Proteine führten lediglich zur Elution von unspezifisch gebundenen Proteinen. Es war keine Anreicherung eines bestimmten Proteins möglich. Dies ist in Abbildung 1 exemplarisch für WRKY6 und WRKY11-CTD gezeigt. Bei den eluierten Proteinen E1 und E2 handelt es sich wahrscheinlich auch nicht um WRKY6 Multimere, da die eluierten Fraktionen keine Bindungsaktivität zeigten.

Bei der Aufreinigung von WRKY11-CTD erwies sich die Verwendung von Kobalt-basierenden gegenüber Nickel-basierenden Säulen als vorteilhaft, da u.a. die Ausbeute an rekombinantem Protein höher war. Mit dem unter nativen Bedingungen aufgereinigten Protein der C-terminalen Domäne von WRKY11 wurde die EMSA-Methode etabliert. Der ungereinigte Proteinaufschluss zeigte im Vergleich zum isolierten Protein keine veränderte Bindung und auch keine zusätzlichen Banden. Da außerdem mit einem Extrakt von *E.coli* Zellen, die nur den Expressionsvektor ohne cDNA-Insert exprimierten, keine spezifische Bindung an die W-Box festgestellt wurde, konnte für die folgenden Bindestudien auf die Aufreinigung der Proteine verzichtet werden. Weiterhin zeigte das WRKY11 Volllängenprotein mit aminoterminalem GST- und carboxyterminalem 6xHis-Epitop das gleiche Bindungsverhalten wie das WRKY11-CTD Konstrukt mit aminoterminalem 6xHis-Epitop. Demnach hat die Fusion mit dem relativ großen GST keinen Einfluss auf die Bindung an W-Boxen, was auch durch Studien von anderen Arbeitsgruppen belegt wird (Yoda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2000).

Abbildung 1 (folgende Seite): Heterologe Expression von 6xHis-WRKY6 und 6xHis-WRKY11-CTD sowie Detektion des aufgereinigten rekombinanten Proteins.

A SDS-PA Gel mit unter denaturierenden (d) und nativen Bedingungen (n) gewonnenen *E. coli* Proteinrohextrakten oder aufgereinigten Fraktionen (E1–E3). Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) wurde mit leerem Expressionsvektor (pQE) sowie entsprechenden 6xHis-WRKY6 und 6xHis-WRKY11-CTD Konstrukten transformiert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (1mM) induziert. Das rekombinante N-terminale 6xHis-Fusionsprotein wurde über Kobalt basierenden-Säulen aufgereinigt. Die Größenmarker sind angegeben. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie-Blau Lösung gefärbt und getrocknet **B** Nachweis von rekombinantem 6xHis-WRKY-Fusionsprotein mittels Protein-Blot-Experiment mit primärem Anti-6xHis-Antikörper und sekundärem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper. Der offene Stern kennzeichnet die Position der spezifischen WRKY11-CTD Bande. Andere Banden sind unspezifisch und stellen Hintergrundsignale dar.

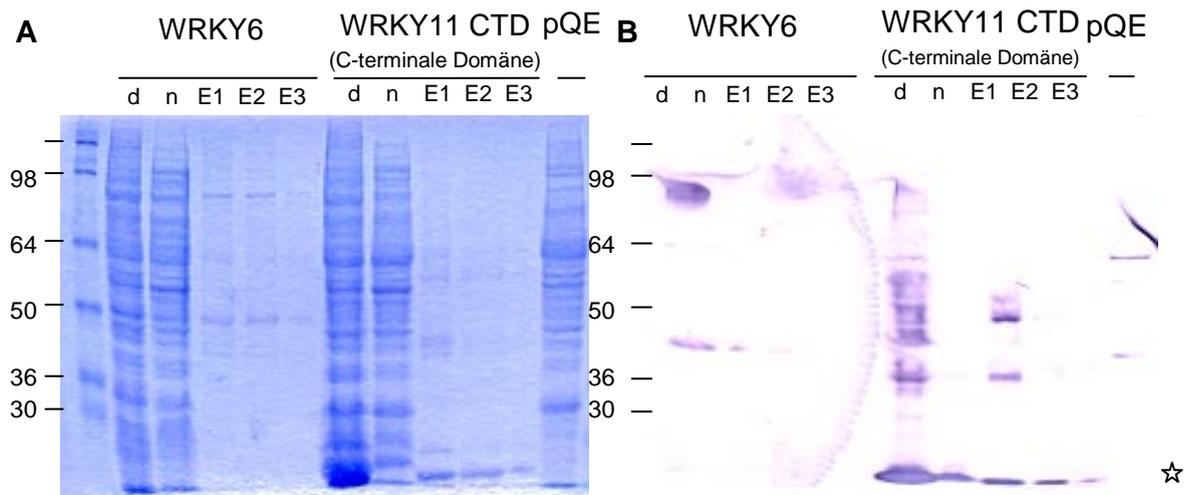


Abbildung 1: Heterologe Expression von 6xHis-WRKY6 und 6xHis-WRKY11-CTD sowie Detektion des aufgereinigten rekombinanten Proteins. (Legende auf vorhergehender Seite)

In mehreren Publikationen wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von WRKY-Proteinen an DNA durch spezifische Erkennung der W-Box Sequenz erfolgt (Chen *et al.*, 2000, 2002, Yoda *et al.*, 2002, Du *et al.*, 2000, Hara *et al.* 2000, Yang *et al.* 1999). Man kann umgekehrt aber auch davon ausgehen, dass an einer W-Box spezifischen Bindung in Kernextrakten WRKY-Faktoren beteiligt sind.

In Abbildung 2 wird gezeigt, dass auch die Bindung in den groben *E.coli* Extrakten spezifisch für das exprimierte *AtWRKY*-Protein und die W-Box ist. In Abbildung 2B wurde die Bindung von WRKY11-CTD an das 1xW2 Element mit den unmarkierten Sequenzen 1xW2 und 1xW2mut kompetitiert. Nur wenn die W-Box in dem Oligonukleotid unverändert ist, kann die Bindung an das radioaktiv markierte 1xW2 Element abgeschwächt bzw. bei einem 500-fachen Überschuss fast komplett aufgehoben werden. Mit mutierten W-Boxen ist kein detektierbarer Einfluss auf die Bindungsstärke festzustellen. Die Änderung von zwei Basen der W-Box Kernsequenz führt zum Verlust der Bindefähigkeit, so dass die sequenzspezifische Bindung an 1xW2 nicht mehr kompetitiert werden kann. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind Abbildung 2A zu entnehmen, die W-Box ist jeweils durch rote Buchstaben hervorgehoben.

Durch Zugabe eines spezifischen anti-6xHis-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Protein und DNA von dem rekombinanten WRKY-Protein gebildet wird. Dies führt zum Auftreten einer weiteren retardierten Bande, dem sogenannten „Supershift“, der einem höhermolekularen Komplex aus WRKY-Protein, Antikörper und DNA entspricht (Abbildung 2C). Zugabe von EDTA reduziert die Bindung von WRKY11-CTD an die W-Box in W2 und die Annahme, dass in der WRKY-Domäne eine Zinkfinger-Struktur ausgebildet wird, konnte somit weiter untermauert werden.

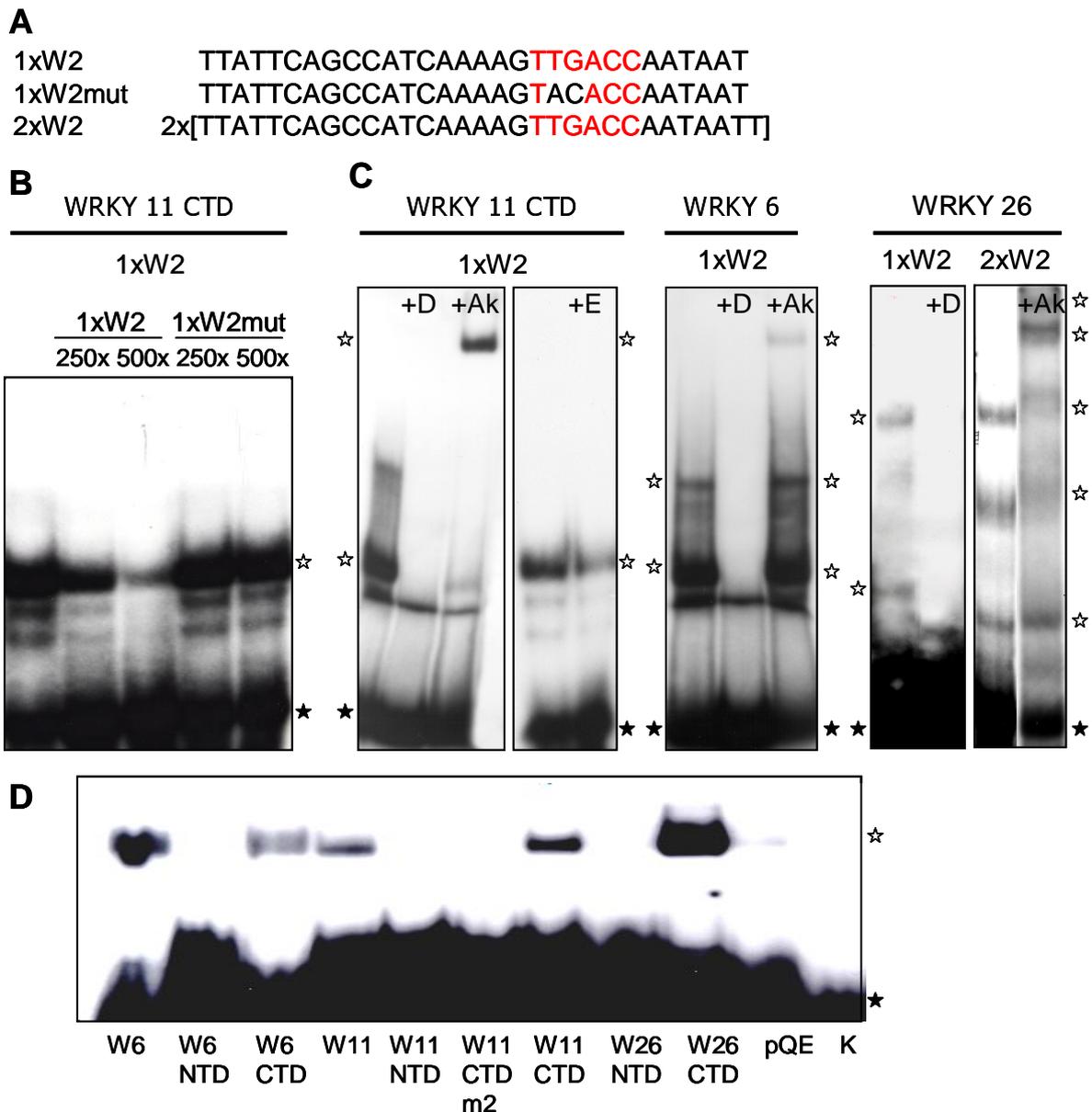


Abbildung 2: Die Bindung von WRKY-Faktoren an W-Boxen ist spezifisch und wird von der C-terminalen WRKY-Domäne vermittelt

A Sequenz und Bezeichnung der verwendeten Sonden (1xW2, 2xW2) und Kompetitoren (1xW2, 1xW2mut), die W-Box ist durch rote Buchstaben hervorgehoben **B** Die Bindereaktion von WRKY11-CTD an 1xW2 wurde zusammen mit den unmarkierten Oligonukleotiden 1xW2 und 1xW2mut in den angegebenen Überschüssen an kalter Sonde bei Raumtemperatur inkubiert. **C** Zugabe der Protein dissoziierenden Substanz Deoxycholat (+D, 0,5% (w/v)), oder eines Antikörpers (+Ak, 1µl), der spezifisch für das rekombinante Protein ist. Ist in der Bindereaktion 25mM EDTA (+E) enthalten, wird die Bindung deutlich abgeschwächt. **D** Vergleich von Vollängen-Proteine und verschiedener C- (CTD) oder N-terminaler (NTD) Konstrukte in ihrer Bindung an 1xW2. pQE - Proteinextrakt nach Induktion von *E.coli*, die lediglich den Leervektor pQE ohne Insert enthalten, K - Kontrolle, es wurde kein Protein in der Bindereaktion eingesetzt.

Gezeigt sind Autoradiogramme von EMSA-Gelen nach 16-stündiger Exposition. Verwendet wurde in allen Bindereaktionen ein grob aufgeschlossener *E.coli*-Extrakt. Offene Sterne kennzeichnen spezifische WRKY-W-Box Komplexe, geschlossene Sterne die freie Sonde. Andere Banden resultieren aus Wechselwirkungen mit unbekanntem Komponenten des *E.coli* Extraktes oder ergeben sich aus degradierten bzw. unvollständig translatierten Proteinen.

Hinweise auf die Beteiligung von Protein-Protein Interaktionen bei der Bindung an DNA-Sequenzen liefert die Zugabe von Deoxycholat, welches dafür bekannt ist, Protein-Protein-Interaktionen zu unterbrechen (Baeuerle & Baltimore, 1988). Es wurde dazu verwendet, in EMSA-Experimenten die Existenz von Multi-Proteinkomplexen gebunden an DNA zu demonstrieren (Depres *et al.*, 1996, Shen & Gigot, 1997, Yang *et al.*, 1999). Bindereaktionen, die Deoxycholat enthalten, zeigen keinen Komplex aus DNA und Protein mehr (Abbildung 2C). Dieser Befund kann jedoch nur als Hinweis für Di- oder Multimerisierung der WRKY-Proteine im Bindekomplex gelten, da kein Kontrollprotein vorhanden war, dessen DNA-Bindung durch Zugabe von Deoxycholat nicht beeinflusst wurde.

Ishiguro und Nakamura (1994) und de Pater *et al.* (1996) zeigten, dass die N-terminale WRKY-Domäne von SPF1 bzw. ZAP1, WRKY-Proteine aus Gruppe I, nicht an W-Boxen binden konnte und keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf die Bindung der C-terminalen Domäne an DNA hat. Aus diesem Grunde sollte überprüft werden, ob AtWRKY26 ebenfalls dieses typische Gruppe I-Bindungsverhalten zeigt. Dazu wurden Bindungsversuche mit der N- und C-terminalen WRKY-Domäne von WRKY26 durchgeführt (Abb. 2D). Die Bindung der N-terminalen Domäne ist nicht zu detektieren. Im Vergleich dazu gibt es eine eindeutige Bindung mit der C-terminalen WRKY-Domäne von WRKY26 an das W2-Motiv. Somit konnten die bekannten Daten von SPF1 und ZAP1 auch auf ein Gruppe I WRKY-Protein aus *Arabidopsis* übertragen werden. Es ist nicht überraschend, dass die N-terminalen Domänen von WRKY6 und WRKY11 keine Bindung an das 1xW2 Element zeigen, da sie keine bekannten DNA-Bindungsmotive enthalten und es unterstreicht die Bedeutung der N-terminalen Bereiche für andere Prozesse. Obwohl die Größe der Proteine von 12 kDa (C- bzw. N-terminale Konstrukte) bis zu 65 kDa (WRKY6) variiert, erscheinen in der Bindungsstudie in Abbildung 2D alle Komplexe auf der gleichen Höhe. Die Länge der DNA-Sonde ist zwar im Allgemeinen der bestimmende Faktor der Mobilität, aber bei den 3- bis 6-fachen Größenunterschiede der Proteine, wurden die Banden trotz niedrigprozentigem Acrylamidgel auf unterschiedlichen Höhen erwartet. Eine Erklärung hierfür könnten die sehr unterschiedlichen pI-Werte der Proteine sein, die unter den gegebenen Bedingungen zu dem sehr ähnlichen Migrationsverhalten führten. Andere pH-Werte des Gels bzw. des Laufpuffers sollten dann zu einem anderen Laufverhalten führen. Auf diese Untersuchungen wurde jedoch verzichtet, da die Spezifität der Bindung bezüglich W-Box und rekombinantem WRKY-Protein für jedes Protein bestätigt wurde. Möglicherweise war auch die Expression von Vollängen-Proteinen aufgrund toxischer Effekte der WRKY-Faktoren in *E.coli* beeinträchtigt, so dass lediglich verkürzte oder deletierte Fragmente exprimiert wurden. Übereinstimmend damit wurden in Western-Analysen Banden detektiert, die solchen Fragmenten entsprechen könnten. Das Bindungsverhalten der in *E. coli* exprimierten Proteine bestätigt bisherige Erkenntnisse zur Bindung von WRKY-Proteinen, so dass kein Zweifel daran besteht, dass die heterolog in *E. coli* produzierten WRKY-Proteine in dem groben Proteinextrakt für die Bindung an die W-Boxen verantwortlich sind.

3.1.2 Analyse der Interaktion von ausgewählten WRKY-Proteinen mit dem W2-Element

Mit dieser Versuchsreihe wird der Einfluss von verschiedenen Basenaustauschen in der W-Box-Sequenz sowie deren Umgebung auf die Bindung durch WRKY-Proteine untersucht. Bisher war lediglich bekannt, dass beispielsweise die Veränderung der sogenannten Kernsequenz TGAC zu TGAA die Bindung von *AtWRKY 18* (Chen and Chen, 2002) an eine DNA-Sequenz aus dem eigenen Promotor fast vollständig verhindert und dass die Mutation der Kernsequenz auch zum Verlust von Genaktivierung führt (Rushton *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 1999, Cormack *et al.*, 2002). Es sollte nun getestet werden, ob Mutationen an anderen Positionen einen ähnlichen Effekt haben. Die Veränderung einzelner Basen an bestimmten Positionen soll aufzeigen, ob abgesehen von der Kernsequenz TGAC weitere Positionen essentiell für die Bindung von WRKY-Proteinen sind. Die Permutation dieser Positionen soll auch aufzeigen, ob die DNA-Protein-Interaktion durch jegliche Mutation gestört wird, oder ob verschiedene Basen einen individuellen Einfluss auf die Bindung ausüben, sowohl in der W-Box Sequenz, als auch außerhalb derselben.

Abbildung 3 zeigt die Bindung der WRKY-Proteine an die W2-Sequenzen mit den verschiedenen Mutationen im Bereich der W-Box. Abgesehen von diesen einzelnen Nukleotidaustauschen handelt es sich bei allen Sequenzen um das gleiche W2-Oligonukleotid. Die Signalstärke der verschiedenen WRKY-Proteine ist sehr unterschiedlich. Dies hat jedoch mit der generellen Qualität der W-Box-Interaktion nichts zu tun, sondern ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Mengen des exprimierten Proteins zurückzuführen. Deshalb ist es schwierig, die Bindungsstärke der WRKY-Proteine untereinander zu vergleichen. Es geht in diesem Versuch vielmehr darum, die Veränderung der Bindung jedes einzelnen WRKY-Faktors durch die Basenaustausche in der W2-Sequenz zu analysieren. Deshalb bezieht sich der Vergleich der Bindungsstärke auf die Bindung des jeweiligen WRKY-Proteins an die unveränderte W2-Sequenz .

Abbildung 3 (folgende Seite): Punktmutationen in der W-Box Sequenz sowie in benachbarten Bereichen können die Bindungsstärke von WRKY-Proteinen an 1xW2 verändern

Gezeigt sind Autoradiogramme von EMSA-Analysen zur DNA-Bindungsspezifität von rekombinantem GST-WRKY-6xHis (WRKY6, 11, 26, 38, 43) oder 6xHis-WRKY (WRKY11-CTD) und verschiedenen, oberhalb der Autoradiogramme gezeigten synthetischen Oligonukleotiden, die auf der Sequenz von 1xW2 (TTATTCAGCCATCAA AAGTTGACCAATAAT) basieren. Die Kontrolle ohne Protein ist für jedes Gel jeweils die letzte Spur und ist mit / gekennzeichnet. Rechts neben den Autoradiogrammen ist das für den entsprechenden Versuch eingesetzte WRKY-Protein aufgelistet. Die für die Bindung relevante Sequenz und Identität der Oligonukleotide (1xW2m1 bis m19) ist für jedes Konstrukt im oberen Bereich der Abbildung gezeigt, und die jeweilige Veränderung zur W2-Sequenz ist rot markiert. Offene Sterne kennzeichnen den spezifischen WRKY-Protein-DNA Komplex und geschlossene Sterne die freie Sonde. Andere Banden resultieren aus Wechselwirkungen mit unbekanntem Komponenten des *E.coli* Extraktes oder ergeben sich aus degradierten bzw. unvollständig translatierten Proteinen.

Die Gelbilder stammen zum Teil aus verschiedenen Gelläufen und die Laufweiten der Banden können deshalb von Bild zu Bild variieren.

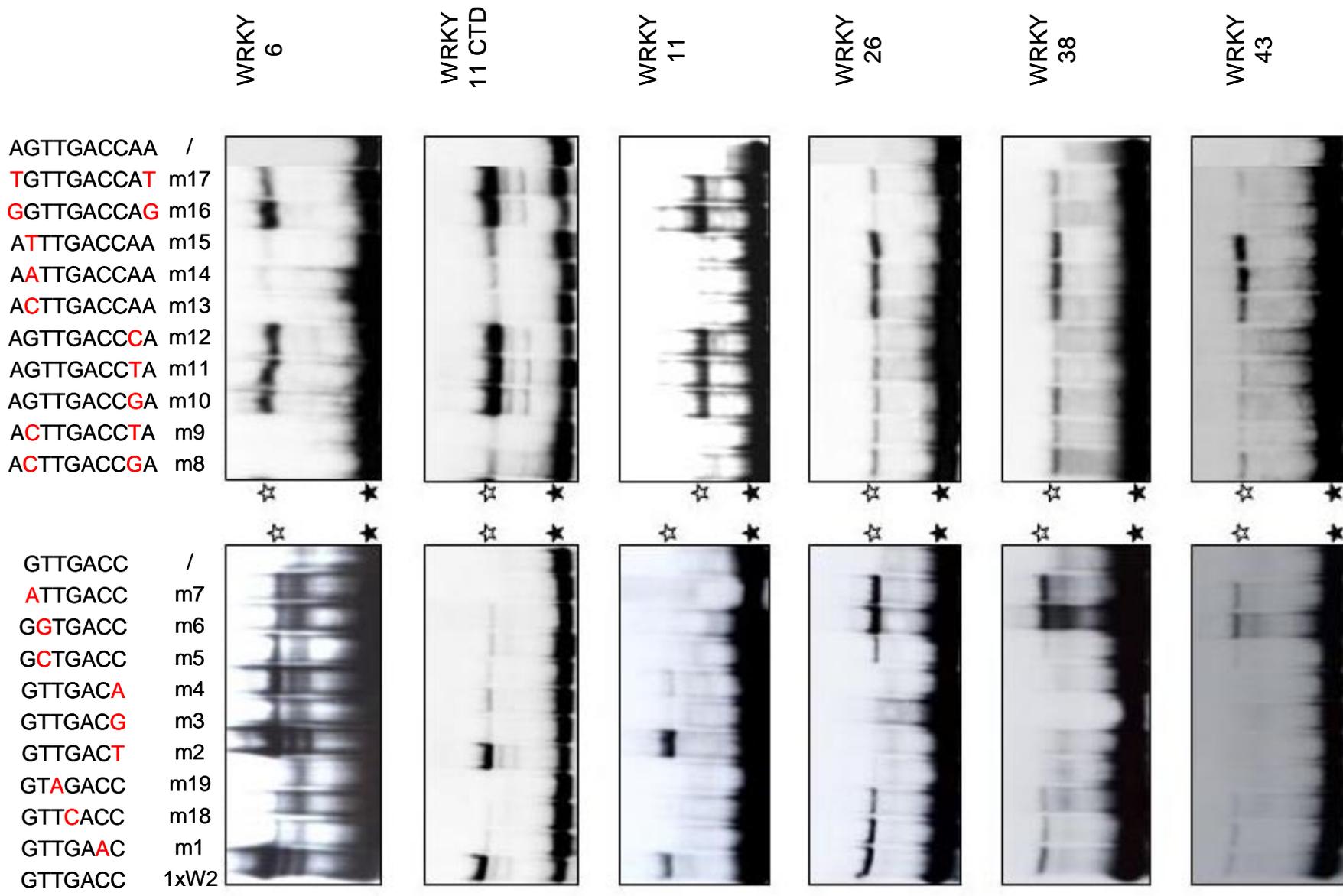


Abb. 3: Punktmutationen in der W-Box Sequenz oder in benachbarten Bereichen können die Bindungsstärke von WRKY-Proteinen an 1xW2 verändern (Legende vorherige Seite)

WRKY6, WRKY11 und WRKY11-CTD binden an keine W-Box, die eine Veränderung in der Kernsequenz beinhaltet (m1, m18, m19), sie scheinen besser an die W-Box-Sequenzen mit dem Suffix „CT“ (m2) statt „CC“ zu binden. Im Gegensatz dazu binden WRKY26, WRKY38 und WRKY43 im Vergleich zur Bindung an das unveränderte W2-Motiv noch relativ gut an das Konstrukt mit der Mutation m1, aber deutlich schwächer an m18. Die Mutation m19 lässt keine Bindung mehr zu. Interessanterweise können diese WRKY-Proteine auch nicht oder zumindest nur sehr schwach an TTGACT-Boxen (m2) binden. Die Konstrukte m10, m11 und m12 sind Mutationen der direkt auf die W-Box folgenden Base. Es ergibt sich für WRKY6 und WRKY11 keine bzw. nur eine leichte Änderung der Bindung, wohingegen für WRKY26, 38 und 43 in fast allen Fällen eine klare Verringerung der Bindungsstärke zu erkennen ist. Die Sequenzen mit den Mutationen direkt vor der W-Box (m13, m14 und m15) haben genau den umgekehrten Effekt, bezogen auf die letztgenannten WRKY-Faktoren.

Manche Austausche haben einen größeren Einfluss auf die Bindung als andere und für manche Proteine ergeben sich verschiedene Bindungsmuster, je nachdem, ob man je eine Base oder beide gleichzeitig verändert. Das Konstrukt m13, bei dem die Mutation von G nach C die Bindung von WRKY11-CTD reduziert bzw. verhindert, hat aber in Kombination mit einer weiteren Änderung im 3'-Bereich der W-Box als Konstrukt m8 (aber nicht m9) wieder ein schwaches Bindungssignal. Geht man von der Sequenz der W-Box zwei Basen nach außen (m16, m17), ergeben sich unterschiedliche Effekte, je nachdem, wie die Nukleotide verändert werden. In Konstrukt m16 hat die Mutation der zwei Basen jeweils nach G keinen Einfluss auf die Bindung von z.B. WRKY6, wenn aber wie in Konstrukt m17 die Änderung der beiden Basen nach T erfolgt, ergibt sich eine reduzierte Bindung.

Es bilden sich bei den untersuchten WRKY-Faktoren zwei Gruppen mit unterschiedlichem Bindeverhalten heraus. In der einen Gruppe sind WRKY6 und WRKY11, und die andere Gruppe besteht aus WRKY26, WRKY38 und WRKY43. Dies wird noch deutlicher in Tabelle 1, in der die Ergebnisse aus den Bindestudien zusammengefasst sind. Dargestellt ist die Bindungsstärke der Proteine an die DNA-Sequenzen relativ zur Bindung an das unveränderte 1xW2-Element.

Vergleicht man nun hier die Bindung der Proteine an die 1xW2-Elemente direkt, so zeigt sich zunächst das bereits beschriebene, sehr differenzierte Bindeverhalten der WRKY-Proteine. Als Gemeinsamkeit lässt sich feststellen, dass die Mutation der TGAC-Kernsequenz die Bindung völlig zerstört. Dies wird deutlich beim Element 1xW2mut, wo die Sequenz TGAC durch CCTT ausgetauscht wurde (nicht gezeigt). Sehr unterschiedliche Effekte auf die Bindung der WRKY-Proteine sind jedoch beim Austausch einzelner Basen zu beobachten, wobei z.T. eine signifikante Reduzierung der Bindung feststellbar ist. Hieraus wird erkennbar, dass die Bindung primär W-Box-abhängig ist, und der Einfluss von einzelnen Nukleotiden der flankierenden Bereiche für die WRKY-Transkriptionsfaktoren von unterschiedlicher Relevanz sein kann.

Sonde	Sequenz	W6	W11	W11 CTD	W26	W38	W43
1xW2	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACCA AATAAT	+++	++	+++	++	+	+
2xW2	2x[TTATTCAGCCATCAAAA TTGACCA AATAAT]	++	++	+++	++	++	++
1xW2mut	TTATTCAGCCATCAAAG GTCTTCA AATAAT	-	-	-	-	-	-
1xW2m1	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACA AATAAT	+	-	+	++	++	++
1xW2m18	TTATTCAGCCATCAAAA TTACCA AATAAT	+	-	+	+	+	+
1xW2m19	TTATTCAGCCATCAAAA TTAGACCA AATAAT	-	-	+	-	-	-
1xW2m2	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACTA AATAAT	++++	++++	++++	-	-	+
1xW2m3	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACGA AATAAT	++	-	+	-	-	-
1xW2m4	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACAA AATAAT	+++	+	+	+	-	-
1xW2m5	TTATTCAGCCATCAAAA CTGACCA AATAAT	++	-	+	+	+	+
1xW2m6	TTATTCAGCCATCAAAA GTGACCA AATAAT	+	-	+	+++	++	++
1xW2m7	TTATTCAGCCATCAAAA ATGACCA AATAAT	+	-	+	+++	++	+++
1xW2m8	TTATTCAGCCATCAAAA CTTGACC GATAAT	-	-	+	++	++	+++
1xW2m9	TTATTCAGCCATCAAAA CTTGACCT AATAAT	-	-	-	+	+	+
1xW2m10	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACC GATAAT	+++	+++	+++	+	+	-
1xW2m11	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACCT AATAAT	++	+++	+++	+	+	-
1xW2m12	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACC CATAAT	+	++	+++	+	-	-
1xW2m13	TTATTCAGCCATCAAAA CTTGACCA AATAAT	-	-	-	++	++	++
1xW2m14	TTATTCAGCCATCAAAA ATTGACCA AATAAT	-	+	+	++	+	++
1xW2m15	TTATTCAGCCATCAAAA TTGACCA AATAAT	-	+	+	++	++	++
1xW2m16	TTATTCAGCCATCAAAA GGTTGACCA GAATAAT	+++	++++	+++	+++	+++	+
1xW2m17	TTATTCAGCCATCAAAA GTTGACCA TATAAT	++	++	++	+	+	++
1xW2m21	TTATTCAGCCATCAAAA GAGTTGACCA GAATAAT	+++	++	+++	++	+	+

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der Bindungsunterschiede von WRKY-Proteinen an die verschiedenen 1xW2 Konstrukte

Dargestellt ist die Abschätzung der Bindungsstärke von WRKY-Proteinen an mutierte W2-Konstrukte im Vergleich zur Bindung an das unveränderte W2-Element. Dabei entspricht + einer schwachen, ++ einer deutlichen, +++ einer starken und ++++ einer außergewöhnlich starken Bindung. –:in den Autoradiogrammen konnte keine Bindung erkannt werden. In der linken Spalte sind die Namen der Konstrukte zusammen mit der zugehörigen Sequenz zu sehen. Die Basenaustausche sind in rot hervorgehoben und die W-Box ist durch fette Buchstaben gekennzeichnet. Die Namen der WRKY-Proteine sind hier mit W6 bis W43 abgekürzt.

Zur Herleitung eines erweiterten Konsensus für die W-Box, der auch flankierende Basen einschließt, war eine andere Darstellung der Ergebnisse notwendig. Um mit den in Tabelle 1 dargestellten Bindungsmustern auswerten zu können, inwieweit ein Austausch der W-Box-Basen oder der flankierenden Basen überhaupt einen Effekt auf die Bindung hat, wurde in Abbildung 4A dargestellt, welche Auswirkungen (positiv/negativ/neutral) die einzelnen Austausche in Relation zur Bindung der unveränderten 1xW2 Konstrukte haben. Dies ist hilfreich, um einen neuen Konsensus abzuleiten, abhängig von verschiedenen WRKY-Proteinen.

Aufbauend auf die unterste Zeile, die die unveränderte DNA-Sequenz zeigt, werden die Effekte der Mutationen jeweils den in der 2. und 3. Zeile einzeln aufgeführten Basen zugeordnet.

positiv oder negativ, nur wenige Änderungen haben keine Auswirkung auf das Bindeverhalten.

Bemerkenswert ist auch, dass das Volllängen-Protein und das C-terminale Konstrukt von WRKY11 ein sehr ähnliches Bindeverhalten aufweisen. Aufgrund der generell stärkeren Signale von WRKY11-CTD sind für dieses Protein allerdings mit einigen DNA-Sequenzen noch schwache Interaktionen detektierbar, die für das Volllängen-Proteinen nicht nachweisbar sind. Da diese unterschiedlichen Signalintensitäten höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen Mengen von rekombinantem Protein bedingt sind, kann man jedoch davon ausgehen, dass Volllängen-Protein und C-terminale Domäne von WRKY11 im Prinzip das gleiche Bindungsverhalten aufweisen.

Demnach sind alle nötigen Eigenschaften zur spezifischen Bindung an die W-box in der C-terminalen Domäne vorhanden. Die HARF-Domäne und vermutlich auch andere Strukturelemente, wie die in manchen WRKY-Faktoren vorkommenden Leucinzipper (Eulgem *et al.*, 2000), sind nicht an der Spezifität der Bindung beteiligt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass nur die 60 Aminosäuren der WRKY-Domäne für die Bindung an das entsprechende cis-Element verantwortlich sind.

3.1.3 Analyse der Interaktion des WRKY11-Proteins mit W-Boxen beinhaltenden Fragmenten aus nativen Promotoren

Die Relevanz des Kontextes der W-Box in Zusammenhang mit der Bindung von WRKY-Proteinen konnte bereits in Kapitel 2.1.2 hinreichend gezeigt werden. Da die Verwendung von permutierten W2-Sequenzen zur weiteren Analyse der W-Box-WRKY-Protein Interaktion auf Grund der notwendigen hohen Anzahl von Konstrukten nicht wünschenswert ist, bietet es sich vielmehr an, die bisher getroffenen Aussagen an einigen ausgewählten W-Boxen in einem natürlichen Promotorkontext zu überprüfen. Für diese Versuchsreihe wurden deshalb verschiedene W-Box-beihaltende Sequenzen aus Promotoren des Arabidopsisgenoms ausgewählt. Es wurden nur solche Fragmente verwendet, die die Nukleotidfolge TTGAC enthalten, da dies die in Bindeversuchen mit Oligonukleotiden gefundene Bindesequenz für WRKY-Proteine ist (Wang *et al.*, 1998, de Pater *et al.*, 1996) und dies darüber hinaus eine Sequenz darstellt, an die, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bisher alle getesteten WRKY-Proteine binden können.

Zunächst wurden W-Boxen aus dem *SIRK*-Promotor ausgewählt, da diese Rezeptor-Kinase bekanntermaßen ein Zielgen von WRKY6 ist. Dieses WRKY-Protein reguliert die seneszenz-abhängige Expression von *SIRK* (Robatzek and Somssich, 2002) und da die WRKY-Proteine ihre Funktion über W-Boxen ausüben, sollte daher zumindest eine der W-Boxen in diesem Promotor von WRKY6 in EMSA-Experimenten gebunden werden. Als weitere Sequenzen wurden W-Boxen im Promotor von WRKY11, von *4-Cumarat:CoA Ligase4* (4CL4), der einzigen *4-Cumarat:CoA Ligase* mit W-Boxen im Promotor (B. Hamberger, Dissertation MPIZ 2003), sowie die elizitorresponsive W-Box Eli17 in *CMPG1* (Kirsch *et al.*, 2001, Heise *et al.*, 2002) ausgewählt (Abb. A1). Erwähnenswert ist die hohe Anzahl an W-Boxen im Promotor der *SIRK*, wohingegen im *WRKY11*-Promotor bzw. im *4CL4*-Promotor die Anzahl der W-Boxen der statistischen Durchschnitt entspricht. Pro

1000 Basen tauchen statistisch etwa 2 W-Boxen auf. Eine Anreicherung dieser Elemente wird mit Funktionalität in Zusammenhang gebracht (Maleck *et al.*, 2000, Dong *et al.*, 2003).

Die Sequenzen der getesteten W-Box-beinhaltenen Elemente sind in Abbildung 5A aufgelistet, Abbildung 5B zeigt die *in vitro* Bindung von WRKY11 an diese Elemente. Auch bei diesen Oligonukleotiden unterscheidet sich die Bindung der C-terminalen Hälfte des Proteins nicht von der Bindung des Volllängen-Proteins (nicht gezeigt). Die W-Box-Konstrukte aus dem *SIRK*-Promotor beinhalten jeweils zwei W-Boxen, wohingegen alle anderen Elemente nur eine W-Box beinhalten. Das Fragment *SIRK*_{2/3} ergibt dementsprechend zwei Banden, bei denen die untere Bande einer besetzten WRKY-Bindestelle entspricht und die obere Bande einem Protein-DNA-Komplex mit zwei besetzten WRKY-Bindestellen. Die Sequenzen *SIRK*_{6/7} und *SIRK*_{8/9} ergeben jedoch nur eine Bande. Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, dass eine der beiden W-Boxen die inverse TTGACA-Sequenz enthält, die auch schon in den Bindeversuchen in Kapitel 2.1.2. keine gute Bindung ermöglichte. Obwohl jeweils zumindest eine TTGACT-W-Box enthalten ist, die eine starke Bindung ermöglichte (Abb. 3), gibt es dennoch nur eine schwache Bindung an das Konstrukt *SIRK*_{6/7}. Dies unterstreicht wiederum die Notwendigkeit eines über TTGAC oder TTGACC/T hinaus erweiterten W-Box Konsensus.

Abbildung 5 (nächste Seite): Bindung von WRKY11 an W-Box enthaltende Sequenzen aus verschiedenen Promotoren

A Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide. Elemente mit gleichem Präfix stammen aus dem gleichen Promotor: *SIRK*p - Promotor der *SIRK*, W11 - Promotor von *WRKY11*, E17 und F - Promotor von *CMPG1*, 4CL4 – Promotor der *4CL4*. Bis auf E17, das in *Petersilie* gefunden wurde, stammen alle Elemente aus *Arabidopsis*. Die W-Box und W-Box-ähnliche Sequenzen sind rot hervorgehoben. Oligonukleotide mit einem „m“ als Suffix in der Bezeichnung stellen mutierte Varianten zum Testen der spezifischen WRKY-W-Box Interaktion dar. **B** Gezeigt ist die Bindung von WRKY11 an verschiedene W-Box-enthaltende Elemente. Grobe *E.coli* Extrakte wurden mit den oberhalb der Autoradiogramme angegebenen Sonden inkubiert. Im Fall von E17-21 wurde die Bindung mit den angegebenen kalten Sonden in 50- bzw. 200-fachem Überschuss kompetitiert. Die Bindung an die W-Box-Sequenzen aus 4CL4 wurden jeweils mit einem 500-fachen Überschuss kompetitiert ((1) Bindung von WRKY11 an die oberhalb angegebene Sonde, (2) Konkurrenz der Bindung mit der unmarkierten, aber intakten Sonde (4CL4-W_x), (3) Konkurrenz der Bindung mit der unmarkierten, mutierten Sonde (4CL4-W_{x,m})). Offene Sterne kennzeichnen den spezifischen WRKY-Protein-DNA Komplex und geschlossene Sterne die freie Sonde. Andere Banden resultieren aus Wechselwirkungen mit unbekanntem Komponenten des *E.coli* Extraktes oder ergeben sich aus degradierten bzw. unvollständig translatierten Proteinen.

SIRKpW2/3 ATTATTGACTTAATTACTAGTTGACCAATA
 SIRKpW6/7 ATTATTGTCAAGTACCTTGACTATATTTAA
 SIRKpW8/9 TGTTTGACCATTTATTTAAATGAACCTTTTCTTGTCAAACAT
 SIRKpW11/12 TTGGTTGACTATCAACATCTTATTGACCAAAAT

W11pW1 CTCGGTCGATCGGGTCAACTACCCCATGTT
 W11pW2 CCACCGTTGGATTGACCTTTTCGAAAATCC
 W11pW3 CTCCTTCCCGGTTTGACTAAAAAATCACCA

E17-27 (*Pc*) TCAATATGTCAATGGTCAACATTCAAC
 E17-21 TGCAATGGTCAACATTCAAC
 E17-21m4 TGTAAATGGTCAACATTCAAC
 E17-21m11 TGCAATGGTAAACATTCAAC
 F (*At*) TTGTCAATGTCATTAATTCAAACATTCAACGGTCAATT

4Cl4-W1 TTGTTTTGCAATAGTCAAACACTATACATCC
 4Cl4-W1m TTGTTTTGCAATATTCAAAACACTATACATCC
 4Cl4-W2 CAGCAAATATTATTGACCAAGAAATGCAAA
 4Cl4-W2m CAGCAAATATTATTGAACAAGAAATGCAAA
 4Cl4-W3 AGAATTTTTGGAGGTCAACTGCGGAATGTA
 4Cl4-W3m AGAATTTTTGGAGTTCAACTGCGGAATGTA

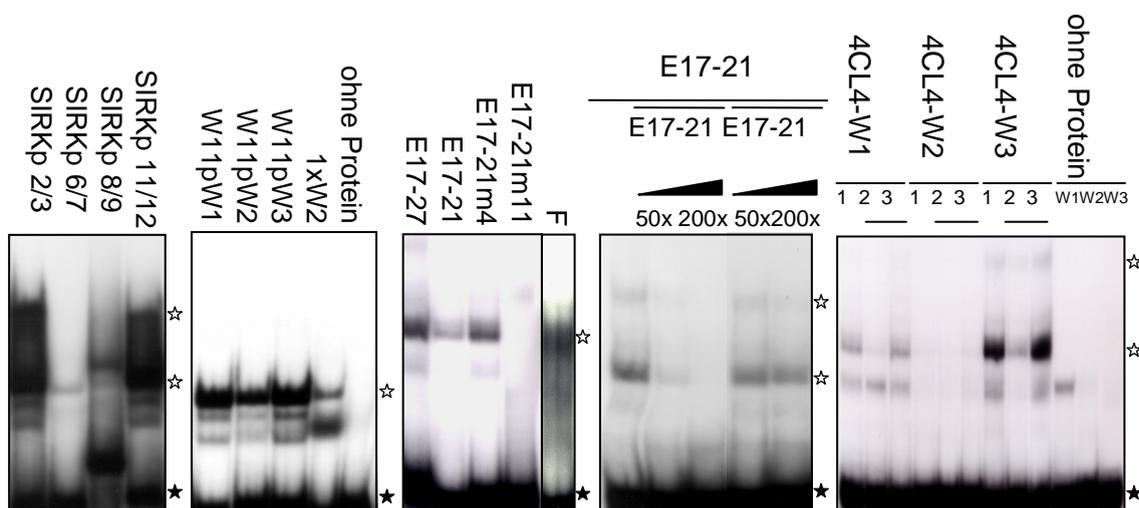


Abbildung 5: Bindung von WRKY11 an W-Box enthaltende Sequenzen aus verschiedenen Promotoren (Legende auf vorheriger Seite)

Die Bindung an W-Boxen aus dem *WRKY11*-Promotor ist jeweils sehr gut. Für das Konstrukt W11pW2 ist die Bindung etwas schwächer als an W11pW3, wobei die höhere Bindungsstärke an TTGACT Boxen gegenüber TTGACC Boxen in Kapitel 2.1.2 bereits gezeigt wurde (Abb. 3). Die invertierte W-Box in W11pW1 wird gegenüber einem normalen TTGACC in Sinn-Richtung etwas besser gebunden. Das muss jedoch nicht unbedingt an der Orientierung der W-Box liegen, sondern kann auch durch den Kontext ermöglicht werden, der genauso für die bessere Bindung verantwortlich gemacht werden kann.

Die Bindung an E17 ist deutlich, wenn auch nicht ganz so gut wie die Bindung an die zuvor beschriebenen Elemente aus dem *SIRK*- oder *WRKY11*-Promotor. Die gebundene Sequenz enthält wiederum eine inverse TTGACC-Box. Die andere W-Box ist eine imperfekte W-Box und an der Bindung nicht beteiligt. Dies konnte durch ein Konkurrenzexperiment mit den unmarkierten mutierten Versionen m4 und m11 gezeigt

werden. Auch das in *CMPG1* aus *Arabidopsis* vorkommende, zu E17 ähnliche Promotorelement (F), zeigt eine Bindung.

Die W-Boxen im Promotor der *4CL4* werden sehr unterschiedlich gebunden. Am stärksten ist die Bindung von WRKY11 Protein mit der dem ATG nächstliegenden W-Box (W3). Die vom ATG aus am weitesten stromaufwärts gelegene W-Box (W1) wird nur schwach gebunden, und auf den ersten Blick ist es sehr erstaunlich, dass an das Konstrukt 4CL4-W2 trotz einer perfekten TTGACC-Sequenz keine Bindung stattfindet. Wenn man jedoch die Ergebnisse mit den mutierten W2-Elementen aus dem Kapitel 2.1.2 in Betracht zieht, erkennt man, dass die Basen A vor der 4CL4-W2-Box-Sequenz auch in den EMSA-Versuchen mit den mutierten W2-Elementen keine gute Bindung ermöglichten. Die Änderung des G vor der W-Box-Sequenz zu einem A reduzierte die Bindung drastisch und war nur noch für das C-terminale Konstrukt von WRKY11 reproduzierbar zu detektieren. Für das Vollängen-Protein konnte nur manchmal eine sehr schwache Bindung nachgewiesen werden. Da aber die W-Boxen in SIRKpW2/3 und W11pBoxII die auch ein A vor dem TTGAC beinhalten eine deutliche Bindung ermöglichen, kann dies nicht das alleinige Kriterium sein. Ein Vergleich der Sequenzen im 3'-Bereich der W-Box enthüllt deutliche Unterschiede: die gebundenen Elemente weisen ein T auf, wohingegen bei 4CL4W2 ein A folgt. Dies steht nun im Gegensatz zu dem W2-Motiv, bei dem die Sequenz GTTGACCA lautet und eine gute Bindung ermöglicht. Hier führt jedoch jede Änderung des G vor der W-Box zu einem fast vollständigen Verlust der Bindung, so daß hier die Position direkt vor der W-Box die Bindung stärker beeinflusst.

Bei der Interaktion von WRKY11 mit DNA-Fragmenten ist demnach nicht nur die Position einzelner Basen zu beachten, sondern der gesamte Kontext der W-Box spielt eine Rolle.

Es gibt innerhalb der untersuchten Elemente gute und schlechte Bindesequenzen. Dabei scheint die Affinität zumindest zu den gut gebundenen W-Boxen in den verschiedenen Oligonukleotiden nicht erheblich voneinander abzuweichen. Ein Kompetitionstest von verschiedenen unmarkierten guten Bindesequenzen mit dem markierten 1xW2 Fragment an das WRKY11-Protein zeigt, dass die Kompetition für alle Sequenzen annähernd gleich ist (Abb. 6). Ein 250-facher Überschuss an unmarkierter Sonde lässt in allen Fällen nur noch eine schwache Bindung an das radioaktiv markierte Element zu. Bei einem 1000-fachen Überschuss ist mit allen Konkurrenten keine Bindung mehr zu detektieren. Somit scheint keine weitere Differenzierung zwischen guten Bindeelementen stattzufinden. Eine starke Bindung kann von einer anderen guten Bindesequenz unabhängig von der genauen Basenabfolge kompetitiert werden.

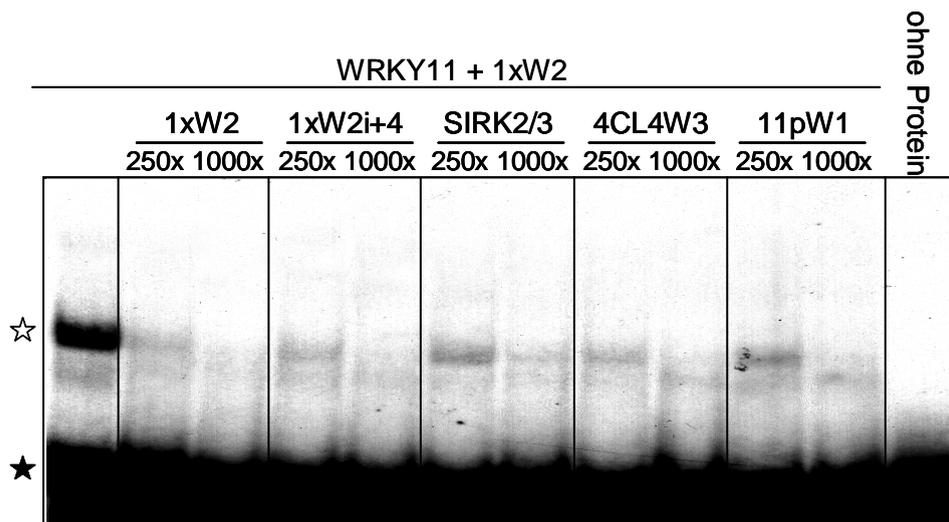


Abbildung 6: Unterschiedliche W-Box-enthaltende Elemente können gleich gut um die Bindung von WRKY11 konkurrieren

Die Abbildung zeigt ein EMSA-Experiment, in dem die Bindung von WRKY11 an 1xW2 mit verschiedenen Elementen, denen lediglich das Vorhandensein der W-Box gemeinsam ist, in den angegebenen Überschüssen kompetitiert wurde. Die Bezeichnung der Kompetitoren ist über dem Autoradiogramm angegeben. Der offene Stern kennzeichnet den spezifischen WRKY-Protein-DNA-Komplex und der geschlossene Stern die freie Sonde. Die linke Spur zeigt die Bindung von WRKY11 an 1xW2 ohne Zugabe eines Kompetitors. Die Sequenz für 1xW2i+4, welche eine invertierte W-Box-Sequenz enthält, ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Bei den untersuchten Promotorelementen gibt es also W-Box-Sequenzen, die gut gebunden werden und solche, die schlecht gebunden werden und sogar W-Boxen, die zumindest mit WRKY11 keine Interaktion ermöglichen. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen die in Kapitel 2.1.2 durchgeführten WRKY-W-Box-Bindungen. Da trotz TTGACC in dem Element 4CL4W2 keine Bindung *in vitro* zu detektieren war, muss die bisherige Definition der W-Box über das TTGACC hinaus erweitert werden, um allgemeine Gültigkeit zu behalten.

Um nun die jeweiligen Gemeinsamkeiten der Boxen mit einer guten oder einer schlechten Bindung zu analysieren, wurden die W-Boxen mit den flankierenden Bereichen aus den verschiedenen Elementen in Tabelle 2 getrennt nach guten und schlechten Bindesequenzen aufgelistet. Aus Gründen der experimentellen Überprüfbarkeit und der wahrscheinlichen Relevanz für die Bindung, wurden neben der W-Box nur 5 weitere Nukleotide außerhalb der Kernsequenz in diesem Vergleich mit einbezogen.

Gute Bindesequenzen		Schlechte Bindesequenzen	
Name	Sequenz	Name	Sequenz
1xW2	AAAAGTTGACCAATAA		
1xW2invert+2	TTAAGTTGACCAATTT	E17-21	GAATGTTGACCATTGA
1xW2invert+4	TAAAGTTGACCAATAT	F	AAAAATTGACCGTTGA
W11pW1	GGTAGTTGACCCGATC	4CI4-W2	TATTATTGACCAAGAA
W11pW2	TTGGAATTGACCTTTCG	1xW2invert	TTATTTTGACCTTTT
W11pW3	CCGGTTGACTAAAAA	SIRKpW6/7	GGTACTTGACAATAAT
SIRKpW2/3	ATTATTGACTTAATT	SIRKpW6/7	GTACCTTGACTATATT
SIRKpW2/3	ACTAGTTGACCAATAA	SIRKpW8/9	TGTTTTGACCATTTA
SIRKpW11/12	TTGGTTGACTATCAA	SIRKpW8/9	ATGTTTGACAAGAAA
SIRKpW11/12	TCTTATTGACCAAAT		
4CI4-W1	TAGTTTTGACTATTGC		
4CI4-W3	CGCAGTTGACCTCCAA		

Tabelle 2: Einteilung der untersuchten Oligonukleotide in gute und schlechte Bindesequenzen

Darstellung der W-Boxen aus den getesteten Elemente mit jeweils bis zu 5 flankierenden Basen im 5'- und 3'-Bereich,. Falls wie am Beispiel von SIRK6/7 nur 5 Basen zwischen den beiden W-Boxen liegen, werden diese für beide Boxen doppelt angegeben. Die Unterscheidung der Elemente nach guten und schlechten Bindesequenzen ist in der Tabelle angezeigt. Alle Sequenzen die im Oligonukleotid in Gegensinn-Orientierung vorliegen sind kursiv gekennzeichnet, ansonsten aber zur besseren Vergleichbarkeit in Sinn-Orientierung angegeben. Die W-Box ist rot hervorgehoben .

In der Tabelle sind alle Sequenzen in Sinn-Richtung aufgelistet, um ihren direkten Vergleich zu ermöglichen. Gemeinsamkeiten der Elemente im 5'-Bereich und im 3'-Bereich werden im Folgenden kurz beschrieben: Besonders auffällig ist das häufige Auftreten von Guanin und das Fehlen von Cytosin direkt vor den W-Boxen, die eine gute Bindung ermöglichen. Auf der zweiten Position vor der W-Box ist ebenfalls kein Cytosin zu finden, sondern vor allem Adenin und Thymin. Im 3'-Bereich fällt auf, dass direkt im Anschluss an die TTGACC/T Sequenz kein Guanin folgt. Insgesamt ist der Bereich nach der W-Box sehr AT-reich. Bei den schlecht gebundenen W-Boxen lässt sich festhalten, dass sowohl 5'- als auch 3'- Bereich sehr AT-reich sind, Guanin und Cytosin treten nur selten auf. Bei schlecht gebundenen W-Box-Sequenzen ist der AT-Reichtum nicht so signifikant wie bei gut gebundenen W-Boxen. Auf Grund der Bindungsstudien lassen sich somit W-Boxen mit guten und schlechten Bindungseigenschaften unterscheiden.

Vor diesem Hintergrund wurde nun eine Konsensus-Sequenz von gut gebundenen Elementen abgeleitet und somit möglicherweise eine „perfekte“ W-Box definiert. Auf alle Fälle sollte es möglich sein, den in Abbildung 4 aufgestellten Konsensus erheblich zu verbessern. Die gleiche Vorgehensweise ist für die schlecht gebundenen Elemente möglich; auch hier wird ein Konsensus ermittelt. Dazu wurde eine Konsensusmatrix erstellt, in der die Häufigkeiten der einzelnen Nukleotide an den jeweiligen Positionen eingetragen wurden. In Abbildung 7 ist die Matrix sowie der daraus erstellte Konsensus dargestellt.

A**Häufigkeiten der Nukleotide in guten Bindesequenzen**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	3	1	4	3	-	-	-	12	-	-	9	6	5	6
T	3	7	5	3	12	12	-	-	-	5	2	4	4	5
C	4	1	-	-	-	-	-	-	12	7	1	1	2	-
G	2	3	3	6	-	-	12	-	-	-	-	1	-	1

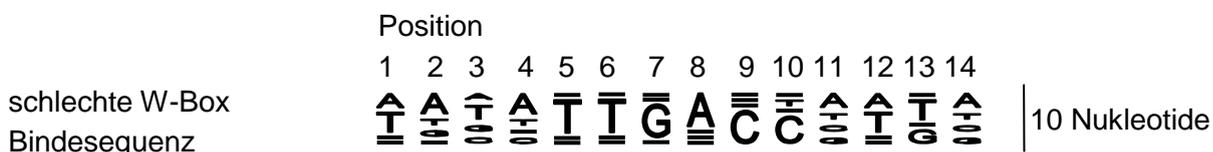


Konsensus für gute W-Box Bindesequenzen:

stringent TWG TTGACY WWWW
weniger stringent KDD TTGACY HHHW

B**Häufigkeiten der Nukleotide in schlechten Bindesequenzen**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	2	3	1	3	-	-	-	5	-	-	2	2	-	2
T	3	1	2	1	5	5	-	-	-	1	1	3	3	1
C	-	-	1	1	-	-	-	-	5	4	1	-	-	1
G	-	1	1	-	-	-	5	-	-	-	1	-	2	1



Konsensus für schlechte W-Box Bindesequenzen:

stringent WWKM TTGACC NTTW
weniger stringent DDBH TTGACY NWKN

Abbildung 7: Erstellung einer Konsensusmatrix zur Generierung eines verbesserten Konsensus für gute und schlechte Bindesequenzen

In den Tabellen ist aufgelistet, wie oft Basen an bestimmten Positionen auftreten. Darunter ist jeweils die grafische Darstellung der absoluten Häufigkeiten der einzelnen Nukleotide an jeder Position gezeigt, wobei durch die Größe der Nukleotid Symbole die Häufigkeit repräsentiert wird. Ein horizontaler Balken dokumentiert das Fehlen des Nukleotids an dieser Stelle. Die Nomenklatur des Konsensus richtet sich nach der Konvention des IUBC. Der Balken links neben der grafischen Darstellung ist ein Maß für die Skalierung und repräsentiert 10-faches Auftreten eines Nukleotids **A** Konsensusmatrix für gute Bindesequenzen **B** Konsensusmatrix für schlechte Bindesequenzen.

In der Matrix sind die Positionen 5 bis 10 von der W-Box-Sequenz belegt, die anderen Positionen repräsentieren die flankierenden Bereiche. Stellt man die Häufigkeit des Auftretens der Basen durch die Größe des Buchstabens dar, ergibt sich die in Abbildung 7

ermittelte Sequenz. Je größer der Buchstabe, desto häufiger ist das Auftreten der jeweiligen Base. Die Skalierung der Buchstaben ist für beide Sequenzen gleich. Die insgesamt kleineren Buchstaben in der schlechten Bindesequenz resultieren aus der geringeren Anzahl an Elementen, die für die Erstellung der Konsensus-Matrix verwendet wurden. Überraschend ist die geringe Differenz zwischen guten und schlechten Boxen, möglicherweise sind es aber schon diese kleinen Unterschiede, die eine differenzielle Regulation ermöglichen. Der Einfluss von invertierten W-Box-Sequenzen auf die Bindung ist anscheinend zu vernachlässigen, da invertierte W-Boxen sowohl in guten als auch in schlechten Elementen vorkommen. Darauf wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Die Versuche mit den mutierten Versionen von W2 und der Konsensus aus den Promotorelementen sollten sich nun gut ergänzen und die Kombination der Ergebnisse sollte eine Vorhersage von guten und schlechten Bindeelementen erlauben.

3.1.4 Untersuchung des Einfluss von inversen W-Boxen auf die Bindung

Wie schon in Kapitel 2.1.2 und Kapitel 2.1.3 beschrieben, gibt es DNA-Sequenzen, die von WRKY-Proteinen unterschiedlich gut gebunden werden. Es scheint dabei keine Rolle zu spielen, in welcher Orientierung die Sequenz vorliegt, denn sowohl gute als auch schlechte Bindesequenzen kommen in Sinn- und Gegensinn-Richtung vor. Um nun den Einfluss zu testen, den die Richtung der W-Box auf die Qualität der Bindung hat, wurde in der 1xW2-Sequenz die W-Box invertiert. Da der Einfluss von flankierenden Bereiche bekannt ist, wurden in weiteren Konstrukten je 2 bzw. je 4 Basen im 5`- und 3`-Bereich beim Invertieren eingeschlossen. Abbildung 8A listet die Sequenzen dieser Oligonukleotide auf, die invertierten Bereiche sind rot gekennzeichnet. Die Autoradiogramme in Abbildung 8B zeigen die entsprechende Bindung der WRKY-Proteine an die in 8A genannten Oligonukleotide.

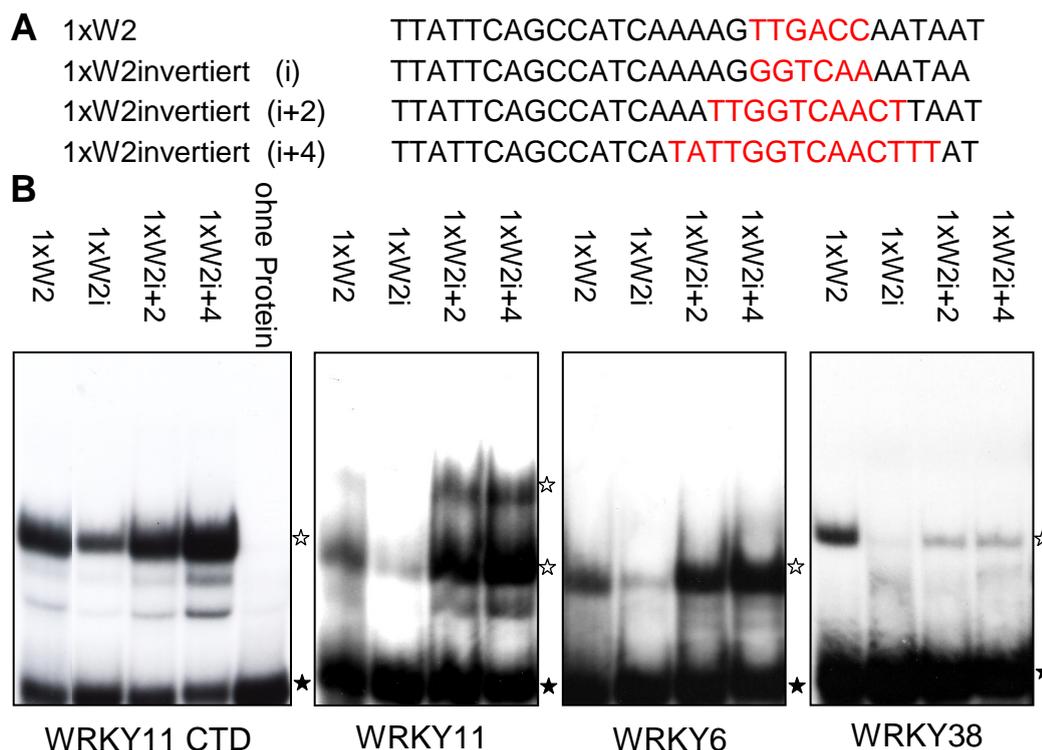


Abbildung 8: Einfluss inverser W-Boxen auf die Bindung von WRKY-Proteinen

A Bezeichnung und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Die jeweils invertierte Sequenz ist rot markiert. **B** EMSA mit den unterhalb der Autoradiogramme angegebenen WRKY-Proteinen. Die verwendeten Sonden sind über jeder Spur angezeigt. Der spezifische Komplex aus WRKY-Protein und DNA ist mit einem offenen Stern, die freie Sonde mit einem geschlossenen Stern markiert.

Ein Invertieren der TTGACC-Sequenz führt in allen untersuchten Fällen zu starker Reduktion der Bindungsstärke. In Anbetracht der Tatsache, dass flankierende Sequenzen die Bindung entscheidend beeinflussen, konnte dies erwartet werden. Erst wenn beim Invertieren flankierende Basen eingeschlossen werden, bleibt die Bindung erhalten. Für WRKY11 und WRKY6 hat die Gegensinn-Orientierung der W-Box nur einen schwachen Einfluss. Die Bindung an die DNA-Sequenz 1xW2(i+4) ist etwas stärker als bei der Originalsequenz. Für WRKY38 ist die Bindung schwächer, nachdem die W-Box mit flankierenden Basen invertiert wurde.

Es kann also keine generelle Aussage über die Bindungsqualität invertierter W-Boxen getroffen werden, hierzu muss wiederum jedes Element und WRKY-Protein individuell untersucht werden. Tendenziell lassen sich die WRKY-Proteine aufgrund des Bindeverhaltens wieder in die beiden bereits beschriebenen Gruppen von Bindungsverhalten einteilen (Kapitel 2.1.2).

3.1.5 Ist eine Prognose der Bindungsstärke mit den bisher gewonnenen Erkenntnissen möglich?

Mit den erarbeiteten Daten konnte ein Konsensus für eine gute bzw. schlechte Bindesequenz, zumindest für WRKY11, abgeleitet werden. Die dafür getestete Anzahl an

W-Box-Elementen ist sehr begrenzt, deshalb ist zur statistischen Absicherung der Erkenntnisse das Testen von weiteren verschiedenen Elementen notwendig. Man kann aber auch einen anderen Weg beschreiten und die getroffenen Aussagen bzw. die aufgestellten Modelle für gut gebundene und schlechte gebundene W-Boxen an zufällig gewählten Elementen testen und die Aussagen anhand der Testergebnisse untermauern oder widerlegen. Dieses Vorgehen wurde in dieser Arbeit gewählt. Die Elemente, an denen die Vorhersage der Bindungsstärke getestet wurde, sind in Abbildung 9A dargestellt.

A

38pW1	AATTGTTTTGGATTGACCATCTATTAGTTT
38pW2	ATCACGGCATAGTTGACTAGTTGTTGTTAG
43pW1	TAATTTGTTTCATTGACACAAAATCTTGTA
43pW2	CCTGACTAGAGCTTGACTCGTAGGTACCAA
PcWRKY1_X	CAACCTGCCAATGGTCAAGCACCATTTACA
PcWRKY1_YZ	CCTGATGTTGACTCGTTTTTTGACTCTTTT

B

Oligo-Name												Vorhersage											
38pW1	G	G	A	T	T	G	A	C	C	A	T	C	↔	↔	↓(↔)				↑	↓(↔)	↔	↓(↔)	
38pW2	T	A	G	T	T	G	A	C	T	A	G	T	↔	↔	↑				↑	↑	↔(↑)	↔	↑
43pW1	T	C	A	T	T	G	A	C	A	C	A	A	↔	↔	↓(↔)				↓	↔	↑(↔)	(↔)↑	↓
43pW2	A	G	C	T	T	G	A	C	T	C	G	T	↔(↓)	↔	↓(↔)				↑	↔	↔(↑)	↔	↓(↔)
PcW1_X	T	G	C	T	T	G	A	C	C	A	T	T	↑	↔	↓(↔)					↔(↑)	↔(↓)	↔	↔
PcW1_Y	A	T	G	T	T	G	A	C	T	C	G	T	↔(↓)	↔	↑				↑	↔	↔	↓	↑
PcW1_Z	T	T	T	T	T	G	A	C	T	C	T	T	↔	↔	↔(↓)				↑	↔	↓(↔)	↑	↑

Abbildung 9: Vorhersage der Bindestärke von ausgewählten, unbekanntem Elementen mit W-Boxen

A Bezeichnung und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Die W-Boxen sind rot markiert. Die zwei W-Boxen in *PcWRKY1_YZ* werden in der Tabelle getrennt als Y bzw. Z betrachtet, 38 bezieht sich auf den Promotor von *AtWRKY38*, 43 entsprechend auf den Promotor von *AtWRKY43* und *PcWRKY1* auf den Promotor von *WRKY1* aus *Petersilie*. **B** Bestimmung der Bindestärke für jede Position auf der Basis der erstellten Konsensussequenzen und den Ergebnissen aus den Bindestudien mit den mutierten Versionen von W2. Ermöglicht die Base eine gute Bindung, ist ein ↑ unterhalb der Position eingetragen, eine schlechte Bindung wird mit ↓ markiert. Hat die Base an dieser Position keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Bindung, so ist ein ↔ zu sehen. Ist keine eindeutige Zuordnung möglich, sondern eine Tendenz zu einer weiteren Kategorie vorhanden, so wurde ein zweiter Pfeil angegeben. Die Vorhersage in der rechten Spalte ergibt sich aus dem Mittelwert der Bindungsstärken an den einzelnen Positionen.

Teil B der Abbildung 9 zeigt die getroffene Vorhersage der Bindung von WRKY-Proteinen an die W-Boxen. Es wurde dabei für jede Position bestimmt, ob die jeweilige Base eine gute (Pfeil nach oben) oder eine schlechte (Pfeil nach unten) Bindung ermöglicht. War keine Unterscheidung zwischen guten und schlechten Bindeeigenschaften möglich, wurde die Base mit einem waagerechten Pfeil gekennzeichnet. Die Eigenschaft des gesamten Elementes wurde durch Addieren der Eigenschaften der einzelnen Basen ermittelt. Überwogen am Ende Basen mit guten Bindeeigenschaften, wurden dem Element gute Bindeeigenschaften zugewiesen. Überwogen Basen mit schlechten Bindeeigenschaften, wurden das Element entsprechend als schwach bindendes Element vorhergesagt. Falls die eindeutige Einordnung nicht möglich war und es eine Tendenz der Bindungsqualität zu einer weiteren Kategorie gab, so wurde diese in Klammern dazu geschrieben.

Der nächste Schritt war nun die experimentelle Evaluierung der prognostizierten Bindungen. Dazu wurden die Sinn- und Gegensinnoligonukleotide aus Abbildung 9A hybridisiert und radioaktiv markiert und in Bindeversuchen eingesetzt. In Abbildung 10 ist gezeigt, dass für WRKY11-CTD und WRKY11 die Bindungsstärke von unbekanntem W-Box-Sequenzen exakt vorhergesagt werden kann. So werden die Oligonukleotide 38pW2, *Pc*WRKY1_X und *Pc*WRKY1_YZ sehr gut gebunden, wohingegen für 43pW1 und 43pW2 nur eine schwache Interaktion nachzuweisen ist (Abb. 10). Die Bindung an 38pW1 ist zwar klar zu erkennen, das Signal ist aber nicht sehr intensiv. Auch dies kann man mit der Bestimmung der Bindungsstärke in Abbildung 9B vorherzusagen. Zumindest für WRKY11 und WRKY6 korreliert die Vorhersage mit der tatsächlichen Bindung. Unter bestimmten Umständen, die nicht genauer untersucht wurden, traten bei starken Bindungen von WRKY11(-CTD) zusätzliche Banden mit geringerer Mobilität auf. Diese sind für das Vollängenprotein stärker ausgeprägt, was vermutlich durch stabilisierende Wirkung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch N-terminal gelegene Proteinbereiche erklärt werden kann. Für WRKY26, WRKY38 und WRKY43 kann angenommen werden, dass nur die starken Signale der Interaktionen zu sehen sind; vor allem eine Bindung an die Elemente 38pW2 und *Pc*WRKY1_YZ ist zu erkennen. So ist festzuhalten, dass die als starke Bindeelemente prognostizierten DNA-Sequenzen auch von WRKY26, WRKY38 und WRKY43 Proteinen am besten gebunden werden, aber eine Beurteilung der Bindungsstärke zu den anderen Elementen ist nur bedingt möglich, da die Signale insgesamt deutlich schwächer sind als bei den zuerst erwähnten WRKY-Proteinen. Dies kann hauptsächlich auf die geringere Menge an WRKY-Protein im Extrakt zurückgeführt werden. Für WRKY43 ist sogar nur die Bindung an *Pc*WRKY1_YZ zu erkennen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die WRKY-Proteine 26, 38 und 43 ein abweichendes Bindeverhalten zeigen. Die Ergebnisse aus Kapitel 2.1.2 zeigen deutlich, dass es Unterschiede bei der Bindung von verschiedenen WRKY-Faktoren zu derselben DNA-Sequenz gibt und dass diese drei Proteine eine Gruppe mit abweichendem Bindeverhalten darstellen.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass es prinzipiell möglich ist, die Qualität der *in vitro* Bindung von WRKY-Faktoren an unbekannte Elemente vorherzusagen. Mit einem spezifisch aus einer Bindungstestreihe an 5 bis 10 Sequenzen erstellten Konsensus kann die WRKY-W-Box Interaktion sehr genau prognostiziert werden.

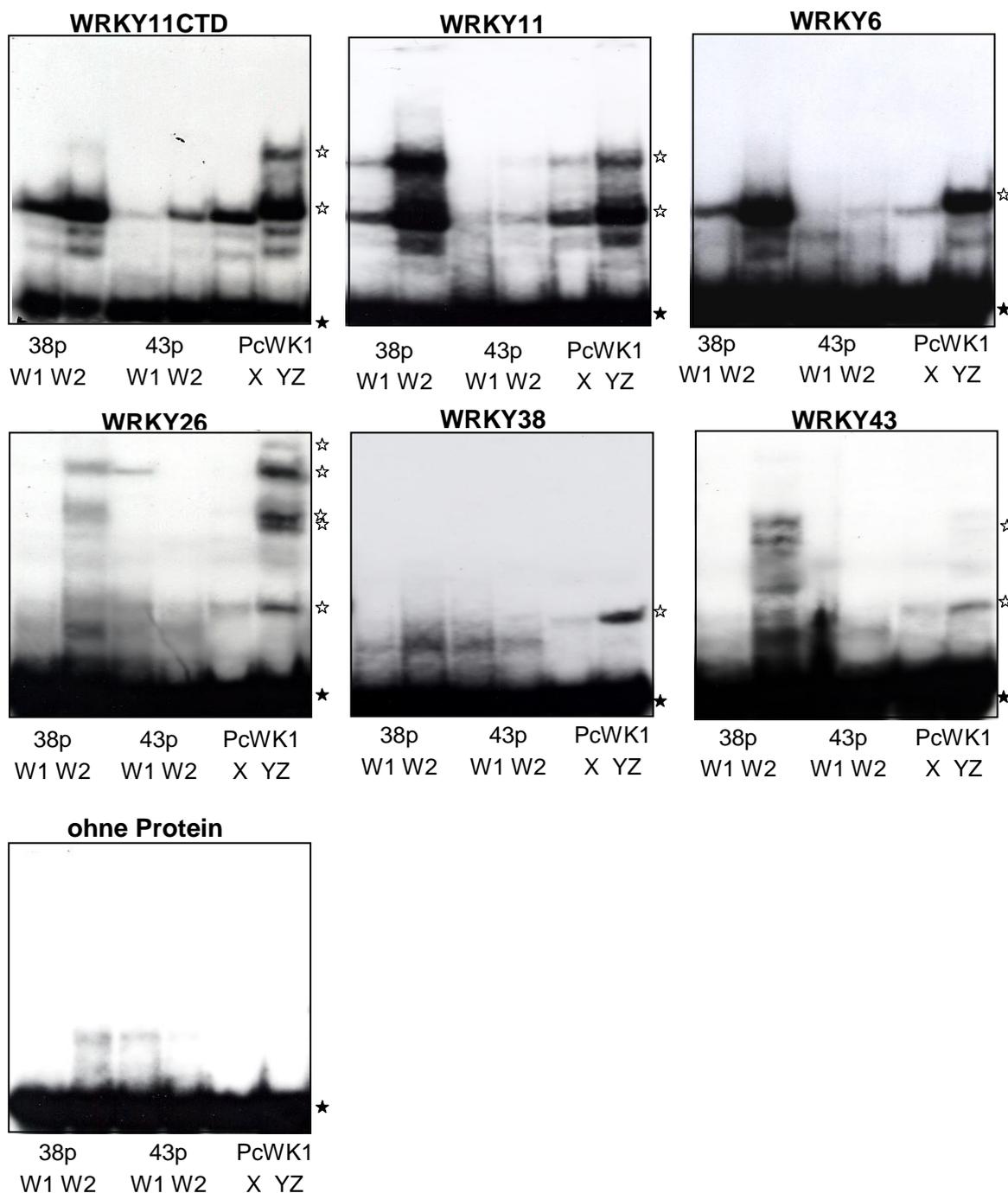


Abbildung 10: Evaluation der vorhergesagten Bindung von verschiedenen WRKY-Proteinen an unbekannte W-Box-Sequenzen

EMSA mit den über den Autoradiogrammen angegebenen Proteinen. Die eingesetzten Sonden sind unterhalb der jeweiligen Spur angezeigt, die Sequenzen und Bezeichnungen sind in Abb. 9A aufgeführt. Der spezifische WRKY-DNA Komplex ist mit einem offenen Stern auf gleicher Höhe markiert und die freie Sonde ist mit einem geschlossenen Stern gekennzeichnet. Andere Banden sind wahrscheinlich unspezifisch und repräsentieren einen Komplex gebildet von Oligonukleotiden und einer unbekanntem Komponente aus dem *E.coli*-Extrakt oder wenn kein Protein in der Reaktion enthalten ist, kann es sich um unspezifische Interaktionen der Sonde mit sich selbst handeln.

3.1.6 Die *in vitro* Bindung von WRKY-Proteinen an W-Boxen des *SIRK*-Promotors kann mit der Bindung und Reporterogenaktivierung *in vivo* korreliert werden

Es ist aufgrund der bisherigen Erkenntnisse also möglich, die Bindestärke von WRKY-Proteinen an unbekannte W-Boxen zu bestimmen. Es bleibt aber offen, ob diese Bindungsstärke mit Bindeeigenschaften *in vivo* einhergeht, da die *in vitro* Bindestudien in einem artifiziellen System durchgeführt werden. In der Pflanzenzelle herrschen andere Bedingungen als in einem Reaktionsgefäß und es ist durchaus denkbar, dass die Bindung *in vivo* anders als die Bindung *in vitro* ist. Durch den gleichzeitigen Partikelbeschuss mit einem Effektor-konstrukt, welches zur ektopischen Expression eines *WRKY*-Gens führt, und einem Reporter-genkonstrukt, welches das *cis*-aktive W-Box-Motiv enthält, soll die spezifische *in planta* Bindung von WRKY-Proteinen über die Aktivierung des *GUS*-Reporter-gens in *Arabidopsis*-Blättern untersucht werden.

In unserem Labor ist die Methode des Partikelbeschusses mit DNA-beschichteten Goldpartikeln bereits etabliert, und da für *WRKY6* als Effektor-konstrukt und dem *SIRK*-Promotor::*GUS* als Reporter-konstrukt die Aktivierung von *GUS*-Expression gezeigt wurde, ist auch eine geeignete positiv-Kontrolle vorhanden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch andere *WRKY*-Proteine, wie beispielsweise *AtWRKY29*, die Aktivierung der Expression von *SIRK/FRK1* (Asai *et al.*, 2002, Aifen Zhou, persl. Mitteilung) induzieren können. Da die in dieser Arbeit untersuchten *WRKY*-Proteine an DNA-Sequenzen aus dem *SIRK*-Promotor *in vitro* binden können (Abb. 11A), ist es durchaus möglich, dass sie in Partikelbeschuss-Experimenten als Effektor Reporter-genaktivität über Bindung an den *SIRK*-Promotor induzieren können.

In Abbildung 11 ist sowohl die *in vitro* Bindung an verschiedene Oligonukleotide aus dem *SIRK*-Promotor als auch die *in vivo* Reporter-genaktivierung über den Gesamtpromotor gezeigt. Am zweiten Tag nach dem Beschuss wurde die Reporter-genaktivität abgeschätzt. Wie erwartet zeigten deutlich mehr Zellen eine Blaufärbung aufgrund von *GUS*-Aktivität nach gemeinsamem Partikelbeschuss mit dem *35S::AtWRKY6*-Effektor-konstrukt (Abb. 11) im Vergleich zu Blättern, die nur mit dem Reporter-genkonstrukt transformiert wurden. Für *WRKY11* konnte keine *GUS*-Färbung, d.h. Aktivierung von *GUS*-Expression gezeigt werden, obwohl gute *in vitro* Bindung festgestellt wurde. Dies stimmt mit Ergebnissen von Aifen Zhou (persl. Mitteilung) überein und kann entweder daran liegen, dass *WRKY11* *in vivo* im Gegensatz zu *in vitro* nicht an den Promotor bindet, oder dass zwar eine Bindung stattfindet, aber *WRKY11* im Gegensatz zu *WRKY6* die *GUS*-Expression nicht aktiviert, sondern als negativer Regulator reprimiert. Möglich ist auch, dass bei *WRKY11* die Fusion mit GFP diesen Effekt auslöst. Die unspezifische Aktivierung des *SIRK*-Promotors wird mit *GFP::GUS* als Effektor-konstrukt kontrolliert und zeigt keine oder nur wenig blau gefärbte Zellen.

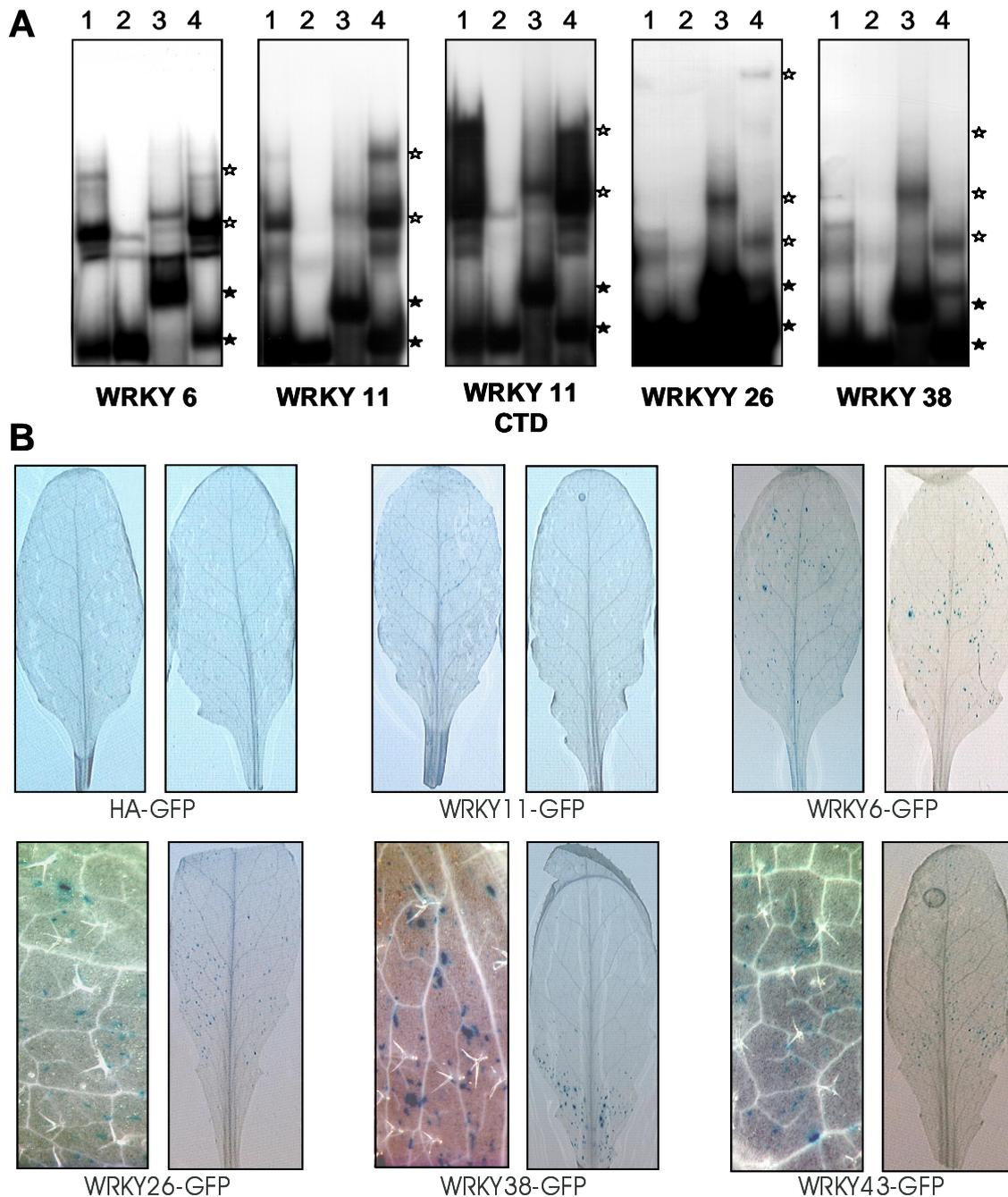


Abbildung 11: Vergleich der *in vitro* Bindung an Oligonukleotidsequenzen aus dem *SIRK*-Promotor mit *in vivo* Reportergenaktivierung

A EMSA der unterhalb der Autoradiogramme angezeigten WRKY-Faktoren mit den bereits in Abb. 5A gezeigten *SIRK*-Oligonukleotiden. Sonde in Spur 1 ist *SIRK*_{2/3}, in Spur 2 *SIRK*_{6/7}, in Spur 3 *SIRK*_{8/9}, in Spur 4 *SIRK*_{11/12}. Der spezifische Komplex aus WRKY-Protein und DNA ist mit einem offenen Stern, die freie Sonde mit einem geschlossenen Stern markiert. **B** Partikelbeschuss von *A. thaliana*-Blättern mit Reporter- und Effektor-Konstrukten. GUS-Aktivität in 4-5 Wochen alten Blättern zwei Tage nach Beschuss. Gezeigt wird die Reporter-Gen-Aktivität des Reporter-Gen-Konstruktes mit Kontroll-Effektor-Konstrukten (obere Reihe, HA-GFP als Kontrolle für unspezifische Reporter-Gen-Aktivität, WRKY6 als positive und WRKY11 als negative Kontrolle) und mit zu untersuchenden Effektor-Konstrukten (untere Reihe, das rechte Bild stellt jeweils ein ganzes Blatt und das linke Bild eine Nahaufnahme dieses Blattes dar). Reporter-Konstrukt war in allen Fällen *SIRK*::GUS. Pro Schuss wurden insgesamt 6 µg DNA verwendet.

Für WRKY38 kann eine deutliche GUS-Färbung (Aktivität), für WRKY26 und WRKY43 im Vergleich zum Hintergrund eine leicht erhöhte Reporter-Gen-Färbung festgestellt werden. Die durch die untersuchten Proteine induzierte GUS-Expression korreliert im großen und ganzen mit der *in vitro* gezeigten Bindung der einzelnen WRKY-Proteine an die W-Box enthaltenden Konstrukte aus dem *SIRK*-Promotor. Alle Proteine binden *in vitro* an eine oder mehrere W-Boxen und können abgesehen von WRKY11 *in vivo* Reporter-Gen-Aktivität induzieren. Jedoch kann von der Stärke der Bindung nicht auf die Stärke der Aktivierung geschlossen werden. Das *in vitro* immer schwach bindende WRKY38 zeigte in diesen Partikelbeschuss-Versuchen im Vergleich zu WRKY26 und 43 die mit Abstand stärkste GUS-Aktivität, die jedoch deutlich schwächer war als die Blaufärbung durch WRKY6.

Geht man davon aus, dass WRKY11 als negativer Regulator funktioniert, kann die *in vitro* Bindung zwar mit einer *in vivo* Bindung und in den meisten Fällen einer Aktivierung korreliert werden, allerdings scheint die Stärke der Aktivierung unabhängig von der *in vitro* Bindestärke zu sein. Man kann weiterhin feststellen, dass die WRKY-Proteine vorwiegend eine Aktivierung von Genexpression induzieren. Nur wenige WRKY-Proteine lösen keine GUS-Aktivität in diesen Co-Bombardment-Versuchen aus (Aifen Zhou, persl. Mitteilung).

Um die Rolle von WRKY11 als mutmaßlichem negativen Regulator etwas näher zu untersuchen, wurden *A. thaliana*-Blätter gleichzeitig mit zwei Effektor- und einem Reporterkonstrukt beschossen. Kann WRKY11 die Expression von GUS reprimieren, sollte bei gemeinsamen Beschuss mit WRKY6 keine oder eine verringerte Anzahl an blau gefärbten Zellen zu sehen sein. Die Auswertung des Versuches ist in Tabelle 3 dargestellt.

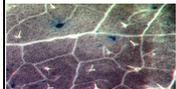
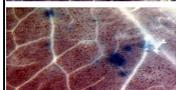
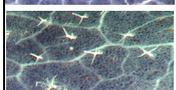
Effektor 1 je 2 µg	Effektor 2 je 2 µg	Reporter je 2 µg		geschätzte Aktivität
-	-	SIRKp		-
GFP	GFP	SIRKp		+
WRKY6	GFP	SIRKp		+++
WRKY11	GFP	SIRKp		-
WRKY6	WRKY11	SIRKp		-/+

Tabelle 3: WRKY11 reprimiert die von WRKY6 vermittelte Reporter-Gen-Aktivität.

Dargestellt ist die Abschätzung der Reporter-Gen-Aktivierung nach gleichzeitigem Beschuss von 4 bis 5 Wochen alten *A. thaliana*-Blättern mit zwei Effektoren und einem Reporterkonstrukt. Als Kontrollen wurden Goldpartikel mit einem WRKY-Konstrukt und zusätzlich mit 35S::GFP als zweitem Effektor, oder nur mit 35S::GFP beschichtet. Die letzte Zeile zeigt WRKY6 und WRKY11 als Effektor und *SIRKp*::GUS als Reporter. Von jedem Konstrukt wurden 2 µg eingesetzt, so dass insgesamt 6 µg DNA auf die Blätter geschossen wurde. In der vierten Spalte wird exemplarisch ein Blattausschnitt der jeweiligen Effektorkombination gezeigt. Abschätzung der Reporter-Gen-Aktivität: (-) kein Hintergrund, (+): schwache Hintergrundaktivität, (+++): starke GUS-Aktivität.

Wie erwartet, zeigt der Beschuss mit WRKY6 und GFP starke und der Beschuss mit WRKY11 und GFP keine Reporter-gen-Aktivität. Im Vergleich zu dem Experiment aus Abbildung 11 ist die GUS-Aktivität insgesamt deutlich geringer, was durch die Reduzierung der eingesetzten DNA-Menge erklärt werden kann. Wenn WRKY6 zusammen mit WRKY11 in Blätter geschossen wird, ist jedoch keine oder kaum GUS-Aktivität zu sehen. Dies bestätigt die Annahme, dass WRKY11 einen negativen Einfluss auf die Expression des Reportergens hat, zumindest im Kontext der von WRKY6 über den *SIRK*-Promotor induzierten GUS-Aktivität.

Ob die einzelnen W-Boxen aus dem *SIRK*-Promotor ausreichend sind, oder ob der Promotor in seiner Gesamtheit erhalten sein muss, um GUS-Aktivierung zu ermöglichen, sollten weitere Partikelbeschuss-Versuche klären. Dazu wurden die bereits für die Bindeversuche eingesetzten Oligonukleotide (vgl. Abb. 5A) aus dem *SIRK*-Promotor, verlängert um vier zusätzliche Basen, um eine Schnittstelle einzuführen, miteinander hybridisiert und in den mit entsprechenden Restriktionsenzymen geöffneten MS23-Vektor ligiert. Der Partikelbeschuss von *A. thaliana*-Blättern wurde wie in dem vorangegangenen Experiment durchgeführt, nur diesmal dienten die kurzen Fragmente der *cis*-regulatorischen W-Boxen in Kombination mit einem 35S-Minimalpromotor als GUS-Reporter-genkonstrukte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Vereinzelt blaue Punkte wurden als Hintergrund bewertet, und nur wenn mehrere blaue Punkte zusammen auftraten, wurde dies als spezifisch induzierte GUS-Aktivität eingestuft.

	ohne Effektor	GFP	WRKY6	WRKY11	WRKY26	WRKY38	WRKY43
SIRKp W6/7	-	-	-	-	+	-	++
SIRKp W8/9	-	-	-	-	-	-	-
SIRKp W11/12	-	-	+	-	++	-	+

Tabelle 4: Partikelbeschuss mit artifiziellen Promotor-Reporter-genkonstrukten in *A. thaliana*

Abschätzung der GUS-Reporter-gen-Aktivität in *A. thaliana*-Blättern einen Tag nach der Vakuuminfiltration und zwei Tage nach dem Partikelbeschuss, gemittelt aus zwei unabhängigen Experimenten: keine (-), eine schwache, aber signifikante (+) oder eine starke signifikante Aktivierung (++) gegenüber der Hintergrundaktivität. Die Anzahl blau gefärbter Zellen pro Platte und pro Behandlung wurde unter der Stereolupe abgeschätzt. Zur Kontrolle der unspezifischen GUS-Aktivität wurden Goldpartikel mit 35S::GFP als Effektor eingesetzt.

Wie schon mit dem Vollängenpromotor kann WRKY11 mit keinem Konstrukt GUS-Aktivität induzieren. Interessanterweise kann WRKY6 nur zusammen mit dem SIRKp11/12 Element GUS-Aktivität induzieren. Dies passt zu der Erkenntnis, dass WRKY6 seine Funktion auch im Vollängenpromotor spezifisch über diese nah am ATG gelegenen W-Boxen ausübt (Aifen Zhou, persl. Mitteilung). WRKY38 war nicht in der Lage, über diese kurzen Promotorfragmente Genaktivität zu induzieren, obwohl aus Abbildung 11 hervorgeht, dass dieses WRKY-Protein eine starke GUS-Aktivität mit dem *SIRK*-Vollängenpromotor induzieren kann. Möglicherweise kann WRKY38 zwar binden, benötigt aber weitere Faktoren zur Aktivierung von GUS-Expression oder die Aktivierung erfolgt direkt oder indirekt über das SIRK2/3-Fragment. WRKY26 und WRKY43 können

über SIRKpW6/7 und SIRKpW11/12 GUS-Aktivität induzieren. Das Konstrukt SIRKpW8/9 ist in diesem Experiment für kein WRKY-Protein ausreichend, um Genaktivierung auszulösen.

Im Vergleich zum Vollängenpromotor sind die synthetischen Promotoren mit den definierten regulatorischen Elementen vermutlich besser und „dichter“ reguliert, da sie weniger bzw. keine Hintergrundaktivität zeigen. Demgegenüber ist die Aktivierung von Reporter-Gen-Expression durch WRKY-Proteine bei allen getesteten Konstrukten insgesamt nur schwach. Die einzelnen Elemente sind offenbar nicht so gut wie Kombinationen aus Elementen in einem längeren Promotorfragment (vgl. Abb. 11), bzw. es sind mehrere Komponenten zur starken Aktivierung notwendig, die jedoch an die kurzen Elemente nicht zusammen binden können.

Die Erkennung von W-Boxen und die über diese Sequenzen vermittelte GUS-Aktivität scheint spezifisch zu sein. Verschiedene WRKY-Faktoren können unterschiedliche W-Boxen erkennen und nur über bestimmte W-Boxen die Aktivierung von Genexpression auslösen. Die Stärke der GUS-Aktivität variierte, je nachdem welches WRKY-Protein mit welchem Oligonukleotid eingesetzt wurde; dies führt zu der Annahme, dass die Regulation der Expression *in planta* durch Spezifität von WRKY-Proteinen zu bestimmten W-Boxen erreicht wird, obwohl die *in vitro* Bindung keine Unterschiede aufwies. Da Partikelbeschuss mit dem Vollängenpromotor eine stärkere GUS-Reporter-Gen-Expression zur Folge hatte als einzelne Elemente ist zusätzlich die Beteiligung von weiteren Proteinen denkbar.

3.1.7 Analyse der gut bzw. schlecht gebundenen Elemente mit dem Motif Mapper Programm

Mit dem von D. Wanke, K. Berendzen und K. Stuiber (MPIZ Köln) entwickelten Motif Mapper Programm kann die Verteilung von bestimmten DNA-Sequenzen im Genom bzw. in der Gesamtheit der Promotoren in *A. thaliana* untersucht werden. Es wurden 1500 bp bzw. 600 bp der DNA-Sequenz vor dem Translationsstart ATG von allen annotierten Genen aus der chromosomalen Sequenz von *A. thaliana* extrahiert und im Folgenden als 1500 bp bzw. 600 bp Promotoren/Promotordatensatz bezeichnet.

Eine Untersuchung von D. Wanke (MPIZ, 2003) zeigte, dass das W-Box-Hexamere TTGACC/T im Genom genauso wie in Promotoren sehr häufig vorkommt und gleichverteilt ist, dass jedoch bei genauerer Betrachtung mit kleinerer Fenstergröße eine lokale Andersverteilung zu beobachten ist. Eine besondere Häufung der W-Boxen tritt im Promotorbereich vor dem ATG auf, was im Durchschnitt zu einer leichten Anreicherung von W-Boxen in 600 bp Promotoren führt (D. Wanke, Dissertation MPIZ 2003). Es konnte auch beobachtet werden, dass die Häufigkeitsverteilung von W-Boxen in Sinn- und Gegensinn-Richtung ungleich ist. TTGACT gibt es häufiger in Sinn- und TTGACC häufiger in Gegensinn-Orientierung.

In vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass die W-Box nicht als Hexamer betrachtet werden sollte, sondern dass auch der Kontext eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit den WRKY-Proteinen spielt. Deshalb wurden die aus den Bindestudien

hergeleiteten Konsensus-Sequenzen für gute und schlechte W-Box-Bindesequenzen mit dem Motif Mapper Programm analysiert. Untersucht wurde die Häufigkeit des Auftretens der Bindemotiv-Konsensus-Sequenzen sowohl für die stringenten als auch für die weniger stringenten Definitionen der Sequenz. Die wichtigsten Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 5 für die Definition der guten und der schlechten Bindesequenz aufgelistet.

	Konsensussequenz	Genom W-boxen	600bp Promotor W-boxen	1500bp Promotor W-boxen	Verhältnis	
gute Bindesequenz stringent	TWGTTGACYWWWW					
	gesamt	966	174	393	600/chr	1,40
	Sinn:	498	92	190	600/1500	1,14
	Gegensinn	468	82	203	1500/chr	1,23
gute Bindesequenz weich	DDTTGACYHND					
	gesamt	59183	9553	21926	600/chr	1,15
	Sinn:	29464	4819	10972	600/1500	1,08
	Gegensinn	29719	4734	10954	1500/chr	1,07
schlechte Bindesequenz stringent	WWWTTGACYNTT					
	gesamt	4120	794	1792	600/chr	1,49
	Sinn:	2027	430	848	600/1500	1,13
	Gegensinn	2093	363	944	1500/chr	1,32
schlechte Bindesequenz weich	DDDTTGACYNWK					
	gesamt	23603	3986	9073	600/chr	1,17
	Sinn:	11874	1993	4528	1500/chr	1,08
	Gegensinn	11729	1993	4545	600/1500	1,08

Tabelle 5: Vergleich der absoluten Häufigkeiten der W-Box-Konsensussequenzen im *A. thaliana*-Genom und in Promotoren sowie deren Anreicherung in den einzelnen Datensätzen unter Berücksichtigung der erwarteten (statistischen) Häufigkeiten.

Dargestellt sind die in Kap. 2.1.3 ermittelten Konsensussequenzen und die Anzahl der W-Box-Motive des Konsensus die im Genom-, 600bp- und 1500bp-Promotor-Datensatz gefunden wurden sowie das Verhältnis der W-Box-Häufigkeiten der Promotordatensätze untereinander und zum Genom. Die vollständige Tabelle, in der auch zwischen TTGACC und TTGACT unterschieden wird, ist als Tab. A1 im Anhang zu finden. Gesamt ist die Summe der gefundenen W-Boxen der einzelnen Sequenzmöglichkeiten des Konsensus. Sinn und Gegensinn dient zur Unterscheidung der Orientierung, in welcher die W-Box gefunden wurde. Fett gedruckte Zahlen bedeuten Ungleichverteilung von Elementen in Sinn- und Gegensinnorientierung. Da die Häufigkeit eines Elementes abhängig von dem AT- bzw. GC-Gehalt ist, ergeben sich für die AT-reicheren Promotoren andere Häufigkeitserwartungen als für die restliche Genomsequenz. Die Häufigkeit eines Elementes ergibt sich demnach aus dem Quotienten der tatsächlich gefundenen Häufigkeit und der erwarteten Häufigkeit. Um die Anreicherung des Elementes in einem Datensatz zu betrachten, müssen die beschriebenen Quotienten von verschiedenen Datensätzen durcheinander geteilt werden, so dass ein zweifacher Quotient entsteht. Ergibt sich ein Wert >1 liegt eine Anreicherung im ersten Datensatz vor, ist der Wert <1 entsprechend eine Unterrepräsentierung. Es ist noch zu beachten, dass W-Boxen ohnehin lokal in Promotoren angereichert sind, so dass erst Werte ab 1,2 eine statistisch signifikante weitere Anreicherung darstellen. 600: 600 bp Promotordatensatz, 1500: 1500 bp Promotordatensatz, chr: Chromosomendatensatz (Gesamtgenom).

Für die Konsensussequenzen gab es jeweils unterschiedlich viele Möglichkeiten an Basenkombinationen, wodurch sich die großen Unterschiede in der Anzahl der gefundenen W-Boxen erklären. Um nicht durch statistische Variabilität verfälscht zu werden, kann in dem Fall von einer Ungleichverteilung von W-Boxen in Sinn- und Gegensinn-Orientierung ausgegangen werden, wenn die Differenz aus Sinn- und Gegensinn-Boxen mindestens 5% der Gesamtzahl an Boxen entspricht. Dies trifft nur für die stringent definierten Bindesequenzen und deren Auftreten in den Promotordatensätze zu, die entsprechenden Werte sind fett hervorgehoben.

Von den untersuchten guten W-Box-Bindesequenzen tauchten bei den stringent definierten Motiven alle möglichen Kombinationen in den Datensätzen auf, nur bei den sehr degenerierten Motiven wurden vereinzelte Basenkombinationen nicht in den Datensätzen gefunden (Tab. A1). Auch wenn alle Kombinationen eines W-Box-Konsensus auftreten, sind die Häufigkeiten der einzelnen Kombinationen der Boxen sehr unterschiedlich (Abb. A3). Es scheint demnach eine Präferenz für das Auftreten von bestimmten W-Boxen zu geben.

Die weniger stringente Definition des W-Box-Konsensus für gut gebundene W-Boxen führte zu dem sehr degenerierten Motiv DDTTGACYHND, bei dem es 1296 mögliche Basenkombinationen gibt und für das über 59000 W-Boxen im Genom und knapp 9500 Elemente im 600 bp Promotor-Datensatz gefunden wurden. Dies bedeutet, dass jede Basenkombination im Durchschnitt etwa fünfzigmal im Genom und etwa achtmal im Promotor auftrat und in den untersuchten Datensätzen erwartungsgemäß gleichverteilt ist. Das stringente Motiv für gut gebundene Boxen TWGTTGACYWWW mit 64 möglichen Kombinationen und 966 W-Boxen im Gesamtgenom und 174 W-Boxen im kurzen Promotor-Datensatz ist hingegen nicht gleichverteilt, sondern in Promotoren angereichert, im 600 bp-Promotor deutlicher als im 1500 bp-Promotor-Datensatz. Zum Vergleich der Anreicherung wurden für jedes Motiv die gefundene Häufigkeit mit der erwarteten Häufigkeit in Relation gesetzt. Mit diesem erhaltenen Wert können die verschiedenen Datensätzen nun durch Quotientenbildung untereinander verglichen werden.

Im Gegensatz zum W-Box-Hexamer TTGACY, für das D. Wank im *A. thaliana*-Genom in Promotoren nur lokal vor dem ATG eine Anreicherung zeigen konnte, wurde für die stringent definierte 12 Basen-Konsensussequenz eine generelle Anreicherung in Promotoren beobachtet. Eine Ungleichverteilung von putativ funktionellen Elementen wurde bereits insofern von D. Wanke postuliert (Dissertation, MPIZ 2003), als die Anreicherung eines Elementes nur dann entstehen kann, wenn ein funktioneller Druck auf diese Sequenz ausgeübt wird. Falls für eine bestimmte Sequenz keine Funktion vorhanden ist, wird sie im Verlauf der Evolution durch zufällige Mutationen verändert und in Genom und Promotoren lediglich mit statistischer Erwartung auftreten.

Da für den stringenten Konsensus von gut gebundenen W-Boxen eine statistisch signifikante Anreicherung in Promotoren gefunden wurde, handelt es sich um ein funktionelles Element. Damit unterstreicht diese Motif Mapper Analyse die Bedeutung der postulierten Konsensussequenz.

Die „weich“ definierte Sequenz der sogenannten schlecht gebundenen W-Box ist genauso wie bei der guten W-Box-Bindesequenz gleichverteilt. Überraschend ist jedoch der Befund, dass auch der stringent Konsensus für schwach gebundene W-Box Sequenzen WWWTTGACYNTT ungleich verteilt ist. Das lässt darauf schließen, dass auch dieses Motiv funktionell ist, wenn auch in einem anderen als dem untersuchten

Kontext; die Funktion kann unabhängig von den verwendeten WRKY-Faktoren sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass WRKY-Proteine unterschiedlich an W-Boxen binden können, und so ist es möglich, dass andere WRKY-Proteine an dieses Motiv binden und dann ihre Funktion ausüben.

Im Folgenden wird lediglich auf die Analyse der stringent definierten Motive eingegangen, da die nicht-stringenten Motive statistisch in Promotor- und Gesamtgenom-Datensätzen gleichverteilt sind und somit vermutlich keine funktionelle Bedeutung für die getesteten WRKY-Proteine haben.

Die Tabelle 5 stellt die Summen der Häufigkeiten und der Anreicherung von W-Box-Sequenzen dar; es ist darüber hinaus von Interesse, die Häufigkeit bestimmter W-Box-Variationen untereinander zu vergleichen. Eine Grafik u.a. mit den Häufigkeiten aller 64 Kombinationen der stringent definierten Konsensussequenz wird im Anhang gezeigt (Abb. A3). In dieser Abbildung treten nur wenige Boxen sehr häufig und die meisten hingegen entsprechend ihrer statistischen Erwartung auf. W-Box-Konsensussequenzen mit TTGACT sind in der Summe häufiger als TTGACC-Boxen, es gibt aber auch bestimmte TTGACC-Boxen die sehr häufig sind, sowie TTGACT-Boxen mit geringer Häufigkeit. Statistisch gesehen sind Promotoren AT-reicher und das Genom im Vergleich dazu GC-reicher. Es gibt für das Auftreten von AT-reichen Boxen rein statistisch eine höhere Frequenz und dies erklärt die insgesamt höhere Anzahl an TTGACT-Sequenzen. Abgesehen davon sind auch Boxen mit gleichem AT- bzw. GC-Gehalt ungleich verteilt.

Es sind nur wenige Sequenzen deutlich in Promotoren angereichert. Obwohl die Konsensussequenz TWGTTGACYWWW insgesamt in Promotoren, vor allem im 600 bp Promotor, angereichert ist, wird dies vor allem durch einzelne Kombinationen erreicht (Abb. A4), sowohl von W-Boxen mit CC- als auch mit CT-Suffix. Die mit Abstand häufigste Sequenz TTGTTGACCAAAA ist jedoch auch im Gesamtgenom eine der häufigsten Sequenzen und daher nicht in Promotoren angereichert.

Bei den drei sehr deutlich in Promotoren angereicherten Sequenzen TAGTTGACCAATT, TAGTTGACCTTAA und TAGTTGACCTTTTA ist die Gegensinn-Sequenz zwar leicht in kurzen Promotoren, jedoch überhaupt nicht mehr in 1500bp Promotoren angereichert. Darüber hinaus gibt es einige Sequenzen, die sowohl in Sinn- als auch Gegensinn-Orientierung nur für den 600bp Promotor-Datensatz angereichert sind. In den Promotoren kommen ebenfalls unterrepräsentierte Boxen vor, diese treten in den meisten Fällen überhaupt nicht in den Datensätzen auf (Quotient = 0). Andere Boxen treten im Chromosomen-Datensatz mit durchschnittlicher Häufigkeit auf, sind in den Promotoren jedoch unterdurchschnittlich häufig.

Es ist demnach sehr viel Variabilität in der Häufigkeit und Anreicherung der W-Box-Sequenzen vorhanden und nach einem Blick auf die summierten Häufigkeiten, kann nur das Betrachten der Einzelhäufigkeiten die besonders interessanten, d.h. die angereicherten oder unterrepräsentierten Elemente und damit die am wahrscheinlichsten funktionellen Motive aufzeigen.

Eine Ungleichverteilung von Sinn- und Gegensinn-Orientierung tritt nur in den Promotordatensätzen, aber nicht im Gesamtgenom auf. Dies kann an den insgesamt höheren Zahlen in letzterem Datensatz liegen, wodurch Abweichungen besser ausgeglichen werden. Meist tritt jede der möglichen W-Box-Sequenzen aus dem Konsensus pro Promotor nur einmal auf, selten findet man mehrfaches Auftreten einer W-Box-Sequenz in demselben Promotor. Die Anreicherung von Elementen im Promotor lässt

wurde eine Konsensussequenz für Bindesequenzen abgeleitet. Es soll nun durch Bindereaktionen mit Deletionskonstrukten kontrolliert werden, ob die Definition des Konsensus der guten bzw. schlechten Bindesequenzen die flankierenden Bereiche der W-Box weit genug umfasst bzw. inwie weit benachbarte Sequenzen direkt an der Bindung beteiligt sind.

In diesen Versuchen wurde das bereits mehrfach eingesetzte 1xW2-Element verwendet. Es wurden für diese Versuchsreihe Deletionen im 5'- und 3'-Bereich eingeführt. Abbildung 13A zeigt alle untersuchten Sequenzen, darunter (Abb. 13B) sind die Autoradiogramme der elektrophoretisch aufgetrennten Bindereaktionen von WRKY-Proteinen an ausgewählte Deletionskonstrukte dargestellt. Nicht gebundene Konstrukte wurden in der Abbildung nicht berücksichtigt.

Auch in diesem Versuch zeigen die verschiedenen WRKY-Proteine unterschiedliches Bindeverhalten. So sind beispielsweise für WRKY6 vier Basen vor und zwei Basen nach der W-Box zur Bindung nötig, womit sich eine Bindesequenz aus 12 Basen ergibt. Für WRKY11 hingegen sind drei Basen im 5'- und auch im 3'-Bereich notwendig, obwohl hier auch noch mit zwei Basen eine sehr schwache Bindung stattfindet. Die zur Bindung nötige Länge beträgt somit 11 bis 12 Basen.

Bei den anderen getesteten Proteinen zeigen Deletionen bis vier Basen vor der W-Box-Sequenz bereits keine Bindung mehr. Im 3'-Bereich sind 3 Basen notwendig. Für WRKY26, 38 und 43 sind deshalb für den 5'-Bereich weitere Konstrukte zur genauen Analyse notwendig; die für eine Bindung notwendige Sequenz ist damit größer als für WRKY6 und WRKY11. Für WRKY6 und WRKY11 wurde auch ein Konstrukt auf Bindung hin getestet, das sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich eine Deletion aufwies (AAAGTTGACCAA). An dieses Konstrukt konnte nur für WRKY11-CTD eine sehr schwache Bindung festgestellt werden (nicht gezeigt). Daraus lässt sich folgern, dass eine Bindung generell möglich ist und die Proteine WRKY6 und WRKY11 wahrscheinlich binden können. Da die Bindung aber sehr schwach ist, konnte sie im Rahmen dieses Experimentes nicht detektiert werden. Diese schwache Bindung ist möglicherweise auf eine zu kurze Bindesequenz im 3'-Bereich zurückzuführen, aber auch fehlerhafte Oligonukleotide, die nicht oder nur unvollständig annealen konnten, sind eine mögliche Fehlerquelle.

Abbildung 13 (folgende Seite): **Die WRKY-Proteine erkennen und benötigen 11-14 Basen zur Bindung an eine W-Box-Sequenz**

A Bezeichnung und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Deletionen vor der W-Box sind mit del5' und Deletionen hinter der W-Box mit del3' gekennzeichnet. Die W-Box ist rot markiert. **B** Kontrollgel mit Sonden ohne Protein in der Bindereaktion **C** EMSA mit dem unterhalb der Autoradiogramme angezeigten WRKY-Protein. Die eingesetzten Sonden sind über jeder Spur sichtbar. Der spezifische Komplex aus WRKY-Protein und DNA ist mit einem offenen Stern, die freie Sonde mit einem geschlossenen Stern markiert. Mit einem Punkt markierte Banden sind unspezifisch und repräsentieren einen Komplex,

gebildet von Oligonukleotiden und einer unbekanntem Komponente aus dem *E. coli*-Extrakt.

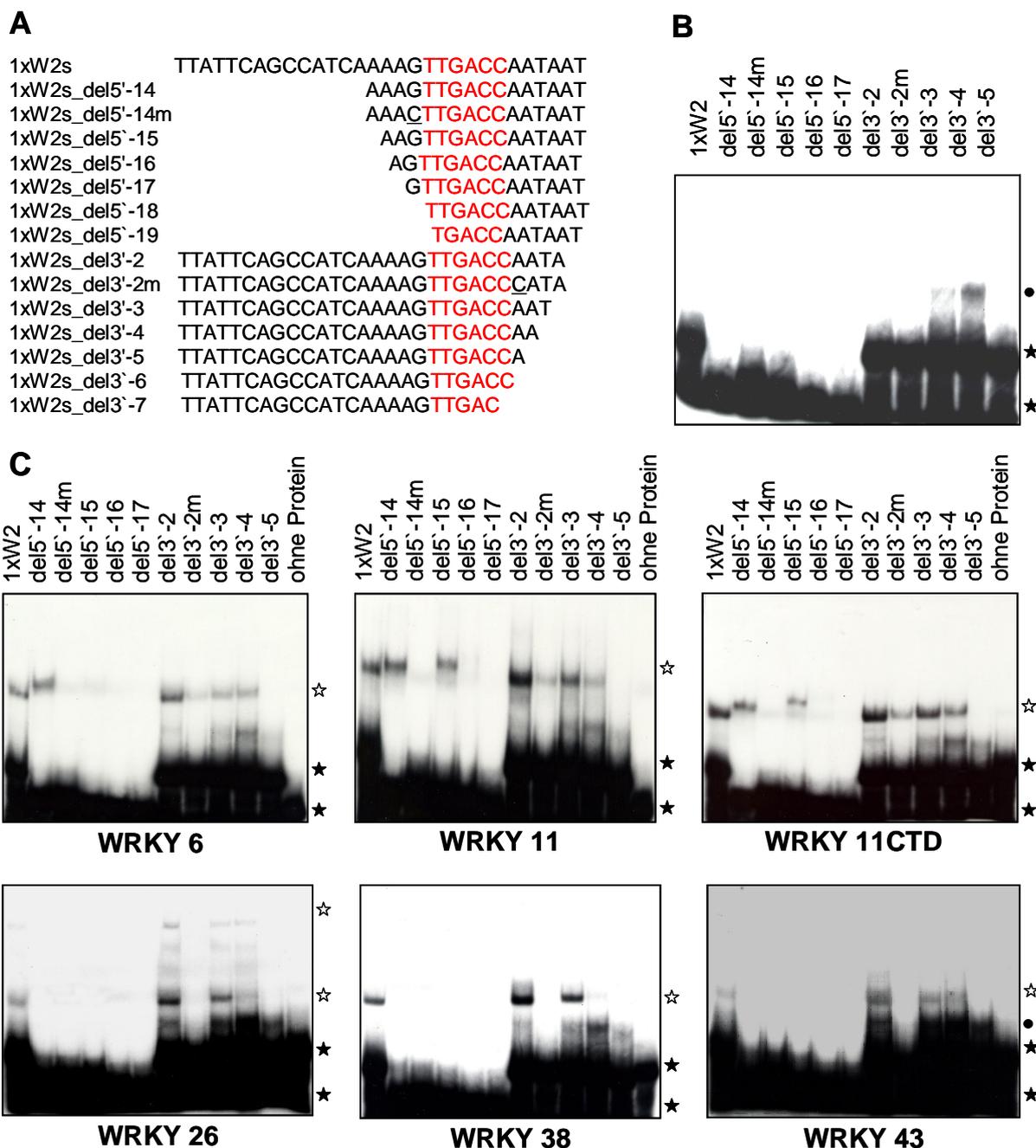


Abbildung 13: Die WRKY-Proteine erkennen und benötigen 12-14 Basen zur Bindung an eine W-Box-Sequenz (Legende siehe vorhergehende Seite)

Die WRKY-Proteine scheinen somit Deletionen auf einer Seite ausgleichen zu können, da bei Deletionen entweder im 5'- oder im 3'-Bereich der W-Box Sequenz auch kürzere flankierende Bereiche eine Bindung zuließen. Bei gleichzeitiger Kürzung der Bindesequenz im 5'- und 3'- Bereich auf die jeweilige zuvor bestimmte Minimallänge scheint jedoch die zur Bindung notwendige Mindestlänge unterschritten zu werden.

Die Definition des Konsensus von W-Boxen mit vier flankierenden Basen vor und nach TTGACC/T sollte dennoch ausreichend sein, um die Sequenz hinreichend genau zu definieren. Dementsprechend beinhaltet eine W-Box-Sequenz 12-14 Basen. Dies

beschreibt aber nur die Länge der gebundenen DNA-Sequenz, es ist nicht auszuschließen, dass andere Basen, die weiter von der W-Box entfernt sind, einen Einfluss auf die Spezifität oder Stabilität der Bindung haben, auch wenn sie nicht direkt daran beteiligt sind.

3.1.9 Untersuchung von kombinierten W-Boxen

Die in dieser Arbeit untersuchte W2-Box aus dem *PcPR1-1* Promotor ist nicht das einzige W-Box-Motiv in diesem Promotor. W-Boxen treten hier in einem kurzen Promotorstück in einer Gruppe auf, wie es auch für andere Promotoren gezeigt werden konnte (Eulgem *et al.*, 2000, Maleck *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass WRKY-Proteine möglicherweise synergistisch mit anderen WRKY-Faktoren oder anderen Klassen von Transkriptionsfaktoren wirken. Zumindest für die W-Boxen im *PcWRKY1*-Promotor konnte solch ein synergistischer Effekt auf die Aktivierung eines Reporterkonstruktes gezeigt werden (Eulgem *et al.*, 1999)

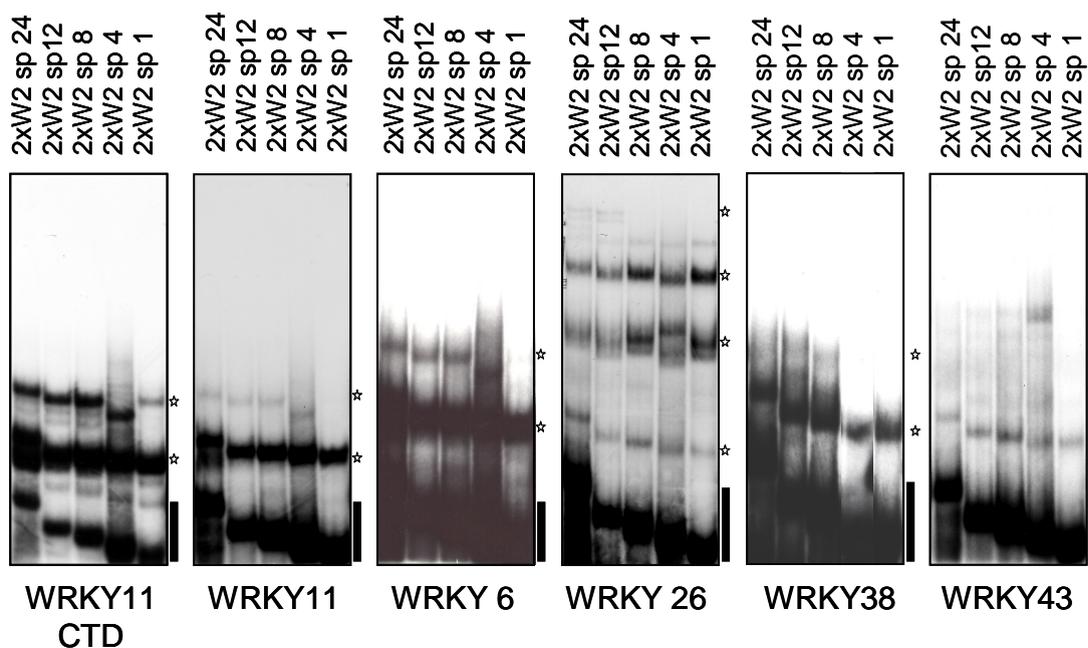
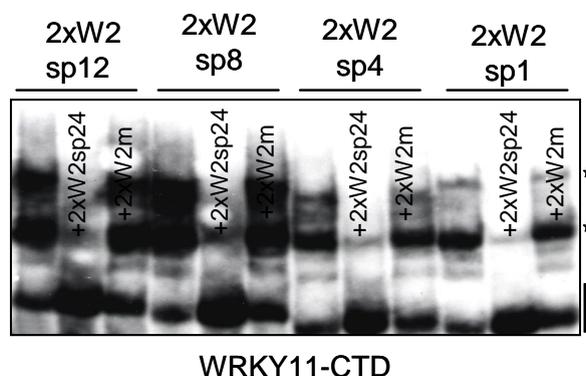
3.1.9.1 Bindung von WRKY-Proteinen an W-Boxen in verschiedenen Abständen

Um diesen synergistischen Effekt ausüben zu können, müssen zwei Proteine gleichzeitig an diese DNA-Sequenz binden können. Dabei stellt sich die Frage, wie nah die W-Boxen überhaupt zueinander sein können, um noch von zwei verschiedenen Proteinen gebunden zu werden. Können die Proteine durch das mehrfache Vorkommen von W-Boxen besser binden oder hat die Bindung von zwei oder mehr WRKY-Faktoren einen stabilisierenden Effekt auf den Protein-DNA-Komplex? Auch die Größe der Proteine könnte sich auf die Bindung auswirken, da größere Proteine sterisch anspruchsvoller sind und mehr Raum beanspruchen und dadurch möglicherweise W-Boxen, die sehr nah beieinander sind, nicht zeitgleich von zwei verschiedenen Proteinen gebunden werden können.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide, bestehend aus zweimaliger Abfolge des W2-Elementes, miteinander hybridisiert und in Bindeversuchen eingesetzt. In weiteren Konstrukten wurde der Abstand der beiden Bindeelemente schrittweise durch Deletion von Basen jeweils in der Mitte zwischen den beiden W-Boxen verringert. Die Sequenzen der Konstrukte sind in Abbildung 14A gezeigt und die deletierten Nukleotide, die zum nächst kleineren Konstrukt führen, sind durch Unterstreichen gekennzeichnet. Erwartungsgemäß ergeben sich in den Bindereaktionen mit dem doppelten W2-Element auch zwei Banden, von denen die obere deutlich schwächer als die untere ist, d.h. die Tendenz zur gleichzeitigen Bindung an beide W-Boxen in dieser kurzen Sequenz ist nicht sehr hoch. Dennoch kann festgehalten werden, dass WRKY-Proteine gleichzeitig an die zwei W-Box-Elemente in dem untersuchten Abstand binden können (2xW2sp24, Abb. 14B). Eine Reduktion des Abstandes auf 12 Basen führt zu keinem sichtbaren Effekt. Erst bei einem Abstand von 8 Basen fehlen bei WRKY26 die hochmolekularen Komplexe mit der geringsten Mobilität. Fortgesetzte Reduktion des Abstandes hatte keinen weiteren Einfluss auf diese Interaktion.

A

2xW2sp24 TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATAATTTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATAAT
 2xW2sp12 TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATAATCAAAAAGTTGACCAATAAT
 2xW2sp8 TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATAAAAAGTTGACCAATAAT
 2xW2sp4 TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAAAAGTTGACCAATAAT
 2xW2sp1 TTATTCAGCCATCAAAAAGTTGACCAATTGACCAATAAT
 2xW2m TTATTCAGCCATCAAAAAGTACACCAATAATTTATTCAGCCATCAAAAAGTACACCAATAAT

B**C****Abbildung 14: Bindung von WRKY-Proteinen an benachbarte W-Boxen**

A Bezeichnung und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Die Zahl im Namen gibt den Basenabstand zwischen den rot markierten W-Boxen an. 2xW2sp24 entspricht der zweifachen W2-Sequenz. Deletierte Sequenzen, die zum nächst kleineren Konstrukt führen, sind unterstrichen, die W-Box ist rot hervorgehoben **B** EMSA mit den unterhalb der Autoradiogramme angezeigten WRKY-Proteinen. Die eingesetzten Sonden sind über jeder Spur zu sehen. **C** Konkurrenz der Bindung von WRKY11-CTD an die 2xW2-Konstrukte. Über dem Autoradiogramm ist die jeweils markierte Sonde angegeben. Die eingesetzten Kompetitoren sind den entsprechenden Spuren zu entnehmen, es handelt sich um 2xW2 und 2xW2m, bei dem die W-Boxen mutiert wurden. Offene Sterne markieren die Positionen von WRKY-W-Box-Komplexen, vertikale Balken kennzeichnen die Lage der freien Sonden.

Für WRKY6 und WRKY11 ist erst bei dem kleinsten Abstand der W-Boxen (2xW2sp1) kein Protein-DNA-Komplex mehr zu sehen, der zwei gebundenen Proteinen oder Proteinkomplexen entsprechen würde. Die C-terminale Domäne von WRKY11 kann jedoch noch eine zweite Bande mit der Sonde 2xW2sp1 bilden, wenn auch schwach. Mit diesem C-terminalen Konstrukt ist demnach die Bindung von zwei Proteinen möglich, wohingegen von den 5- bzw. 3-mal größeren Vollängenproteinen nur noch an eines der beiden W-Box-Motive gebunden werden kann. So kann ein größenspezifischer Effekt als Ursache vermutet werden.

Bemerkenswert ist das Auftreten der hochmolekularen Bande in der Bindereaktion von WRKY43 mit 2xW2sp4, die mit dem Element 2xW2sp8 zwar auch schon vorhanden ist, aber nur sehr undeutlich. Durch die verringerten Abstände ist dieser Komplex erst möglich, entweder tritt eine stabilisierende Wirkung ein oder es handelt sich um eine unspezifische Wechselwirkung mit unbekanntenen Komponenten aus dem *E. coli*-Extrakt. Abbildung 14C stellt ein Konkurrenzexperiment dar, in dem die Bindung an die radioaktiv markierten Deletionskonstrukte mit dem unveränderten 2xW2sp24 oder dem mutierten 2xW2m kompetitiert wurden. Nur mit den intakten W-Boxen in 2xW2sp24 kann um die Bindung an die markierten Deletionskonstrukte konkurriert werden. Die Deletionen zwischen den zwei W-Boxen der Konstrukte haben demnach keinen Einfluss auf die Bindung von WRKY-Proteinen. Es werden durch die Deletionen zwischen den beiden W-Boxen keine neuen Bindesequenzen geschaffen und auch keine vorhandenen zerstört. Insgesamt ist der Effekt der variierten Abstände zwischen den W-Boxen auf die Bindung eines WRKY-Proteines nur gering. Die *in vivo* beobachteten synergistischen Effekte resultieren daher vermutlich aus Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen.

3.1.9.2 Untersuchung der Häufigkeit des Auftretens der kombinierten W-Boxen im *A. thaliana*-Genom mit dem Motif Mapper Programm

Zusätzlich zur Untersuchung der Bindung von ausgewählten WRKY-Proteinen an zwei W-Boxen, kann auch hier wieder die Häufigkeit der Elementkombinationen mit den verschiedenen Abständen im *Arabidopsis*-Genom analysiert werden. Bei dieser Analyse wurden nicht nur die in den Bindeversuchen eingesetzten W-Box-Kombinationen {TTGACC-(N24, N12, N8, N4, N1)-TTGACC} gezählt, sondern zusätzlich TTGACT-Boxen einbezogen. Weiterhin wurde berücksichtigt, dass W-Boxen auch in Gegensinn-Richtung funktionell sein können, und deshalb wurden auch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Sinn/Gegensinn-Boxen bei der Analyse mit dem Motif Mapper Programm eingeschlossen. Damit ergaben sich insgesamt 16 verschiedene Elementkombinationen, deren Häufigkeiten untersucht wurden. Die Anzahl kombinierter W-Boxen in den Promotor-Datensätzen wird aus den über 87000 einzelnen W-Boxen im Gesamtgenom bestimmt.

Erwartungsgemäß ist die Anzahl gefundener W-Boxen höher, je größer der durchsuchte Datensatz ist. In dem Genom- und 1500 bp-Promotordatensatz ist die Häufigkeit der kombinierten W-Boxen scheinbar unabhängig von dem Abstand der W-Boxen, alle Kombinationen kommen mit geringen Variationen etwa gleich häufig vor. Im 600 bp-Promotor gibt es hingegen eine größere Anzahl an kombinierten W-Boxen mit dem Abstand von einer Base, bzw. eine Tendenz, dass mit kürzerem Abstand die absolute Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten Kombination zunimmt. Um zu untersuchen, ob

dies ein genereller Trend ist oder nur zufällig bei den ausgewählten Abständen auftritt, wurde eine weitere Motif Mapper Analyse durchgeführt, in der die Häufigkeiten von kombinierten W-Boxen mit den Abständen von 0 bis 30 untersucht wurden. In Abbildung 15 sind die Summen der relativen Häufigkeiten, sortiert nach einzelnen Abständen (Abb. 15A) oder den 16 verschiedenen W-Box-Kombinationen (Abb. 15B) gezeigt. Die Einzelsummen und die absoluten Häufigkeiten sind dem Anhang beigefügt (Abb. A6, A7 und A8).

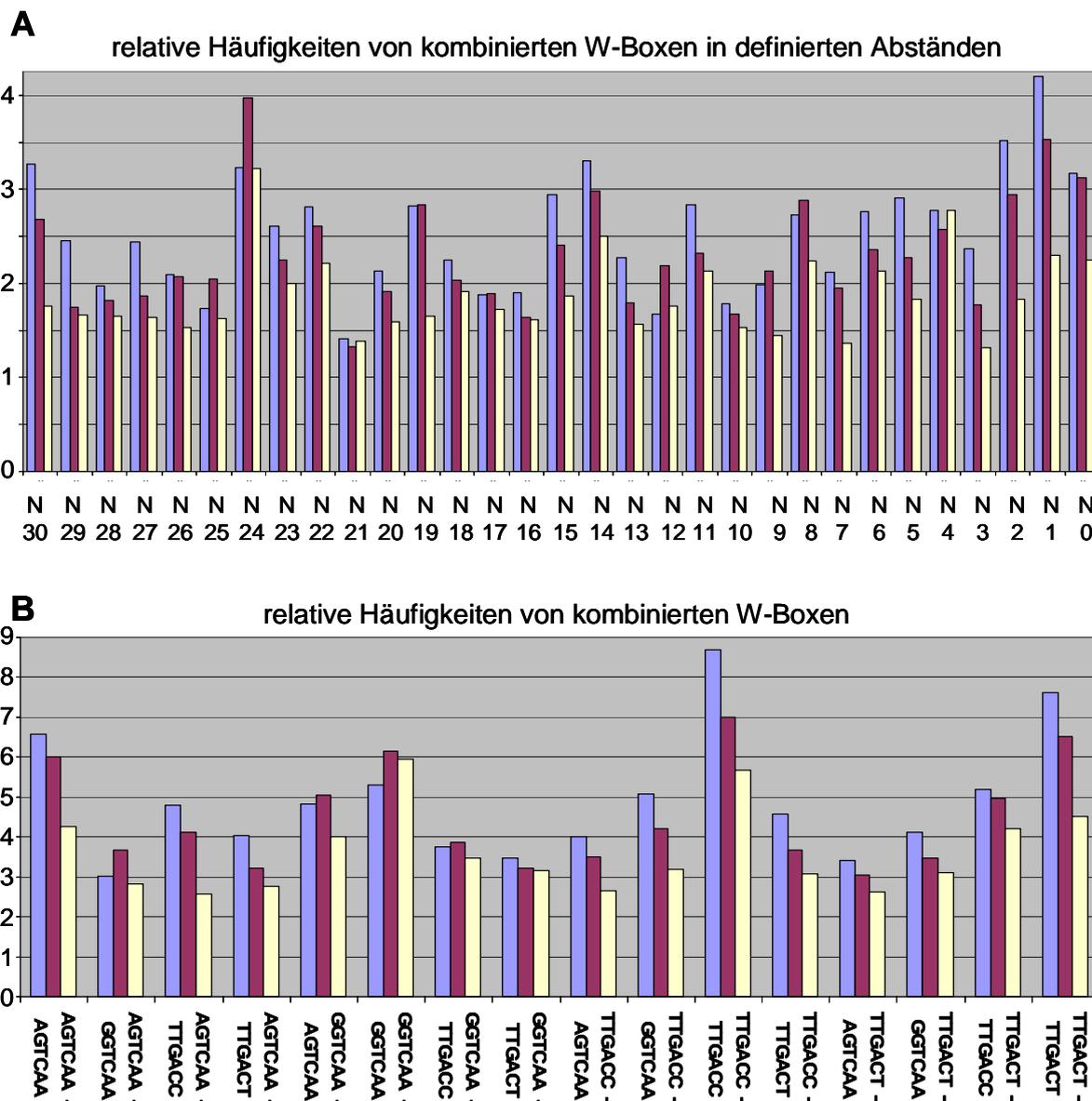


Abbildung 15: Häufigkeiten von kombinierten W-Boxen in definierten Abständen im Arabidopsis Genom und in Promotoren

A Summierte relative Häufigkeiten der 16 verschiedenen W-Box-Kombinationen, sortiert nach bestimmten Abständen, N = Anzahl der Basen zwischen zwei W-Boxen. **B** Summierte relative Häufigkeiten der verschiedenen Abstände, sortiert nach den 16 möglichen W-Box-Kombinationen.

Die relative Häufigkeit zur Darstellung der Über-/Unterrepräsentierung berechnet sich aus dem Quotienten aus beobachtetem Auftreten und erwartetem Auftreten. hellgrau: 600 bp-Promotor, dunkelgrau: 1500 bp-Promotor, hell: Gesamtgenom.

Das Verhältnis der für die einzelnen Abstände gefundenen absoluten Häufigkeiten der einzelnen Datensätze entspricht prozentual der Größe des Datensatzes, wobei der 600 bp-Promotor 13% und der 1500 bp Promotor 33% des Genoms entspricht. Die Anzahl kombinierte auftretender W-Boxen liegt meist über der statistischen Erwartung, so dass man von einer Überrepräsentierung ausgehen kann. Da jedoch auch im Genom-Datensatz eine überdurchschnittlich hohe Zahl an kombinierten W-Boxen auftritt, ist die Anreicherung der Sequenzen in den Promotor-Datensätzen nur gering (Abb. A5 und A6).

Jedoch scheinen vor allem W-Boxen mit geringen Abständen (N0-N3) besonders überrepräsentiert und in den Promotoren angereichert zu sein. Die untersuchte Kombination im Abstand von 24 Basen ist zwar sehr häufig, aber nicht oder kaum angereichert, da auch im Genom-Datensatz eine sehr hohe Anzahl gefunden wurde. Weiterhin sind Abstände wie beispielsweise 19 und 30 Nukleotide überrepräsentiert. Die relativen Häufigkeiten sortiert nach Abständen (Abb. 15A) unterliegen deutlichen Schwankungen. Bei der Betrachtung entstand der Eindruck, dass die Häufigkeiten periodisch auf- und abschwanken. Wenn man die Abstände der Maxima bestimmt, fällt auf, dass sie etwa alle 5 bis 6 Basen auftreten. Das würde etwa einer halben Umdrehung der DNA-Helix entsprechend und legt die Vermutung nahe, dass WRKY-Proteine möglicherweise auf gegenüberliegenden Seiten der Helix binden und so benachbarte Bindestellen bessere Zugänglichkeit für Interaktionspartner, wie beispielsweise andere Transkriptionsfaktoren, ermöglichen.

Bei den W-Box-Kombinationen zeigen interessanterweise Kombinationen aus jeweils gleichen W-Boxen (CC- oder CT-Suffix bzw. Sinn oder Gegensinn) die größten relativen Häufigkeiten. Bis auf GGTC AA-GGTC AA sind diese Kombinationen zusätzlich deutlich in Promotoren gegenüber dem Genom angereichert. Erwähnenswert sind weiterhin die Kombinationen TTGACC-GGTC AA und AGTC AA-TTGACC, die im Vergleich zum Chromosomen-Datensatz in Promotoren gehäuft auftreten. Die restlichen Kombinationen sind in den Promotor-Datensätzen nur leicht angereichert, was sich aufgrund der schon beschriebenen lokalen Anreicherung von W-Boxen in Promotoren ergibt.

Bestimmte W-Box-Kombinationen sind also angereichert und daher mit großer Wahrscheinlichkeit funktionell. Dies betrifft auch W-Boxen mit den Abständen 0 bis 3, 9, 14, 19 und 30 Basen. Die Mehrheit der untersuchten Kombinationen ist jedoch in Promotoren und im Gesamtgenom gleichverteilt und eine Funktionalität ist eher unwahrscheinlich. Dies schließt aber nicht aus, dass einzelne solcher Motive dennoch eine Funktion haben können.

3.1.10 *In vivo* Interaktion der WRKY-Proteine mit 1xW2-Konstrukten

Um Einblicke in die transkriptionelle Regulation eines Gens zu erhalten, ist es nicht ausreichend, die *in vitro* Bindung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren an das zugehörige *cis*-Element zu analysieren. Vielmehr ist es wichtig, ob die Bindung an das Element auch *in vivo* stattfinden kann und damit möglicherweise eine positive oder negative Regulation bewirkt. Um dies zu untersuchen, bietet sich die Fusion des *cis*-regulatorischen Elementes des Promotors oder auch von längeren Promotorbereichen mit

einem Reporter gen und langfristig die Transformation von Pflanzen mit solchen Konstrukten an. So können wichtige Informationen über das zu untersuchende *cis*-Element gewonnen werden, ohne dessen Funktion zu stören. Die Verwendung artifizieller Promotoren zeigte, dass bereits einzelne *cis*-Elemente in der Lage sind, die Expression eines Reporter gens (*GUS*) spezifisch und lokal begrenzt zu kontrollieren (Rushton *et al.*, 2002). Auch das in dieser Arbeit verwendete W2-Element wurde von Rushton *et al.* getestet und war als einzelnes Element in der Pflanze funktionell.

In diesem Kapitel soll versucht werden, die Bindungsfähigkeit von WRKY-Proteinen in EMSA-Experimenten mit der Aktivierung von Genexpression in Partikelbeschuss-Versuchen durch die gleichen WRKY-Faktoren zu vergleichen. Deshalb wurde das einzelne Element (1xW2) genauso wie das vierfache Element (4xW2) in Partikelbeschuss-Experimenten eingesetzt. Des Weiteren wurden die schon in Kapitel 2.1.2 aufgeführten Konstrukte 1xW2m11, 1xW2m13 und die in Kapitel 2.1.6 getestete invertierte W-Box Sequenz 1xW2(i+4) verwendet. Die Ergebnisse der Partikelbeschuss-Experimente sind in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt. Es wurde vor allem zwischen starker signifikanter Aktivierung (+++), schwacher aber signifikanter Aktivierung (+) und keiner Aktivierung (-) unterschieden.

		Effektorkonstrukte						
		ohne Effektor	GFP	WRKY 6	WRKY 11	WRKY 26	WRKY 38	WRKY 43
Reporterkonstrukte	1xW2	-	-	+	+	+	+	+
	4xW2	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
	4xW2mut	-	-	+	-	-	-	-
	1xW2m11	-	-	+++	+++	-	+(+)	+
	1xW2m13	-	-	++	-	-	+	-
	1xW2(i+4)	-	-	++	-	+	-	-
	1xW2(i+4)i	-	-	+	-	-	-	-

Tabelle 6: Partikelbeschuss mit artifiziellen Promotor-Reporter genkonstrukten und verschiedenen Effektoren in *A. thaliana*

Dargestellt ist die Abschätzung der *GUS*-Aktivität in *Arabidopsis*-Blättern einen Tag nach der Vakuuminfiltration und zwei Tage nach dem Partikelbeschuss. Abschätzung und Beispiele der *GUS*-Reporter gen-Aktivierung: keine  (-), schwach, aber signifikant  (+) oder eine starke signifikante  (+++) *GUS*-Aktivität gegenüber der Hintergrundaktivität. Die Anzahl blau gefärbter Zellen pro Platte und pro Behandlung wurde unter der Stereolupe abgeschätzt. Zur Kontrolle der unspezifischen Reporter gen-Aktivität wurden die Goldpartikel entweder ohne Effektor oder mit 35S::GFP als Effektor beschichtet.

Die einzelne W-Box als *cis*-Element in 1xW2 ist zwar in der Lage, eine Reporter gen-Aktivität in geringem Maße zu vermitteln, im Vergleich dazu können die WRKY-Faktoren jedoch eine deutlich stärkere *GUS*-Aktivität auslösen, wenn das Reporter konstrukt die Kombination aus vier gleichen Elementen enthält. Insgesamt ist die Hintergrund-Aktivität leicht erhöht, wenn man das 4xW2-Konstrukt mit dem 1xW2 Konstrukt vergleicht. Diese

Aktivierung ist W-Box-abhängig, da mit mutierten W-Boxen (4xW2mut) keine *GUS*-Expression induziert werden konnte. Die Aktivierung des Reportergens über 1xW2 oder 4xW2 ist für alle getesteten WRKY-Proteine jeweils gleich stark, und interessanterweise induzieren alle WRKY-Faktoren eine Aktivierung der Genexpression, obwohl z.B. WRKY11 über den *SIRK*-Promotor keine *GUS*-Aktivität auslösen konnte.

Für 1xW2m11 kann man die Bindung der verschiedenen WRKY-Proteine aus Kapitel 2.1.2 gut mit der Aktivierung von *GUS* korrelieren. WRKY6 und WRKY11 binden gut an diese Sequenz und führen auch zu einer starken *GUS*-Expression, wohingegen WRKY26, 38 und 43 nur schwach binden und dementsprechend keine oder nur eine leichte Reportergen-Aktivität induzieren. Mit den restlichen Konstrukten (1xW2m13/i+4/(i+4)i) kann eigentlich nur WRKY6 eine deutliche Aktivierung von *GUS*-Aktivität auslösen. Des Weiteren können nur WRKY38 und WRKY26 eine leichte Aktivität mit 1xW2m13 bzw. 1xW2(i+4) induzieren. Dies steht in keinem direkten Zusammenhang zur *in vitro* Bindung an W-Box-enhaltende Elemente und führt zu der Annahme, dass die WRKY-Faktoren durch verschiedene Regulationsdomänen unterschiedlich gut aktivieren bzw. reprimieren können. Eventuell ist die Genaktivierung auch kontextabhängig, d.h. es sind weitere (gebundene) Faktoren notwendig, die entweder die Bindung oder die Genexpression beeinflussen. Diese Interaktionspartner sind in den *E. coli*-Extrakten, die für die EMSA-Experimente eingesetzt wurden, nicht vorhanden.

3.1.11 Der Einfluss von konservierten Aminosäuren in WRKY11-CTD auf die Bindung an W-Boxen

Bei der Bindung von WRKY-Transkriptionsfaktoren an die W-Box ist nicht nur die bisher untersuchte Basenabfolge des W-Box-Elementes wichtig, sondern auch die Anordnung der konservierten Aminosäuren in der WRKY-Domäne. Frühere Arbeiten von de Pater *et al.* (1994) und Hara *et al.* (2000) zeigten bereits durch Deletionen, dass die putative Zinkfinger-Struktur essentiell für die Bindung ist. Maeo *et al.* (2001) konnten mittels Aminosäure-Austauschen zeigen, dass die konservierten Cysteine und Histidine des Zinkfingers und vier von sieben konservierten Aminosäuren der WRKYGQK-Sequenz in den untersuchten WRKY-Proteinen in Tabak wichtig für die Bindung sind.

Die zuletzt genannten Ergebnisse bestätigten das Bindeverhalten von mutierten WRKY11-CTD Konstrukten, in denen in einer ersten Testreihe im Zinkfinger und der WRKY-Sequenz Aminosäure-Austausche vorgenommen wurden. In einem EMSA-Experiment wurde die Bindung dieser mutierten Versionen an verschiedene W-Box-enhaltende Oligonukleotide getestet (Abb. 16B).

Das Vorhandensein des WRKY11-CTD-Protein im groben Zellaufschluss konnte mittels Protein-Blot-Experiment mit einem spezifischen Anti-6xHis-Antikörper gezeigt werden (Abb. 16A). Das erhaltene Signal entspricht der errechneten Größe für ein Fusionsprotein aus WRKY11-CTD und 6xHis und ist für fast alle Konstrukte etwa gleich stark. Da die Proteinmenge für die Mutation WRKY11-CTDm1 deutlich geringer war als für die anderen Extrakte, wurde dieses Konstrukt nicht in den Bindeversuchen eingesetzt. Außerdem führte bereits die Änderung von zwei Aminosäuren in WRKY11-CTDm2 zum Verlust der

Bindfähigkeit (Abb. 16B), so dass der Nachweis des Bindungsverlustes bei vollständiger Mutation der WRKY-Sequenz nicht mehr notwendig war.

Es zeigte sich auch hier, dass eine Veränderung der Zinkfinger-Struktur und der WRKY-Sequenz die Bindung negativ beeinflussten (Abb. 16B). Die Erkenntnisse mit WRKY-Faktoren aus Tabak konnten somit auf *Arabidopsis*-WRKY-Proteine übertragen werden.

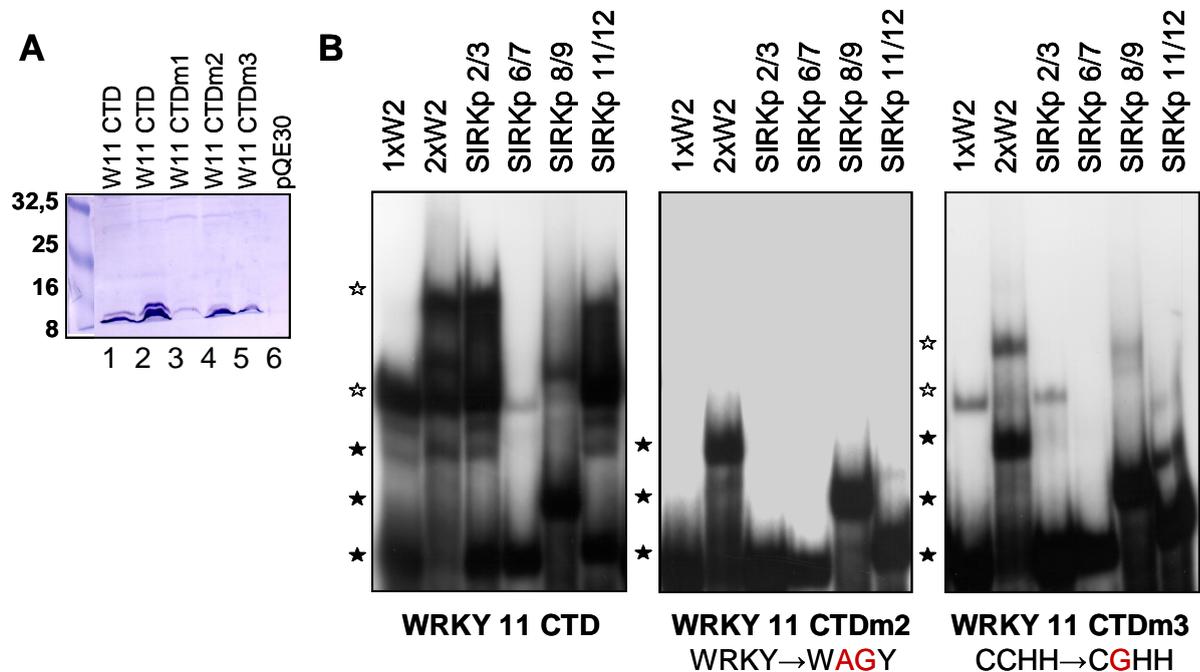


Abbildung 16: Die konservierte WRKY-Sequenz und die Zinkfinger-Struktur sind essentiell für die Bindung an W-Boxen

A Nachweis von rekombinantem 6xHis-WRKY11-CTD-Fusionsprotein in einem groben, nativ aufgeschlossenen Zellextrakt mittels Western-Analyse mit primärem Anti-6xHis-Antikörper und sekundärem alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-Maus Antikörper. Spur 1 und 2 enthalten das unveränderte WRKY11-CTD-Protein, Spur 3 bis Spur 5 die angezeigten mutierten Versionen und Spur 6 einen denaturiert aufgeschlossenen Proteinextrakt von *E.coli*-Zellen, die mit dem Leervektor transformiert wurden. **B** EMSA mit rekombinantem 6xHis-WRKY11-CTD und verschiedenen synthetischen Oligonukleotiden, deren Sequenzen in Abb. 2A und 5A aufgelistet sind. Die eingesetzte Sonde ist über jeder Spur angegeben. Die entsprechenden Proteine sind unterhalb der Autoradiogramme angezeigt, für die mutierten Konstrukte wurde die Änderung in rot hervorgehoben. WRKY11-CTDm2: Ändern von zwei Aminosäuren in der WRKY-Sequenz, WRKY11-CTDm3: Ändern der zweiten konservierten Aminosäure des Zinkfingers von C nach G. Offene Sterne markieren die spezifischen WRKY-W-Box-Komplexe, geschlossene Sterne kennzeichnen die freie Sonde.

Im Gegensatz zu Maeo *et al.* (2001) blieb bei der Änderung des zweiten Cysteins im Zinkfinger noch eine geringe Bindungsfähigkeit erhalten, die sich möglicherweise daraus ergibt, dass Maeo *et al.* die Cysteine jeweils zu Alanin änderten, wohingegen hier Cystein durch Glycin ersetzt wurde.

Da das Bindeverhalten der mutierten WKRY11-CTD-Versionen an alle Oligonukleotide gleich ist, scheint der Verlust der Bindungsfähigkeit W-Box-spezifisch zu sein, d.h. es wurden keine anderen DNA-Sequenzen durch beispielsweise veränderte

Bindungsspezifitäten aufgrund der eingeführten Mutationen gebunden, zumindest im Rahmen der Variabilität der eingesetzten DNA-Sequenzen.

Es ist nicht sehr überraschend, dass ähnliche Mutationen in WRKY-Proteinen sowohl aus Tabak als auch aus *Arabidopsis* den selben Effekt haben. Dies unterstreicht die ähnliche Funktionalität der konservierten WRKY-Domäne und damit der DNA-Bindungssequenz in verschiedenen Organismen.

Abgesehen von der WRKY-Sequenz und dem Zinkfinger gibt es noch weitere konservierte Aminosäuren in der WRKY-Domäne, die an der Bindung zu W-Boxen beteiligt sein können. Abbildung A9 im Anhang zeigt in einem Alignment den Sequenzvergleich aller WRKY-Domänen, einschließlich der N-terminalen WRKY-Domänen von Gruppe I-WRKY-Faktoren. Es fallen vor allem zwei konservierte Bereiche auf, zum einen die namensgebende WRKYGQK-Sequenz und zum anderen die 7 Aminosäuren entfernte Sequenz PRXYR/KC. Außerdem sind die vier Aminosäuren des Zinkfingers und weitere fünf Aminosäuren hoch konserviert. Es fällt auch auf, dass die Konserviertheit innerhalb von Subgruppen deutlich höher ist, als die Gesamtkonservierung. Deshalb ist es für die Auswahl von konservierten Aminosäuren in WRKY11 nicht ausreichend, die Subgruppe IId untereinander zu vergleichen (Abb. 17), um mit weiteren Mutationen deren Einfluss auf die DNA-Bindung zu testen. Am Beispiel dieser Untergruppe ist zu sehen, dass hier nur wenige Positionen variabel sind. Es ist aber anzunehmen, dass die Aminosäuren zur spezifischen W-Box-Bindung in allen Proteinen der WRKY-Familie konserviert sind.

```

WRKY11  IADIPPEEYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIIVTYEGEHRH
WRKY7   MADIPSEDFSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSSVRGCPARKHVERALDDAMMLIVTYEGDHNH
WRKY15  MSDVPPDDYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSSVRGCPARKHVERAADDSSMLIVTYEGDHNH
WRKY39  IADIPPEEYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSSVRGCPARKHVERCIDETSMLIVTYEGEHRH
WRKY74  IADIPPEEYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSSVRGCPARKHVERCVEETSMLIVTYEGEHRH
WRKY21  VADIPPDDYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSSMRGCPARKHVERCLEDPAMLIIVTYEAEHRH
WRKY17  IADIPPEEYSWRKYGQKPIKGSPPHPRGYKCSTFRGCPARKHVERALDDSTMLIVTYEGEHRH

```

Abbildung 17: Die WRKY-Domäne ist in Subgruppen sehr hoch konserviert

Sequenzvergleich der WRKY-Domäne der Mitglieder von Subgruppe IId. Konservierte Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Orange markiert sind Positionen, an denen eine Aminosäure (ca. 80% Konservierung), blau an denen zwei Aminosäuren (ca. 70% Konservierung) von den restlichen Sequenzen abweichen.

Aus diesem Grund ist es wichtig, die Gesamtheit aller WRKY-Domänen zu betrachten. Aus dem Alignment (Abb. A9) ist bereits zu entnehmen, dass die N-terminale WRKY-Domäne von Gruppe I-WRKY-Proteinen eine eigene Untergruppe bildet. Deutlicher treten die Subgruppen hervor, wenn man mit dem Programm ClustalW einen phylogenetischen Baum aus diesen Sequenzen berechnen lässt (Abb. A10). Interessanterweise scheint die Verwandtschaft der N-terminalen Domäne zur C-terminalen Domäne von Gruppe I weniger nah als zu beispielsweise Gruppe III zu sein.

Bei einem detaillierteren phylogenetischen Vergleich der beiden WRKY-Domänen von Gruppe I fällt auf, dass die einzelnen Proteine der beiden Domänen unterschiedlich gruppieren, die phylogenetische Verwandtschaft ist demzufolge in der N-terminalen Domäne eine andere als in der C-terminalen Domäne (Abb. A11). Demnach scheint sich die Funktion der N-terminalen WRKY-Domäne anders als die der C-terminalen Domäne

entwickelt zu haben. Da für die N-terminale WRKY-Domäne passend zu diesem Befund keine oder nur eine schwache W-Box-Bindung gezeigt wurde, muss man sich fragen, welche Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz diesen Verlust der Bindung zur Folge haben. Betrachtet man die Summen der einzelnen Aminosäuren jeweils in der N- und C-terminalen WRKY-Domäne, kann kein großer Unterschied festgestellt werden. Lediglich Lysin (K) ist in der N-terminalen Domäne deutlich häufiger genutzt als in der C-terminalen Domäne, hier wiederum treten Arginin (R) und Threonin (T) etwas häufiger auf als in der N-terminalen Domäne (Abb. A12).

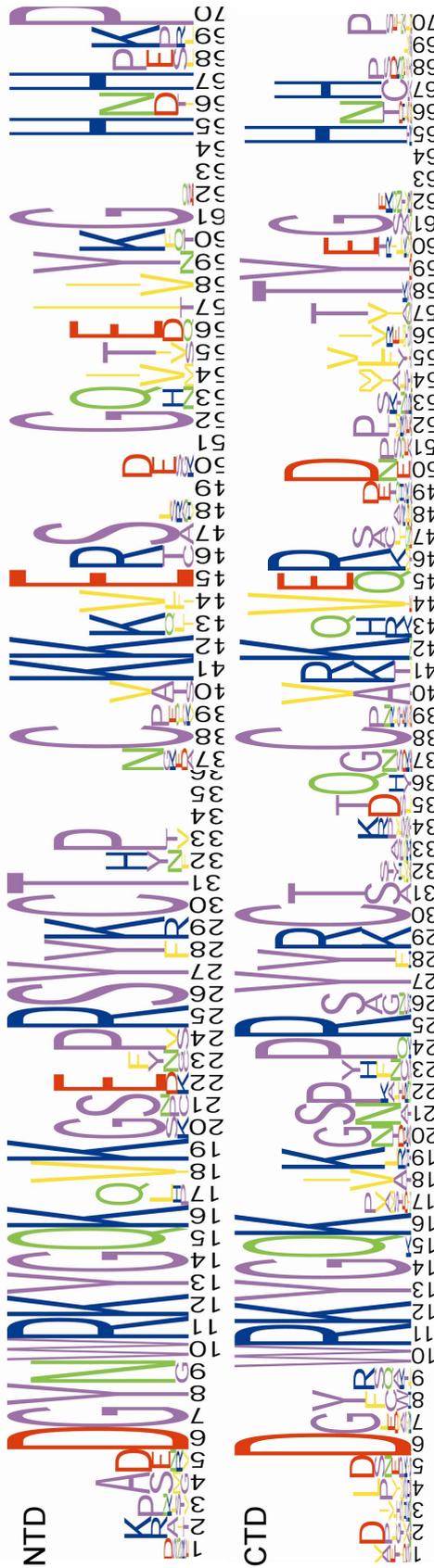
Wenn man jedoch die Häufigkeit des Auftretens von Aminosäuren an bestimmten Positionen in N- und C-terminaler Domäne vergleicht, fällt auf, dass es einige wenige Positionen gibt, an denen die beiden Domänen deutliche Unterschiede aufweisen. Mit dem SequenceLogo-Programm wurde auf der Basis des Sequenzvergleichs (Abb. A9) ein sogenanntes Sequenz-Logo erstellt (Abb. 18A). Es ist eine grafische Darstellung der Häufigkeit des Auftretens von Aminosäuren an jeder Position, bei der ein Quotient aus der Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren und Anzahl verschiedener Aminosäuren an der jeweiligen Position gebildet wird. Dadurch treten Unterschiede stärker hervor. Eine ähnliche Grafik, bei der im Gegensatz zu dem Sequenz-Logo jedoch die absoluten Häufigkeiten des Auftretens an bestimmten Positionen aufgetragen werden, ist in Abbildung 18B gezeigt. Das Sequenz-Logo ist hilfreich, um die deutlichen Unterschiede zwischen N- und C-terminaler WRKY-Domäne zu finden. Wenn man jedoch wissen will, ob und welche Aminosäuren an bestimmten Positionen auftreten, ist die Darstellung der absoluten Häufigkeit als Grafik von Vorteil. Die absoluten Werte erlauben zusätzlich den Vergleich einzelner (konservierter) Positionen, da die Häufigkeit gleich skaliert ist.

Abbildung 18: Vergleich der positionsbezogenen Aminosäure-Häufigkeiten der N- und C-terminalen WRKY-Domäne

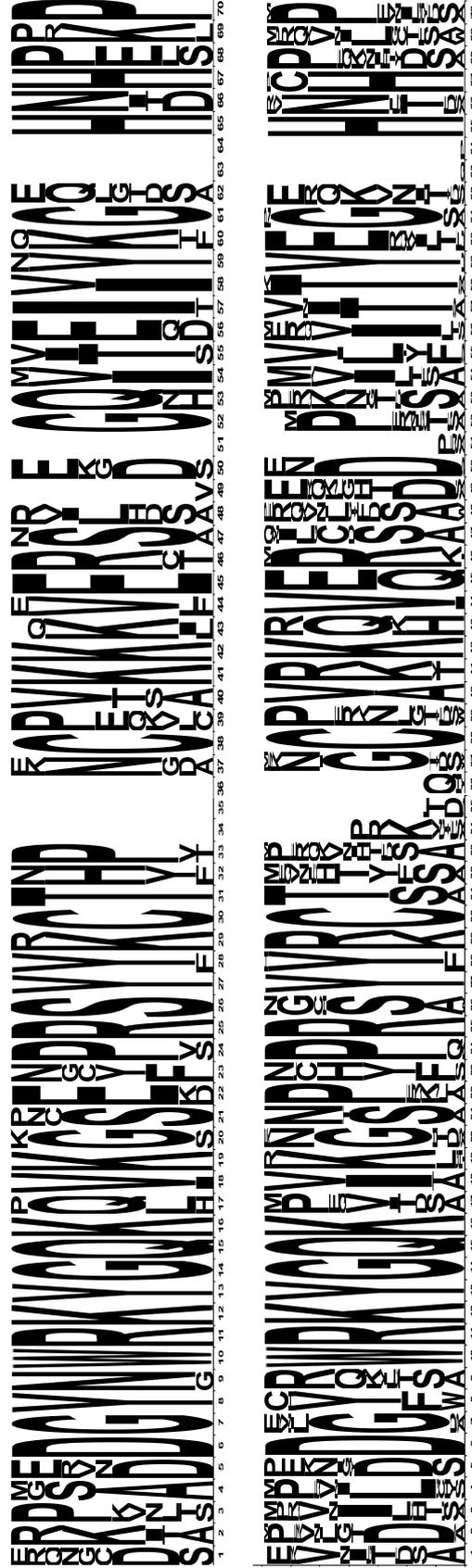
A Auf der Basis des Sequenzvergleiches aus Abbildung A9 wurde jeweils für die N- und die C-terminalen Sequenzen mit dem SequenceLogo-Programm eine Grafik erstellt, die die relativen Häufigkeiten des Auftretens von Aminosäuren an bestimmten Positionen verdeutlicht. Farbcode: Gelb: I, V, L, M, F (unpolar, aliphatisch), Violett: G, C, P, A, T, S, Y (polar, ungeladen), Blau: R, K, H (positiv geladen, basisch), Rot: D, E (negativ geladen, sauer), Grün: Q, N (polar, ungeladen). **B** Die vergleichende Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Aminosäuren an jeder Position der N- und C-terminalen WRKY-Domäne. Graue Kästchen kennzeichnen Positionen, an denen in der NTD gleiche Aminosäuren wie in der CTD auftreten, aber mit anderen Häufigkeiten. Schwarze Kästchen markieren Positionen, an denen in der NTD andere Aminosäuren auftauchen als in der CTD.

Abb. 18: Vergleich der Positionsbezogenen Aminosäurehäufigkeiten der N- und C-terminalen WRKY-Domäne

A Sequence Logo



B Absolute Aminosäurehäufigkeiten



Mit diesem Vergleich sollten in einem weiteren Schritt Mutationen in WRKY11-CTD eingeführt werden, die zu Aminosäuren führen, die wiederum charakteristisch für N-terminale WRKY-Domänen sind. Sehr auffällig ist beispielsweise das Auftreten der Aminosäuren Valin (V) und Isoleucin (I) an Position 58 der N-terminalen WRKY-Domäne, wohingegen bei C-terminalen Domänen Lysin (K), Threonin (T), Serin (S) und Alanin (A) auftreten. Es gibt hier sogar eine Verschiebung in den Eigenschaften der Aminosäuren. Während die erstgenannten unpolar sind, handelt es sich bei letzteren um polare oder geladene Aminosäuren. So kann man durch diese vergleichende Darstellung die markanten Unterschiede zwischen N- und C-terminalen Domänen übersichtlich darstellen. Weitere auffällige Positionen sind in Abbildung 18 durch graue und schwarze Kästchen hervorgehoben.

Auf der Basis dieser vergleichenden Analyse und der Bestimmung von konservierten Aminosäuren mit dem Sequenzvergleich wurden Positionen bestimmt, um weitere Mutationen in WRKY11-CTD einzufügen und zu klonieren. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Sequenzen und deren Bezeichnung.

Name	Aminosäure-Sequenz
CTD	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
*m1	DI PPDEYS IAGLGQK PIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
*m2	DI PPDEYSW AGYGQK PIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
*m3	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRG G PARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m4	DI PPDEYSW GKYGQK PIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m5	DI PPDEYSW KRYGQK PIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m6	DI PPDEYSWRK FGQK PIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m7	E I PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m8	DI PPDEYSWRKYGQKPI R GS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m9	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPR H YKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m10	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPR F YKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m11	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPAR R HVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m12	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKH L ERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m13	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVE K ALDDPAMLIVTYEGEHRH
m14	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALD E PAMLIVTYEGEHRH
m15	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIV P YEGEHRH
m16	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVT I EGEHRH
m17	DI PP D GSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m19	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPR S YKSTFRGCPARKHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH
m20	DI PPDEYSWRKYGQKPIKGS PHPRGYKSTFRGCPA K KHVERALDDPAMLIVTYEGEHRH

Tabelle 7: Bezeichnung und Sequenz der klonierten WRKY11-CTD-Mutationskonstrukte

Der Name der Sequenz ist in der linken Spalte aufgeführt und die zugehörige Sequenz in der rechten. Die jeweilige Aminosäure-Änderung ist rot hervorgehoben. Die mit * markierten Sequenzen sind in den pQE30-Vektor kloniert, wohingegen die restlichen Sequenzen in den zum Gateway-System kompatiblen Vektor pASKgwy kloniert wurden. Die unveränderte WRKY11-CTD-Sequenz wurde sowohl in pQE30 als auch in pASKgwy kloniert. Die Mutationen wurden mittels Megaprimer-Methode erzeugt (Ke & Madison, 1997). Fett hervorgehoben sind die WRKYGQK-Sequenz und die Cysteine und Histidine des Zinkfingers.

Es wurden nicht nur neue Positionen für Aminosäure-Austausche bestimmt, sondern auch Mutationen in der WRKY-Sequenz eingeführt, die den Effekt von konservierten Austauschen auf die Bindungsfähigkeit zeigen sollen, wie beispielsweise der Austausch der aromatischen Aminosäure Tyrosin (Y) gegen eine weitere aromatische Aminosäure Phenylalanin (F) in dem Konstrukt m6. Die Bindung aller WRKY11-CTD-Mutationen an W-Box-enhaltende Oligonukleotide ist in Abbildung 19 gezeigt.

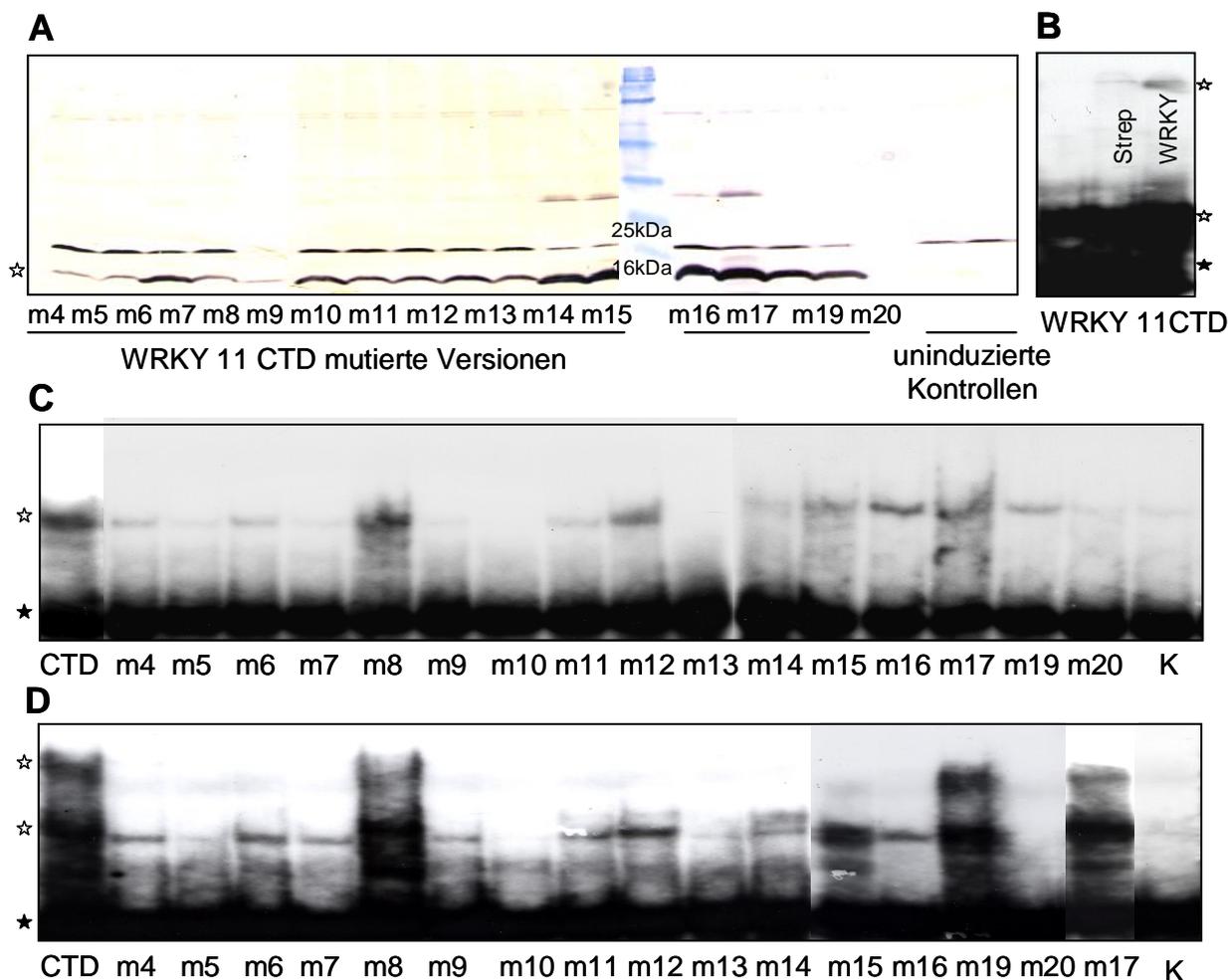


Abbildung 19: Veränderung von konservierten Aminosäuren in der WRKY-Domäne führt im allgemeinen zur Reduktion der DNA-Binddefähigkeit

A Nachweis von rekombinantem Strep-WRKY11-CTD-Fusionsprotein in einem groben, nativ aufgeschlossenen Zellextrakt mittels Protein-Blot-Experiment mit Anti-Strep-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Unterhalb jeder Spur ist das in dem jeweiligen Extrakt exprimierte Protein angegeben. Als Kontrolle für unspezifische Signale diente ein Extrakt aus uninduzierten *E. coli*-Zellen (BL21(DE3)), die mit dem WRKY11-CTD-Konstrukt transformiert wurden. **B** EMSA mit rekombinantem Strep-WRKY11-CTD-Protein und dem 1xW2 Oligonukleotid. Zur Überprüfung der spezifischen Interaktion wurde in Spur 2 Anti-Strep- und in Spur 3 Anti-WRKY-Antikörper zugegeben. **C** EMSA mit rekombinanten WRKY11-CTD-Mutationskonstrukten und dem 1xW2-Oligonukleotid. Die eingesetzten Proteine sind unterhalb der Autoradiogramme angezeigt: **D** EMSA mit rekombinanten WRKY11-CTD-Mutationskonstrukten und dem SIRK11/12-Oligonukleotid. Die eingesetzten Proteine sind unterhalb der Autoradiogramme angezeigt.

Die spezifischen WRKY-DNA-Komplexe sind mit einem offenen Stern markiert, genauso wie die spezifische WRKY-Bande im Protein-Blot. Die freie Sonde ist mit einem geschlossenen Stern gekennzeichnet.

Die Sequenzen m17, m19 und m20 stellen Konstrukte dar, in denen in der C-terminalen Domäne bestimmte Positionen zu spezifisch in der N-terminalen Domäne auftretenden Aminosäuren geändert wurden. Die in *E. coli* exprimierten Proteine sind N-terminal mit dem Strep-Epitop fusioniert und wurden mittels Gateway-Technologie kloniert. Die Expression der verschiedenen Proteine funktioniert unterschiedlich gut, es kann aber immer ein klares Signal der spezifischen WRKY11-CTD-Proteinbande in einer Western-Analyse detektiert werden (Abb. 19A). Das Auftauchen einer zusätzlichen Bande in den EMSA-Experimenten in Abbildung 19B bei Zugabe von Antikörpern bestätigt die Beteiligung von rekombinantem WRKY11-CTD-Protein an dem Protein-DNA-Komplex.

Fast alle Mutationskonstrukte zeigen im Vergleich zum unveränderten WRKY11-CTD-Konstrukt eine schwächere oder gar keine Bindung an die verwendeten Oligonukleotide. Alle Änderungen in der WRKY-Sequenz führen zu einer sehr starken Abnahme der Bindung, selbst wenn - wie beispielsweise in m6 - wieder eine aromatische Aminosäure eingeführt wurde oder in m5 nur die Positionen der beiden basischen Aminosäuren getauscht wurden. Vermutlich spielen bei der DNA-Bindung sehr spezifische Wechselwirkungen von Seitenketten eine Rolle, so dass schon kleine Änderungen zum Verlust von Bindeaktivität führen. Lediglich das Konstrukt m8 zeigt keine veränderte Bindung an die untersuchten DNA-Sequenzen. Interessant ist die Bindung der Proteine WRKY11-CTDm17 und m19. Hier ist die Interaktion mit dem *SIRK11/12*-Oligonukleotid kaum schwächer als mit dem unveränderten WRKY11-CTD. An die Sequenz von 1xW2 scheint die Interaktion hingegen abgeschwächt zu sein. Dies kann durch geänderte Spezifität zu flankierenden Basen der W-Box-Sequenz aufgrund der Mutation erklärt werden. Die Mutation in m20 hat den Verlust der Bindung sowohl an 1xW2 als auch an *SIRK11/12* zur Folge. Die drei Änderungen m17, m19 und m20 betreffen Aminosäuren, die spezifisch für die N-terminale Domäne sind. Die Auswirkung auf die Bindung ist bei den Konstrukten unterschiedlich, für eine umfassende Aussage über den Einfluss N-Terminus-spezifischer Aminosäuren müssen deshalb weitere Konstrukte getestet werden.

Der Vergleich der Bindungen von WRKY11-CTDm9 und m19, bei denen an der gleichen Position verschiedene Mutationen eingefügt wurden, zeigt unterschiedliches Bindungsverhalten dieser Proteine. Es ist also von Bedeutung, welche Aminosäure eingefügt wird. Eine ähnliche Beobachtung ist auch für Aminosäureaustausche im Pep13-Elizitor beschrieben (Hahlbrock *et al.*, 2003). Im Protein-Blot ist zwar nur eine schwache Bande für m9 zu sehen, für die Bindeversuche wurden die Proteinmengen jedoch neu eingestellt und die Proben zueinander angepasst. Unterschiedliche Proteinmengen sind als Ursache für die verschiedenen Bindestärken deshalb nicht sehr wahrscheinlich, aber auch nicht ganz auszuschließen. Bei der Betrachtung von m17 zeigt sich, dass nicht nur die eingefügte Aminosäure, sondern auch der Kontext dieser Aminosäure wichtig ist. Das hier eingefügte Glycin (G) ist auch in anderen C-terminalen Domänen vorhanden, nicht jedoch in der Subgruppe lid (HARF). Auch wenn andere WRKY-Proteine mit einem G an dieser Position funktionell sind, kann WRKY11-CTD mit dieser Aminosäure nicht mehr an die W2-Box binden. Dies könnte ein für die Subgruppe spezifischer Effekt sein und vielleicht die Bildung von Gruppen mit verschiedenem Bindeverhalten erklären.

Fast alle konservierten Aminosäuren sind wahrscheinlich entweder an der Protein-DNA-Interaktion beteiligt oder notwendig zur Ausbildung der funktionsfähigen 3D-Struktur des Proteins. Da auch die konservierten Aminosäureaustausche zum Verlust der

Bindeaktivität führten, liegt die Vermutung nahe, dass diese Aminosäuren an einer spezifischen, direkten DNA-Interaktion beteiligt sind.

3.2 Untersuchung ausgewählter Vertreter der WRKY-Familie

Über die meisten WRKY-Proteine ist nur wenig bekannt, lediglich einzelne Vertreter dieser Genfamilie, wie z.B. WRKY6 (Robatzek & Somssich, 2001, 2002), sind detaillierter untersucht. Deshalb sollten drei Vertreter der WRKY-Familie, ergänzend zu den Bindeversuchen, eingehender untersucht werden. Die Wahl fiel auf WRKY26, WRKY38 und WRKY43, da somit wieder aus allen drei Hauptgruppen der WRKY-Familie ein Vertreter vorhanden ist und für WRKY26 und WRKY43 außerdem noch nicht charakterisierte Nullmutanten vorlagen.

3.2.1 Vergleich der Proteinsequenzen mittels computergestützter Analysen

WRKY-Proteine zeigen außerhalb der WRKY-Domäne keine oder kaum Homologie (Eulgem *et al.*, 2000). Dies wird schon deutlich beim statistischen Betrachten der Aminosäuresequenz (Tabelle 8). WRKY26 und 43 sind basische Proteine, aber in der Größe sehr unterschiedlich. WRKY26 und 38 haben zwar ähnliches Molekulargewicht, aber WRKY38 ist ein eher saures Protein und hat einen höheren Anteil an negativ geladenen Aminosäuren als die beiden anderen WRKY-Faktoren. WRKY43 hat gegenüber den anderen Proteinen einen hohen Anteil an Schwefel.

	WRKY26	WRKY38	WRKY43
Anzahl Aminosäuren:	310	288	98
Molekulargewicht (Da)	35096,7	33194,1	11806,5
Theoretischer pI:	9,53	5,49	9,51
- geladene Reste (Asp, Glu):	31	47	9
+ geladene Reste (Arg, Lys):	46	37	16

Tabelle 8: Eigenschaften der WRKY-Proteine 26, 38 und 43

Anhand der Primärstruktur wurden dem Programm ProtParam die dargestellten Parameter berechnet.

Die Primärsequenzen der untersuchten WRKY-Proteine sind in Abbildung 20 aufgelistet. Sie wurden auf das Auftreten von potentiellen Transkriptionsregulationsdomänen durchsucht, hinzu kommen auch basische Regionen, die potenzielle Kernlokalisierungssignale (NLS) beinhalten. Des weiteren gibt es auffallende Sequenzabschnitte, denen aber keine putative Funktion zugeordnet werden konnte. Es soll nun untersucht werden, ob neben der Primärstruktur andere, aus der Primärstruktur ableitbare, Eigenschaften mehr Ähnlichkeiten und damit mögliche gemeinsame funktionelle Bereiche zeigen oder ob die Diversität der Proteinfamilie weiter unterstrichen wird. Untersucht wurden die Aminosäuresequenzen mit Programmen aus dem Internet (Expasy) oder mit dem Wisconsin GCG-Paket.

A1WRKY26

MGSFDRQRAVPKFKTATPSPLPLSPSPYFTMPGLTPADFLDSPLLFTSSNILPSPTTGTFPAQSLN
 YNNGLLIDKNEIKYEDTTPPLFLPSMVTQPLQLDLFKSEIMSSNKTSDDGYNWRKYGQKQVKG
SENPRSYFKCTYPNCLTKKKVETSLVKGQMIIVYKGSNHHPKPQSTKRSSSTAIAAHQNSSNGD
 GKDIGEDETEAKRWKREENVKEPRVVVQTTSDIDILDDGYRWRKYGQKVVKGPNPRSYKCTF
 TGCFVRKHVERAFQDPKSVITTYEGKHKHQIPTPRRGPVLRLLGKTET

A1WRKY38

MNSPHEKAVQAIRYGHSCAMRLKRRLNHPMADGGPLSSYDLAKSIVESFSNAISILSAKPETEDDQ
 FSDLSSRDSSPPQGSPSKKRKIDSTNSENWRDDSPDPIYYDGYLWRKYGQKSIKSNHQRSY
YRCSYNKDNHCEARKHEQKIKDNPPVYRTTYFGHHTCKTEHNLDAIFIAGQDPLDDFKSTQMIRF
 GKDQDQEKESRSNGFSLSVKHEEDIIEQAIDQYREITSNDQDCQDVIEEYLSPPSGSYPPSSSSG
SEADFNSDLLFDNPDSWDRYDQFYF

A1WRKY43

MKNPRFSFRKSDADILDDGYRWRKYGQKSVKNSLYPRSYRCTQHMCNVKKQVQRLSKETSI
 VETTYEGIHHPCEELMQTLTPLLHQLQLSKFT

Abbildung 20: Aminosäuresequenz und mögliche funktionelle Bereiche von ausgewählten WRKY-Faktoren

Aminosäuresequenz von A1WRKY26, 38 und 43. Funktionelle Domänen sind wie folgt hervorgehoben: Die WRKY-Domäne ist fett markiert. Rot: potenzielle Transkriptionsregulationsdomänen, gepunktet unterstrichen: putative NLS. In WRKY38 wurde mit dem Programm REPRO eine Region als HAT identifiziert (zwei lange unterstrichene Bereiche).

Aufgrund der Aminosäuren-Sequenz ergeben sich Eigenschaften des Proteins, wie beispielsweise Hydrophobie/Hydrophilie. Diese Parameter können mittels Hydropathie-Plot nach Kyte-Doolittle dargestellt werden (Abb. 21). Des weiteren kann man die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der sich bestimmte Aminosäuren bzw. Abschnitte eines Proteins an der Oberfläche der Tertiärstruktur befinden (Abb. 22). Dies steht in direktem Zusammenhang zur Hydropathie und ergänzt die Darstellung des Kyte-Doolittle-Plots.

Abbildung 21 (folgende Seite): Hydropathie-Plot nach Kyte-Doolittle

Für die Aminosäuresequenzen der angegebenen WRKY-Proteine wurde berechnet, wie hydrophil oder hydrophob bestimmte Bereiche im Protein sind. Die Fenstergröße zur Berechnung war 9 Aminosäuren. Die Lage der C-terminalen WRKY-Domäne ist grau unterlegt, die Position der WRKY-Sequenz ist durch ein schwarzes Rechteck, die Lage der Cysteine und Histidine des Zinkfingers durch vertikale Striche markiert.

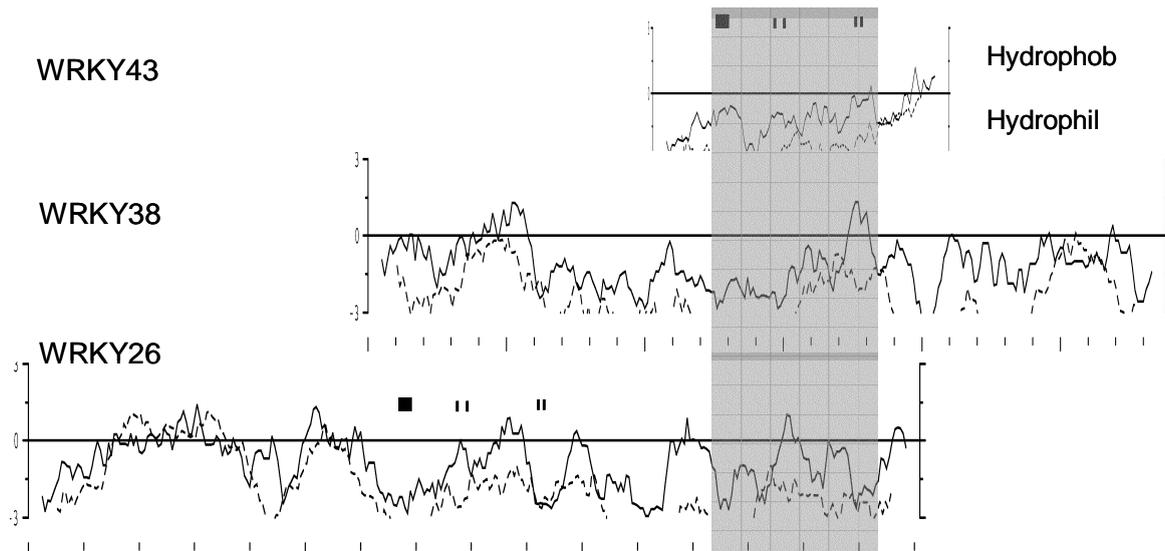


Abbildung 21: Hydropathie-Plot nach Kyte-Doolittle

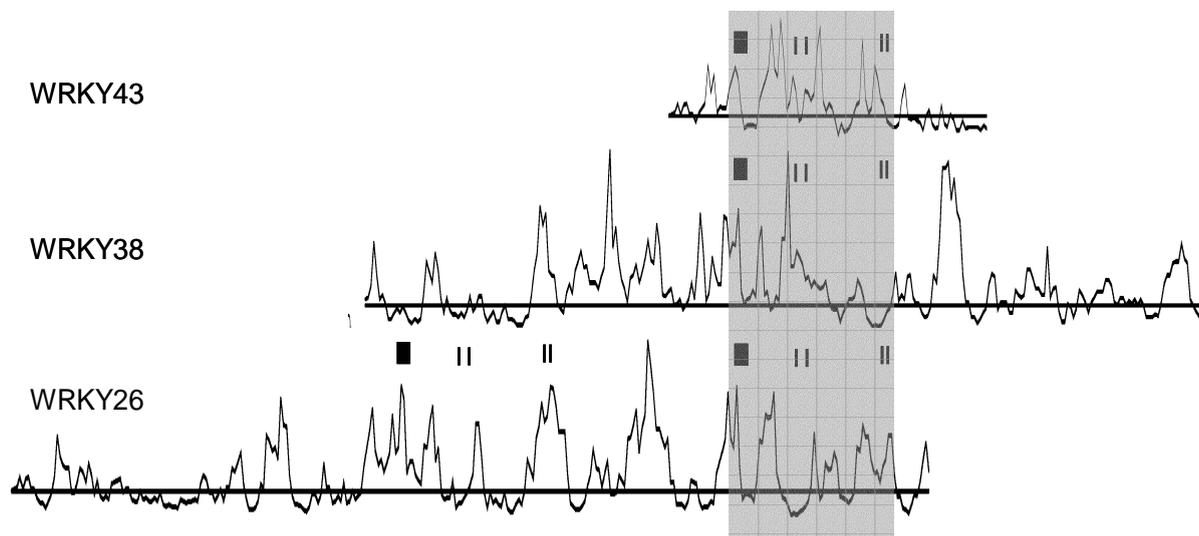


Abbildung 22: Oberflächenwahrscheinlichkeit für Proteinbereiche

Für die Aminosäuresequenzen der angegebenen WRKY-Proteine wurde berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten an der Oberfläche einer Proteinstruktur ist. Die Fenstergröße zur Berechnung war 9 Aminosäuren. Die Lage der C-terminalen WRKY-Domäne ist grau unterlegt, die Position der WRKY-Sequenz ist durch ein schwarzes Rechteck, die Lage der Cysteine und Histidine des Zinkfingers durch vertikale Striche markiert.

Dies gibt Aufschluss darüber, ob bestimmte Sequenzen zumindest theoretisch in einer wässrigen Lösung zugänglich sein können. Sowohl Hydropathie als auch Oberflächenwahrscheinlichkeit muss für jede Position im Kontext der sie umgebenden Aminosäuren berechnet werden. Für die untersuchten Parameter lassen sich keine einheitlichen Merkmale in den drei WRKY-Proteinen finden. Lediglich die WRKY-Domäne zeigt ähnliche Eigenschaften, abgesehen davon sind die untersuchten WRKY-Faktoren hydrophile Proteine, die in ihren absoluten Hydropathiewerten in bestimmten Bereichen durchaus große Unterschiede aufweisen. Es gibt nur wenige und kurze hydrophobe Bereiche.

Interessant sind die drei Gipfel im Bereich der WRKY-Domäne, wobei der hydrophobste „peak“ bei WRKY38 der mittlere und bei WRKY26 der letzte ist. Gemeinsam ist allen ein hydrophober „peak“ im Anschluss an die WRKY-Domäne. Bemerkenswert ist, dass die N-terminale WRKY-Sequenz keinen Gipfel, sondern ein Tal bildet.

Die hohe Wahrscheinlichkeit für die WRKY-Sequenz, sich an der Oberfläche zu befinden, spricht weiter für die Annahme, dass diese konservierten Aminosäuren die Bindung an die W-Box vermitteln. Es gibt nur wenige längere Sequenzabschnitte, in denen keine hohe Oberflächenwahrscheinlichkeit auftritt, da diese immer wieder in prägnanten „peaks“ auftritt. Um mehr und bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden in dieser Untersuchung WRKY6 und WRKY11 mit einbezogen (Abb. A14), die das aufgezeigte Bild bestätigen. Auffallend ist lediglich bei WRKY11, dass in der gesamten Sequenz nur für die WRKY-Domäne „peaks“ mit hoher Oberflächenwahrscheinlichkeit berechnet wurden.

Auf andere untersuchte Parameter (Abb. A15-A20) wird im Folgenden nur kurz eingegangen: WRKY-Proteine sind eher unipolar und bilden nur stellenweise polare Bereiche aus. Lediglich bei WRKY26 gibt es einen relativ langen polaren Bereich von etwa 30 Aminosäuren. Eine ähnliche Untersuchung ist die Analyse der Ladungsverteilung, hier wird zwischen positiv und negativ geladenen und unpolaren Aminosäuren unterschieden. WRKY26 hat einen ungeladenen Bereich am Beginn der Sequenz, aber keine Bereiche von gemischter Ladung, WRKY38 hat mehrere kurze Bereiche dieser gemischten Ladung, dafür aber keine ungeladenen Bereiche und WRKY43 hat im Vergleich zu seiner eher kurzen Sequenz einen kleinen ungeladenen Bereich nach der WRKY-Domäne. Phosphorylierungsstellen sind über das ganze Protein verteilt und geben kein einheitliches Muster, selbst die mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen innerhalb der konservierten WRKY-Domäne sind unterschiedlich. Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, die Proteine differenziell zu phosphorylieren und damit die Regulation zu ermöglichen. Die Zugänglichkeit von Aminosäuren für z.B. solche Phosphorylierungen kann über die Grafiken aufgrund der ungenauen Bestimmung von einzelnen Positionen nicht mit letzter Sicherheit beschrieben werden, aber es ergibt sich wiederum ein für die untersuchten Proteine unterschiedliches Muster. Gemeinsam ist jedoch allen Proteinen die Zugänglichkeit der WRKY-Sequenz, was ihrer möglichen Rolle als DNA-Bindesequenz entspricht. Bei der Bindung an DNA kann auch Sperrigkeit und Flexibilität einer Aminosäuresequenz eine Rolle spielen. Die untersuchten WRKY-Proteine weisen Blöcke mit großer Sperrigkeit auf, die von kurzen Abschnitten mit kleiner Sperrigkeit unterbrochen sind, diese haben aber nicht unbedingt höhere Flexibilität zur Folge. WRKY-Proteine sind durchschnittlich beweglich, es gibt einige Maxima und genauso einige Minima, auffällig ist lediglich ein Minimum in allen untersuchten Proteinen in der letzten Hälfte der WRKY-Domäne, d.h. dies könnte strukturell von Bedeutung sein und eine bestimmte Faltung zur Tertiärstruktur ermöglichen, die dann wiederum die Bindung an DNA vermittelt.

Von besonderem Interesse ist die Vorhersage der Sekundärstruktur, da dies funktionelle Gemeinsamkeiten der Proteine aufzeigen kann. Falls das DNA-Bindemotiv in der WRKY-Domäne konserviert ist, sollte für alle WRKY-Proteinen die gleiche Abfolge von α -Helices und β -Faltblättern bestimmt werden. Die Vorhersagen für jedes Protein sind im Anhang aufgeführt (Abb. A21), in Abbildung 23 sind die Sekundärstrukturbestimmungen für den Bereich der WRKY-Domäne zusammengefasst.

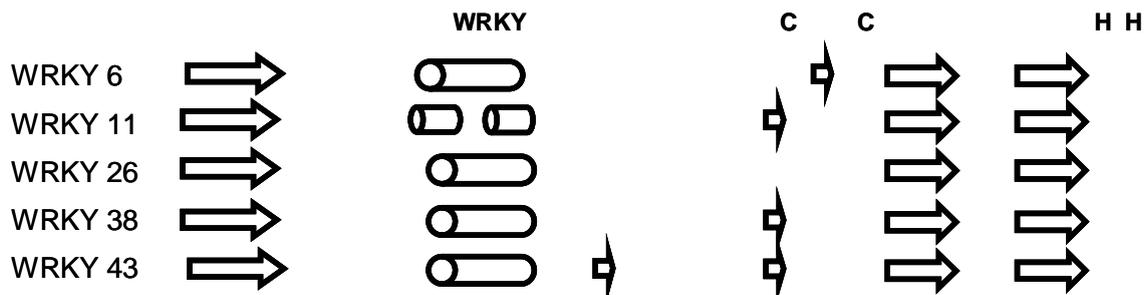


Abbildung 23. Zusammenfassende Darstellung der vorhergesagten Sekundärstrukturen

Mit Hilfe verschiedener Programme wurde für die Aminosäuresequenzen der angegebenen WRKY-Faktoren die Sekundärstruktur berechnet. Gezeigt ist die Vorhersage für den Bereich der WRKY-Domäne und für den Fall, dass mehr als die Hälfte der Programme die gleiche Vorhersage traf. Die Länge und Position der Strukturen ist annähernd Maßstabsgerecht. Pfeile: β -Faltblatt, Röhre: α -Helix

Zinkfinger-Proteine sind in ihrer Sekundärstruktur sehr variabel und es ist durchaus denkbar, dass WRKY-Domänen unterschiedlich gefaltet sind. Mit kleineren Abweichungen ist die Vorhersage jedoch für alle Proteine gleich, zumindest im Bereich der WRKY-Domäne. Das erste gezeigte β -Faltblatt liegt zwar vor der konservierten WRKY-Domäne, aufgrund des Auftretens in allen Proteinen könnte es jedoch zur funktionellen Einheit gehören.

Bemerkenswert sind noch die langen Helices, die für WRKY6 am C-terminalen Ende des Proteins und für WRKY11 direkt am Beginn der Primärsequenz vorhergesagt sind. Dies passt zur Berechnung von Transmembran-Domänen für diese Bereiche. Die Vorhersage der Tertiärstruktur auf der Basis von Kristallstrukturen schon bekannter Proteine war nicht möglich, da die Ähnlichkeit der WRKY-Proteine zu den schon bestimmten Proteinen nicht hoch genug war. Die gezeigte Sekundärstrukturvorhersage muss mit Vorsicht betrachtet werden, da die Struktur funktionell wichtiger als die Sequenz ist, die Vorhersagen aber nur auf der Sequenz und der Präferenz von Aminosäuren zum Auftreten in einer Helix oder einem Faltblatt basieren.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisation

Bei der Datenbankrecherche hinsichtlich vorhandener Proteindomänen und allgemeinen strukturellen Merkmalen, wurde gleichzeitig nach vorhandenen Kernlokalisationssequenzen (NLS, „nuclear localization signal“) gesucht (Abb. 20). Obwohl für viele *Arabidopsis*-WRKY-Proteine inzwischen gezeigt werden konnte, dass sie im Zellkern lokalisiert sind (Janna Brümmer, Bekir Ülker, persl. Mitteilung), musste dies für die ausgewählten WRKY-Proteine erst noch gezeigt werden. Die computergenerierte Vorhersage der Lokalisation ist nicht sehr signifikant und lässt eher cytoplasmatischen Aufenthalt vermuten. Für WRKY6 als Positivkontrolle konnte jedoch mit hoher Sicherheit die Kernlokalisierung vorhergesagt werden.

	WRKY6	WRKY26	WRKY38	WRKY43
Cytoplasma		0,65		0,45
mitochondriale Matrix	0,1	0,1	0,1	0,1
Lysosom (Lumen)		0,1		
Nukleus	0,76		0,3	
Peroxisomen				0,154

Tabelle 9: Wahrscheinlichkeiten des Auftretens der untersuchten WRKY-Proteine in Subzellulären Kompartimenten

Das Programm PSORT wurde verwendet, um die Wahrscheinlichkeiten für mögliche subzelluläre Lokalisationen der WRKY-Proteine vorherzusagen. Das Kompartiment (linke Spalte) und die zugehörige Wahrscheinlichkeit (rechte Spalte) sind für jedes WRKY-Protein angegeben.

Die manuelle Durchsichtung der Primärsequenz nach putativen NLS ergab für WRKY26 das NLS-Motiv ²⁰⁹KRWKR²¹³, für WRKY38 die beiden Sequenzen ²¹RLKRR²⁵ und ⁸⁵KKRK⁸⁸ und für WRKY43 eine Anreicherung von basischen Aminosäuren K₂R_x3R_xK. Um die computergenerierten Vorhersagen experimentell zu überprüfen, wurde die cDNA-Sequenz von WRKY26, 38 und 43 unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors am Carboxyterminus translational mit GFP fusioniert. Die Transformation mit den erstellten p35S::WRKY-GFP Konstrukten erfolgte mittels biolistischem Partikelbeschuss mit Goldpartikeln, an deren Oberfläche die Vektor-DNA präzipitiert wurde. Als Kontrollen dienten der Vektor p35S-intron-GFP-GUS, dessen Genprodukt als Marker für die cytosolische Lokalisation verwendet wurde und p35S-Intron-GFP zur Kontrolle der freien Diffusion für das kleine Protein der WRKY43-GFP-Fusion, sowie ein Konstrukt zur Positivkontrolle, bei dem WRKY6, von dem die Kernlokalisierung bereits bekannt ist, mit GFP fusioniert wurde. Als Testsystem hat sich die heterologe Expression in Epidermiszellen von Zwiebeln bewährt. Nach 24 h wurde die beschossene Epidermis im UV-Licht betrachtet.

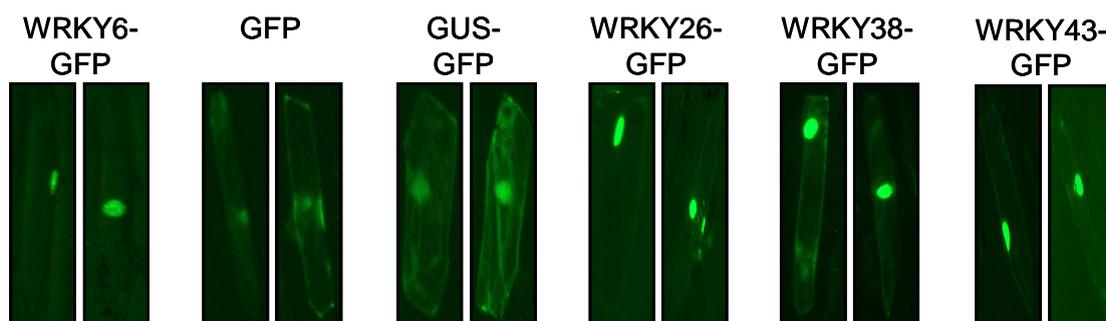


Abbildung 24: Subzelluläre Lokalisation von ausgewählten WRKY-Proteinen

Heterologe Expression von WRKY-GFP-Konstrukten in Zwiebelzellen 24 h nach Partikelbeschuss. Als Kontrolle für die Kernlokalisierung diente Δ WRKY6-GFP. GFP-GUS wurde als Kontrolle für die cytosolische Expression herangezogen, GFP diente zur Beobachtung der freien Diffusion. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Ausschnitt von Epidermiszellen unter UV-Licht durch eine GFP-Fluoreszenz-Filtereinheit.

Alle untersuchten WRKY-GFP Proteine sind im Zellkern zu finden, was mit ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren übereinstimmt. Selbst WRKY43-GFP, das mit seiner geringen Größe von etwa 40kDa durchaus wieder aus dem Zellkern diffundieren könnte, ist nur im

Nukleus detektierbar. Die WRKY-Proteine sind konstitutiv im Zellkern und benötigen keinen weiteren Stimulus zum Kernimport.

Die computergestützte Vorhersage der subzellulären Lokalisation ist demnach mit Vorsicht zu betrachten. Sie kann durchaus richtig sein, wie z.B. für die Lokalisation im Zellkern von WRKY6, aber da im vorliegenden Fall die Computeranalyse auch bei relativ sicheren Vorhersagen, wie beispielsweise der Lokalisation von WRKY26 im Cytoplasma, falsch liegen kann, muss die Vorhersage immer experimentell abgesichert werden.

3.2.3 Untersuchung der Expression der WRKY-Gene

3.2.3.1 Untersuchung der Promotorstruktur

Das Vorkommen bestimmter Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren gibt bereits Hinweise auf eine mögliche Funktion des zugehörigen Gens, da die Entwicklung und Spezifizierung von Pflanzen vor allem über Differenzierung der transkriptionellen Regulierung stattfindet.

Daher wurden die Promotoren von *AtWRKY26*, *AtWRKY38* und *AtWRKY43* auf das Vorhandensein von *cis*-Elementen untersucht, die in der PLACE-Datenbank annotiert sind. Die manuelle Durchsichtung des Promotors lieferte die Positionen von experimentell bestimmten, gut gebundenen W-Box-Sequenzen. In der folgenden Abbildung 25 sind die gefundenen W-Boxen und einige andere bekannte funktionelle *cis*-Elemente aufgelistet. Eine detaillierte Auflistung der Elemente, Konsensussequenzen und Positionen ist im Anhang in Tabelle A4 wiedergegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass die Promotoren der drei untersuchten WRKY-Gene sehr verschieden sind, aber auch einige putative Elemente gemeinsam haben. W-Boxen sind in allen Promotoren im Bereich bis etwa 1 kb unterrepräsentiert oder nicht vorhanden. Zwischen 1 kb und 2 kb stromaufwärts sind in den Promotoren von *AtWRKY38* und *AtWRKY43* zwar W-Boxen vorhanden, aber in geringer Anzahl. Für den Promotor von *AtWRKY26* gibt es in diesem Bereich eine Anreicherung dieser Sequenzen und möglicherweise sind diese funktionell.

Auffallend ist im Promotor von *AtWRKY43* die gegenüber anderen Promotoren große Anzahl an Boxen, denen eine Beteiligung an der Erkennung von Kälte- bzw. Trockenstress zugewiesen wird (CDT/DRE: GTCGAC (Xue, 2003), RCCGAC (Kizis *et al.*, 2002, Dubouzet *et al.*, 2003), LTRE: CCGACA (Dunn *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2002)).

Erhöht war im Promotor von *AtWRKY38* die Anzahl von lichtresponsiven Elementen, wie beispielsweise GT1-Konsensus Sequenzen (GRWAAW, Terzaghi *et al.*, 1995, Villain *et al.*, 1996, Zhou 1999), T-Box (ACTTTG, Chan *et al.*, 2001), oder auch EVENING (AAAATATCT), das für circadiane Expression notwendig ist (Harmer *et al.*, 2000). Abgesehen davon traten wurzelspezifische Elemente (ATATT) in erhöhter Anzahl auf, die jedoch aufgrund der kurzen Sequenz ohnehin sehr häufig sind.

- ARF („auxin response factor“) Bindestellen in *AtWRKY26* (TGTCTC, Ulmasov *et al.*, 1999, Hagen *et al.*, 2002)
- as-1 (TGACG, Redman *et al.*, 2002) in *AtWRKY38*, involviert in Auxin- und oder SA-Transkriptionsaktivierung
- CARGAT und C8GCARGAT in *AtWRKY38*: Impliziert in Blütenentwicklung, (CCWWWWWWGG, Michaels *et al.*, 2003, Tang & Perry, 2003)
- QAR-Element (AACGTGT) in *AtWRKY38*, Verwundung und mechanische Beanspruchung werden hierüber transduziert (Elliott & Shirsat, 1998)
- ARE1 „antioxidant response element“ (RGTGACNNGC) in *AtWRKY43*, (Rushmore *et al.*, 1991)
- GCN4 (TGAGTCA) in *AtWRKY43*: Endosperm spezifische Expression (Onodera *et al.*, 2001)

3.2.3.2 Untersuchungen zur Expression mittels Promotor::*GUS*-Fusionen

Der erste Schritt, um die Funktion von bestimmten WRKY-Genen zu verstehen, ist die Analyse der Expression. Es gilt herauszufinden in welchem Gewebe, zu welchem Zeitpunkt und unter welchem Stimulus die WRKY-Gene exprimiert sind.

Eine Möglichkeit, Einblicke in die transkriptionelle Regulation eines Gens zu erhalten, ist die Fusion des Promotors mit einem Reporter gen und die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von Pflanzen mit solchen Konstrukten (Clough and Bent, 1998). Diese Promotor-Reporter genanalyse repräsentiert ein sehr empfindliches System, welches eine genaue zeitliche und räumliche Auflösung von Expressionsmustern ermöglicht (Jefferson *et al.*, 1987). So können wichtige Informationen über das zu untersuchende Gen gewonnen werden, ohne dessen Funktion zu stören. Bei der Betrachtung der Expressionsmuster gilt es zu beachten, dass manchmal eine artifizielle Expression des Promotor-*GUS*-Systems beobachtet wird (Mascarenhas & Hamilton, 1992). Deshalb sollte auf die Übereinstimmung der Daten mit Ergebnissen aus Northern-Analysen geachtet werden.

Die transgenen Pflanzen mit der *WRKY*-Promotor::*GUS*-Fusion wurden nicht nur hinsichtlich ihrer gewebe- und entwicklungspezifischen, sondern auch auf eine induzierbare Expression untersucht. 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.*, 2002), wurde die *WRKY*-Promotor-Aktivität nach Behandlungen mit den Hormonen SA, JA, Ethylen und einem Elizitor anhand der *GUS*-Expression verfolgt. Bei dem Elizitor handelt es sich um flg22, einen Peptid-Elizitor, der sich vom Flagellin Gram-negativer Bakterien ableitet (Gomez-Gomez & Boller, 2000).

Die Bestrahlung der Blätter mit definierten UV-Mengen wurde in einem UV-Crosslinker der Firma Stratagene durchgeführt. Dazu wurde die Strahlendosis mit der Energie von 25 oder 50 mJ verwendet. Die Bestrahlung dauerte zwischen 15 und 30 s, um die eingestellten UV-Dosen zu erreichen.

Da in der Promotor-Analyse kälte- und trockenheitsresponsive Elemente gefunden wurden, schien eine Inkubation der Pflanzen bei 4 °C (Kältestress) und 37 °C (Hitzestress) vielversprechend. Trockenstress wurde durch Öffnen der ½-MS-Platten unter der Sterilbank und Inkubation bis zum Auftreten von Welke-Symptomen ausgelöst. Im

Gewächshaus wurden ca. 4 Wochen alte Pflanzen nicht mehr gegossen, bis auch hier welken zu sehen war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

	AtWRKY26	AtWRKY38	AtWRKY43
Kontrolle	Expression in Trichomen von 3-5 Wochen alten Pflanzen	leichte Expression in Blättern	keine Expression detektierbar
SA	n.i.	induziert	n.i.
JA	n.i.	induziert	spezifisch induziert in Abscissionszone
ACC	n.i.	induziert	n.i.
flg22	induziert	schwach	n.i.
P.s. (DC3000)	n.i.	schwach	n.i.
UV 25mJ	n.i.	n.i.	n.i.
UV 50mJ	n.i.	schwach induziert	n.i.
37°C	induziert nach 25 h, v.a. in Wurzel	n.i.	n.i.
4°C	stark induziert nach 25 h	n.i.	n.i.
Trockenstress	induziert, nach 25h	n.i.	n.i.
Dunkelkeimung	n.i.	stark induziert in Wurzel + Hypocotyl	n.i.
Dunkelheit	n.i.	n.i.	n.i.
Verwundung	n.i.	stark induziert	n.i.
Gewebe-spezifische Expression:	- In Trichomen von 3-6 Wochen alten Pflanzen - in Wurzelspitzen von 5 Wochen alten Pflanzen - Behandlung mit Hormonen reduziert Expression in Trichomen	- vor allem in Wurzeln junger Pflanzen, - in allen Blättern geringe Expression zu detektieren	- In Übergang von Schote-Stiel schwache Blaufärbung in 6-8 Wochen alten Pflanzen

Tabelle 10: Expressionsanalyse der *A. thaliana* WRKY-Gene 26, 38 und 43 mittels Promotor::GUS-Reporter-Gen-Studien

Beschrieben ist die gewebespezifische und induzierbare Expression. Die ausgewählten Behandlungen sind in der linken Spalte aufgelistet und das entsprechende Expressionsmuster der WRKY-Gene ist in der jeweiligen Spalte kurz charakterisiert. Untersucht wurden 7 und 14 Tage alte Pflanzen, die unter sterilen Bedingungen angezogen wurden und 3 bis 8 Wochen alte Pflanzen, die in Erde und im Gewächshaus kultiviert wurden. Behandlungen wurden mit 2, 4 und 6 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. n.i.: nicht induziert, im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Genexpression. induziert: erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. schwach: leicht erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Falls die Expression in besonderen Geweben oder Stadien war, ist dies in der Tabelle erwähnt, ansonsten ist die Expression immer in Blättern beobachtet worden. SA-Salicylsäure, JA-Jasmonsäure, ACC-Ethylen Vorstufe, flg22-Flagellin-Elicitor, P.s.(DC3000)-Pseudomonas syringae DC3000, UV-Ultraviolette Strahlung, Dunkelheit-Transfer von Pflanzen von Licht in Dunkelheit,

AtWRKY38

In Keimlingen war eine äußerst starke GUS-Expression im gesamten Bereich der Wurzel vorhanden (Abb. 26B). Schon in jungen, 2-Tage alten Keimlingen war eine hohe GUS-Expression in der Wurzel sichtbar. Auch in älteren Keimlingen blieb dieses Bild erhalten. Hervorzuheben war dabei die scharfe und deutliche Grenze zwischen starker Expression in der Wurzel und keiner im Hypokotyl (Abb. 26B). Dies war auch für die weitere Entwicklung bis hin zu schotentragende 4 Wochen alten Pflanzen zu beobachten. Generell wurde *AtWRKY38* in Blättern exprimiert, sowohl in ganz jungen (Abb. 26A) als auch in alten (Abb. 26 E).

AtWRKY38 wird auch bei Verwundung und mechanischer Beanspruchung induziert (Abb. 26G, H). Es wurde an einer Schnittstelle starke und lokal begrenzte GUS-Färbung beobachtet. Zusätzlich führte leichter mechanischer Druck durch Pressen mit einer Pinzette zur Induktion von GUS-Expression. Verwundung kann auch als mutmaßliche Induktionsquelle der Wurzelexpression nicht ausgeschlossen werden, da die Pflanzen aufgrund des Herauslösen aus dem Erdboden bzw. der Agarplatten Verletzungen ausgesetzt werden. Unter Umständen kann die Zeit vom Herauslösen der Wurzel aus dem Medium bis zur Infiltration ausreichend für Wundinduktion sein (Rushton *et al.*, 2002). Dies würde auch erklären, dass dieser Effekt an manchen Wurzeln sehr stark, an anderen hingegen kaum bis schwach detektierbar ist.

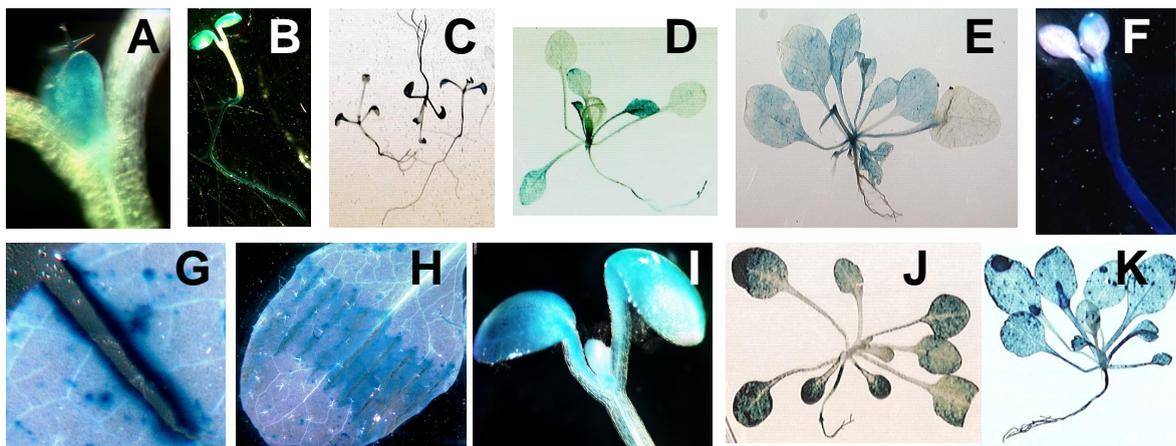


Abbildung 26: Die *AtWRKY38*-Promotor::GUS-Konstrukt vermittelte Expression in *Arabidopsis*-Pflanzen

Dargestellt ist die GUS-Aktivität in ausgewählten Entwicklungsstadien und nach verschiedenen Behandlungen. Die Pflanzen wurden jeweils über Nacht bei 37 °C mit X-Gluc-Lösung inkubiert. **A** 7 Tage alter Keimling, **B** 7 Tage alte, ganze Pflanze, **C** 14 Tage alte Pflanze, **D** 21 Tage alte Pflanze, **E** 6 Wochen alte Pflanze, **F** Dunkelkeimung, 7 Tage alt, **G** Verwundung durch schneiden, 4 Wochen alte Blätter **H** Verwundung durch mechanischen Druck, 4 Wochen alte Blätter **I** Sprühen von Flagellin, 14 Tage alte Pflanzen **J** Sprühen von Ethylen, 4 Wochen alte Pflanze **K** UV-Licht 50 mJ, 4 Wochen alte Pflanze.

Manche Wurzeln konnten nur umhüllt von Medium aus der Platte herausgelöst werden, wodurch mechanische Zugbelastung und Verletzung der Wurzel(haare) geringer war.

Bei den in Dunkelheit gehaltenen Keimlingen war weiterhin eine starke Färbung der Wurzeln und des Hypokotyls vorhanden (Abb. 26F). Darüber hinaus war auch eine GUS-Expression im Hauptleitgewebe des Hypokotyls zu sehen (Daten nicht gezeigt). Durch eine

Substrat-Infiltration ohne anschließende Inkubation wurde die starke Promotor-Aktivität in Wurzeln von jungen Pflanzen deutlich, denn selbst unter diesen Bedingungen war eine *GUS*-Expression schon erkennbar. In den vegetativen grünen Geweben der adulten Pflanzen war immer schwache Promotor-Aktivität bemerkbar. Nach Behandlung mit Hormonen oder Elizitor konnte diese gesteigert werden (Abb. 26I-J), dabei war die Induktion der Expression durch Salizylsäure und Ethylen am stärksten und durch Flagellin am schwächsten. Weiterhin war die beobachtete Induktion in 2 Wochen alten Pflanzen stärker als in 4 Wochen alten Pflanzen, jedoch zeigte die Expression in ersteren auch größere Variabilität. Nach UV-Behandlung ist die Expression in Blättern leicht oder kaum erhöht, es treten aber viele unregelmäßige und mehr oder weniger große Flecken mit stark erhöhter *GUS*-Expression auf (Abb. 26K).

AtWRKY26

Das auffälligste Merkmal von *AtWRKY26* war die Expression in Trichomen, sowohl auf den Blättern (Abb. 27C) als auch am Stamm (Abb. 27E). Diese trat allerdings frühestens bei etwa 2 bis 3 Wochen alten Blättern auf, in jüngeren Pflanzen war keine *GUS*-Aktivität in Trichomen zu sehen. Die Promotor-Aktivität wurde nach Inkubation mit verschiedenen Pflanzenhormonen, die bei Pathogenabwehrprozessen eine Rolle spielen (Dong, 1998), getestet. Sowohl bei Keimlingen als auch bei abgeschnittenen Blättern (Daten nicht gezeigt) wurde in grünen vegetativen Geweben keine gesteigerte *GUS*-Expression durch Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen festgestellt. Im Gegenteil, die Expression in den Trichomen ist durch Sprühen mit den Hormonen deutlich reduziert (Abb. 27F). Lediglich durch Flagellin scheint die Expression in Trichomen erhöht zu sein, allerdings gilt dies nur für 3 bis 6 Wochen alte Pflanzen.

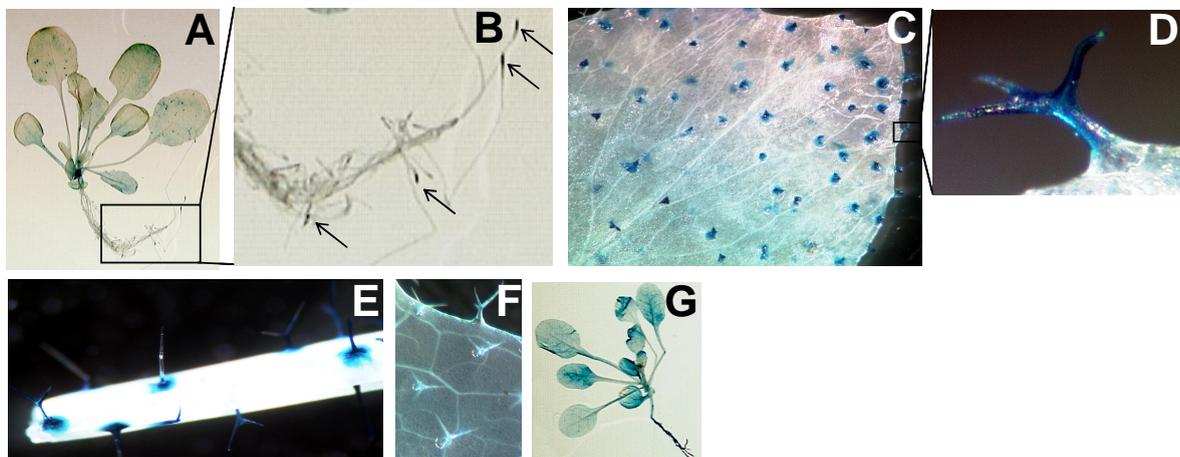


Abbildung 27: Die *AtWRKY26*-Promotor::*GUS*-Konstrukt vermittelte Expression in *Arabidopsis*-Pflanzen.

Dargestellt ist die *GUS*-Aktivität in ausgewählten Entwicklungsstadien und nach verschiedenen Behandlungen. Die Pflanzen wurden jeweils über Nacht bei 37 °C mit X-Gluc-Lösung inkubiert. **A** 3 Wochen alte Pflanze **B** Ausschnitt aus A, markante Expression in Wurzelspitzen ist mit Pfeilen gekennzeichnet **C** Blatt einer 5 Wochen alten Pflanze **D** Ausschnittsvergrößerung von C, Expression in einem Trichom **E** Stamm einer 5 Wochen alten Pflanze **F** Expression nach Behandlung mit SA in 5 Wochen alten Blättern **G** Induzierte Expression in 4 Wochen alten Pflanzen nach 48h bei 4 °C.

Bei 2 Wochen alten Pflanzen war eine stärkere Expression des Reportergens in Blättern nach Trocken-, Hitze- und Kältestress zu beobachten (Abb. 27G), in 4 Wochen alten Pflanzen war dies nicht mehr ganz so deutlich zu sehen. Bei einigen Pflanzen konnte auch eine spezifische Expression in Wurzelspitzen festgestellt werden (Abb. 27B), die jedoch nicht weitergehend analysiert wurden.

AtWRKY43

Dieses *WRKY*-Gen ist insgesamt kaum zu detektieren, auch unter den getesteten Stimuli war keine Induktion der Expression zu beobachten. Lediglich im Bereich des Übergangs zwischen Stiel und Schote, bei dem es sich wahrscheinlich um die Abscissionszone handelt, fiel nach Behandlung mit Jasmonsäure deutliche Reporter-Gen-Aktivität auf (Abb. 28D-E). Bei genauerer Analyse fiel diese Expression auch in unbehandelten Pflanzen auf, allerdings meist erst in 6 Wochen alten Pflanzen und deutlich schwächer als bei JA-Behandlung. Aufgrund dieser räumlich sehr begrenzten Expression konnte in Northern-Analysen keine *WRKY*-Transkript-Akkumulation festgestellt werden. In seltenen Fällen war auch eine Expression auf der Unterseite der Ansatzstellen von Blättern am Stamm zu beobachten.

Bemerkenswert war die Expression in den Haaren in der Übergangszone von Hypokotyl zu Wurzel, wobei diese nicht im ganzen Gewebe zu sehen war, sondern sehr begrenzt in der Spitze dieser Wurzelhaare (Abb. 28B).

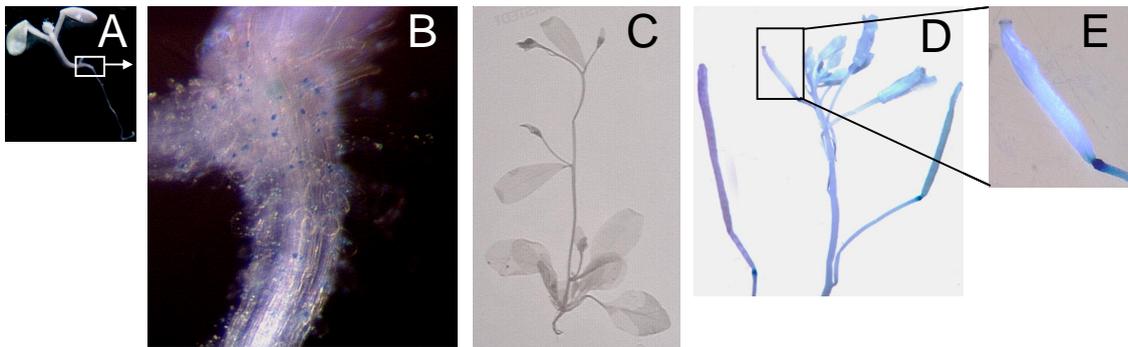


Abbildung 28: Die *AtWRKY43*-Promotor::*GUS*-Konstrukt vermittelte Expression in *Arabidopsis*-Pflanzen

Dargestellt ist die GUS-Aktivität in ausgewählten Entwicklungsstadien. Die Pflanzen wurden jeweils über Nacht bei 37 °C mit X-Gluc-Lösung inkubiert. *AtWRKY43*-Promoter vermittelte GUS-Expression in **A** 7 Tage alte Pflanze **B** 7 Tage alte Pflanze, Ausschnitt der Transitionszone von Wurzel zu Hypokotyl **C** 4 Wochen alte Pflanze **D** 5 Wochen alte Pflanze nach Sprühen mit JA **E** 5 Wochen alte Pflanze nach Sprühen mit JA, nur Schote,

Das komplexe Expressionsbild der untersuchten *WRKY*-Gene zeigt gewebe-, entwicklungs- und stressspezifische Komponenten. Dies sind erste Hinweise auf die pflanzlichen Prozesse, in denen diese *WRKY*-Faktoren involviert sind. Als solche können für *AtWRKY38* Wurzelentwicklung und Abwehrreaktionen bei Verwundung und Pathogenbefall betrachtet werden, und es fällt vor allem durch Induzierbarkeit durch Hormone und Elizitor auf. *AtWRKY26* scheint in Trichomen eine Funktion zu übernehmen und auch eine Rolle bei Trockenheit und Kälte zu spielen. Für *AtWRKY43* konnte lediglich

Expression in der Abscissionszone detektiert werden, was eine Funktion bei Seneszenz und/oder Reifung vermuten lässt.

3.2.3.3 Untersuchen der Expression mittels Filter-Hybridisierungs-Experimenten

Die Expressionsdaten der Promotor::*GUS* Linien lieferten interessante Einblicke in die gewebe- und stimulusspezifische Expression der drei ausgewählten *WRKY*-Gene. Diese Daten sollen anhand isolierter RNA aus verschiedenen Geweben (Wurzel, Stamm, Blüte, Schote und Blätter) oder nach ausgewählten Stimuli, hierzu zählen *flg22*, SA und MeJA, bestätigt werden. Um nicht nur die Expression der drei untersuchten *WRKY*-Faktoren zu untersuchen, sondern um die drei *WRKY*-Gene im Kontext der gesamten *Arabidopsis* *WRKY*-Familie platzieren zu können, wurde die Expression von fast allen *AtWRKY*-Genen getestet. Außerdem kann so nach *WRKY*-Genen mit gleicher Gewebeexpression und gleichem Induktionsmuster gesucht werden, die dann zumindest partiell redundante Funktionen haben könnten und bei der Betrachtung von Nullmutanten zur Erklärung von ausbleibenden Phänotypen herangezogen werden können. Des Weiteren lassen sich eventuell interessante Kandidaten für Doppel-Nullmutanten bestimmen.

Für diesen Ansatz wurden Slot-Blot-Experimente durchgeführt. Um Unterschiede in der cDNA-Menge, die sich durch die unterschiedliche Länge der *WRKY*-cDNAs ergibt, auszugleichen, wurden pro Slot 1 µg linearisierte und denaturierte Plasmid-DNA aufgetragen. Zur Kontrolle konnte auf Expressionsdaten von bereits untersuchten *WRKY*-Genen zurück gegriffen werden. Auf den Filtern sind somit einige interne Kontrollen, die eine Aussage über die Qualität der RNA zulassen. Normalisierung wurde auch anhand bekannter Daten vollzogen und jeweils Gene verwendet, die bei dem entsprechenden Stimulus unverändert bleiben. So ist bekannt, dass z.B. *AtWRKY1* nicht durch SA induziert wird. Nicht induziert durch Flagellin oder MeJA ist *AtWRKY60*, das in diesen Untersuchungen zur Normalisierung der Daten eingesetzt wurde.

Exemplarisch gezeigt ist in Abbildung 29 die Expression der *WRKY*-Gene nach SA-Behandlung. Die Daten für MeJA- und *flg22*-Behandlung sind im Anhang zu finden (Abb. A22, A23), genauso wie die Auswertung der gewebespezifischen Expression (Abb. A24, Tab. A5).

Die in diesem Experiment beobachtete Genexpression nach Besprühen von 5 Wochen alten Pflanzen mit SA korreliert gut mit den bekannten Daten (Dong *et al.*, 2003), nur wenige *WRKY*-Gene zeigen ein abweichendes Verhalten. Dies kann durch die möglicherweise weniger sensitive Micro-Array-Methode gegenüber Northern-Analysen, unterschiedliches Pflanzenmaterial oder auch die Art der RNA-Extraktion und Markierung der Sonde erklärt werden.

Zu den Ergebnissen der Promotor::*GUS* Linien passt das Ergebnis sehr gut, *WRKY38* ist nach den Behandlungen deutlich induziert, *AtWRKY26* hingegen nicht, aber mit einem etwas höheren Expressionsniveau als *AtWRKY43*, das im Hintergrundbereich liegt und auch nicht induziert ist.

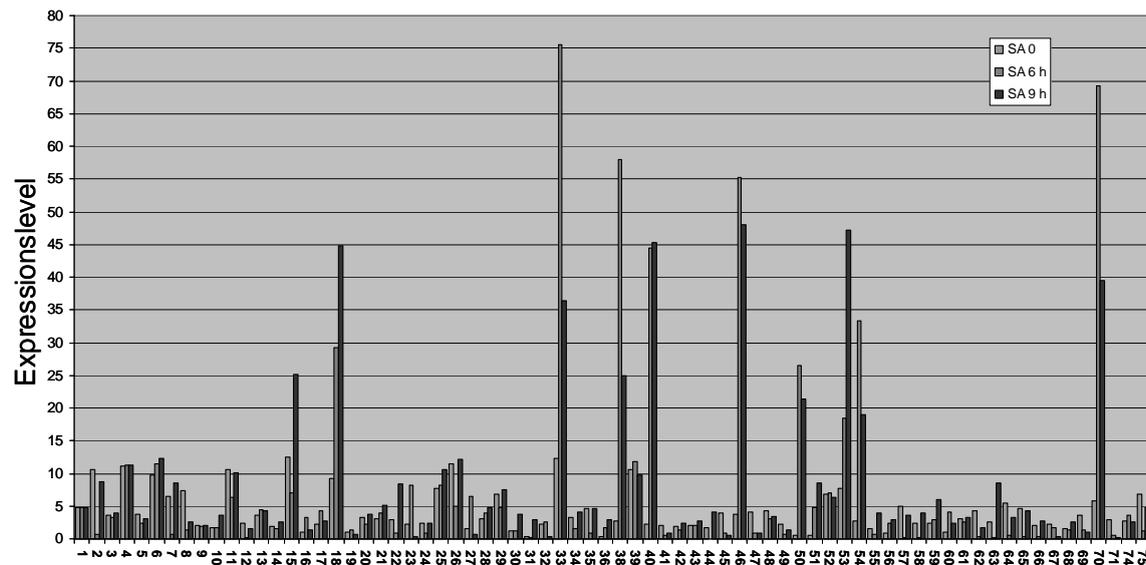


Abbildung 29: Expression von *AtWRKY*-Genen zu verschiedenen Zeiten nach SA-Behandlung

Dargestellt ist das Expressionsniveau der WRKY-Gene nach Abzug der Hintergrundsignale und Normalisierung mit Hilfe von *AtWRKY1*. 4 bis 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 1mM SA-Lösung besprüht und nach 0 (hellgrau), 6 (grau) und 9 (dunkelgrau) h Blattmaterial zur RNA-Extraktion entnommen. Aus Gesamt-RNA wurde mittels oligo(dT) über cDNA-Erststrang-Synthese mRNA-Moleküle markiert. Von den Sonden wurde jeweils die gleiche Menge an markierter cDNA zur Hybridisierung verwendet, jedoch mindestens 50 Millionen cpm.

Die Expression in bestimmten Geweben war für WRKY43 immer im Hintergrundniveau, wie auch für *AtWRKY38*, wobei hier eine leicht erhöhte Expression in Wurzeln beobachtet wurde. Die Expression in den Wurzeln ist jedoch insgesamt bei allen WRKY-Genen sehr niedrig, so dass eine in diesem Gewebe erhöhte Expression immer noch schwächer ist als die Expression in beispielsweise Blättern. Die spezifische Expression von z.B. *AtWRKY43* in dem Abscissionsgewebe kann über Gesamt-RNA nicht detektiert werden, da hier der Anteil dieses speziellen Gewebes nur einen Bruchteil ausmacht. Dementsprechend ist auch nach Behandlung mit MeJA kaum eine erhöhte WRKY43-Expression detektiert worden. Die GUS-Aktivität für *AtWRKY38* war in Keimlingen sehr stark exprimiert, in adulten Pflanzen konnte aber nur noch wenig GUS-Aktivität in Blättern detektiert werden, zumindest ohne Behandlung mit Hormonen oder Elizitoren. Dies deckt sich gut mit den durch die Hybridisierungen erhaltenen Daten.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die festgestellte Aktivität des Reportergens nicht durch artifizielle Expression verursacht wurde. Die beobachteten Expressionsmuster konnten, soweit es der Rahmen der hier durchgeführten Filteranalysen zulässt, bestätigt werden.

Innerhalb der WRKY-Familie zeigen nur wenige Faktoren ein mit den untersuchten WRKY-Genen überlappendes Expressionsmuster. Für *AtWRKY26* konnten kaum ähnlich exprimierte Gene gefunden werden, selbst bei lediglich zwei zu vergleichenden Stimuli gab es jeweils nur ein weiteres WRKY-Gen mit gleicher Expression. Für *AtWRKY38* gab es mehr überlappende Expressionsprofile und für *AtWRKY60* sogar das gleiche Profil bei allen drei Stimuli. Bei den Behandlungen mit SA und flg22 gab es bemerkenswerterweise

kein einziges WRKY-Gen mit der gleichen Expression. Im Gegensatz dazu wurden für *AtWRKY43* für jeweils zwei Stimuli mindestens drei WRKY-Faktoren mit ähnlicher Expression bestimmt, jedoch gibt es auch hier nur ein WRKY-Gen (*AtWRKY10*), das bei allen drei Behandlungen ähnliche mRNA-Level wie *AtWRKY43* aufweist. Dies lässt vermuten, dass für *AtWRKY43* deutlich mehr Gene eine überlappende Funktion einnehmen können als für *AtWRKY38* oder *AtWRKY26*. Bei Nullmutanten ist demnach für *AtWRKY26* ein offensichtlicher Phänotyp wahrscheinlicher als für *AtWRKY43*.

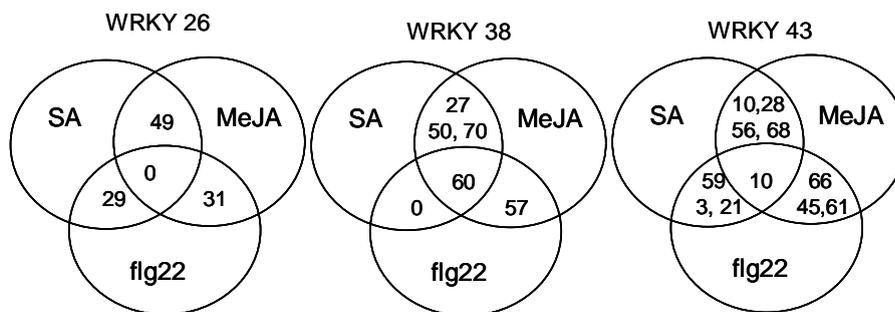


Abbildung 30: Überlappende Expressionsmuster innerhalb der *Arabidopsis*-WRKY-Familie

Dargestellt ist die Überschneidung von Expressionsmustern mit den über den einzelnen Grafiken angegebenen *AtWRKY*-Genen. Die mRNA-Level aus den Filter-Hybridisierungen wurden verglichen und *AtWRKY*-Gene mit ähnlicher Expression nach den angegebenen Behandlungen in die Schnittmenge eingetragen. WRKY-Gene sind durch die entsprechenden Zahlen gekennzeichnet.

4 Diskussion

Informationen über pflanzliche Transkriptionsfaktoren können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Regulationsprozessen in Pflanzen liefern. Sie spielen bei verschiedenen Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise Organidentitätsentwicklung oder Blühinduktion eine Rolle. Von besonderem Interesse ist auch die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren bei Perzeption und Transduktion von Signalen aus der Umwelt. Dabei können eingehende Signale zu einer veränderten Genexpression führen, wobei die Transkriptionsfaktoren die zeitliche und räumliche Koordination steuern. WRKY-Proteine sind bisher nur in Pflanzen gefundene Genregulatoren, deren Funktion hauptsächlich mit Stress- und Pathogenresponsivität in Verbindung gebracht wird, sie können aber auch an Entwicklungsprozessen beteiligt sein.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion von WRKY-Proteinen mit dem zugehörigen *cis*-Element, der W-Box, führten zu einer erweiterten Definition eines Konsens für Bindesequenzen. Versuche mit dem durch Aminosäureaustausche veränderten WRKY11-CTD Protein zeigten die Bedeutung von konservierten Aminosäuren bei der WRKY-W-Box-Interaktion und die weiterführende Analyse von drei ausgewählten WRKY-Proteinen bestätigte die Diversität der WRKY-Proteine in Struktur, Expression und Funktion. Die Kurz-Charakterisierung der drei ausgewählten Mitglieder der WRKY-Familie lieferte weitere Einblicke in mögliche Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren.

4.1 Biochemische Merkmale von WRKY-Proteinen

WRKY-Proteine sind meist zwischen 30 und 60 kDa groß, aber es gibt auch sehr kleine Proteine von nur 12 kDa, wie z.B. WRKY45 und im Gegensatz dazu sehr große wie WRKY19 mit etwa 200 kDa. Die hier untersuchten WRKY-Proteine variieren in ihrer Größe von 12 kDa (WRKY43), bis 33 kDa (WRKY38) und 35 kDa (WRKY26). Alle WRKY-Proteine besitzen die namensgebende WRKY-Domäne, die aus der hoch konservierten WRKYGQK-Sequenz und der Zinkfinger-Struktur aufgebaut ist, die gemeinsam für die DNA-Bindung notwendig sind. WRKY26 trägt, wie alle Gruppe I WRKY-Faktoren, eine zweite, N-terminal gelegene WRKY-Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Ein Einfluss auf eine bessere DNA-Bindung der zweiten WRKY-Domäne oder eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen wird diskutiert (de Pater *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 2000).

Transkriptionsfaktoren besitzen oft eine komplexe Struktur mit modularem Aufbau (Ptashne, 1992, Riechmann *et al.*, 2000), bei dem die einzelnen, voneinander abgegrenzten Module die Funktion des Proteins bestimmen. Es wird angenommen, dass die Komplexität in der Protein-Domänen Organisation mit zunehmender Höherentwicklung des Organismus ansteigt (Rubin *et al.*, 2000). Experimente mit Transkriptionsfaktoren, in denen Domänen ausgetauscht wurden, zeigten, dass zumindest manche DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomänen unabhängig voneinander funktionieren können (Lefstin & Yamamoto, 1998). Wie auch bei vielen anderen Familien von Transkriptionsfaktoren ähneln sich die Sequenzen der einzelnen Vertreter der *At*WRKY-Familie in ihrer DNA-Binde-Domäne sehr stark, allerdings sind sie außerhalb davon sehr verschieden (Liu *et*

al., 1999). Innerhalb der WRKY-Familie fallen Gene wie z.B. *WRKY52* auf, das aus mehreren bekannten Domänen besteht (*TIR-NBS-LRR-WRKY*), typische Charakteristika von Resistenzgenen aufweist (Ellis & Jones, 1998, Gassmann *et al.*, 1999, Meyers *et al.*, 1999, Martin, 1999) und eine dementsprechende Rolle ausübt. Tatsächlich konnten genetische Studien zeigen, dass *WRKY52*, auch *RRS1* genannt, Resistenz gegen *Ralstonia solanacearum* vermittelt (Deslandes *et al.*, 2002). Möglicherweise können solche einzelnen Module unabhängig voneinander agieren bzw. funktionieren, wie für Domänen der Kinasen *BRI1* und *Xa21* gezeigt wurde (He *et al.*, 2000). Es wurde die Ser/Thr-Rezeptorkinase von *Xa21* mit der LRR- und Transmembrandomäne von *BRI1* fusioniert. Das Chimer-Konstrukt löst Verteidigungsreaktionen nach Behandlung mit Brassinosteroiden aus und zeigt so die modulare Natur der Proteine und darüber hinaus die Kompatibilität von verschiedenen Domänen. Solch ein System erlaubt die Entwicklung einer großen Fülle verschiedener Proteine aus einer begrenzten Anzahl von Domänen. In *WRKY26* und *WRKY38* treten weiterhin typische Aktivierungsdomänen, wie beispielsweise serin-/threoninreiche Bereiche auf (Hanna-Rose & Hansen, 1996), während für *WRKY43* keine solchen Bereiche identifiziert werden konnten (Abb. 20). Es gibt jedoch keine genauen Vorhersagen, wie eine Aktivierungsdomäne auszusehen hat, es kann sich durchaus um Bereiche ohne auffallend strukturierte Merkmale handeln (Triezenberg, 1995), so dass eine bisher unbekannte Sequenz für die von *WRKY43* ausgehende Transaktivierung (Abb. 11) verantwortlich sein kann. Für *WRKY11* wurde eine prolinreiche Sequenz identifiziert, die ein Repressionsmotiv darstellen könnte (Hanna-Rose & Hansen, 1996) und dementsprechend die negative Regulation der *WRKY6* induzierten Genexpression erklären könnte (Abb. 12).

Ein weiteres strukturelles Motiv von Transkriptionsfaktoren sind Kernlokalisations-Sequenzen (NLS, „nuclear localization signal“). Die in dieser Arbeit untersuchten *WRKY*-Proteine sind wie in Abbildung 24 anhand transienter Transformationsexperimente an Zwiebelzellen gezeigt werden konnte, genauso wie alle anderen bisher untersuchten *WRKY*-Faktoren, entsprechend ihrer Rolle als DNA-Bindeproteine, im Zellkern lokalisiert. Da die Größe des Fusionsprotein von *WRKY26* und *WRKY38* jeweils mit GFP etwa 60 kDa betrug, ist von einem aktiven Transport in den Zellkern auszugehen, denn die Kernporenkomplexe (NPC, „nuclear pore complex“), die das Cytoplasma mit dem Nukleoplasma verbinden, ermöglichen nur freie Diffusion von Proteinen bis 50 kDa. Der selektive Transport durch die NPCs findet bei Erkennung der Kernlokalisationssequenz und Bindung der Proteine statt (Görlach & Mattaj, 1996, Yoneda 1997). NLS werden in verschiedene Klassen unterteilt, dabei enthält Klasse I meist vier basische Aminosäuren mit dem Konsensus K-K/R-X-K/R, der auch mit Prolin assoziiert sein kann (Garcia-Bustos, 1991). NLS der Klasse II enthalten ein zweigeteiltes Signal (bipartite NLS) mit dem Konsensus K/R-K/R-X₁₀₋₁₂-K/R-K/R-K/R. Das Auftreten von zwei oder mehr NLS kann den Kerntransport positiv beeinflussen (Merkle, 2001, Jans & Hübner, 1996), wobei die einzelnen NLS funktionell unabhängig voneinander sein können.

In der Aminosäuresequenz von *WRKY26* und *WRKY38* wurde jeweils eine putative NLS der Klasse I gefunden (Abb. 20). Für *WRKY43* konnte jedoch keine Konsensussequenz einer NLS detektiert werden. Möglicherweise überlappt die NLS mit der *WRKY*-Domäne, in deren N-terminus basische Aminosäuren auftreten, denn es konnte gezeigt werden, dass NLS durchaus innerhalb von anderen Domänen liegen können (Varagon & Raikhel, 1994). Außerdem sind NLS in der Primärstruktur eines Proteins unabhängig von ihrer

Position und werden nach erfolgreichem Kernimport nicht abgespalten (Smith & Raikhel, 1999). Es ist genauso denkbar, dass dieses Protein eine noch unbekannte NLS aufweist. So wurde beispielsweise für WRKY6 eine funktionelle NLS bestimmt, die nicht den bekannten Konsensussequenzen entsprach (Nakielny & Dreifuss, 1999, Robatzek & Somssich, 2001). Wegen der geringen Größe des WRKY43-GFP Proteins (etwa 40 kDa) war neben der Kontrolle für passiven Transport (GFP-GUS) eine weitere Kontrolle zur freien Diffusion notwendig (GFP). Im Vergleich zu den Kontrollen konnte für WRKY43 auch ohne bekannte NLS der Kernimport nachgewiesen werden (Abb. 24).

Dieser kann zusätzlich einer Regulation, z.B. durch Phosphorylierung unterliegen (Schwechtheimer & Bevan, 1998, Hunter & Karin, 1992). Da sich die drei untersuchten Proteine jedoch konstitutiv im Nukleus befinden, ist der Kernimport unabhängig von weiteren Stimuli. Dies ist in Einklang mit Beobachtungen an anderen WRKY-Faktoren, wie *PcWRKY1*, *NWIZZ* oder *AtWRKY6* (Eulgem *et al.*, 1999, Hara *et al.*, 2000, Robatzek & Somssich, 2001). Ob jedoch ein stimulusabhängiger Nukleoexportmechanismus vorliegen könnte, wurde bisher nicht untersucht.

4.2 Vergleich der WRKY-Faktoren mit bekannten Zinkfinger-Proteinen

WRKY-Proteine sind trotz neuartiger Struktur den Zinkfinger-Proteinen zuzuordnen. Sie werden zu den klassischen C2H2-Zinkfingern gezählt, obwohl in Gruppe III ein abweichendes C2HC-Motiv vorliegt (Eulgem *et al.*, 2000, Takatsuij, 1998). Der klassische Zinkfinger mit der C2H2-Struktur wurde vor etwa 20 Jahren als TFIIIA in *Xenopus* entdeckt (Hanas *et al.*, 1983, Miller *et al.*, 1985). Heute sind neben C2H2 noch weitere verschiedene Familien von Zinkfingern bekannt, die in ihrer Sekundärstruktur, Metall-Koordination und Modularität unterschieden werden (Schwabe & Klug, 1994). Typischerweise sind mehrere Zinkfinger tandemartig hintereinander angeordnet und durch kurze Aminosäuresequenzen voneinander getrennt. In Pflanzen sind diese „Spacer“ gewöhnlich deutlich länger als bei Tieren. Die Zinkfinger sind eines der wichtigsten Strukturmodule, die bei Eukaryoten in Protein-DNA-Interaktionen involviert sind (Berg, 1995, Berg & Godwin, 1997). Es gibt aber auch Zinkfinger-Proteine, die an RNA-Interaktion (z.B. Zif268, Pavletich & Pabo, 1991) oder Protein-Protein-Interaktion (z.B. RING-Finger, Borden, 2000) beteiligt sind.

Es wird davon ausgegangen, dass jeder Zinkfinger nur mit 3 oder 4 Basen einen spezifischen Kontakt zur DNA herstellen kann, so dass die spezifische Erkennung von längeren Sequenzen durch die Kombination von mehreren Zinkfingern erzielt wird. Für artifizielle sechsfingrige-Proteine wurde dem entsprechend die hochspezifische Erkennung von 18 aufeinanderfolgenden Basen gezeigt (Segal & Barbas, 2001, Beerli & Barbas, 2002). Weiterhin können auch Tripletts erkannt werden, die nicht zusammenhängend, sondern unabhängig voneinander sind und einen bestimmten Abstand haben. So werden von den zwei Zinkfingern des Proteins ZPT-2 aus *Petunia* zwei unabhängige und unterschiedliche Tripletts erkannt, obwohl beide Finger die konservierte QALGGH-Aminosäuresequenz beinhalten. Der N-terminale Zinkfinger bindet an ein AGC-Triplett, während der C-terminale an AGT bindet (Yoshioka *et al.*, 2001). Hier dienen also 2 Zinkfinger zur Erkennung von 6 Basen, auch wenn diese in zwei

unabhängigen Triplets organisiert sind. Die Spezifität kann jedoch auch mit einem einzelnen Finger über 3 Basen hinaus erhöht werden. Die aufgelöste Struktur des Zinkfingers SWI5 zeigt, dass eine zusätzliche Helix und ein Faltblatt zur strukturellen Stabilität beitragen, des weiteren aber in der DNA-Erkennung impliziert sind und durch Verlängerung der DNA-Bindungsoberfläche die Erkennungssequenz erweitern (Duvall *et al.*, 1994, Neuhaus *et al.*, 1992).

Da für die meisten WRKY-Proteine nur ein Zinkfinger vorhanden ist und gezeigt werden konnte, dass die Erkennungssequenz etwa 12 bis 14 Basen umfasst (Abb. 13), kann auch hier auf einen Mechanismus geschlossen werden, der das Bindungsmotiv erweitert. Die Tertiärstruktur von klassischen Zinkfingern besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern und einer gegenüberstehenden α -Helix, dem sogenannten $\beta\beta\alpha$ -Motiv (Berg & Godwin, 1997). Diese Struktur wurde auch für WRKY-Proteine durch eine Vorhersage der Sekundärstruktur mit verschiedenen Programmen (Abb. 23 und A14) bestätigt. Für die konservierte WRKYGQK-Sequenz wird eine Helix und für den Zinkfinger-Bereich zwei Faltblätter vorhergesagt. Vor dem WRKYGQK-Motiv wird für alle untersuchten Proteine ein zusätzliches β -Faltblatt berechnet. Interessanterweise befindet sich dieses β -Faltblatt nicht mehr im hoch konservierten Bereich der WRKY-Domäne, sondern davor in einem bereits variablen Abschnitt, der allenfalls noch in den einzelnen Subgruppen Gemeinsamkeiten aufweist. So könnte in Anlehnung an den Befund in SWI5 auch in WRKY-Proteinen ein zusätzliches β -Faltblatt die Erkennungssequenz über TGAC hinaus verlängern.

Abgesehen davon erinnert die vorhergesagte Struktur an den SUPERMAN-Zinkfinger, bei dem auch die absolut konservierte Sequenz QALGGH eine α -Helix bildet, die von zwei Faltblättern begleitet und von einem Metallion zusammengehalten wird. Mit dieser Struktur wird der Kontakt zur großen Furche der DNA hergestellt (Isernia *et al.*, 2003, Wolfe *et al.*, 2000). Erst kürzlich wurde mit SUPERMAN erstmals die Kristallstruktur eines klassischen pflanzlichen Zinkfingers publiziert. Die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren sind den Autoren zufolge wahrscheinlich mehr im C-Terminus der Helix und nicht, wie für den Drosophila GAGA-Faktor gezeigt und allgemein für tierische Zinkfinger postuliert, an den Positionen -1/+2/+3, relativ zum N-terminus der Helix. Unabhängig von den genauen Positionen sind die Aminosäuren, die den DNA-Kontakt herstellen, aber immer in der Helix lokalisiert.

WRKY-Proteine weisen wie SUPERMAN und im Gegensatz zu den meisten Zinkfinger-Proteinen nur einen einzelnen Zinkfinger auf, abgesehen von WRKY-Proteinen der Gruppe I, die mit der N-terminalen WRKY-Domäne auch einen zweiten Zinkfinger besitzen. Bei der Bindung zur W-Box scheint jedoch nur der C-terminale Finger funktionell zu sein (Abb. 2). Für WRKY-Proteine lässt sich spekulieren, dass die konservierte WRKY-Sequenz analog zur konservierten QALGGH-Sequenz von SUPERMAN den Kontakt zur DNA vermittelt und so die gleichartige Bindung aller WRKY-Proteine zur W-Box-Kernsequenz TGAC erklärbar wird. Gestützt wird diese Annahme durch die in einer Sekundärstruktur-Analyse für diese Sequenz vorhergesagte α -Helix, die Teil der klassischen $\beta\beta\alpha$ -Struktur sein könnte. Unterschiede in Bindungspräferenzen von WRKY-Faktoren können durch das zusätzliche Faltblatt erklärt werden, das außerhalb der für alle WRKY-Proteine hoch konservierten Region vorhergesagt wird. Die Präferenzen ergeben sich in diesem Modell durch die in diesem Strukturmotiv für Subgruppen spezifische Aminosäureanordnung. Unter Einbeziehung der Primärstrukturanalysen (Abb. 23 u. 24,

A15-A20) ergeben sich weitere Hinweise auf die Bindung der DNA durch die WRKYGQK-Sequenz. Zum einen ist dieser Bereich in allen untersuchten Proteinen besonders hydrophil und zum anderen ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Sequenz an der Oberfläche liegt, hoch, so dass der kurze Bereich der α -Helix in der WRKY-Domäne besonders zugänglich ist. Des Weiteren weist die berechnete Flexibilität der Aminosäuresequenz in Bereichen Maximalwerte auf, in denen zwischen α -Helix und β -Faltblatt bzw. β -Faltblatt und β -Faltblatt für die korrekte Faltung der Tertiärstruktur zum klassischen $\beta\beta\alpha$ -Motiv jeweils eine etwa 180-Grad-Drehung notwendig wäre. Aufgrund dieser Daten kann man eine Struktur postulieren und auch einen DNA-Bindungsmechanismus vorschlagen.

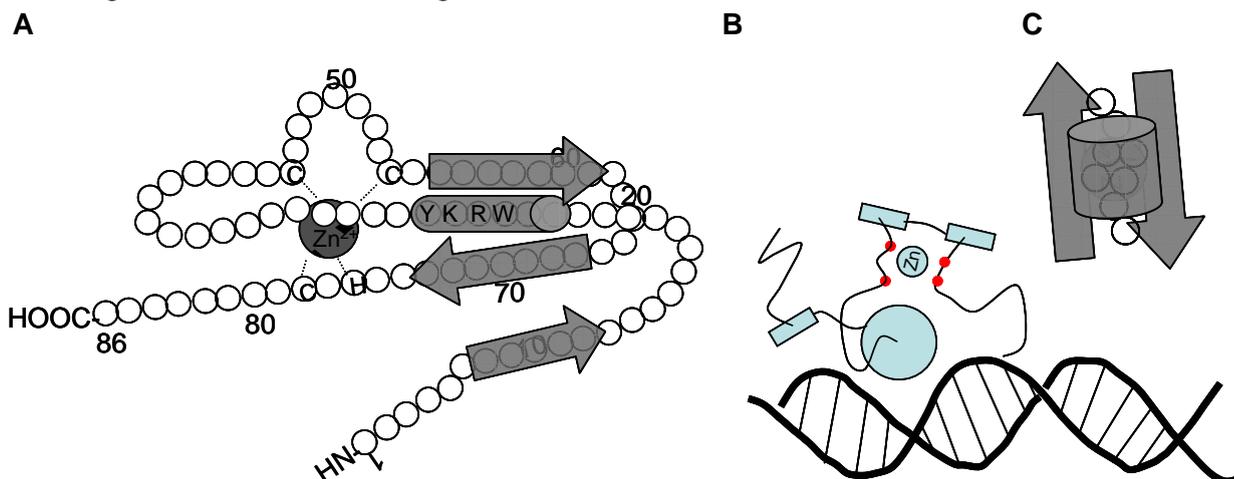


Abbildung 35: Hypothetisches Modell der Tertiärstruktur und zur DNA-Bindung der WRKY-Domäne

Dargestellt ist die putative Tertiärstruktur der WRKY-Domäne, erstellt auf der Basis der Sekundärstrukturvorhersagen (Abb. 23, A14) und durch Vergleich mit den Strukturen von bekannten Zinkfinger-Proteinen. Diese hypothetische Struktur steht im Einklang mit den Primärstrukturanalysen. **A** Mögliche Anordnung der Faltblätter und Helix zueinander. Aminosäuren sind durch Kreise dargestellt, die konservierte WRKY-Sequenz und Cystein und Histidine des Zinkfingers sind durch die entsprechenden Buchstaben gezeigt. Das Zinkion ist als Kugel und die Wechselwirkungen mit dem Zinkfinger durch gepunktete Linien dargestellt, Pfeile repräsentieren β -Faltblätter und die Röhre die α -Helix. **B** Putative DNA-Interaktion der WRKY-Domäne. Die DNA-Helix ist in schwarz dargestellt, die Faltblätter durch Rechtecke, die Helix als großer Kreis, das Zinkion als kleiner Kreis, die Cysteine und Histidine sind rote Punkte. **C** Aufsicht auf die relative Größe und Lage der Helix und Faltblätter zueinander

In diesem Modell bilden die beiden Faltblätter eine Fläche, über der die kurze Helix angeordnet ist (Abb. 35C). Das Zinkion stabilisiert durch Wechselwirkung mit den Cysteinen und Histidinen die Lage der Faltblätter zueinander. In Abbildung 35B wird gezeigt, wie das zusätzliche Faltblatt die Erkennungssequenz erweitern könnte. Die α -Helix des Proteins kontaktiert die DNA und das angrenzende β -Faltblatt erkennt weitere der (TGAC)-Erkennungssequenz benachbarte Basen. Die Helix ist aufgrund der konservierten WRKYGQK-Sequenz invariabel und vermittelt die hochspezifische Bindung an TGAC. Das zusätzliche β -Faltblatt in dem variablen Sequenzabschnitt ermöglicht dann die Erkennung von weiteren, verschiedenen Basen.

Mit diesem Modell lässt sich auch das Bindungsverhalten des C-terminalen Konstruktes von WRKY11 mit den eingeführten Mutationen erklären. Alle Änderungen, die funktionelle

Bereiche wie α -Helix oder β -Faltblatt betrafen, führten zu starker Reduktion der Bindung. Mutationen in unstrukturierten Bereichen hatten keinen Effekt (Abb. 19). Analog dazu führten Mutationen in der QALGGH-Sequenz anderer Zinkfinger auch zum Verlust von DNA-Bindung, oder im Fall der Mutation von Q zumindest zur Reduktion der Bindung (Takatsuij, 1998). Die Mutation von WRKY11-CTDm14, die eine Aminosäure zwischen den vorhergesagten Faltblättern betrifft, verhindert dennoch die Bindung von WRKY11-CTD an die Oligonukleotide. Möglicherweise ist die Toleranz für Änderungen in dieser Sequenz nur sehr gering, da in einem kurzen Sequenzabschnitt eine 180-Grad-Drehung vollzogen werden muss und die etwas größere Aminosäure dies verhindert, entweder durch sterische Behinderung oder durch zusätzliche oder fehlende Wechselwirkungen von Seitenresten. Eine weitere Änderung in WRKY11-CTD (m11), die auf den ersten Blick keinen funktionellen Bereich betrifft, aber dennoch die Bindung reduziert, könnte in einer hydrophoben Tasche liegen, wie sie für klassische Zinkfinger bekannt ist (Isernia *et al.*, 2003). Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin stört vermutlich aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe die Ausbildung der Tasche, auch wenn wieder eine hydrophobe Aminosäure eingeführt wurde.

Es ist aber zu bedenken, dass die mögliche Faltung der Proteine allein noch keine definitiven Antworten auf alle Fragen zur Funktion gibt (Martin *et al.*, 1998). Auch wenn eine Zinkfingerstruktur sehr wahrscheinlich ist und das klassische Faltungsprinzip sogar in Sekundärstruktur-Vorhersagen bestätigt wird, kann die Familie der WRKY-Proteine dennoch eine eigene, von bekannten Zinkfingern unterschiedliche Bindungsstruktur aufweisen. Obwohl die WRKY-Proteine außerhalb der WRKY-Domäne kaum Gemeinsamkeiten aufweisen, kann in diesen Bereichen dennoch eine gemeinsame Struktur vorhanden sein, wie z.B. das vor der WRKY-Sequenz vorhergesagte β -Faltblatt, denn die Struktur eines Proteins ist letztlich robuster als dessen Sequenz. Proteine, die bis jenseits von signifikanten Sequenzähnlichkeiten divergiert sind, können dennoch die gleiche Sekundärstruktur und Tertiärstruktur beibehalten (Chothia & Lesk, 1986, Sander & Schneider, 1991, Wood, 1999).

Die Spekulationen zur Struktur basieren auf computergenerierten Vorhersagen, die mit einer Unsicherheit behaftet sind. Durch Vergleich mit bekannten Zinkfinger-Strukturen und zusätzlichen Untersuchungen der Aminosäuresequenz konnte die postulierte Struktur immerhin bestätigt werden, aber der Einfluss von anderen Proteindomänen auf die Bindung wurde vernachlässigt, da die WRKY-Domäne als funktionell unabhängige Domäne betrachtet wird. Die kleinsten WRKY-Proteine sind kaum größer als die WRKY-Domäne selbst, so dass die grundlegende DNA-Bindung von dieser Domäne alleine vermittelt werden kann. Dies wird unterstützt durch den Befund, dass die C-terminale Domäne von WRKY11 ähnliches Bindeverhalten zeigt wie das Volllängenprotein (Abb. 3). Gleichartiges Bindungsverhalten von Volllängen- und verkürztem Protein stellt keine Ausnahme dar und konnte auch für die Bindung von AtERF-Proteinen (AtERF 1 und 2) an die GCC-Box gezeigt werden (Fujimoto *et al.*, 2000, Hao *et al.*, 1998).

Welche Aminosäuren aber genau die Bindung an DNA verursachen und welche Aminosäuren „nur“ zur Stabilisierung der Tertiärstruktur notwendig sind, bleibt unklar, aber es konnte gezeigt werden, dass fast alle konservierten Aminosäuren auf die eine oder andere Art wichtig für die Bindung sind.

Es ist nicht überraschend, dass die N-terminalen Domänen von WRKY6 und WRKY11 keine Bindung an das 1xW2 Element zeigen (Abb. 2), da sie keine bekannten DNA-

Bindungsmotive enthalten und es unterstreicht die Bedeutung der N-terminalen Bereiche für andere Prozesse. Die N-terminale Domäne von WRKY6 enthält eine sogenannte LRR-Domäne, der im allgemeinen eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen zugewiesen wird. Tatsächlich konnte durch Studien in Hefe gezeigt werden, dass der LRR an der Dimerisierung von WRKY6 Proteinen beteiligt ist (Silke Robatzek, unveröffentlicht). Das Konstrukt der N-terminalen Domäne von WRKY11 enthält die charakteristische Signatur GHARFRR, die der Untergruppe IId gemeinsam ist. Eine Funktion konnte dieser Sequenz bislang noch nicht zugeordnet werden. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch eine Beteiligung an der Bindung und auch an der Ausbildung der Spezifität zu W-Boxen ausgeschlossen werden (Abb. 2D).

Im Gegensatz dazu hat die N-terminale Domäne von WRKY26 vermutlich einen Einfluss auf die DNA-Bindung. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne zwar nicht an W-Boxen bindet (Abb. 2D), aber bisher wurde nicht untersucht, ob eine Bindung an eine (beliebige) andere DNA-Sequenz möglich ist. Für WRKY26-NTD kann das Vorhandensein einer von der W-Box abweichenden Zielsequenz oder aber eine unspezifische Interaktion mit DNA in Betracht gezogen werden. Dies könnte Bindungen von WRKY-Proteinen an DNA-Sequenzen erklären, die keine W-Boxen enthalten (Ishiguro & Nakamura, 1994, Sun *et al.*, 2003). Vor allem die aktuelle Publikation ist bemerkenswert, da dieses Protein zwar eine W-Box-unabhängige Bindung an DNA zeigt. Im direkten Vergleich bindet sie aber deutlich stärker an eine W-Box-Sequenz und da sich die Sonde ohne W-Box durch AT-Reichtum auszeichnet und eine Änderung von jeweils drei Basen nach A die Bindung nur abschwächt, aber niemals aufhebt, in einem Fall sogar verstärkt, könnte es sich hier auch um eine unspezifische Interaktion mit AT-reichen Sequenzen handeln. Für die N-terminale WRKY-Domäne von WRKY26 ist damit übereinstimmend in dem Sekundärstrukturmodell keine Helix vorhergesagt (Abb. A14), so dass sich hier eine andere Erklärung für eine mögliche DNA-Bindung finden müsste als für die C-terminalen Domänen. Auf jeden Fall ist die Interaktion mit DNA auch ohne W-Box möglich; es bleibt die Frage offen, wie spezifisch diese Bindung ist.

Transkriptionsfaktoren können tatsächlich in der Lage sein, zwei verschiedene Zielsequenzen zu erkennen, wie am Beispiel des Trihelix-DNA-Bindeproteins DF1 gezeigt wurde (Nagano *et al.*, 2001). Dieses Protein bindet sowohl an das Element DE1 (TACAGT), als auch an GT2 (GGTAATT), die beide involviert in Licht-/Dunkel-Genregulation sind. Bei den zwei Elementen handelt es sich nicht um ähnliche Sequenzen, man kann also wirklich von einer spezifischen Bindung an zwei verschiedene Elemente sprechen. Die N-terminale WRKY-Domäne könnte dem zufolge aufgrund einer eigenen Zielsequenz oder einer unspezifischen Bindung an AT-reiche Sequenzen in Promotoren durch den N-terminalen Zinkfinger die Ursache für die bessere Bindung der C-terminalen Domäne sein.

Es bietet sich hier ein Vergleich von WRKY-Proteinen der Gruppe I mit GATA-Zinkfingern an. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen genau wie die WRKY-Faktoren zwei Zinkfinger, von denen nur der C-terminale an einer direkten DNA-Interaktion beteiligt zu sein scheint. Der N-terminale Finger kann zumindest in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen mit anderen Proteinen interagieren (Mackay & Crossley, 1998). Denkbar ist demnach, wie bereits erwähnt, die Interaktion von WRKY26 mit anderen Proteinen. Das Auftreten von hochmolekularen Multiprotein-Komplexen, ausschließlich bei gebundenem WRKY26 legt

solch eine Vermutung nahe (Abb. 2C, Abb. 10 u. 14). Die WRKY-Domäne könnte in diesem Zusammenhang, wie beispielsweise die Untereinheit der Kinase CK2, eine Homodimerisierung ermöglichen (Chantalat *et al.*, 1999), und das Dimer dann wiederum als funktionelle Einheit die Bindung an DNA erleichtern oder als Gerüst für weitere Protein-Interaktionen dienen.

Es sind auch andere Funktionen für die N-terminale WRKY-Domäne denkbar. Im Transkriptionsfaktor „Activation Transcription Factor-2“ (ATF-2) wurde eine Zinkfinger-Struktur identifiziert, die nicht an der DNA-Bindung, sondern an Transaktivierung beteiligt ist (Nagadoi *et al.*, 1999). Auch für den Zinkfinger Zap1 wurde von Bird *et al.* (2000) gezeigt, dass er nicht nur an DNA-Bindung beteiligt ist, sondern zusätzlich als Metallosensor agieren kann. Dabei wird durch den Zink-Gehalt die DNA-Bindung entweder direkt oder indirekt über Protein-Protein-Interaktion reguliert. Als Folge wird die Expression von Zink-Transporter-Genen kontrolliert und die eigene Expression bei Zinkmangel induziert (Zhao & Eide, 1996, 1997). So wäre es durchaus möglich, dass die N-terminale Domäne von WRKY26 zwar unter bestimmten Umständen, die noch unbekannt sind, eine DNA- oder Protein-Bindung eingehen kann. Es können aber auch völlig andere Funktionen, z.B. als Transaktivierungsdomäne oder als Sensor für bestimmte Metallionen, in Betracht gezogen werden.

4.3 Die W-Box als regulatorisches cis-Element

Die Bindung an W-Box-Sequenzen ist ein charakteristisches Merkmal für die WRKY-Faktoren. Proteine mit (partiell) deletiertem Zinkfinger können nicht mehr an die DNA binden (de Pater *et al.*, 1996, Ishiguro & Nakamura, 1994). Bereits die Änderung von einzelnen konservierten Aminosäuren in der WRKYGQK-Sequenz sowie den Cysteinen und Histidinen des Zinkfingers führt zum Verlust, zumindest aber zu starker Reduktion der Bindung (Maeo *et al.*, 2001). In Einklang mit diesen Versuchen zeigten auch die in dieser Arbeit eingeführten Mutationen in dem C-terminalen Konstrukt von WRKY11 eine drastische Reduktion der Bindung oder sogar den völligen Ausfall jeglicher Bindeaktivität (Abb. 20).

Als W-Box sind verschiedene Sequenzen definiert, die von, TTGAC bis TGACC oder auch TTGACC/T reichen, gemeinsam ist allen die typische von Rushton und Somssich (1998) beschriebene Kernsequenz TGAC. In Versuchen mit mutierten W-Boxen (Abb. 3) konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der Kernsequenz die Bindung sehr stark reduzieren oder sogar verhindern. Je weiter solche Veränderungen von TGAC nach außen führten, desto weniger drastisch war der Einfluss auf die Bindung. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass nicht jede W-Box mit der TTGACC/T-Basenfolge zumindest *in vitro* gleich gut gebunden wird (Abb. 5 u. 10). Die Art und Kombination der flankierenden Basen entscheidet über die Stärke der Bindung und so wurde schließlich ein Konsensus für gute und schlechte W-Box-Sequenzen für WRKY11 abgeleitet (Abb. 7). Dieser Konsensus ist vermutlich auch für WRKY6 gültig, da beide Proteine das gleiche Bindeverhalten zeigen. Die Konsensussequenz wurde durch Einbeziehen der für die Bindungsvorhersage verwendeten W-Box-Sequenzen (Abb. 9A) in die Konsensus-Matrix überprüft und bestätigt (Abb. A2). Lediglich das G vor der W-Box sowie AT-Reichtum im 3'-Bereich wurde stärker betont. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auch für ZAP1 eine Bindesequenz mit GTTGACC bestimmt wurde (de Pater *et al.*, 1996). Auch bei

der Genaktivierung haben flankierende Basen der W-Box in W2 einen Einfluss (Kirsch *et al.*, 2001). Änderungen in der W-Box-Sequenz TTGACC verursachen dabei die größten Reduktionen in der Reporter-gen-Aktivierung, insbesondere die Änderung von G nach T bzw. A nach C in der Kernsequenz hat nur noch 5% Genaktivität in Vergleich zur unveränderten Sequenz zur Folge. Insgesamt scheinen in diesem Fall Änderungen im 3'-Bereich größeren Einfluss zu haben

Flankierende Sequenzen spielen auch bei der Bindung von Proteinen an die G-Box eine Rolle. In Versuchen mit permutierten Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, dass bestimmte Basen an bestimmten Positionen in flankierenden Bereichen der G-Box einen definierten Effekt haben und die DNA-Bindung negativ oder positiv beeinflussen. Die G-Boxen wurden aufgrund dieser Ergebnisse in drei verschiedene Bindeklassen unterteilt (Williams *et al.*, 1992). Zusätzlich interagiert eine palindromische G-Box mit zwei gleichen Proteinen, wohingegen eine nicht palindromische G-Box eher mit Heterodimeren interagiert und dem Einfluss der flankierenden Sequenz gerecht wird.

Für WRKY-Proteine wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Gruppen mit unterschiedlicher Bindung an DNA beobachtet (Abb. 3 u. 4) und es ist möglich, dass bei der Analyse weiterer Proteine die Anzahl von Gruppen mit unterschiedlichem Bindeverhalten ansteigt. Es liegt die Vermutung nahe, dass WRKY-Proteine der einen Gruppe sensitiver auf Mutationen im 3'-Bereich der W-Box reagieren (WRKY26, 38 und 43), wohingegen die anderen WRKY-Faktoren empfindlicher auf Veränderungen im 5'-Bereich reagieren (WKRY6 und 11). Dies ist auch der Fall, wenn die Mutationen außerhalb der eigentlichen W-Box liegen und nur flankierende Sequenzen betreffen (Abb. 3). Was genau diese Gruppen ausmacht, in Bezug auf die W-Box-Sequenz, muss noch untersucht werden. Dazu ist die Optimierung der Expression der WRKY-Proteine notwendig, um stärkere Signale zu erhalten und wahrscheinlich kann diesen Gruppen mit unterschiedlicher Bindung jeweils eine bestimmte W-Box-Sequenz zugeordnet werden.

Da die W-Box nicht palindromisch ist und WRKY-Proteine im allgemeinen nur einen Zinkfinger aufweisen, kann man annehmen, dass WRKY-Faktoren nur mit einem W-Box-Element in direkter Weise interagieren. Für WRKY-Proteine ist nicht bekannt, wie genau die Spezifität zu W-Boxen gebildet wird, auch wenn das in Abb. 35 postulierte Modell eine Möglichkeit aufzeigt. Des weiteren scheint die Bindung *in vitro* nicht so spezifisch wie die *in vivo* Interaktion zu sein, da WRKY6 *in vitro* an fast alle W-Boxen aus dem *SIRK*-Promotor bindet, aber *in vivo* wird Reporter-genaktivität spezifisch über die dem ATG nächstliegende W-Box induziert und impliziert spezifische Bindung an diese Box (Aifen Zhou, persl. Mitteilung). Eine naheliegende Erklärung sind die artifiziellen Bindebedingungen *in vitro*, die nicht mit den *in vivo* Verhältnissen übereinstimmen und so zu unterschiedlichem Bindeverhalten führen. Die Experimente finden unter definierten Bedingungen (pH, Salzkonzentration, DNA-Gehalt, Proteingehalt) statt und es ist denkbar, dass bereits *in vitro* unter geänderten Bedingungen keine bzw. eine veränderte Bindung an DNA stattfindet. Von dieser Bindung kann deshalb nur eingeschränkt auf *in vivo* Bindung mit einhergehender Genaktivierung geschlossen werden. Aufgrund der Partikelbeschussversuche (Kap. 2.1.10) liegt der Schluss nahe, dass die WRKY-Proteine zusätzlich unterschiedlich stark Genexpression induzieren können (Tab. 4 und 7). Die Stärke der induzierten GUS-Aktivität war zumindest in einigen Fällen (Tab. 7) unabhängig von der *in vitro* Bindungsstärke. Dies ist nicht sehr verwunderlich, denn messbar ist in

diesem System nur die Aktivierung des Reportergens, jedoch ist auch Repression als Funktion der WRKY-Faktoren möglich. *In vitro* wird außerdem die Interaktion mit weiteren Proteinen vernachlässigt, die einen Beitrag zur Bindung oder zur spezifischen Zielsequenz-Erkennung leisten könnten.

Im Fall von W2 konnte mit einer Kopie der Sequenz eine schwache und mit vier Kopien von W2 eine starke Aktivierung von Reporter-genaktivität gemessen werden, die bei allen untersuchten WRKY-Proteinen jeweils etwa gleich stark war. Mit dem Promotor von *SIRK* ergab sich ein deutlich differenzierteres Bild. WRKY6 induzierte wieder starke, WRKY26, 38 und 43 hingegen nur eine schwache Genaktivität. Innerhalb dieser drei Proteine war WRKY43 am schwächsten. WRKY11 kann aus mehreren Gründen nicht in der Lage gewesen sein, Reporter-genaktivität zu induzieren. Zum einen ist es möglich, dass WRKY11 *in vivo* gar nicht bindet, zum anderen könnte zwar eine Bindung möglich sein, aber eine Genaktivität findet nicht statt, oder das Reporter-gen wird nicht aktiviert, sondern reprimiert.

Eine Interaktion mit weiteren Proteinen muss auch als Grund für das unterschiedliche Bindungsverhalten der WRKY-Proteine sowohl untereinander als auch im Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Bindung in Betracht gezogen werden. Es ist auch denkbar, dass zur spezifischen Genaktivierung eine Interaktion mit weiteren in der Umgebung der W-Box gebundenen Faktoren stattfinden muss. Diese Interaktionspartner sind entweder notwendig zur spezifischen Bindung oder sie vermitteln als Adapter z.B. den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie und lösen so die Induktion von Genaktivität aus. Neben Aktivierung ist jedoch, wie erwähnt, auch Reprimierung von Genaktivität möglich. Bei Reprimierung verhindern sie den Kontakt zur Transkriptionsmaschinerie. Das experimentelle Partikelbeschussystem ist hingegen etabliert worden, um Aktivierung von Genen nachzuweisen und limitiert so die nachzuweisenden Interaktionen. Wenn *in vivo* eine Bindung stattfindet, dadurch jedoch lediglich weitere Bindestellen blockiert werden und Genaktivität reprimiert und nicht aktiviert wird, kann dies nicht von nicht-bindenden Proteinen unterschieden werden. Repression lässt sich nur in bestimmten Fällen zeigen. Beim Zusammenspiel von WRKY6 und WRKY11 war dies möglich, da über den *SIRK*-Promotor Reporter-genaktivität durch WRKY6 induziert wurde, die jedoch bei Partikelbeschuss zusammen mit WRKY11 nicht mehr zu beobachten war. Somit kann für WRKY11 eine reprimierende Wirkung postuliert werden.

In bisherigen Studien wurden nur WRKY-Proteine als W-Box-Bindeproteine identifiziert (Ishiguro & Nakamura, 1994, Rushton *et al.*, 1995, 1996) und die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mehrere verschiedene WRKY-Proteine an die gleiche W-Box-Sequenz binden können. Auch die G-Box tritt mit mehr als einem DNA-Bindeprotein in Interaktion. Die Sequenz TGACGTAA kann zumindest *in vitro* von HBP1a und 1b (Tabata *et al.*, 1991), TGA-1a und 1b (Katagari *et al.*, 1989) und ACSTF (Tokuhisa *et al.*, 1990) gebunden werden. Ursprünglich wurde das G-Box Motiv als 12 bp Sequenz beschrieben, aber die generelle Bindesequenz ist genau wie für WRKY-Proteine ein Hexamer. Die Funktionalität des G-Box-Hexamers wurde in Deletionsstudien gezeigt, da die Eliminierung des Hexamers in zwei lichtregulierten Promotoren zu drastisch reduzierten Expressionsleveln führte (Schulze-Leffert, 1989a, Donald & Cashmore, 1990). Dies scheint artenübergreifend zuzutreffen, da Proteine aus *Antirrhinum* (Staiger *et al.*, 1991), Weizen (Guiltinan *et al.*, 1990), Tabak (Oeda *et al.*, 1991) und Petersilie (Weisshaar *et al.*, 1991) an diese Sequenz binden.

Auch hier gibt es eine Parallele zur WRKY-W-Box-Interaktion, die in verschiedenen Pflanzenarten, wie *Arabidopsis* (de Pater *et al.*, 1996), Hafer (Rushton *et al.*, 1995), Petersilie (Rushton *et al.* 1996), Süßkartoffel (Ishiguro & Nakamura), Reis (Kim *et al.*, 2000) und Tabak (Wang *et al.*, 1998) detektiert wurde. Lediglich ein WRKY-Protein aus *Physcomitrella patens*, das heterolog in *E.coli* exprimiert wurde, zeigte keine Bindung an zwei getestete W-Box-enthaltende Sequenzen (D. Wanke, Dissertation 2003). Dafür kann es unterschiedliche Gründe geben. Es wurden zum einen nur zwei verschiedenen W-Box-beinhaltende Sequenzen getestet, so dass für dieses spezielle WRKY-Protein eine andere Affinität vorliegen kann und dementsprechend andere flankierende Bereiche für eine gute Bindung notwendig sein könnten. Des Weiteren könnten posttranslationale Modifikationen notwendig sein oder es werden, wie schon erwähnt, *in vivo* weitere Interaktionspartner benötigt, die *in vitro* fehlen und so DNA-Bindung nicht ermöglichen.

Man kann auch vermuten, dass die Funktionalität des untersuchten *cis*-Elementes für diese Unterschiede verantwortlich sein kann. Rushton *et al.* (2002) konnten jedoch zeigen, dass das von ihnen im transienten System mit Petersilie-Zellkulturen getestete elizitorinduzierbare W2-Element, unabhängig von seiner Herkunft, auch in *Arabidopsis*-Pflanzen eine Pathogenresponsivität aufwies. Die Funktionalität des W2-Elementes ist anscheinend über Artengrenzen hinweg konserviert, und es sollte auch die Bindung von WRKY-Proteinen als *trans*-Faktoren entsprechend konserviert sein. Im Gegensatz zu den Versuchen von Rushton *et al.* (2002), in denen starke synthetische Promotorderivate durch Multimerisierung definierter *cis*-aktiver Elemente verwendet wurden, kamen in den Bindeversuchen hingegen nur einzelne *cis*-Elemente oder maximal zwei verschiedene W-Boxen gemeinsam zum Einsatz. So ist es möglich, dass die Interaktion nur sehr schwach war und daher unter den experimentellen Bedingungen nicht detektiert wurde.

Die funktionelle Konservierung von Promotorelementen über Artengrenzen hinweg kann aber nicht generell postuliert werden. Unterschiede in der Genregulation in Abhängigkeit von dem verwendeten System wurden bei Beilmann *et al.* (1991) und Fujiwara *et al.*, (1991) festgestellt. Die erstgenannte Arbeitsgruppe konnte die in transienten Expressionsversuchen mit Tabak- oder Karotten-Protoplasten eingeleitete Expression des *GUS*-Reportergens in transgenen Pflanzen nicht reproduzieren, obwohl sie für beide Systeme das gleiche Promotorfragment des Tabak *PR-1a*-Gens verwendet hatten. Die zweite Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Promotor des gewebespezifisch exprimierten β -*conglycinin*-Gens (Meinke *et al.*, 1981) im transienten System mit Protoplasten verschiedener Herkunft generell die Expression des Reportergens einleiten kann.

Es gibt viele Hinweise, dass W-Boxen eine wichtige Klasse von *cis*-Elementen sind, die verantwortlich für Pathogeninduzierbarkeit von vielen Pflanzengen sind (Raventos *et al.*, 1995, Rushton *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998, Robatzek & Somssich, 2002). W-Boxen sind funktionell als elizitorresponsive Elemente charakterisiert, die in Promotoren häufig in kombinierter Anordnung, sowohl als Tandem als auch palindromisch, vorkommen (Rushton *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1999, Eulgem *et al.*, 1999). W-Boxen kommen auch in *WRKY*-Promotoren gehäuft vor, was eine Autoregulation vermuten lässt (Dong *et al.*, 2003), wie sie schon für *WRKY18* (Chen & Chen, 2002) und *WRKY6* (Robatzek & Somssich, 2002) beschrieben wurde. W-Boxen können sowohl positiv als auch negativ regulierend wirken (Chen & Chen, 2002, Eulgem *et al.*, 1999), und es gibt verschiedene *WRKY*-Proteine mit unterschiedlichen Affinitäten zu den W-Box-Variationen. Wie in dieser

Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Interaktion sowohl von dem TGAC-Kernmotiv, als auch von den flankierenden Sequenzen bestimmt (Abb. 3, Abb. 5). Unterstützt wird dieser Befund durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Rushton *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 1999, Du & Chen, 2000, Yu *et al.*, 2001, Rushton *et al.*, 2002).

Es taucht nun die Frage auf, wie mit der hohen Anzahl von WRKY-Proteinen und der generellen Bindungspräferenz der WRKY-Proteine zu W-Boxen die Spezifität für bestimmte Promotoren bzw. W-Boxen zustande kommt. Die Spezifität der Interaktion von WRKY-Proteinen wird anhand von W-Boxen aus dem *SIRK*-Promotor deutlich. Dieser Promotor beinhaltet neun W-Boxen, und WRKY15 aktiviert Reporter-Gen-Expression über die am weitesten stromaufwärts gelegene W-Box (TCATTGACTTAG), während WRKY6 die dem ATG nächstliegende W-Box bindet (TTATTGACCAAA) (Aifen Zhou, persl. Mitteilung). Beide Sequenzen beinhalten W-Boxen, die nach bisheriger Definition als „perfekte“ W-Boxen bezeichnet wurden, lösen aber differenzielle Genaktivität aus. Die Bindung an W-Boxen ist auch sehr spezifisch, da z.B. keine Bindung an *as1*-Elementen stattfindet, die wie W-Boxen das Kernmotiv TGAC tragen. (Hara *et al.*, 2000).

Aber nicht für jedes WRKY-Protein gibt es eine eigene W-Box, vielmehr scheinen WRKY-Faktoren in bestimmte Gruppen sortiert werden zu können, die eine ähnliche W-Box-Sequenz binden. Es konnten zwei Gruppen von Proteinen mit verschiedenem Bindeverhalten beschrieben werden (Abb. 4). Diese Gruppierung ist zumindest anhand der untersuchten Proteine nicht den definierten Subgruppen (Abb. A10, Eulgem *et al.*, 2000) zuweisbar. Dies ist nicht überraschend, da die Konservierung in bestimmten Gruppen nichts mit Bindung und Funktionalität zu tun haben muss (Baba *et al.*, 2003).

Die Bindestudien mit mutierten Versionen von W2 (Abb. 3) konnten die zwei Gruppen von Proteinen mit verschiedenem Bindeverhalten deutlich zeigen. Deshalb war die Erweiterung des Konsensus über das bisher definierte Motiv TTGACC/T hinaus nicht generell möglich. Der Konsensus für die einzelnen Gruppen war vermutlich aufgrund der Verwendung von nur einer Sequenz, auch wenn verschiedene Mutationen eingeführt wurden, nicht sehr aussagekräftig. Zur Generierung eines besseren Konsensus wurde die Bindung an weitere W-Box-Elemente in ihrem natürlichen Umfeld, d.h. in Promotoren aus dem *Arabidopsis*-Genom, untersucht. Der aus diesen Versuchen abgeleitete Konsensus TWGTTGACYWWWW für gute Bindesequenzen ist für WRKY11 erstellt worden und ist zumindest auch für WRKY6 gültig, da beide Proteine das gleiche Bindeverhalten mit W2-Variationen zeigen. Aber da andere Proteine in den Bindeversuchen mit veränderten W2-Sequenzen ein abweichendes Bindeverhalten zeigten, sollte für jede Gruppe mit dem gleichen oder ähnlichen Bindemuster ein eigener Konsensus erstellt werden. Ein solcher Konsensus schließt aber nicht aus, dass auch andere W-Box-Sequenzen funktionell sein können. So ist die von WRKY6 zur Genaktivierung benötigte W-Box im *SIRK*-Promotor abweichend von der Konsensussequenz, jedoch kann auch für diese W-Box-Sequenz eine gute Bindung vorhergesagt werden.

Um die Aussagekraft des Konsensus zu untersuchen, wurde dieser mit dem Motif Mapper Programm analysiert. Wenn man postuliert, dass angereicherte Elemente funktionell sind, sollte die Häufigkeit des Auftretens Aufschluss über die Funktionalität geben können. Durch solche Häufigkeitsanalysen konnten schon in *S. cerevisiae* spezifische *cis*-Elemente identifiziert werden, die an der Transkription von rDNA beteiligt sind (Sudarsanam *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit einer Analyse von D. Wanke (Diss., MPIZ 2003) wurde für den weich definierten Konsensus DDTTGACYHND eine

Gleichverteilung von W-Boxen im Promotor- und Genomdatensatz beobachtet. Die Untersuchung des stringenten Konsensus ergab im Gegensatz dazu eine Anreicherung in den Promotordatensätzen, die am stärksten in 600 bp Datensatz ausgeprägt war. Man kann also davon ausgehen, dass dieses Motiv in der Pflanze funktionell ist. Dieser Konsensus wurde fast 200 Mal in Promotoren in *Arabidopsis* gefunden; es handelt sich dabei vermutlich um putative Zielgene der entsprechenden WRKY-Faktoren.

Ähnlich wie WRKY-Proteine binden EREBP-Faktoren sequenzspezifisch an deren *cis*-Element, die GCC-Boxen (Yamamoto *et al.*, 1999, Menke *et al.*, 1999). Innerhalb der Multigenfamilie der AP2/EREBP-Faktoren finden sich die CBF-Faktoren (Riechmann & Meyerowitz, 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 und so von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren gebunden wird und differenzielle Genaktivierung ermöglicht. Rushton *et al.* (2002) konnten zeigen, dass vier sehr ähnliche Sequenzen (S, GCC, JERE, DRE) auch verschiedene Expressionsmuster vermitteln. So führt der Unterschied von genau einer Base zwischen S-Box und GCC-Box zu der geringen Hintergrundaktivität und damit der extrem guten Induzierbarkeit der S-Box. Wenn man annimmt, dass sowohl S-Box als auch GCC-Box von AP2/ERF-Proteinen gebunden werden, sollte die Identifizierung von Bindeproteinen interessante Einblicke in die Vermittlung dieser Spezifität liefern und so vielleicht auch zur Aufklärung der WRKY-W-Box Interaktion beitragen. Die hohe Konserviertheit der W- und GCC-Boxen ist mit einer hohen Spezifität der Bindung, vermutlich durch die hohe Konserviertheit der jeweiligen DNA-Binde-Domänen der WRKY- bzw. EREBP-Faktoren verbunden.

Eine ähnlich hohe Konserviertheit findet sich auch bei den Interaktionen von Faktoren der ARF-Multigenfamilie mit den auxinresponsiven Elementen TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind die DNA-Binde-Motive der MYB-Faktoren sehr viel heterogener (Martin & Paz-Ares, 1997). Dementsprechend ist die Konservierung der DNA-Binde-Domäne im Gegensatz zu WRKY-Proteinen eher auf ein bestimmtes Muster an konservierten Aminosäuren angelegt. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Funktionen der einzelnen MYB-Faktoren wieder und zeichnet sich insgesamt durch eine 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 durch die Aufklärung der Funktion(en) von einzelnen WRKY-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Tendenziell ist ihre Funktion bisher aber als Stressabwehr-Genfamilie zu bezeichnen.

4.4 Regulation von Genexpression über W-Boxen

WRKY-Proteine binden, wie beschrieben, an W-Boxen und üben so ihre Funktion aus. In diesem Zusammenhang ist nicht nur das vereinzelt Auftreten von Elementen von Interesse, auch das gemeinsame Vorkommen mit weiteren W-Boxen oder anderen *cis*-Elementen kann Hinweise auf Funktionalität liefern. Der synergistische Effekt von zwei W-Boxen zur Genaktivierung ist von Eulgem *et al.* (1999) nachgewiesen worden. Eine kooperative Bindung von zwei WRKY-Proteinen an benachbarte Elemente ist mehrfach diskutiert worden (Rushton *et al.*, 2002, Eulgem *et al.*, 1999, Rushton & Somssich, 1998). Auch das häufige gemeinsame Vorkommen von G-Boxen in Promotoren ist beschrieben worden (McKendree *et al.*, 1990, Salinas *et al.*, 1992). Interessanterweise konnte auch eine Anreicherung von benachbarten W- und G-Boxen in Promotoren festgestellt werden, was eine neue Kombination von *cis*-Elementen darstellt (D. Wanke, MPIZ 2003). Zur Funktionalität dieser beiden Boxen gibt es zwar keine Daten, aber es wird vermutet, dass auch diese Kombination ein funktionelles Element darstellt (Rolland *et al.*, 2002). Für einige benachbarte GCC-Box-ähnliche Elemente und W-Boxen ist spekuliert worden, dass diese Kombination funktionell für kooperatives Binden von EREBP- und WRKY-Faktoren ist (Rushton *et al.*, 2002, Eulgem *et al.*, 1999). Es konnte jedoch keine signifikante Häufung dieser Kombination gefunden werden, was eine von den W-Boxen unabhängige Funktion nahe legt (D. Wanke, MPIZ 2003).

Zusammenwirken von *cis*-Elementen

Cis-Elemente können in Kombinationen miteinander auftreten und als funktionelle Einheit eine verbesserte Genregulation ermöglichen. Es kann ein positiver synergistischer Effekt auf die Transkriptionsrate ausgeübt werden, wenn die Proteine gemeinsam und gleichzeitig wirken (Herschlag & Johnson, 1993). Verantwortlich dafür kann die kooperative Bindung der beteiligten Faktoren sein (Gininger & Ptashne, 1988, Ptashne & Gann, 1997). Kooperative Bindung bedeutet, dass bei der Bindung eines Proteins die Affinität zur Bindung eines zweiten Proteins durch direkte oder indirekte Interaktion erhöht wird (Ptashne, 1988, 1992). Yang *et al.* (1999) konnten für WRKY-Proteine aus Tabak zeigen, dass direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfinden, wodurch solche Interaktionen von WRKY-Faktoren bei kooperativen Bindungen in Betracht gezogen werden können. Als Protein-Protein-Interaktionsdomäne ist in Proteinen der WRKY-Gruppen IIa, IIb und III ein Leucinzipper-Motiv identifiziert worden (Eulgem *et al.*, 2000). WRKY-Proteine mit deletiertem Leucinzipper können zwar weiterhin an W-Boxen binden, aber die Aktivierung des *GUS*-Reportergens ist bei Proteinen mit intaktem Leucin-Zipper erheblich höher (Cormack *et al.*, 2002). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen konnte keine solcher Protein-Interaktionsdomänen gefunden werden. Hochmolekulare Banden bei WRKY26 in EMSA-Experimenten legen aber eine Beteiligung der N-terminalen Domäne an Protein-Protein-Wechselwirkungen nahe.

Entscheidend für solche Effekte ist das Vorkommen und die Verteilung der W-Boxen. Das einzelne W-Box-Hexamer ist in Promotoren gegenüber dem Genom nicht oder nur lokal angereichert. In Anbetracht einer möglichen kooperativen Funktion von W-Boxen wurde die Häufigkeit von zwei W-Boxen in definiertem Abstand von 0 bis 30 Basen analysiert. Bei den kombinierten W-Boxen handelt es sich um eine direkte oder indirekte Wiederholung der W-Box Sequenz TTGACY. Dabei fiel auf, dass besonders zwei W-

Boxen mit 0 bis 3 Basen Abstand deutlich in Promotoren angereichert sind. Außerdem sind W-Boxen im Abstand von 9, 14, 19 und 30 Basen überrepräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von zwei W-Boxen in einem Abstand zwischen 0 und 30 ist für jede Kombination gleich hoch, dennoch kommen die W-Boxen in den genannten Abständen häufiger vor als andere, was wiederum eine Funktionalität dieser definierten W-Box-Kombinationen impliziert. Es fällt zusätzlich auf, dass die Häufungen jeweils in 5-6 Basen Abstand auftreten. Das entspricht etwa einer halben Umdrehung der DNA-Doppelhelix und suggeriert die Bindung von WRKY-Proteinen auf gegenüberliegenden Seiten der Helix. Es konnte gezeigt werden, dass der Abstand von zwei W-Boxen zumindest *in vitro* kaum einen Effekt auf die Bindung hat, nur bei einem Abstand von einer Base konnte lediglich eine der beiden W-Box-Bindestellen von WRKY6 oder WRKY11 besetzt werden (Abb. 13). Die biologische Bedeutung ist unklar, aber die Häufung von W-Boxen mit dem geringen Abstand lässt neben der Erkennung von verschiedenen W-Box-Sequenzen eine weitere Spezifitätsbildung vermuten. Die Bildung von multimeren Protein-DNA-Komplexen könnte durch eine definierte Anordnung von W-Boxen einen weiteren Mechanismus zur Regulation darstellen. Dabei spielen sowohl Abstände zwischen den Motiven als auch deren Orientierung in Sinn- bzw. Gegensinn-Richtung eine Rolle. Strukturelemente wie Leucinzipper könnten für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein; alternativ ermöglichen andere noch funktionell unbekannt Strukturen, wie beispielsweise das HARF-Motiv, die Multiproteinkomplexe. Jedes involvierte Protein leistet hier z.B. einen Beitrag zur Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie und erhöht die Effizienz zur Aktivierung von Genexpression. Es können nur Proteine mit einer bestimmten Tertiärstruktur in diesen Komplex aufgenommen werden, wodurch letztlich die Spezifität des Komplexes erzielt wird. Die Kombination von W-Boxen mit anderen *cis*-Elementen, wie beispielsweise der G-Box lässt die Beteiligung von Faktoren aus anderen Proteinfamilien an diesem Protein-Protein-DNA Komplex vermuten.

Generell scheint die Fähigkeit zur Reporter-gen-Aktivierung direkt mit der Anzahl der vorhandenen Elemente zuzunehmen. Rushton *et al.* (2002) konnten anhand verschiedener transgener *Arabidopsis*-Pflanzen mit 1, 2, 4 oder 8 Kopien des W2-Elementes eine steigende GUS-Aktivität nach Elizitorbehandlung zeigen. Die Induzierbarkeit war jedoch bei 2xW2 am höchsten, da mehr Kopien in den anderen Konstrukten auch zu einer deutlich erhöhten Hintergrundaktivität führten. In dieser Arbeit konnte mittels Partikelbeschussversuchen mit W2 und verschiedenen WRKY-Proteinen gezeigt werden, dass auch WRKY-Faktoren mit vier Kopien von W2 eine deutlich bessere Reporter-genaktivität induzieren können als mit dem einzelnen Element (Tab. 6). Die Stärke und die Induzierbarkeit eines Promotors kann also durch variierende Anzahl an Elementen moduliert werden. Auch wenn zwei Aktivatoren in gesättigter Konzentration vorliegen, da sie z.B. wie in den transienten Partikelbeschussversuchen überexprimiert werden und dadurch alle Bindungsstellen besetzt sind, können synergistische Effekte festgestellt werden (Lin *et al.*, 1990, Carey *et al.*, 1990). Die synergistische Wirkung wird hier nicht durch kooperative Bindung, sondern aufgrund multipler Protein-Interaktionen zwischen den gebundenen Aktivatoren und Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erzielt (Sauer *et al.*, 1995a).

In transienten Studien vermitteln 4 Kopien von W2 deutlich stärkere GUS-Aktivität als die gleiche Anzahl von W1-Elementen, obwohl beide mit TTGACC eine „perfekte“ W-Box besitzen (Rushton *et al.*, 2002). Das Element W1 aus dem PR1-1-Promotor wird im Bezug dazu in EMSA-Versuchen auch schwächer gebunden als das W2-Element (Daten nicht

gezeigt). Wenn in den Elementen 4xW1 und 4xW2 die Positionen der W-Boxen jeweils angeglichen werden, so dass in jedem Element die gleichen Abstände zwischen den einzelnen W-Boxen vorliegen und die einzelnen Elemente gleich lang sind, zeigen sowohl 4xW2 als auch 4xW1 sehr ähnliches Verhalten (Rushton *et al.*, 2002). Der Effekt auf 4xW2 ist nur gering, wohingegen die elizitorinduzierbare Reporter-Expression von 4xW1 deutlich verbessert wird. Positionierung des Elementes innerhalb des Promotors relativ zur TATA-Box hatte eine kleine Änderung der Promotorstärke zur Folge, aber kaum Auswirkung auf die Induzierbarkeit (Rushton *et al.*, 2002). Interessanterweise scheint demnach der Abstand der W-Boxen einen wesentlichen Einfluss auf die Stärke des Elementes zu haben, auch wenn die *in vitro* Bindung bei variablen Abständen der W-Boxen in 2xW2 kaum Unterschiede sowohl in Bindungsstärke als auch bezüglich Komplexbildung aufwies (Abb. 13). Dennoch lässt die Anreicherung von zwei W-Boxen in bestimmten Abständen vermuten, dass es sich dabei um eine funktionelle Einheit handelt. So scheint die definierte Anordnung der W-Boxen B und C im *PcWRKY1*-Promotor entscheidend für die schnelle und transiente Expression des Reportergens zu sein (Eulgem *et al.*, 1999). Für zwei direkt benachbarte W-Box-Einheiten des Tabak *CHN50*-Gens wurde nachgewiesen, dass deren Anordnung essentiell für effektives Binden von Proteinen in Kernextrakten ist (Fukuda, 1997). Diese beiden W-Box-Einheiten, die in Tabakpflanzen elizitorresponsiv wirken, befinden sich in umgekehrter Orientierung und sind durch drei Basenpaare voneinander getrennt. Eine Variation des Abstandes zwischen den beiden Einheiten führte zu einer drastischen Reduktion der *in vitro* Bindung von nukleären Faktoren. Da weitere Untersuchungen nahe legten, dass es sich bei den bindenden Proteinen um WRKY-Faktoren handelt (Yang *et al.*, 1999), ist auch diese Beobachtung durch Bindung eines WRKY-Komplexes definierter Struktur zu dem W-Box-Arrangement erklärbar. Solche Unterschiede konnten in dieser Arbeit nicht gezeigt werden; die Ursache hierfür ist vermutlich, dass für die EMSA-Experimente in *E. coli* exprimiertes Protein eingesetzt wurde, wohingegen Yang *et al.* (1999) Kernextrakte verwendeten, die zusätzlich zu WRKY-Proteinen auch mögliche interagierende Proteine enthielten. Die Bildung solcher aus mehreren Transkriptionsfaktoren bestehenden Komplexe an komplexe Arrangements von *cis*-Elementen wurde bereits in einigen Fällen beschrieben (Tjian & Maniatis, 1994). Der genaue Einfluss des Abstandes zwischen den einzelnen Boxen kann aber nur schwer vorhergesagt werden (Wray, 1998), so dass nur die experimentelle Überprüfung des optimalen Abstandes von W-Boxen in einem Promotorkontext bleibt.

Zur Wirkungsweise von zwei kombinierten W-Boxen sind nicht nur kooperative Bindung und/oder synergistischer Effekt zur Genaktivierung denkbar, sondern auch die Regulation von Genexpression durch Blockieren von benachbarten Bindestellen. An zwei sehr nahe gelegenen Elementen könnte dann nur ein Protein binden und dadurch die Bindung des zweiten verhindern. So könnten, je nachdem welches der beiden Proteine gerade bindet, verschiedene Funktionen ausgeübt werden, in einem einfachen Fall die Repression mit dem ersten Protein und Aktivierung mit dem zweiten. Die Kontrolle über das bindende Protein könnte durch das Mengenverhältnis der beiden Proteine zueinander stattfinden, oder über weitere Faktoren, die mittels Protein-Interaktion die Bindung ermöglichen oder verhindern. So konnte gezeigt werden, dass WRKY6 und WRKY11 an die gleichen DNA-Sequenzen binden (Abb. 3, Abb. 10), aber in Partikelbeschuss-Experimenten in *Arabidopsis*-Blättern unterschiedliche Funktionen aufweisen. WRKY6 kann mit fast allen

getesteten Konstrukten die Expression des Reportergens aktivieren, wohingegen WRKY11 nur mit zwei der neun Konstrukte GUS-Expression induziert (Tab. 3 u. 4, Tab. 7). Es ist demnach zwar in der Lage, Gene zu Aktivieren, aber in dem speziellen Kontext mit WRKY6 und dem *SIRK*-Promotor scheint WRKY11 als Repressor zu fungieren. Obwohl die Bindung von WRKY11 und WRKY6 *in vitro* sehr ähnlich war, kann man aufgrund dieser Ergebnisse deutliche Unterschiede bei der Interaktion *in vivo* vermuten. Prinzipiell lassen sich zwei Arten von Repression unterscheiden: aktive und passive (Cowell, 1994, Hanna-Rose & Hansen, 1996). In Maispflanzen scheint Dof2 ein passiver Repressor zu sein, der die transkriptionelle Aktivität von Dof1 negativ reguliert, in dem er um die gleiche Bindungsstelle kompetitiert. Dies wird unterstützt durch die Abwesenheit von einer Repressionsdomäne, die unabhängig von der DNA-Bindung ist (Cowell *et al.*, 1992, 1994, Hanna-Rose & Hansen, 1996). In Soja ist mit dem G-Box Bindeprotein2 ein aktiver Repressor gefunden worden (Liu *et al.*, 1999). Aktive Repressionsmechanismen interagieren mit transkriptionellen Aktivatoren, die wiederum mit der basalen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung treten. Alternativ können Co-Repressoren rekrutiert werden, wie beispielsweise Histon-Deacetylasen zur Modifizierung der Chromatinstruktur, die damit einhergehend die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren an deren *cis*-Elemente verhindern (Pazin & Kadonga, 1997). Also könnte WRKY11 ein passiver Repressor sein, der mit WRKY6 um die gleiche Bindestelle konkurriert und so in Co-Bombardment-Versuchen die Induktion von Genexpression über W-Boxen im *SIRK*-Promotor unterbindet. Die beobachtete Aktivierung oder Reprimierung kann jedoch auch durch unphysiologische Menge der WRKY-Proteine hervorgerufen werden, da bei den Partikelbeschuss-Versuchen das jeweilige WRKY-Protein überexprimiert wird.

Unterschiede zwischen *in vitro* Bindung und *in vivo* Funktion könnten daraus resultieren, dass die Bindung von Protein an DNA abhängig von posttranslationalen Modifizierungen, wie beispielsweise Phosphorylierung, ist (Hunter & Karin, 1992, Schwechheimer & Bevan, 1998). Dies könnte z.T. Bindungsunterschiede von verschiedenen in *E. coli* exprimierten Proteinen erklären, wobei manche Proteine vielleicht eine Phosphorylierung benötigen, andere hingegen unabhängig davon sind. Yang *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die *in vitro* Bindung von *NtWRKY1* und *NtWRKY2* an Zielsequenzen abhängig vom Phosphorylierungsstatus ist. Behandlung mit Phosphatase reduzierte die Bindungsstärke. Funktionelle Unterschiede resultieren aber am wahrscheinlichsten aus Unterschieden in anderen Aspekten der Proteinfunktion, wie z.B. die Kapazität zur Interaktion mit Proteinen der basalen Transkriptions-Maschinerie oder mit anderen regulatorischen Transkriptionsfaktoren.

Für W-Boxen wurde gezeigt, dass sie in Minimalpromotoren die elizitorinduzierbare Genexpression in transienten System in Petersilie verleihen (Raventos *et al.*, 1995, Rushton *et al.*, 1996, 2002, Eulgem *et al.*, 1999), auch die Funktionalität von isolierten W-Boxen zur Vermittlung von pathogeninduzierter Genexpression in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen ist beschrieben (Kirsch *et al.*, 2001, Rushton *et al.*, 2002). Die Deletion der W-Box im *WRKY1*-Promotor hat den Verlust von GUS-Aktivität zur Folge, wenn jedoch im *PR1-1*-Promotor eine W-Box deletiert ist, ist kein Effekt messbar. Die W-Boxen des *PR1-1* Promotors sind also in ihrer Wirkung redundant. W-Boxen können sich in ihrer Funktion demnach auch *in vivo* unterscheiden, was am deutlichsten bei der bereits

erwähnten differenziellen Genaktivierung durch WRKY6 und WRKY15 über verschiedene W-Boxen im *SIRK*-Promotor hervortritt.

Die einzigartige Anordnung von *cis*-regulatorischen Bindestellen, von denen jede einen oder mehrere Aspekte zu einem komplexen Expressionsprofil beiträgt und von spezifischen DNA-Bindefaktoren erkannt wird, ist charakteristisch für jeden Promotor und ermöglicht die Unterscheidung zwischen verschiedenen Genen. Für ein solches Modell spricht auch, dass die Spezifität dadurch vermittelt wird, dass in einer Pflanzenart in einem bestimmten Gewebe unter bestimmten physiologischen Bedingungen nur ein Teil der zahlreichen WRKY-Gene exprimiert wird. Zu einer gegebenen Zeit bindet ein bestimmtes Set von Transkriptionsfaktoren an diese verschiedenen Stellen, und obwohl einige dieser Regulatoren vielleicht ähnliche Typen von Aktivierungs- oder Repressions-Domänen haben, lassen Kontext-(=Primärstruktur)-abhängige, strukturelle Effekte dieser Domänen einen hochmolekularen Nukleoproteinkomplex, genannt Enhanceosom, entstehen (Carey, 1998, Lefstin & Yamamoto, 1998).

Die allosterische Kontrolle der Interaktion von Regulatoren mit ihren Zielsequenzen kann durch subtile Unterschiede in den DNA-Bindestellen genauso wie durch Interaktion von lokal angereicherten *trans*-Faktoren in spezifischen DNA-lokalisierten Komplexen ausgeübt werden (Singh, 1998). Bei WRKY-Proteinen gibt es zum einen verschiedene Gruppen mit unterschiedlicher W-Box-Erkennung (Abb. 4) und innerhalb dieser Gruppen könnten dann zum anderen weitere strukturelle Merkmale, wie beispielsweise Aktivierungsdomänen, für die spezifische Regulation von Genen sorgen. Denkbar sind auch spezifische Wechselwirkungen, die zur Rekrutierung von Proteinen führen und so eine damit verbundene Funktion auslösen.

Genau wie WRKY-Proteine sind auch Homöobox-Gene (ATHB) bisher nur in Pflanzen gefunden worden. Involviert sind sie in pflanzenspezifische Prozesse, z.B. kontrolliert ATHB10 die Differenzierung von Trichomen auf Blättern und Stängel und die Entwicklung von Wurzelhaaren (Rerie *et al.*, 1994, DiChristina *et al.*, 1996). Homöobox-Gene können sowohl aktivieren (ATHB1, Aoyama *et al.*, 1995) als auch reprimieren (OsHox1, Meijer *et al.*, 1997). Verschiedene ATHB-Proteine interagieren mit beinahe identischen Bindestellen als Homodimere, unterscheiden sich aber in der Spezifität für die zentrale Position der Bindungsstelle und binden an die pseudopalindromische Sequenz CAATNATTG. Dabei wird vor allem in der mittleren Position zwischen A/T und G/C unterschieden (Johannesson *et al.*, 2001).

Ähnlich wie WRKY-Proteine binden die Proteine der meisten bekannten HDZip-Gene unter ähnlichen *in vitro* Bedingungen sehr ähnliche DNA-Sequenzen. Dies ist nicht unerwartet, da die Homöodomänen der verschiedenen Proteine sehr ähnlich in der Sequenz sind. Im Gegensatz dazu haben sie aber *in vivo* verschiedene Funktionen. Überexpression von zumindest drei Vertretern führt zu sehr definierten Phänotypen. Die funktionelle Differenz zwischen diesen Proteinen kann wie bei WRKY-Proteinen teilweise durch die graduellen Unterschiede in der Erkennung der Bindestelle erklärt werden. Im Gegensatz zu den WRKY-Proteinen können die Bindungs-Präferenzen von ATHB-Faktoren jedoch anhand ihrer Position im phylogenetischen Baum vorhergesagt werden.

Expression und Aufgaben *in vivo*

Sowohl GCC-ähnliche Elemente (Suzuki *et al.*, 1998 Ohme-Tagaki *et al.*, 2000) als auch W-Boxen (Rushton *et al.*, 1996, Hara *et al.*, 2000) sind in Genexpression als Reaktion auf Verwundung impliziert. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Verwundung und auch Pathogene induzierten Netzwerke der Signaltransduktion einige Komponenten gemeinsam haben. Die GCC-Box (AGCCGCC) wird oft in Promotoren von Verteidigungsgenen gefunden (Ohme-Tagaki & Shinshi, 1995). Ein ähnliches Element dirigiert jasmonsäure- und elizitorresponsive Expression (JERE, AGACCGCC, Menke *et al.*, 1999) und ein weiteres (DRE, TACCGAC) vermittelt Kälte-, Salz- und Trockenstress-Antworten (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Die von Kirsch *et al.*, (2000) identifizierte S-Box (AGCCACC) stellt ein weiteres GCC-ähnliches Element dar, das Expression durch pilzliche Elizitoren vermittelt. Diese Elemente werden von Transkriptionsfaktoren der gleichen Familie gebunden, antworten aber in unterschiedlicher Weise auf Pathogene und Verwundung. Möglich ist, dass einige *cis*-Elemente sowohl Verwundungs- als auch Pathogenresponsivität vermitteln, aber auch eine funktionelle Trennung von Elementen in beiden Signalwegen ist denkbar. Das Vorkommen von Bindestellen für WRKY- oder AP2/ERF-Proteine kann bereits ausreichend für eine solche Pathogeninduzierbarkeit eines Promotors sein (Rushton *et al.*, 2002). Obwohl nicht mehr als ein Element für Pathogen-Induzierbarkeit notwendig ist, enthalten Promotoren meist verschiedene Elemente und wie bereits diskutiert wurde, können mehrere Elemente zur besseren Aktivierung der Expression von Genen beitragen. Für *as-1* Elemente gibt es hingegen Hinweise, dass sie nicht isoliert funktionieren (Rushton & Somssich, 1998).

Rushton *et al.* (2002) konnten zeigen, dass einige pathogeninduzierbare Elemente auf Verwundung reagieren, so dass man von zweifacher Funktionalität und somit von in Pathogen- und Verwundungssignalweg geteilten Elementen ausgehen kann. Sie konnten damit Konvergenz von Resistenz und Verwundung auf der Ebene von einzelnen Promotorelementen demonstrieren. Eine Überlappung in der transkriptionellen Antwort auf bestimmte Elizitoren und mechanischen Stress wurde bereits von Durrant *et al.* (2000) beobachtet. Wahrscheinlich gibt es in diesen Signalnetzwerken gemeinsame Komponenten an einigen Verknüpfungspunkten, die in der Lage sind, Eingaben von multiplen Pfaden zu erhalten (Bent, 2001). Solche Knotenpunkte könnten pathogen- oder wundinduzierbare *cis*-Elemente sein, wie sie beispielsweise im Promotor von *WRKY38* auftreten müssen, da dieser Genexpression durch verschiedenste Stimuli induziert, wie z.B. SA, JA, Ethylen, aber auch Verwundung und Dunkelkeimung. Es gibt weiterhin eine Anreicherung von ACGT-Elementen in diesem Promotor, aber auch W-Boxen sind vorhanden. Es mag sein, dass Signalwege, die über verschiedene Transkriptionsfaktoren verfügen, dennoch das gleiche Zielgen haben. Die Identifizierung von Zielgenen von *WRKY38* wird daher von besonderem Interesse sein, da dies ein an vielen Stressantworten beteiligter Transkriptionsfaktor ist und das Zusammenwirken mit anderen Faktoren mehr Einzelheiten aus der Funktionsweise von Netzwerken aufzeigen wird.

WRKY-Gene unterliegen als typische Transkriptionsfaktoren selbst einer transkriptionellen Regulation. Die Analyse des Expressionsverhaltens ergab eine hohe Komplexität, die sowohl räumlich und zeitlich bedingte gewebespezifische Entwicklungen als auch bestimmte Stresssituationen umfasste. Die Vermittlung der transkriptionellen Kontrolle wird vermutlich nicht von einem multifunktionellen *cis*-Element (Takeda *et al.*, 1999),

sondern von multiplen *cis*-Elementen, die in verschiedenen Promotorbereichen der von *WRKY*-Genen lokalisiert sind (Gough *et al.*, 1995), getragen.

Auffälliges Merkmal des Promotors von *WRKY38* sind aufeinanderfolgende *as1*-verwandte Elemente an den Positionen 670, 710, 721 stromaufwärts von ATG, sowie ein inverses Element bei 673. Zusätzlich gibt es drei weitere Elemente bei 1053, 1089 und 1167. Funktionell sind die *as1*-Elemente mit Responsivitäten zu Auxin, Salizylsäure, Jasmonsäure und H₂O₂ verbunden (Droog *et al.*, 1995, Guevara-Garc *et al.*, 1998, Chen & Singh, 1999, Redman *et al.*, 2002). Eine darüber folgende Aktivierung einiger pathogenresponsiver Gene legt eine Beteiligung dieses Elementes an der Pathogenabwehrreaktion nahe. In Übereinstimmung damit konnten für den *WRKY38*-Promotor Salizylsäure- und Jasmonsäureresponsivitäten festgestellt werden. Ob dafür allerdings tatsächlich der die *as1*-Elemente umspannende Promotorbereich zuständig ist, muss noch bestätigt werden. Als *trans*-Faktoren, die zu *as1*-Elementen binden, wurden bZIP-Faktoren identifiziert (Cheong *et al.*, 1998, Rushton & Somssich, 1998). Interaktionen von bZIP-Faktoren mit *as1*-verwandten Elementen sind an Promotoren pathogenresponsiver Gene wie *PR1* beschrieben (Zhang *et al.*, 1999).

ACGT-Elemente wurden erstmals als „abscisic acid response element“ (ABRE) mit der Sequenz ACGTGGC identifiziert (=G-Box, Guiltinan *et al.*, 1990). Das ACGT-Motiv ist auch in anderen Motiven als der G-Box sind bekannt. Eine Rolle in ABA-Sensitivität wird in Promotoren gewöhnlich durch zwei oder mehr solcher fast identischer Elemente, die in bestimmten Abstand kombiniert sind, vermittelt, da eine Box wahrscheinlich nicht für ABA-Responsivität ausreicht (Ono *et al.*, 1996, Leung & Giraudat, 1998, Kao *et al.*, 1996). G-Boxen gibt es auch in vielen Genen, die nicht auf ABA reagieren (Quatrano *et al.*, 1997), denn G-Boxen vermitteln auch Induktion von Genexpression durch MeJA (Mason *et al.*, 1993), SA (Qin *et al.*, 1994), Auxin (Liu *et al.*, 1994) oder Licht (Donald & Cashmore, 1990). Die Häufung der ACGT-Elemente im Promotor von *WRKY38* und die Induktion der Reporter-Gen-Expression durch SA und JA legt die Beteiligung an solchen Prozessen nahe. Eine potentielle Auxin-Responsivität kann auch für den *WRKY43*-Promotor aufgrund einer Expression in Abscissionszonen am Übergang Stiel/Schote sowie drei mutmaßlicher ACGT-Elemente (Positionen 994, 1810, 1822) diskutiert werden.

ACGT-Elemente können auch gewebespezifische Expression regulieren. Das Motiv *as1* in *Arabidopsis rd29A* ist in Wurzeln für ABA-spezifische Induktion verantwortlich, nicht jedoch in Blättern (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). In Mais *rab17* gibt es fünf ABRE-Elemente, vier davon sind in Keimlingen aktiv, nur 3 in Blättern (Bush & Pages, 1998). ABRE-Elemente bei *WRKY38* können deshalb neben der Induzierbarkeit auch für die wurzelspezifische Expression verantwortlich sein. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. ABRE- und DRE-Elemente sind in Promotoren von kälteresponsiven-Genen angereichert (Chen *et al.*, 2002), jedoch wurde für *WRKY38* keine erhöhte Expression durch Kälte oder Trockenheit festgestellt. Durch die Untersuchung von Promotoren anderer Gene wurden weitere zu dem ACGT-Element identische oder ähnliche *cis*-aktive Elemente identifiziert, die durch andere Signale reguliert werden. Zu diesen Signalen zählen unter anderen das UV-Licht (Schulze-Leffert *et al.*, 1989), die Jasmonsäure (Mason *et al.*, 1993), und das Auxin (Liu *et al.*, 1994, Ulmasov *et al.*, 1995). Zumindest bei UV-Strahlung mit 50mJ konnte eine leicht erhöhte Reporter-Gen-Expression beobachtet werden, so dass die ACGT-Elemente in *WRKY38*-Promotor an den meisten Expressionsmustern beteiligt sein könnten. Erst eine genauere Analyse mit Promotor-Deletionen kann jedoch die Rolle einzelner Promotorbereiche exakt aufzeigen.

Trotz einer ermittelten Ethylen-Responsivität des *WRKY38*-Promotors sind in der Sequenz keine der klassischen GCC-Boxen zu erkennen, die als ethylenresponsive *cis*-Elemente funktionell charakterisiert sind und in zahlreichen Ethylen-regulierten Genen vorkommen (Rushton & Somssich, 1998). GCC-Boxen sind aber nicht alleine ausschlaggebend für Ethylen-Induzierbarkeit, da auch Ethylen-induzierbare Genen ohne solche Motive beschrieben sind (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). Somit könnte ein bisher unbekanntes Element für diese Induzierbarkeit verantwortlich sein. Ethylen spielt eine pleiotrope Rolle bei Pflanzenwachstum und Entwicklung und ist involviert in weiteren Prozessen wie Keimung, Seneszenz, Abscission und Fruchtreifung (Ecker, 1995).

Besonders auffällig war bei *WRKY38* die starke und konstitutive organspezifische Expression in der Wurzel. *WRKY*-Gen-Expression in Wurzeln ist nicht unbekannt und bereits für *SPF1* und die *Arabidopsis*-Vertreter *AtWRKY1/ZAP1* und *WRKY6* demonstriert (Ishiguro & Nakamura, 1994, de Pater *et al.*, 1996, Robatzek & Somssich, 2001). Die in der Datenbank für *WRKY38* gefundenen ATATT-Motive können wurzelspezifische Expression vermitteln (Elmayan & Tepfer, 1995), sind jedoch aufgrund der kurzen Sequenz und des generellen AT-Reichtums in Promotoren nicht sehr spezifisch und relativ häufig. Im Vergleich mit den Promotoren von *WRKY26* und *WRKY43* tritt dieses Element jedoch 3- bis 5-mal häufiger auf, so dass an dieser Stelle über eine Beteiligung dieser *cis*-Elemente an der Wurzelexpression spekuliert werden kann. Des weiteren konnte eine Expression in grünen vegetativen Geweben, die normalerweise schwach detektierbare Reportergenmengen aufwies, durch Verwundung induziert werden. Die beiden mit der PLACE-Datenbank identifizierten QAR-Elemente (AACGTGT) könnten für die bei *WRKY38* beobachtete Wundreaktion verantwortlich sein (Elliott & Shirsat, 1998). Eine Wundresponsivität wurde ebenfalls für *NtWIZZ* und *AtWRKY6* beobachtet (Hara *et al.*, 2000, Robatzek & Somssich, 2001). Cheong *et al.* (2002) unterscheiden weiterhin zwischen frühen und späten Verwundungsgenen, 90% der von ihnen untersuchten Gene sind entweder früh oder spät, nur 10% der Gene sind in beiden Gruppen vertreten. Für *WRKY38* wurde der Zeitverlauf der Induktion nicht im Detail analysiert, da zunächst nur die generelle Induzierbarkeit von Interesse war. Insgesamt zeichnet sich ab, dass *WRKY38* wie alle Gruppe III *WRKY*-Faktoren eine Stress-bezogene Funktion einnimmt, da es durch Hormone und Verwundung induziert werden konnte, in geringem Maß auch durch *Pseudomonas syringae* (DC3000) (nicht gezeigt). Dabei zeichnen sich die Vertreter gerade dieser Gruppe eigentlich durch ihre Responsivität gegenüber Pathogenbefall besonders aus (Dong *et al.*, 2003, Kalde *et al.*, 2003). Die stimulierte *WRKY38* Expression in den genannten Prozessen unterlag, soweit analysiert, einer Beteiligung in den Signalwegen von Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen.

Moleküle wie SA, JA oder Ethylen aktivieren z.T. gleiche, aber auch verschiedene Signalwege. Es gibt Hinweise auf Quervernetzung und Kommunikation in den Signalwegen zur Regulation der jeweils anderen Signalwege (Seo *et al.*, 1997, Shah *et al.*, 1999). Auch die Expression einiger wundresponsiver Gene kann durch Ethylen bzw. Jasmonsäure stimuliert werden (O'Donnell *et al.*, 1996, Titarenko *et al.*, 1997). Die Expression einiger Stress-bezogener Gene ist in Wurzeln erhöht (Chen *et al.*, 2002).

Die Identifizierung von einem *WRKY*-Gen, das besonders bei kombiniertem Stress von Trockenheit und Hitze induziert wird, aber nicht (kaum) bei jeweils individuellem Stress, unterstützt die These, dass es Schlüsselregulatoren in den Stressantworten gibt und die

verschiedenen Stresssignalwege miteinander vernetzt sind (Rizhsky *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang ist die Induktion von *WRKY26* bei Trockenheit, Kälte- oder Hitzestress interessant, allerdings muss dieser Stress mindestens 48 Stunden aufrechterhalten werden.

Auffälliges Merkmal von *AtWRKY26* war weiterhin die Expression in Trichomen von 3 bis 6 Wochen alten Pflanzen. Jüngere und ältere Pflanzen zeigten keine Expression von *AtWRKY26* in diesen Strukturen. Das Trichom ist eine große, verzweigte, einzelne Zelle, die mit bloßem Auge zu erkennen und in den meisten oberirdischen Geweben zu finden ist. Die Trichomentwicklung in *Arabidopsis* kann in drei Ereignisse unterteilt werden, nämlich Initiation, Expansion und Reifung (Oppenheimer *et al.*, 1993). Da *AtWRKY26* vor allem in Trichomen von mindestens 3 Wochen alten Pflanzen exprimiert wird, kann eine Rolle in der Reifung und Expansion angenommen werden. Jedoch scheint die Anzahl und Form der Trichome in (heterozygoten) Mutanten nicht verändert zu sein. Hier sind jedoch ausführlichere Analysen notwendig. Es gibt viele Mutanten, die Form und Abstand der Trichome betreffen, jedoch nur zwei klassische Mutationen, die für die Initiierung von Trichomen notwendig sind. Diese sind *TTG1* (Koorneef, 1981) und der trichomspezifische Locus *GL1* (Koorneef *et al.*, 1982). Diese spielen auch eine Rolle bei Wurzelhaarentwicklung, hier ist statt *GL1* das Gen *WER* an der Regulation beteiligt. *WRKY26* scheint auch spezifisch in Wurzelspitzen von älteren Pflanzen exprimiert zu sein, die Mutante zeigt jedoch auch hier in einer ersten Analyse keine Veränderung der Wurzeln. Mit *ttg2* existiert eine *AtWRKY*-Nullmutante, die durch einen eindeutigen entwicklungspezifischen Phänotyp gekennzeichnet ist (Johnson & Smyth, 1998). Dieser mutante Phänotyp ist dem der *ttg1* Nullmutante analog, die einen defekten *WD40-repeat* Faktor trägt (Walker *et al.*, 1999). *TTG2/AtWRKY44*-Nullmutanten teilen mit *TTG1*-Nullmutanten die reduzierte Trichomentwicklung, die blasse Samenhülle und den Verlust der Produktion von Schleim, nicht jedoch den Verlust von Anthocyan-Pigmentation oder erhöhte Wurzelhaarbildung. *TTG2* wirkt stromabwärts der bereits beschriebenen Initiierungsgene *GL1* und *TTG1* und teilt später eine Funktion mit *GL2* in der Kontrolle des Trichomwachstums. Die Funktion von *TTG1* liegt sowohl in der Differenzierung der Trichome als auch in der Festlegung des Trichommusters sowie in der Biosynthese von Anthocyanen.

Da *WRKY*-Faktoren bisher ausschließlich in Pflanzen bekannt sind, übernehmen sie vermutlich regulatorische Funktionen vor allem in rein pflanzenspezifischen Prozessen, wie es beispielsweise für *AtWRKY26* und die Expression in Trichomen gezeigt werden konnte. 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.*, 2002, Wang *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1999). Dies könnte auch für das in dieser Arbeit untersuchte *WRKY38* zutreffen.

AtWRKY43 konnte kaum detektiert werden, es war im Gegensatz zu den meisten *WRKY*-Genen auch nach Stressbehandlungen keine Expression festzustellen. Unter den untersuchten Bedingungen war es nur mit *JA* sehr spezifisch und lokal begrenzt am Übergang zwischen Stiel und Schote (Abb. 28) induzierbar. Es handelt sich dabei vermutlich um die kollabierten Nektarien in der Abscissionszone der Blütenorgane (Fordham-Skelton *et al.*, 1997, Fernandez *et al.*, 2000). Ohne *JA* Behandlung war die Expression nur schwach und oft erst in späten Stadien zu sehen. Dies lässt eine

Verbindung zwischen Seneszenz- und Gewebereifungsprozessen vermuten (Bleecker & Patterson, 1997). Die Expression vieler Seneszenz-assoziiierter Gene ist durch Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen induzierbar (Tucker *et al.*, 1988, Park *et al.*, 1998, Quirino *et al.*, 2000). Ausreifung reproduktiver Organe, sowie Abscission und Seneszenz sind eng mit programmiertem Zelltod verknüpfte Prozesse (Jones & Dangl, 1996, Lam *et al.*, 1999), der wiederum in Verbindung zu Pathogenabwehr gebracht werden kann und in die weitere WRKY-Faktoren involviert sind (Rushton *et al.*, 1995, de Pater *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1997). So kann für *AtWRKY43* nicht ausgeschlossen werden, dass es eine abwehrbezogene Funktion ausübt, jedoch müssen die Bedingungen erst noch gefunden werden, unter denen diese Gen induziert wird. Denkbar ist beispielsweise die spezifische Induktion durch pilzliche Erreger, die in dieser Arbeit nicht getestet wurden.

Biologische Relevanz

Genetische Redundanz spielt sowohl in Tieren als auch in Pflanzen eine wichtige Rolle in regulatorischen Signalketten (Molin *et al.*, 2000). Bei der Analyse von Genfunktionen unter Vertretern einer Genfamilie sollte deshalb funktionelle Redundanz beachtet werden (Scheres, 1998, Vision *et al.*, 2000, Riechmann & Ratcliffe, 2000). Obwohl das Ausbleiben eines mutanten Phänotyps deshalb schnell zu der Annahme verleitet, dass es sich bei dem untersuchten Gen um ein nicht essentielles Gen für den entsprechenden Organismus handeln könnte, sollten diesbezüglich andere Erklärungsansätze nicht außer Acht gelassen werden (Tautz, 2000). Zum einen kann nie ausgeschlossen werden, dass die geeigneten experimentellen Bedingungen, unter denen der Organismus aufgrund der Nullmutation einen subtilen Phänotyp zeigt, nicht untersucht wurden. Andererseits gibt es Gene, die nur eine geringe Auswirkung auf den Phänotyp des Organismus haben, oder nur einen molekularen Phänotyp zeigen. Die Mitglieder einer Genfamilie liegen in der Regel im ganzen Genom verstreut vor, so dass synchrone segmentale Duplikationen, die eine Mehrheit von Genen innerhalb einer Genfamilie betreffen, eher selten sind (Lynch & Conery, 2000). Chromosomale Sequenzvergleiche mit der verfügbaren genomischen Sequenz aus *A. thaliana* haben gezeigt, dass das Genom dieser Art mindestens vier Runden kompletter Duplikation durchlaufen haben muss (Simillion *et al.*, 2002). Das Ausschalten eines einzelnen Transkriptionsfaktors kann zwar wie bei den Blütenidentitätsgenen einen offensichtlichen morphologischen mutanten Phänotyp verursachen, dennoch ist dies nicht immer die Regel. Da WRKY-Transkriptionsfaktoren in einer großen Multigenfamilien angelegt sind, deutet dies schon auf potentielle genetische Redundanzen einzelner Vertreter hin.

Ein Beispiel für überlappende Aktivierung von Zielgenen durch WRKY-Transkriptionsfaktoren ist die Rezeptorkinase *SIRK/FRK1* (Robatzek & Somssich, 2002, Asai *et al.*, 2002). Von Robatzek und Somssich (2002) konnte *SIRK/FRK1* als Zielgen für *AtWRKY6* identifiziert werden. Unabhängig davon wurde in einem System, das Protoplasten aus Mesophyllzellen von *Arabidopsis* zur transienten Expression verwendet (Kovtun *et al.*, 2000), die spezifische Aktivierung von *SIRK/FRK1* durch *AtWRKY29* gezeigt (Asai *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass unter den gleichen Bedingungen auch *AtWRKY22* in der Lage war, die Expression von *SIRK/FRK1* zu induzieren und somit redundant zu *AtWRKY29* ist (Asai *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass der Signalübertragungsweg nur über bestimmte der neun W-Boxen des *SIRK/FRK1*-Promotors abläuft und für die Aktivierung der Expression keine simultane Bindung von *AtWRKY6* und *AtWRKY22* oder *AtWRKY29* an mehrere W-Boxen gleichzeitig nötig ist

(Aifen Zhou, persl. Mitteilung, Asai *et al.*, 2002). Eine funktionelle Redundanz gilt aber nicht zwingend für alle WRKY-Faktoren, wie der morphologische Phänotyp der *ttg2/WRKY44* Nullmutante verdeutlicht (Johnson *et al.*, 2002). Mittlerweile sind viele weitere WRKY-Nullmutanten in *Arabidopsis* identifiziert worden. Zu den meisten fehlt jedoch die Beschreibung eines (möglichen) vorhandenen Phänotyps.

Die Analyse von Nullmutanten ist ein hilfreiches Element bei der Charakterisierung von Genprodukten, insbesondere bei Transkriptionsfaktoren. Durch das Fehlen eines Transkriptionsfaktors, der ein wichtiges Kontrollelement in der Regulation der Genexpression darstellt, kann es zur veränderten Expression von Genen kommen. Dies kann sowohl primäre als auch sekundäre Zielgene betreffen. Infolge dessen kann eine Störung pflanzlicher 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 offensichtlichen mutanten Phänotypen führen (Sessions & Yanofsky, 1999). Diese Tatsache trifft wahrscheinlich auch auf Vertreter der WRKY-Genfamilie aus *A. thaliana* zu.

Auch für die in dieser Arbeit näher untersuchten WRKY-Proteine fehlen Informationen über Funktion(en) und Zielgene. Deshalb wurde in den bekannten Datenbanken nach Insertionslinien für die entsprechenden Gene gesucht. Für WRKY38 konnte jedoch in keiner Datenbank eine potenzielle Nullmutanten-Linie identifiziert werden. Für die WRKY-Faktoren 26 und 43 wurden in den Enhancer Trap-Linien aus dem Labor von Robert Martienssen (Cold Spring Harbor Laboratory, Arabidopsis Gene Trap Stock Center) die zwei Linien ET1705 (WRKY26) und ET5604 (WRKY43), gefunden. Diese Linien wurden nach homozygoten Pflanzen durchsucht.

Für *AtWRKY43* konnten zwei Linien identifiziert werden, die bezüglich der T-DNA Insertion homozygot sind. Für *AtWRKY26* scheint jedoch immer zumindest ein *WRKY26*-Allel überlebenswichtig zu sein, so dass lediglich heterozygote Linien identifiziert werden konnten (nicht gezeigt). Unterschiedliche Generationen der Mutanten wurden auf Segregation hin untersucht. Dazu wurden pro Linie für 150 bis 200 ausgebrachte Samen das Verhältnis von überlebenden zu nicht überlebenden Pflanzen ausgezählt. Die homozygoten Linien der *AtWRKY43*-Nullmutanten entsprachen der Erwartung, abgesehen von einzelnen nicht gekeimten Samen konnten alle Pflanzen auf dem Selektionsmedium wachsen. Die heterozygoten Linien der *AtWRKY26* Mutanten hingegen zeigten auch in späteren Generationen noch eine Segregation, bei der die Hälfte der Pflanzen nicht auf Selektionsplatten überlebensfähig war. Erwartungsgemäß sollten 25% der Pflanzen eingehen, was der Anzahl an homozygoten Wildtyppflanzen ohne Resistenzmarkergenen entspricht. Da aber weitere 25% an Pflanzen sterben, kann man annehmen, dass es sich dabei um homozygote Mutanten von *AtWRKY26* handelt. Sehr wahrscheinlich hat der vollständige Verlust von *AtWRKY26*-Transkripten einen lethalen Effekt in der frühen Entwicklung zur Folge. Des Weiteren kann ein semi-dominanter Effekt dieser Mutation diskutiert werden, aufgrund dessen heterozygote Pflanzen überlebensfähig sind, homozygote Mutanten jedoch eingehen.

Defekte bei der Samenbildung sind nicht sehr wahrscheinlich, da sowohl die Samen als auch die Schoten in Anzahl, Form und Farbe nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren.

Die Pflanzen mit Insertionen wurden auch auf Expression des jeweiligen WRKY-Gens untersucht (Daten nicht gezeigt). Für die homozygote *AtWRKY43*-Nullmutante konnte

kein Transkript detektiert werden. Die heterozygoten Mutantenlinien von *AtWRKY26* zeigten erwartungsgemäß einen sehr schwachen Transkript-Level. Diese Expression konnte durch Vergleich mit der PCR-Produktmenge mit Wildtyp-RNA als sehr gering eingestuft werden. So kann man hier zwar nicht von einer Nullmutante reden, aber durch den sehr stark reduzierten mRNA-Level können sich dennoch Auswirkungen auf die Funktionen in der Pflanze ergeben.

Sowohl die *WRKY43*-Nullmutanten als auch die heterozygoten *WRKY26*-Mutantenlinien wurden in ersten Untersuchungen auf einen möglichen morphologischen Phänotyp hin untersucht. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung, bis zum Beginn des Blühens. Das Höhenwachstum und auch das Öffnen der Blüten war jedoch bei *AtWRKY26*-Mutanten verzögert. Es handelt sich nur um einen kleinen Unterschied von einigen Stunden bis zu einem Tag im Langtag und 1 bis 2 Tage im Kurztag.

Eine Beteiligung von *AtWRKY26* an der Blütenöffnung ist demnach wahrscheinlich. Die auffällige Verzögerung des Blühens der Mutanten könnte auf die geringeren Transkriptmengen zurückzuführen sein. Der generelle Mechanismus in Pflanzen scheint dabei die Beibehaltung der vegetativen Phase zu sein, d.h. die Blütenbildung wird im allgemeinen unterdrückt (Sung *et al.*, 2003). Verzögertes Blühen wurde in Pflanzen gefunden, in den das Gen *CONSTANS* (*CO*) nicht mehr funktionell ist (Putterill *et al.*, 1995), aber auch saisonale Faktoren wie z.B. die Temperatur (Poethig, 2003) regulieren die Transition zum Blühen.

Eine Erklärung für das verzögerte Blühen in *WRKY26*-Mutanten könnte die Interaktion von *WRKY26* mit *CO* oder einem anderen (Schlüssel)Gen für die Blühinduktion sein. Allgemeiner ausgedrückt könnte eine Wechselwirkung mit einer oder mehreren Komponenten in dem Signalweg zur Blühinduktion stattfinden. Dies sind jedoch nur vorläufige Erkenntnisse, die weiter überprüft werden müssen.

Für *AtWRKY43*-Nullmutanten wurde kein offensichtlicher Phänotyp gefunden, hier sind weitere Analysen notwendig. Die Analyse der Filter-Hybridisierung legt überlappende Funktionen zu anderen *WRKY*-Faktoren nahe. Die nächsten Untersuchungen sollten die mit den Promotor::*GUS*-Linien beobachtete Expression und die Schotenbildung und -reifung einbeziehen.

Die Abwesenheit eines eindeutigen makroskopischen mutanten Phänotyps der *AtWRKY43* Nullmutanten kann zum einen durch eine genetische Redundanz bedingt sein (Abb. 30). Da *WRKY43* als eines der kleinsten *WRKY*-Proteine vermutlich nur eine oder wenige Funktionen erfüllen kann und dementsprechend nur in Abscissionszonen zu detektieren ist (Abb. 28), wird der Verlust des Genproduktes entweder kompensiert, oder die Umstände, unter denen *AtWRKY43* essentiell sein könnte, kommen unter Laborbedingungen nicht vor.

4.5 Ausblick

Die bisher vorliegenden Resultate bedürfen erweiterter und fortführender Experimente. Dies betrifft auf der einen Seite die transkriptionelle Regulation der Gene von *WRKY26*, *38* und *43* und auf der anderen Seite die Funktion der genannten *WRKY*-Faktoren. Ein erster Schritt kann dabei die Analyse der Transkript-Level der genannten Gene in Schlüsselmutanten aus verschiedenen Signalwegen, die sowohl Hormon- als auch

Resistenzsignaltransduktion betreffen, sein. Dafür können die Resistenz-Mutanten *ndr1* (Century *et al.*, 1995), *cpr5* (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 transgene Salizylsäure-defizienten *nahG*-Pflanzen (Gaffney *et al.*, 1993) ausgewählt werden, die eine gute Abdeckung der zum Teil parallelen und zum Teil miteinander vernetzten Signalwege in der Pathogenabwehr erlauben. Mit diesen Experimenten kann man die Gene in bestimmte Signaltransduktionswege einordnen und erhält nähere Hinweise auf eine mögliche Funktionsweise und Interaktionspartner.

Auf der Suche nach Zielgenen kann mit den überprüften homozygoten WRKY-Nullmutanten-Linien und den überexprimierenden Linien im Vergleich mit dem Wildtyp zusätzlich eine differenzielle-Genexpressions-Analyse (cDNA-AFLP) durchgeführt werden. Gene mit reduziertem oder erhöhtem Expressionslevel sind putative Zielgene und können weiter analysiert werden. Ein alternativer Weg zur Identifizierung primärer Zielgene wäre auch die direkte Reinigung von Protein-DNA-Komplexen mittels Chromatin-Immuno-Präzipitation (X-ChIP) mit Epitop- oder WRKY-spezifischen Antikörpern. Für letztere ist eine optimierte heterologe Proteinexpression notwendig, die beispielsweise für WRKY26 eine Aufreinigung des Proteins ermöglicht und dann die Herstellung spezifischer Antikörper gegen WRKY26 erlaubt. Über X-ChIP können auch Informationen zu den *in vivo* gebundenen DNA-Zielsequenzen gewonnen werden und in Kombination mit dem Motif Mapper Programm ist die Identifizierung putativer Zielgene möglich. Ein weiterer Aspekt ist in diesem Zusammenhang der Vergleich der *in vivo* gebundenen DNA-Sequenz mit den *in vitro* bestimmten Bindemotiven, um die Gültigkeit der Konsensusmotive, die auf *in vitro* Bindungen basieren, zu validieren.

Für *AtWRKY26*-Mutanten sollte der in dieser Arbeit beobachtete Phänotyp mit *AtWRKY26*-Mutanten aus anderen unabhängigen Populationen verglichen werden, oder falls weiterhin nur heterozygote Mutanten identifiziert werden können, sollten Nullmutanten mit induzierbarer RNAi-Technologie hergestellt werden. Diese sollten den beobachteten Phänotyp bestätigen, falls dieser tatsächlich auf die reduzierten Expressionslevel von *AtWRKY26* zurückzuführen ist. Die auftretende Segregation der Nullmutanten-Linien auch in der T3-Generation bedarf sicherlich weitere Untersuchungen, falls sich dies bei unabhängigen Nullmutanten bestätigt. Des Weiteren ist auch die Herstellung von Doppel- und Tripelmutanten denkbar, da *AtWRKY26* zusammen mit *AtWRKY25* und *AtWRKY33* eine Untergruppe im phylogenetischen Stammbaum bildet (Abb. A15) und diese Proteine somit zumindest teilweise redundante Funktionen haben können. Bisher wurde in Mutanten-Kollektionen keine Nullmutante des *AtWRKY38*-Gens gefunden. Für *AtWRKY38* wäre daher die Generierung einer Nullmutante über RNAi-Technologie eine alternative Strategie.

Zur weiteren Analyse der Expression kann mittels Promotor-Deletionsstudien untersucht werden, welche Promotorbereiche für Expression in bestimmten Geweben oder die Induzierbarkeit durch verschiedene Behandlungen verantwortlich sind. So können wichtige funktionelle *cis*-Elemente identifiziert werden und vielleicht kann auch das Zusammenspiel von verschiedenen *cis*-Elementen beleuchtet werden und Einblicke in die transkriptionelle Regulation ermöglichen.

Die *in vitro* Interaktion von WRKY-Proteinen mit der W-Box ist in dieser Arbeit untersucht worden und der nächste Schritt sollte nun die Beobachtung der Interaktion *in planta* sein. Dazu könnten die in dieser Arbeit gezeigten transienten Studien weitergeführt werden, um

den Effekt von weiteren Mutationen in W2 auf die Reporter-gen-Aktivierung detaillierter zu untersuchen. Dies schließt die Messung der Reporter-gen-Aktivität für genauere Vergleiche ein. Die genaue Bestimmung der Bindesequenz für einzelne WRKY-Proteine sollte in Zukunft differenzielle Genexpressionsstudien ergänzen und durch Promotoranalysen mit dem Motif Mapper Programm schnelles Herausfiltern von wahrscheinlichen Zielgen-Kandidaten ermöglichen.

Es ist auch denkbar, die Reporter-gen-Konstrukte stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen zu transformieren und mit diesen Linien veränderte Induzierbarkeit des Reporter-gens bei verschiedenen Stimuli zu vergleichen (Vgl. Rushton *et al.*, 2002). Umgekehrt ist es auch von Interesse, die transienten Partikelbeschuss-Versuche mit dem unveränderten W2-Element und mutierten Versionen des Proteins WRKY11-CTD durchzuführen. Für diese Versuche könnte es vorteilhaft sein, mit zwei Kopien des DNA-Konstruktes zu arbeiten, da diese höhere GUS-Aktivität aufweisen. Hier kann auch analysiert werden, inwie weit die verschiedenen C-terminalen Konstrukte von WRKY11 das Reporter-gen aktivieren können. Man kann also nicht nur die Bindung/Genaktivierung untersuchen, sondern auch Domänen bezüglich ihrer Beteiligung als Aktivator analysieren. Auch die Fähigkeit zur Repression der Genaktivierung durch WRKY6 im *SIRK*-Promotor sollte mit diesem deletierten Protein untersucht werden. So können nützliche Informationen über funktionelle Domänen und deren Zusammenwirken in WRKY-Faktoren gewonnen werden. Möglicherweise ergeben sich so auch generelle Einblicke in die Funktionsweise von Transkriptionsfaktoren.

5 Zusammenfassung

WRKY-Proteine sind Transkriptionsfaktoren einer pflanzenspezifischen Multigenfamilie, mit in 74 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*. Alle Vertreter sind bis auf die konservierte WRKY-Domäne strukturell sehr verschieden. Die WRKY-Domäne besteht in ihrem C-terminalen Teil aus einem CCH(H/C)-Zinkfinger und ist in ihrem N-terminalen Bereich durch das hochkonservierte und namensgebende Motiv WRKYGQK gekennzeichnet. Beide Strukturen sind an der DNA-Bindung beteiligt. Parallelen zu klassischen Zinkfingern lassen vermuten, dass die Spezifität der Bindung z.T. durch die WRKYGQK-Sequenz vermittelt wird und der Zinkfinger zur Stabilisierung der Tertiärstruktur beiträgt. WRKY-Faktoren binden sequenzspezifisch an W-Boxen, als das zugehörige *cis*-Element. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht nur das W-Box-Hexamere, sondern auch flankierende Basen entscheidend für die spezifische Erkennung sind. WRKY-Proteinen können in verschiedene Gruppen mit bestimmten W-Box-Präferenzen eingeteilt werden, dabei bilden WRKY6 und 11 und die WRKY-Proteine 26, 38 und 43 jeweils eine Gruppe mit ähnlichem Bindeverhalten. Deshalb konnte die W-Box-Definition nicht allgemein im 5'- und im 3'-Bereich jeweils um 3 Basen erweitert werden, um diesen Einfluss einzuschließen. Es wurde hier nur für die Gruppe mit WRKY11 und WRKY6 die Bindesequenz als TWGTTGACYWWW bestimmt. Die funktionelle Relevanz dieser Sequenz wurde mit dem Motif Mapper Programm analysiert. Dieses Motiv war in Promotoren gegenüber dem Gesamtgenom angereichert und ist deshalb sehr wahrscheinlich auch in Pflanzen funktionell.

Die Regulation der Genexpression durch WRKY-Proteine kann sowohl über die spezifische Erkennung einzelner W-Boxen laufen, als auch über das Zusammenwirken kombinierter W-Boxen. W-Boxen im Abstand von 0 bis 3 Basen sind in Promotoren deutlich angereichert und implizieren eine regulatorische Funktion. Weitere W-Box-Kombinationen in bestimmten Abständen, die jeweils einer halben Umdrehung der DNA-Helix bzw. einem mehrfachen davon entsprechen (9, 14, 19 und 30 Basen Abstand), sind genauso angereichert. Dies lässt die Beteiligung von Multi-Protein-Komplexen an der Genregulation vermuten.

Partikelbeschuss-Experimente mit dem W2-Element als Reporter- und verschiedenen WRKY-Proteinen (WRKY6, 11, 26, 38 und 43) als Effektorstrukturen zeigten die Fähigkeit der untersuchten Proteine, generell Reporter-Expression aktivieren zu können. Für alle Proteine zeigte sich eine gleich starke GUS-Aktivität, die durch Kombination mehrerer W2-Elemente verstärkt werden konnte. Mit dem Promotor von *SIRK*, einem Zielgen von *AtWRKY6*, bzw. mit Fragmenten aus diesem Promotor ergab sich ein deutlich differenzierteres Bild. Die WRKY-Proteine haben hier die Fähigkeit, die Expression des Reportergens unterschiedlich gut zu aktivieren, bzw. für WRKY11 kann eine reprimierende Wirkung diskutiert werden. Die *in vitro* Bindung an DNA ist nur in manchen Fällen mit der *in vivo* Genaktivierung zu korrelieren. Es kann vermutet werden, dass weitere Domänen und/oder Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig bei der Ausübung der Funktion sind.

Funktionell sind Vertreter der WRKY-Multigenfamilie bei der Regulation diverser pflanzlicher Prozesse beteiligt. Diese sind unter anderem Stress-assoziierte Prozesse in der Pathogenabwehr und Verwundung sowie entwicklungspezifische Prozesse in der

Trichom-Differenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus jeder Hauptgruppe ein Vertreter der *AtWRKY*-Multigenfamilie (*WRKY26*, *WRKY38*, *WRKY43*) ausgewählt, um Fragen zur Regulation und Funktion der *WRKY*-Proteine nachzugehen.

Im Konsens mit der Funktion als Transkriptionsfaktoren zeigten die untersuchten *WRKY*-Proteine eine konstitutive Lokalisierung im Zellkern. Für *WRKY26* und *WRKY38* wurden mutmaßliche NLS des Typl in der Primärsequenz detektiert.

Ein etwa 2 kb großes Promotor-Fragment wurde zur Analyse des Expressionsmusters in verschiedenen Geweben und nach verschiedenen Behandlungen eingesetzt und zeigte für die *WRKY*-Gene sehr unterschiedliche Profile auf. *WRKY26* zeichnet sich durch Expression in Trichomen von 3-5 Wochen alten Pflanzen aus, weiterhin war in Wurzelspitzen von 5 Wochen alten Pflanzen eine Reporter-gen-Aktivität nachzuweisen. Induzierbar war die Expression durch Kälte, Trockenheit und z.T. auch durch Hitze. Eine Beteiligung an Entwicklungsprozessen kann als Hauptmerkmal festgehalten werden. Für *WRKY38* konnte vor allem Induzierbarkeit durch SA, JA, Ethylen, Flagellin, Verwundung und in geringerem Maße auch durch UV-Behandlung gezeigt werden. In Wurzeln von vor allem jungen Pflanzen war hohe Expression zu sehen. Somit ist *WRKY38* hauptsächlich in Stress-/Pathogen-assoziierten Signalwegen involviert. *WRKY43* war im Gegensatz dazu kaum zu detektieren, lediglich in älteren Pflanzen konnte durch JA eine Expression am Übergang von Schote zu Stiel induziert werden. Ohne Behandlung war diese Reporter-gen-Aktivität nur sehr schwach. Für *WRKY43* ist eine Seneszenz-/Fruchtreifungsfunktion sehr wahrscheinlich.

Die Nullmutanten Analyse von *WRKY43* lieferte jedoch, womöglich aufgrund funktioneller Redundanz, keinen sichtbaren Phänotyp, wohingegen für die *WRKY26*-Nullmutante gegenüber Wildtyp-Pflanzen verzögertes Blühen beobachtet wurde.

Kurzzusammenfassung

WRKY-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die charakteristischerweise aus einem Zinkfinger und dem konservierten WRKYGQK-Motiv bestehen. Parallelen zu klassischen Zinkfingern lassen vermuten, dass die Spezifität der DNA-Bindung durch die WRKYGQK-Sequenz vermittelt wird. WRKY-Faktoren binden spezifisch an das W-Box *cis*-Element, wobei flankierende Basen entscheidend für die Erkennung sind. WRKY-Proteine bilden verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen W-Box-Präferenzen. Für WRKY11 und WRKY6 wurde die Bindesequenz als TWGTTGACYWWW bestimmt, deren funktionelle Bedeutung mit dem Motif Mapper Programm bestätigt wurde, da eine Anreicherung in Promotorregionen gegenüber dem Gesamtgenom vorlag. Partikelbeschuss-Experimente mit dem W2-Element, das TTGACC umfasst, als Reporter- und den WRKY-Proteinen 6, 11, 26, 38 und 43 Effektoronstrukten zeigten generelle Reporterogen-Aktivierung. Mit dem Promotor von *SIRK*, einem Zielgen von *AtWRKY6*, ergab sich ein differenzierteres Bild. WRKY-Proteine haben die Fähigkeit, die Expression des Reportergens unterschiedlich gut, sowohl positiv als auch negativ, zu regulieren. Die Regulation durch WRKY-Proteine kann über die Erkennung einzelner W-Boxen oder das Zusammenwirken kombinierter W-Boxen laufen. W-Boxen im Abstand von 0 bis 3 Basen sind in Promotoren deutlich angereichert, genauso wie weitere W-Box-Kombinationen in Abständen, die jeweils einer halben Umdrehung der DNA-Helix oder einem Mehrfachen davon entsprechen. Die Anreicherung impliziert Funktionalität. Drei WRKY-Gene (26, 38 und 43) wurden weitergehend analysiert. Diese WRKY-Proteine zeigen eine konstitutive Lokalisierung im Zellkern. Ein 2 kb großes Promotor-Fragment wurde zur Analyse des Expressionsmusters eingesetzt. *AtWRKY26* zeichnet sich vor allem durch Expression in Trichomen von 3-5 Wochen alten Pflanzen aus. Induzierbar war die Expression durch Kälte, Trockenheit und auch durch Hitze. *AtWRKY38* war schwach in Blättern, jedoch stark in jungen Wurzeln exprimiert und induzierbar durch SA, JA, ACC, flg22 und Verwundung. *AtWRKY43* war lediglich in älteren Pflanzen in der Abscissionszone zu detektieren bzw. durch JA zu induzieren. Die Nullmutanten-Analyse von *AtWRKY43* lieferte keinen sichtbaren Phänotyp, wohingegen für die *AtWRKY26*-Mutante gegenüber Wildtyp-Pflanzen ein verzögertes Blühen beobachtet wurde.

Abstract

WRKY transcription factors are zinc finger proteins containing the highly conserved WRKYGQK amino acid stretch. Comparison to classical zinc finger proteins suggests, that recognition of the W-box *cis*-element is mediated by this sequence. Binding specificity is also influenced by bases flanking the W-box hexamer. Two different groups of WRKY-proteins with distinct binding behaviour have been observed. WRKY26, 38 and 43 show similar binding to W-box sequences and for WRKY 6 and 11, which belong to another of these groups, the binding motif TWGTTGACYWWW has been defined. Analysis of the distribution of this consensus sequence within the *Arabidopsis* genome reveals enrichment in promoter regions, suggesting a functional aspect of this new motif. Bombardment experiments including WRKY6, 11, 26, 38 and 43 as effector constructs and the W2-element containing TTGACC as a reporter construct always led to activation of the reporter gene. Using parts of the promoter of *SIRK*, a target of *AtWRKY6*, reveals the ability of these WRKY proteins to positively or negatively regulate gene expression. Regulation of gene expression appears to be mediated by recognition of a certain W-box element and/or interaction with combined W-boxes which are 0 to 3 bases apart. These combined W-boxes are enriched in promoter regions and might be functional. This is also true for W-Boxes with different spacings, which correspond to half-turns of the DNA-helix and suggests formation of multi-protein-complexes. The WRKY genes 26, 38 and 43 have been analysed in more detail. They encode proteins which are constitutively localized within the nucleus. Expression studies were investigated using a 2 kb promoter fragment. *AtWRKY26* is expressed in the trichomes of 3-5 week old plants. Expression could be induced by cold, drought and slightly by heat. *AtWRKY38* was inducible by SA, JA, ACC, flg22 and wounding, and showed general expression in leaves and strong expression in younger roots. The expression *AtWRKY43* was hardly detectable, it could be induced in older plants by JA in flower abscission zone, where it expresses weakly. Analysis of a knock-out mutant for WRKY43 did not reveal any phenotype whereas a knock-out mutant of WRKY26 displayed a delayed flowering phenotype in comparison to wildtype plants..

6 Literaturverzeichnis

Abel, S., Ballas, N., Won, L.-M. and Theologis, A. (1996), DNA elements responsive to auxin. *BioEssays* 18: 647-654.

Allen, M.D., Yamasaki, K., Masaru Ohme-Takagi, M., Masaru Tateno, M. and Masashi Suzuki, M. (1998), A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal* 17 (18): 5484–5496

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002), MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415(6875): 977-983.

Baba, M.M. and Teichman S.A. (2003), Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families and binding sites. *Trends in Genetics* 19(2): 75-79

Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988), I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 242: 540-545

Ballas N., Zakai N., Friedberg D., Loyter A. (1988). Linear forms of plasmid DNA are superior to supercoiled structures as activ templates for gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 11: 517-527

Ballas, N., Wong, L.-M., Malcolm, K. and Theologis, A. (1995), Two auxin-responsive domains interact positively to induce expression of the early indoleacetic acid-inducible gene PS-IAA4/5, *J. Mol. Biol.*, 83: 3483-3487

Barton, K. and Scheres, B. (2000), Growth and development -Plant from genes: towards the information network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 13-16

Batz, O., Logemann, E., Reinold, S., and Hahlbrock, K. (1998). Extensive Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism By Fungal Elicitor or Infection in Parsley Cells. *Biological Chemistry* 379: 1127-1135.

Beerli, R.R. and Barbas, C.F.,III (2002), Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors, *Nat. Biotechnol.* 20: 135-141

Bent, A.F., (2001), Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive, *PNAS* 98: 784-786

Berg, J.M. (1995) *Acc.Chem.Res.* ,28 ,14-19.

Berg, J.M. and Godwin, H.A. (1997), Lessons from zinc-binding peptides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 357-361

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R, Dirkse, W., Van Staveren, M., Siekema, W. and others (1998), Analysis of 1,9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*, *Nature* 391: 485-488

Bleecker, A. and Patterson, S.E. (1997), Last exit senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1169-1179.

Bomblies, K., Dagenais, N. and Weigel, D. (1999), Redundant enhancers mediate transcriptional repression of AGAMOUS by APETALA2. *Developmental Biol* 216: 260-264.

- Borden, K.L., (2000)**, RING domains: Master builders of molecular scaffolds. *J. Mol. Biol.* 295: 1103-1112
- Busk, P.K. and Pages, M. (1998)**, Regulation of abscisic acid-induced transcription, *Plant Mol. Biol.* 37: 425-435.
- 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.
- Büttner, M. and Singh, K.B. (1997)**. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *PNAS* 94: 5961-5966
- Carey, M. (1998)**, The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92: 5-8
- Carey, M., Lin, Y.-S., Grenn, M.R. and Ptashne, M. (1990)**, A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature* 345. 361-364
- Chandrasekharan, M.B., Bishop, K.J. and Hall ,T.C. (2003)**, Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J.* 33(5): 853-866.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Jose-Benitez, M., Chambaz, E.M., Cochet, C. and Dideberg, O. (1999)**, Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *The EMBO Journal* 18 (11): 2930-2940
- Chen C. and Chen Z. (2000)**, Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid induced WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology*, 42: 387-396
- Chen C. and Chen Z. (2002)**, Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology* 129: 1-11
- 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.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Kaatgiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A, et al. (2002)**, Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factors genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574
- Cheong, Y.H, Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. and Luan, S. (2002)**, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 1-17
- 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.
- Chothia C. and Lesk A.M. (1986)**, The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5: 823-826)
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998)**, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743
- 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 *Zmbox1a* and *Trap* (transposon-associated protein). *Plant Mol.Biol.* 41: 615-625.
- Cormack, R.S., Eulgem, R., Rushton, P.J., Köchner, P., Hahlbrock K. and Somssich I.E. (2002)**, Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576(1-2):92-100

- Cowell, I.G. and Hurst, H.C. (1994)**, Transcriptional repression by the human bZIP factor E4BP4: definition of a minimal repression domain, *Nucleic Acid Res.* 22: 59-65
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E., 1997**, Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression, *Plant Cell* 9: 1211-1223
- 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.
- Dellagi, A., Helibron, J., Avrova, A.O. Montesano, M., Palva, E.T., Stewan, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E., Lyon, G.D. and Birch, P.R. (2000)**. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol. Plant Microbe Interaction* 13: 1092-1101.
- Depres, c., Subramaniam, R., Matton, D.P. and Brisson, N. (1996)**, The activation of the potato PR-10a gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *The Plant Cell* 7: 589-498
- Di Christina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1996)**, The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *The Plant Journal* 10: 393-402
- 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.
- Doke, N. (1997)**, The oxidative burst: Roles in signal transduction and plant stress, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 785-814
- Donald, R.G.K., and Cashmore, A.R. (1990)**, Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* *rbcS-1A* promoter. *EMBO J.* 9, 1717-1726.
- Dong, X. (1998)**, SA, JA, ethylene and disease resistance, *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-323
- Dong, J., Chen, C. and Chen, Z. (2003)**, Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* 51(1): 21-37.
- 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.
- Du L. and Chen Z. (2000)**, Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 24(6): 837-847
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. (2000)**, cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12(6):963-977.
- Duvall, R.N., Neuhaus, D. and Rhodes, D (1994)**, The solution structure of the first zinc finger domain of SWI5: a novel structural extension to a common fold. *Current Biology* 4: 599-611
- Ecker, J.R. (1995)**, The ethylene signal transduction pathway in plants, *Science* 268: 667-675
- Elliott, K.A. and Shirsat, A.H. (1998)**, Promoter regions of the *extA* extensin gene from *Brassica napus* control activation in response to wounding and tensile stress. *Plant Mol Biol* 37: 675-687
- Ellis, J.G., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Bouchez, D., Singh, K., Dennis, E.S., Peacock, W.S. (1993)**. Does the ocs-Element occur as a functional component of the promoter of plant genes? *The Plant Journal* 4: 433-443

- 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
- Eulgem T., Rushton P.J., Schmelzer E., Hahlbrock K. and Somssich I.E. (1999)**, Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO Journal*, 18(17): 4589-4699
- 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
- Faktor, O., Loake, G.J., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1997)**. The G-box and the H-box in a 39 bp region of a french bean chalcon synthase promoter constitutes a tissue-specific regulatory element. *The Plant Journal* 11: 1105-1113
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T. (1999)**, Plant have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 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 enescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12: 183-197.
- 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.
- 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.
- Fukuda Y. (1997)** Interaction of tobacco nuclear proteins with an Elizitor-responsive element in the promoter of a basic class I chitinase gene *Plant Mol. Biol.* 34: 81-87
- Fujimoto S.J., Ohta M., Usui A., Shinshi I., Ohme-Takagi M. (2000)**. *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. *The Plant Cell* 12: 393-404
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J. and Hall, M. (1991)**, Nuclear protein localization *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 83-101
- 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
- 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 activator 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
- Gomez-Gomez L, Felix G. and Boller T. (1999)**, A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana* *The Plant Journal*, 18(3): 277-284
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2000)**, FLS2: A LRR receptor-like kinase involve in recognition of the flagellin Elizitor in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5: 1-20
- Gomez-Gomez L, Bauer Z. and Boller T. (2001)**, Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13(5):1155-1163.
- Görlich, D. and Mattaj, I.W. (1996)**, Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271: 1513-1518

- 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.
- 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.
- Gultinan, M.J., Marcotte, W.R., and Quatrano, R.S. (1990)**, A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element *Science* 250, 267-271.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K. and Schmelzer, E. (1998)**, Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *PNAS* 95: 8398-8403.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. and Tan, J. (2003)**, Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *PNAS* 10: 1073-1081
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996)**, Resistance gene-dependent plant defense response. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hanahan, D. (1983)**, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166-557.
- Hanas, J.S., Hazuda, D.J., Bogenhagen, D.F., Wu, F.Y.-H., Wu, C.-W. (1983)**, Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene, *J. Biol. Chem.* 258: 14120-14125.
- Hanna-Rose, W. and Hansen, U. (1996)**, Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors *Trends in Genetics* 12(6): 229-234
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., and Sarai, A. (1998)**, Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plants. *J. Biol. Chem.* 273: 26857-26861
- Hara K., Yagi M., Kusano T. and Sano H. (2000)**, Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding *Mol. Gen. Genet.* 263: 30-37
- He, S.Y., Bauer, D.W., Collmer, A. and Beer, S.V. (1994)**, Hypersensitive response elicited by *Erwinia angovorae* requires active plant metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 289-292.
- He, Z., Wang, Z.-Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P. and Chory, J. (2000)**, Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1 *Science* 288: 2360-2363
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F. and Gan, S. (2002)**, Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence *Plant Physiology* 128: 876-884
- Heise A., Lippok B., Kirsch C. and Hahlbrock K. (2002)**, Two immediate-early pathogen-responsive members of the AtCMPG gene family in *Arabidopsis thaliana* and the W-box-containing elicitor-response element of AtCMPG1 *PNAS*, 99(13): 9049-9054
- 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.
- Herschman, H.R. (1991)**, Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 281-319.
- Hildebrand, D., Afithhile, M. and Fukushige, H. (2000)**, Regulation of oxylipin synthesis *Biochem Soc Trans* 28: 847-849

- Hill, C.S. and Treisman, R. (1995)**, Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211.
- Hoecker, U., Vasil, I.K., McCarty, D.R. (1995)**, Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes Dev.* 9(20): 2459-2469.
- Huang, T. and Duman, J.G. (2002)**, Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* *Plant Mol. Biol.* 48: 339-350
- Hunt, M.D. and Ryals, J.A. (1996)**, Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 538-606.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992)**, The regulation of transcription by phosphorylation *Cell* 70: 375-387
- Isernia, C., Bucci, E., Leone, M., Zaccaro, L., DiLello, P., Digilio, G., Esposito, S., Saviano, M., DiBlasio, B., Pedone, C., Pedone, P.V. and Fattorusso, R. (2003)**, NMR Structure of the Single QALGGH Zinc Finger Domain from the Arabidopsis thaliana SUPERMAN Protein *Chem Bio Chem* 4:171-180
- 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 β -amylase *Mol Gen Genet*, 244: 563-571
- Iyer, V.R., Ross, D., Schuler, G., Moore, T., Lee, J., Trent, J., Staudt, L., Hudson, J., Boguski, M., Lakhari, D., Shalon, D., Botstein, D. and Brown, P. (1999)**, The transcriptional programme in response of human fibroblasts to serum. *Science* 283: 83-87.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, d.G., Schabenberger, O. and Phomashow, M.F. (1998)**, Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jakoby, M., Droege-Laser, W., Kroj, R., Tiedemann, J., Vicente-Carbajosa, Weisshaar, B. and Parcy, F. (2002)**, The bZIP family of transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Trends Plant Sci.* 7: 106-111.
- Jans, D. and Hübner, S. (1996)**, Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation *Physiological Reviews* 76: 651-685J
- Johannesson, H., Wang, Y. and Engström, P. (2001)**, DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro* *Plant Molecular Biology* 45:63-73
- Johnson C.S., Kolevski B and Smyth D.R. (2002)**, TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor *The Plant Cell*, 14:1359-1375
- Jones, A.M. and Dangl, J.L. (1996)**, Logjam at the styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* 1: 114-119.
- Jupin, I., Chua, N-H (1996)**, Activation of the CaMV *as-1 cis*-element by salicylic acid: differential binding of a factor related to TGA1a. *EMBO Journal* 15: 5679-5689
- Kalde, M., Barth M., Somssich, I.E. and Lippok, B. (2003)**, Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different defense signaling pathways *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16(4): 295-305
- Kang, H.-G. and Singh, K.B. (2000)**, Characterization of alicyclic acid-responsive Arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.* 21: 329-339.

- Kao, C.-Y., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K. and McCarty, D.R. (1996)**, Plant Cell 8: 1171-1179
- Kasuga, M., Liu, W., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999)**, Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat. Biotechnol. 17: 287-291.
- Kardailsky, I., Shukla V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D. (1999)**, Activation tagging of the floral inducer FT, Science 286(5446): 1962-1965
- Katagiri, F., Lam, E., and Chua, N.-H. (1989)**, Two tobacco DNA binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. Nature 340: 727-730.
- 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.
- 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.
- Kim, C.Y., Lee, S.-H., Park, H.C., Bae, C.G., Chong, Y.H., Choi, Y.J., Han, C.-D., Lee, S.Y., Lim, C.O. and Cho, M.J. (2000)**, Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. MPMI 13(4): 470-474
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (2000)**, A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley ELL17 gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. Mol. Plant Pathol. 1: 243-251
- Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E. and Hahlbrock K. (2001)**, A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. The Plant Journal, 26(2): 217-227
- Kolukisaoglu, H.U., Bovet, L., Klein, M., Eggmann, T., Geisler, M., Wanke, D., Martinoia, E., Schulz, B. (2002)**, Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. Planta 216(1):107-119.
- Koornneef,M. (1981)**, The complex syndrome of *ttg* mutants. Arabidopsis Inf. Serv. 18: 45-51.
- Koornneef,M., Dellaert, S.W.M and van der Veen, J.H. (1982)**, EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana*. Heynh. Mutat. Res 93: 109-123.
- Koornneef,M., Hanhart, C.J. and van der Veen, J.H. (1991)**, A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet 229: 57-66
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000)**, Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. PNAS 97(6): 2940-2945.
- Kunst, L., Lenz, J.E., Martinez-Zapater, J. and Haughn, G.W. (1989)**, AP2 gene determine 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.
- Lefstin, J.A. & Yamamoto, K.R., (1998)**, Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators Nature 392: 885-888
- Leung, J. and Giraudat, J. (1998)**, Abscisic Acid Signal Transduction, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 199-222
- Lin, Y.-S., Carey, M., Ptashne, M. and Green, M.R. (1990)**, How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously Nature 345: 359-361

- Liu, Z.-B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1994), Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements, *Plant Cell* 6: 645-657
- Liu, L., White, M.J., MacRae, T.H. (1999), Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem.* 262(2): 247-257.
- Lynch, M. and Conery, J.S. (2000), The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151-1155.
- Maeo K., Hayashi S., Kojima-Suzuki H., Morikami A. and Nakamura K. (2001), Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(11):2428-2436
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangl J.L. und Dietrich R.A. (2000), The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 26:403-410
- Martin, A.C., Orengo, C.A., Hutchinson, E.G., Jones, S., Karmirantzou, M., Laskowski, R. A. et al. (1998), Protein folds and functions. *Structure* 6: 875-884
- Martin, G.B. (1999), Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2,273-279.
- Mason, H.S., DeWald, D.B. and Mullet, J.E. (1993), Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter, *Plant Cell* 5: 241-251
- Masucci, J.D., Rerie, W.G., Foreman, D.R., Zhang, M., Galway, M.E., Marks, M.D. and Schiefelbein, J. (1996), The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122: 1253-1260
- Matthews, R.E.R. (1991), *Plant Virology*, 3rd Edition. 3 San Diego: Academic Press.
- McCarty, D.R., 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(5): 895-905.
- McKendree W.L., Paul A.L., DeLisle A.J., Ferl R.J. (1990), In vivo and in vitro characterization of protein interactions with the dyad G-box of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Cell.*;2(3):207-214
- Meijer, A.H., Scarpella, E., von Dijk, E.L., Qin, L., Taal, A.J., Rueb, S., Harrington, S.E., McCouch, S.R., Schilperoort, R.A. and Hoge, J.H. (1997), Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *The Plant Journal* 11: 263-276
- 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: 4455-463
- Merkle, T. (2001), Nuclear import and export of proteins in plants: A tool for the regulation of signaling. *Planta* 213: 499-517
- Meyerowitz, E. (1999), Plants, animals and the logic of development. *Trends in CB, TIBS, Trends in Genetics; Millenium 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.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985), Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*, *EMBO J.* 4: 1609-1614.

- Molin, L., Mounsey, A., Aslam, S., Bauer, P., Young, J., James, M., Sharma-Oates, A. and Hope, I.A. (2000)**, Evolutionary conservation of redundancy between a diverged pair of forkhead transcription factors homologues. *Dev.* 127: 4825-4835.
- Mudd, J.B. (1997)**, Biochemical basis for the toxicity of ozone, Plant response to air pollution.: 267-284
- Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1999)**, Solution structure of the transactivation domain of ATF-w comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. *J. Mol. Biol.* 287: 593-607
- Nagano, Y., Inaba, T., Furuhashi, H. and Yukiko Sasaki (2001)**, Trihelix DNA-binding Protein with Specificities for Two Distinct *cis*-Elements. *The Journal of Biological Chemistry* 276(25): 22238–22243
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1999)**, Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-690.
- Neuhaus, D., Nakaseko, Y., Schwabe, J.W., Klug, A. (1992)**, Solution structures of two zinc-finger domains from SWI5 obtained using two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. A zinc-finger structure with a third strand of beta-sheet *J. Mol. Biol.* 228: 637-651
- Neustaedter, D.A., Lee, S.P. and Douglas, C.J. (1999)**, A novel parsley 4CL1 *cis*-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. *The Plant Journal* 18(1): 77-88
- Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U. and Gatz C. (2000)**. Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Molecular Biology* 42: 775-788
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R. and Halbrock K. (1994)**. High Affinity binding of a Fungal Oligopeptide Elizitor to Parsley Plasma Membranes Triggers Multiple Defense Responses. *Cell* 78: 449-460
- Nürnberg, T., (1999)**, Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 167-182.
- Oeda, K., Salinas, J., and Chua, N.-H. (1991)**, A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes *EMBO J.* 10: 1793-1802.
- Ohme-Tagaki, M. and Shinshi, H. (2000)**, Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element *Plant Cell* 7: 173-182
- Ohme-Tagaki, M., Suzuki, K. and Shinshi, H. (2000)**, Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes *Plant Cell Physiol.* 41: 1187-1192
- Ono, A., Izawa, T., Chua, N.-H. and Shimamoto, K. (1996)**, The rab16B promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements, *Plant Physiol.* 112: 483-491
- Oppenheimer, D., Esch, J. and Marks, M (1993)**, Molecular genetics of Arabidopsis trichome development. In „Control of Plant Gene Expression, CRC Press, pp 275-286.
- Orlando, V., Strutt, H. and Paro, R. (1997)**, Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde crosslinking. *Methods, Companion Methods Enzymol.* 11: 205-214.
- 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.
- Pavletich, N.P. and Pabo, C.O. (1991)**, Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252:809-817
- dePater S., Greco V., Pham K., Memelink J. and Kijne J. (1996)**, Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 24(23): 4624-4631
- Pnueli, L., Hallak-Herr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A. and Mittler, R. (2002)**, Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant Journal* 31(3): 319-330
- Poethig, R.S., (2003)**, Phase change and the regulation of developmental timing in plants, *Science* 301: 334-.
- Ptashne, M. (1992)**, *A Genetic Switch* Cambridge, Ma, USA: Cell Press & Blackwell Scientific Publications
- Putteril, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and Coupland, G. (1995)**, The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847-857
- Qin, X.-F., Holuigue, L., Horvath, D.M. and Chua, N.-H. (1994)**, Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus *as-1* element. *Plant Cell* 6: 863-874
- Quatrano, R.S., Bartels., D., Ho, T.-H.D. and Pages, M. (1997)**, New Insights into ABA-Mediated Processes, *Plant Cell* 9: 470-475
- 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., Chua, N.H. (1994)**, Transcription factors in plant growth and development. *Curr Opin Genet Dev.* 4(5): 642-646.
- Rao, M.V. and Davis, K.R. (1999)**, Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms. The role of salicylic acid, *Plant Journal* 17: 603-614
- Raventos, D., Jensen, A.B., Rask, M.-B., Casacuberta, J.M., Mundy, J. and San Segundo, B. (1995)** A 20-bp *cis*-acting element is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize PRms gene. *Plant Journal* 7: 147-156
- Redman, J., Whitcraft, J., Johnson, C. and Arias, J., (2002)**, Abiotic and biotic stress differentially stimulate *as-1* element activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 21: 180-185
- 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.
- Rerie, W.G., Feldmann, K.A. and Marks, M.D. (1994)** The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 8: 1388-1399
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2003)**, The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco, *Plant Physiology* 130:1143-1151)
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.-L. (2000)**, *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290 (5499): 2105-2110

- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1998), The AP2/EREBP family of plant transcription factor. *Biol. Chem.* 379: 633-646.
- Riechmann, J.L. and Ratcliffe, O.J. (2000), A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 423-434.
- Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M. and Leyser, O. (1998), Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. *Science* 279:1371-1373.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vosshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S. (2000), Comparative genomics of the eukaryotes, *Science* 287(5461): 2204-2215
- 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 α -Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* 29: 691-702
- Rushton T., Tovar Torres J., 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 PR1 genes. *The EMBO Journal*, 15(20): 5690-5700
- 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., Reinstädler A., Lipka V., Lippok B. and Somssich I.E. (2002), Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *The Plant Cell*, 14: 1-15
- Robatzek S. and Somssich I.E. (2001), A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *The Plant Journal*, 28: 123-133
- Robatzek S. and Somssich I.E. (2002), Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev*, 16: 1139-1149
- Roeder, R. (1996), The role of initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21: 327-335.
- Ryals, J.A., Ukness, S.J. and Ward, E.R. (1994), Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104: 1109-1112.
- Ryan, C.A. (2000), The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477: 112-121
- Sakai, H., Medrano, L.J. and Meyerowitz, E.M. (1995), Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries, *Nature* 37: 199-203.
- Salinas J., Oeda K., Chua N.H. (1992), Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 4(12):1485-93
- Samach, A. Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. and Coupland G. (2000), Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis, *Science* 288(5471): 1613-1616
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sander C. and Schneider R. (1991)**, Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 9: 56-68
- Sanders, P.M., Lee, P.-Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weilerb, E.W. and Goldberg, R.B. (2000)**, The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12: 1041-1062
- Sauer, F., Hansen, S. and Tjian, R. (1995)**, DNA Template and activator-coactivator requirements for transcriptional synergism by *drosophila* bicoid. *Science* 270: 1825-1828
- Scandalios, J.G. (1997)**, Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., and Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. and Manners, J.M. (2000)**, Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis, *PNAS* 97:11655-11660
- Scheres, B. (1998)**, A LEAFY link from outer space. *Nature* 395: 545-546.
- Schneider, TD and Stephens, MR (1990)**, Sequence Logos: A new way to display consensus sequences *Nucleic Acids Res* 18:6097-6100
- Schnittger, A., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (1998)**, Tissue layer and organ specificity of trichome formation are regulated by GLABRA1 and TRYPTYCHON in *Arabidopsis*. *Development* 125: 2283-2289.
- 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.
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Becker-Anders, M., Hahlbrock, K. and Schulz, W. (1989b)** Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene *EMBO J.* 8: 651-656.
- Schwabe, J.W.R and Klug, A. (1994)**, Zinc mining for protein domains, *Nat. Struct. Biol.* 1(6): 345-349
- Schwechheimer, C. and Bevan, M. (1998)**, Regulation of transcription factor activity in plants *Trends in Plant Science* 3: 378-383
- Segal, D.J. and Barbas, C.F., III (2001)**, Custom DNA-binding proteins come of age: polydactyl zinc-finger proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632-637
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2001)**, Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray, *Plant Cell* 13: 61-72)
- Seo, S., Sano, H. and Ohashi, Y. (1997)**, Jasmonic acid in wound signal transduction pathways, *Physiol. Plant.* 101: 740-745
- 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
- Shen, W.H. and Gigot, C. (1997)**, Protein complexes binding to cis-elements of the plant histone gene promoters: multiplicity, phosphorylation, and cell cycle regulation *Plant Mol. Biol.* 33: 367-379
- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C., Zabeau, M. and Van de Peer, Y. (2002)**, The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 99(21): 13627-13632.

- Singh, K.B. (1998)**, Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control *Plant Physiol.* 118: 1111-1120
- Singh, K., Foley, R.C. and Onate-Sanchez, L. (2002)**, Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5(5): 430-436.
- Skerra, A. (1994)**, Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli* *Gene* 151: 131-135
- Smith, H.M.S., Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (1997)**, Importin α from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114: 411-417.
- 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.
- Sprenger-Haussels M., Weisshaar B. (2000)**, Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* 22(1):1-8.
- Staiger, D., Becker, F., Schell, J., Koncz, C., and Palme, K. (1991)**, Purification of tobacco nuclear proteins binding to a CACGTG motif of the chalcone synthase promoter by DNA affinity chromatography *Eur. J. Biochem.* 199: 519-527.
- Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L. and Galan, J.E. (2001)**, Common and Contrasting Themes of Plant and Animal Diseases. *Science* 292: 2285-2289
- Stintzi, A. and Browse, J. (2000)**, The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis *PNAS* 97: 10625-10630
- 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. *PNAS* 94, 1035-1040.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001)**, *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116-1120
- Sudarsanam, P., Pilpel, Y., Church, G.M. (2002)**, Genome-wide co-occurrence of promoter elements reveals a cis-regulatory cassette of rRNA transcription motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.*;12(11):1723-1731.
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S. and Jansson, C. (2003)**, A novel WRKY transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter. *The Plant Cell* 15: 1076-2092.
- Sung, Z.R., Chen, L., Moon, Y.-H. and Lertpiriyapong, k. (2003)**, Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr. Op. Plant Biol.* 6: 29-35.
- Suzuki, K., Suzuki, N., Ohme-Tagaki, M. and Shinshi, H. (1998)**, Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting *Plant Journal* 15: 657-665
- Tabata, T., Takuya, N., Mikami, K., and Iwabuchi, M. (1991)**, HBP-Ia and HBP-Ib: Leucine zipper-type transcription factors of wheat, *EMBO J.* 10: 1459-1467.
- Takatsuji, H. (1998)**, Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 582-596.
- 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, methyljasmonate and fungal elicitors. *Plant J.* 18: 383-393.

- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. and Martin, G.B. (1999)**, Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase: *Science* 274: 2060-2063
- Tautz, D. (2000)**, A genetic uncertainty problem. *Trends Genet.* 16 (11): 475-477.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)**, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thornton, J.M., Orengo, C.A., Todd, A.E. and Pearl, F.M. (1999)**, Protein folds, functions and evolution, *J. Mol. Biol.* 293: 333-342
- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994)**, Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces, *Cell* 77(1): 5-8
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torre, 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.
- Tjian, R. (1995)**, Molecular machines that control genes, *Sci Am.* 272(2): 54-61
- Tokuhsa, J.G., Singh, K., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (1990)**, A DNA-binding protein factor recognizes two binding domains within the octopine synthase enhancer element, *Plant Cell* 2, 215-224.
- Triezenberg, S.J. (1995)**, Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* 5(2): 190-196.
- Tucker, M.L., Sexton, R., del Campillo, E. and Lewis, L.N. (1988)**, Bean abscission cellulase. *Plant Physiol.* 88: 1257-1262.
- Ulmasov, R., Liu, Z.-B., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1995)**, Composite structure of auxin response elements, *Plant Cell* 7: 1611-1623
- 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.
- Verrijzer, C.P. and Tjian, R. (1996)**, TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci* 21: 338-342.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J. and Browse, J. (1998)**, A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *PNAS* 95:7209-7214
- Vision, T.J., Brown, D.G. and Tanksley, S.D. (2000)**, The origins of genomic duplication in *Arabidopsis*. *Science* 290: 2114-2117.
- Wada, T., Tachibana, R., 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.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. and Wang, X. (2000)** Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2237-2246
- Wang, Z., Yang, P., Fan, B. and Chen, Z. (1998)**, An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response. *The Plant Journal*, 16(4): 515-522
- Weintraub, H., Cheng, P.F. and Conrad, K. (1986)**. Expression of transfected depends on topology. *Cell* 46: 115-122

- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., and Hahlbrock, K. (1991)**, Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognize a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* 10: 1777-1786.
- 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.
- Williams, M.E., Foster, R. and Chua, N.-H. (1992)**, Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG Affect the Specificity of Protein Binding. *The Plant Cell* 4: 485-496,
- Wisman, E., Cardon, G.H., Franz, P. and Saedler, H. (1998)**, The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allow efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* .37: 989-999.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L. and Pabo, C.O. (2000)**, DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 183-112.
- Wood T.C. (1999)**, Evolution of protein sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 291: 977-995
- Wray, G.A. (1998)**, Promoter logic. *Science* 279: 1871-1872
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. (1998)**, COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994)**, A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Journal* 16: 515-522
- 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, H.S., Huang, H.C. and Collmer, A. (1993)**, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive resistance in plants. *Cell* 73: 1255-1266.
- Yang P., Chen C., Wang Z., Fan B. and Chen Z. (1999)**, A pathogen and salicylic acid induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant Journal*, 18(2): 141-149
- Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D.F. (1997)**. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639
- Yoda H., Ogawa M., Yamaguchi Y., Koizumi N., Kusano R. and Sano H. (2002)**, Identification of early responsive genes associated with the hypersensitive response upon tobacco mosaic virus infection and properties of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*; 267(2): 154-161.
- Yoneda (1997)** How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *Biochem J.* 121: 811-817
- Yoshioka, K., Fukushima, S., Yamazaki, T., Yoshida, M., Takatsuji, H., 2001**, The plant zinc finger protein ZPT2-2 has a unique mode of DNA interaction, *J. Biol. Chem* 276: 35802-35807.
- Yu, D., Chen, C. and Chen, Z. (2001)**, Evidence for an important role of WRKY DNA-binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13: 1527-1539.

7 Anhang

Abbildung A1: Lage der in den Bindeversuchen verwendeten W-Boxen in den Promotoren

Dargestellt ist die Anzahl und Position der W-Boxen, die als Oligonukleotide in den Bindeversuchen zusammen mit WRKY-Proteinen eingesetzt wurden. W-Boxen sind als Kästchen und der Translationsstart als ATG gekennzeichnet. Der jeweilige Promotor, in dem diese W-Boxen gefunden wurden, ist links angezeigt. Skalierung: kleine Striche jeweils 100 Basen, grosse Striche 500 Basen.

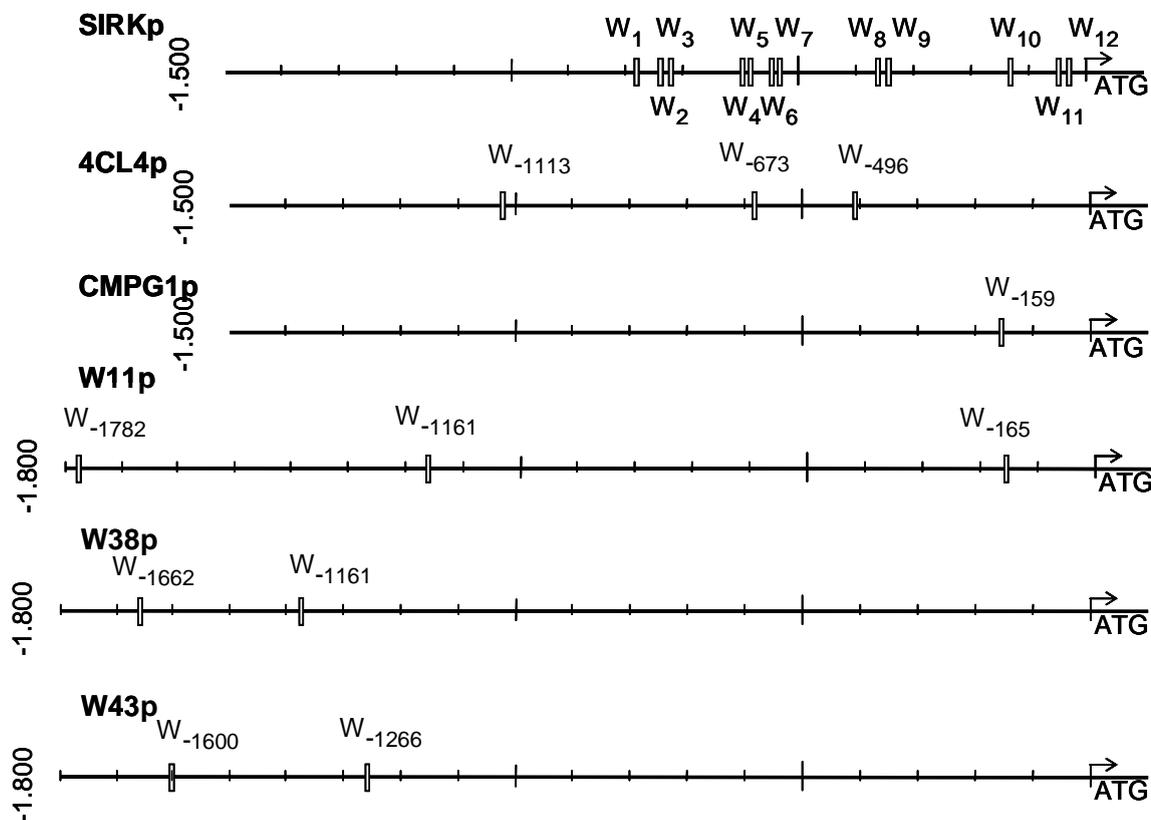


Abbildung A2: Konsensusmatrix zur Generierung eines Konsensus für gute und schlechte W-Box-Sequenzen

In der Tabelle sind die absoluten Häufigkeiten von Basen in der W-Box-Sequenz dargestellt, hier inklusive der zur Vorhersage eingesetzten Oligonukleotide. Damit soll der bestehende Konsensus erweitert werden und gegebenenfalls auf Veränderungen aufmerksam gemacht werden. In der Tabelle sind die Häufigkeiten der Basen aufgelistet und darunter als Grafik präsentiert. Aufgrund der Grafik wird im nächsten Schritt ein Konsensus abgeleitet, einmal sehr stringen und einmal weniger stringent (weich).

		Position													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
gute	W-Box	A	A	A	A	T	T	G	A	C	T	A	A	A	A
Bindesequenzen		T	T	T	T	I	I	G	A	C	C	T	G	T	T
		C	G	G	G	I	I	G	A	C	C	T	G	C	I
schlechte	W-Box	T	A	G	A	I	I	G	A	C	C	A	T	T	A
Bindesequenzen		T	T	G	C	I	I	G	A	C	C	T	G	T	A
		G	G	C	C	I	I	G	A	C	C	T	G	T	A
		10 Nukleotide													
Konsensus gute Boxen:	stringent	TWG TTGACY							WWWWW						
	weniger stringent	KDD TTGACY							HWHW						
Konsensus schlechte Boxen:	stringent	TWKM TTGACC							AWKW						
	weniger stringent	DDBH TTGACY							NWND						

Tabelle A1: Häufigkeiten W-Box Konsensussequenzen Genom vs Promotor

Dargestellt sind die in Kpa. 2.1.3 ermittelten Konsensussequenzen und das Verhältnis der W-Box-Häufigkeiten der Promotordatensätze untereinander und zum Genom. Die Anzahl möglicher Kombinationen des Konsensus ist direkt hinter der Sequenz angezeigt. Motive: Anzahl der gefundenen Basenkombinationen des Konsensus, W-Boxen: Anzahl gefunder W-Boxen, P: Anzahl von Promotoren, in denen W-Boxen gefunden wurden.

Konsensus (Anzahl möglicher Kombinationen)	Genom		600bp Promotor			1500bp Promotor		
	Motive	W-Boxen	Motive	W-Boxen	P	Motive	W-Boxen	P
WWWTGACCNTT, 64								
gesamt	64	1314	61	232	230	64	549	545
Sinn:	32	611	31	126	125	32	288	287
Gegensinn	32	703	30	106	105	32	261	258
WWWTGACYNTT, 128								
gesamt	128	4120	122	794	790	128	1792	1784
Sinn:	64	2027	61	430	430	64	848	843
Gegensinn	64	2093	61	363	360	64	944	941
DDDTGACCNWK, 864								
gesamt	843	8095	525	1207	1201	707	2920	2906
Sinn:	422	4010	255	597	595	351	1466	1459
Gegensinn	421	4085	270	610	606	356	1454	1447
DDDTGACYNWK, 1728								
gesamt	1707	23603	1216	3986	3971	1523	9073	9025
Sinn:	854	11874	606	1993	1989	758	4528	4505
Gegensinn	853	11729	610	1993	1982	765	4545	4520
TWGTTGACCWWW, 32								
gesamt	32	557	29	98	98	32	220	220
Sinn:	16	275	16	53	53	16	109	109
Gegensinn	16	282	13	45	45	16	111	111
TWGTTGACYWWW, 64								
gesamt	64	1458	61	263	263	64	581	583
Sinn:	32	746	32	133	133	32	287	286
Gegensinn	32	712	29	130	130	32	296	295
TWGTTGACCWWWWW, 64								
gesamt	62	373	39	72	72	56	159	159
Sinn:	31	183	21	39	39	32	77	77
Gegensinn	31	190	18	33	33	32	82	82
TWGTTGACYWWWWW, 128								
gesamt	126	966	84	174	174	115	393	392
Sinn:	63	498	44	92	92	55	190	190
Gegensinn	63	468	40	82	83	60	203	202
DDTTGACCHND, 648								
gesamt	648	21993	584	3384	3364	634	7937	7872
Sinn:	324	10849	293	1713	1699	316	3973	3934
Gegensinn	324	11144	291	1671	1665	318	3964	3938
DDTTGACYHND, 1296								
gesamt	1296	59183	1211	9553	9502	1279	21926	21728
Sinn:	648	29464	608	4819	4794	639	10972	10867
Gegensinn	648	29719	604	4734	4708	640	10954	10861

Abbildung A3: Häufigkeiten und Anreicherung der einzelnen Kombinationen der Konsensussequenz TWGTTGACYWWW

Mit dem Motif Mapper Programm ermittelten Häufigkeiten wurden von oben nach unten als absolute Häufigkeiten, relative Häufigkeiten (gefundene Häufigkeit/erwartete Häufigkeit) und Vergleich der Anreicherung in den Datensätzen.

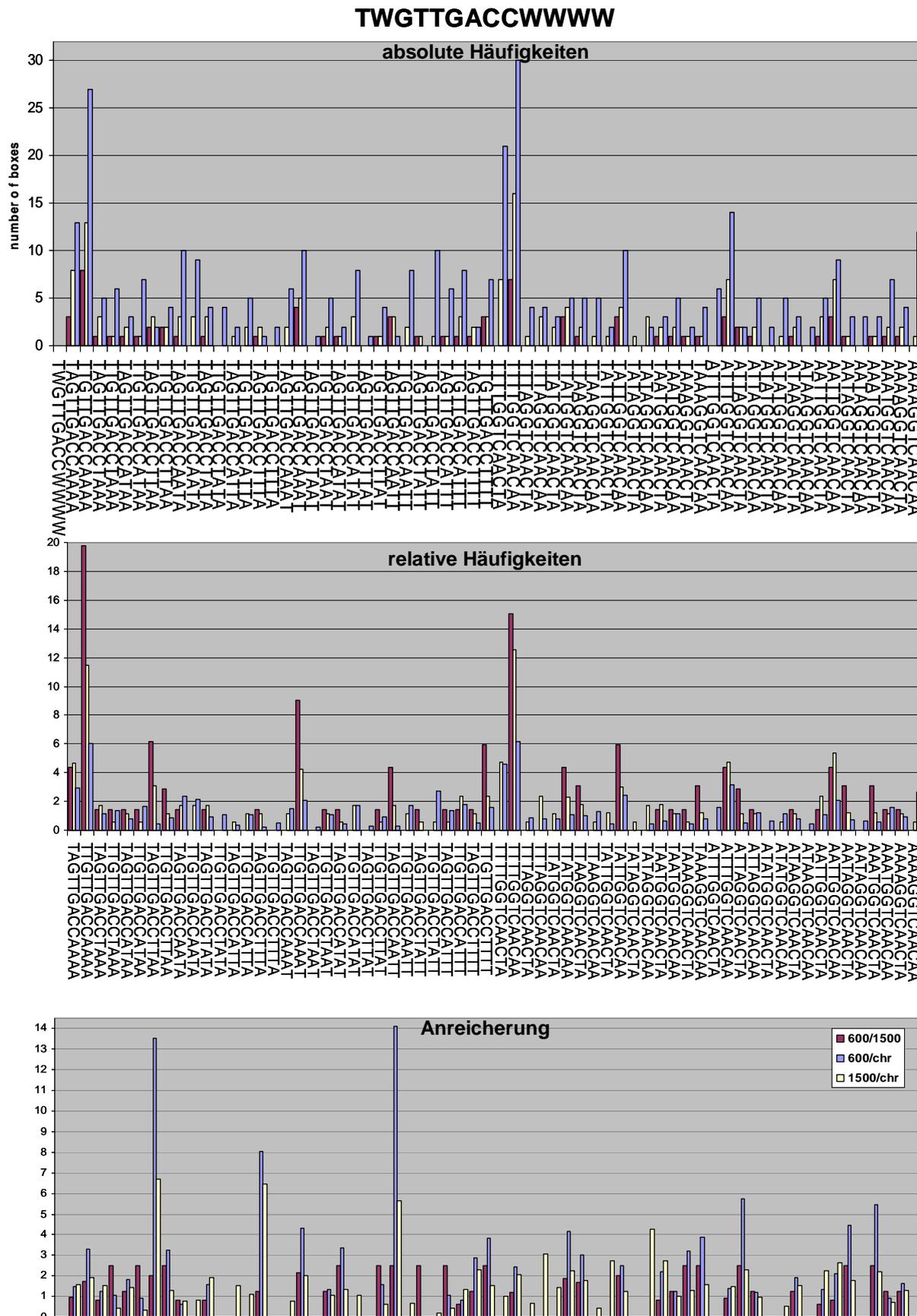
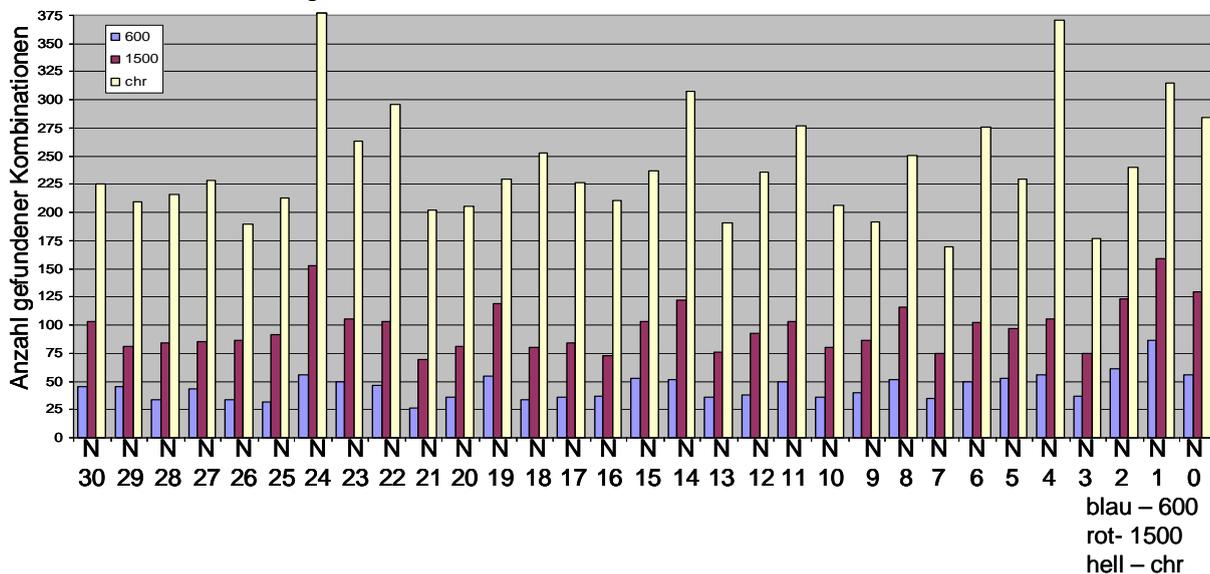


Abbildung A6: Häufigkeit und Anreicherung der verschiedenen W-Box Kombinationen in definierten Abständen in den Datensätzen

A Absolute Häufigkeiten des Auftretens jeder einzelnen Kombination mit dem angegebenen Abstand (N)
B Analyse der Anreicherung der kombinierten W-Boxen durch Vergleich der relativen Häufigkeiten in den zwei angegebenen Datensätzen

A Summe der Häufigkeiten von W-Box Kombinationen in bestimmten Abständen



B Anreicherung von W-Box Kombinationen in bestimmten Abständen

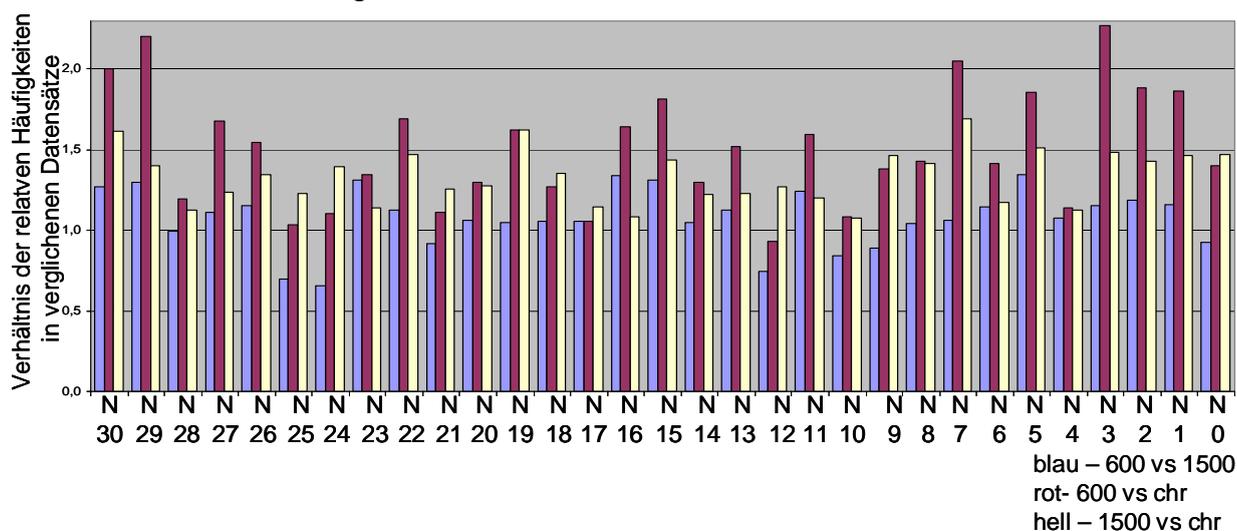


Abbildung A7: Häufigkeiten von kombinierten W-Boxen in den Abständen N 24, 12, 8, 4 und 1.

Summierte Häufigkeiten und Einzelhäufigkeiten der in den Bindeversuchen eingesetzten W-Box Kombinationen **A** Absolute Häufigkeiten nach Kombinationen sortiert, Reihenfolge der Kombinationen wie in **B** **B** relative Häufigkeiten, **C** relative Häufigkeiten der einzelnen Kombinationen und Abstände, unsummiert

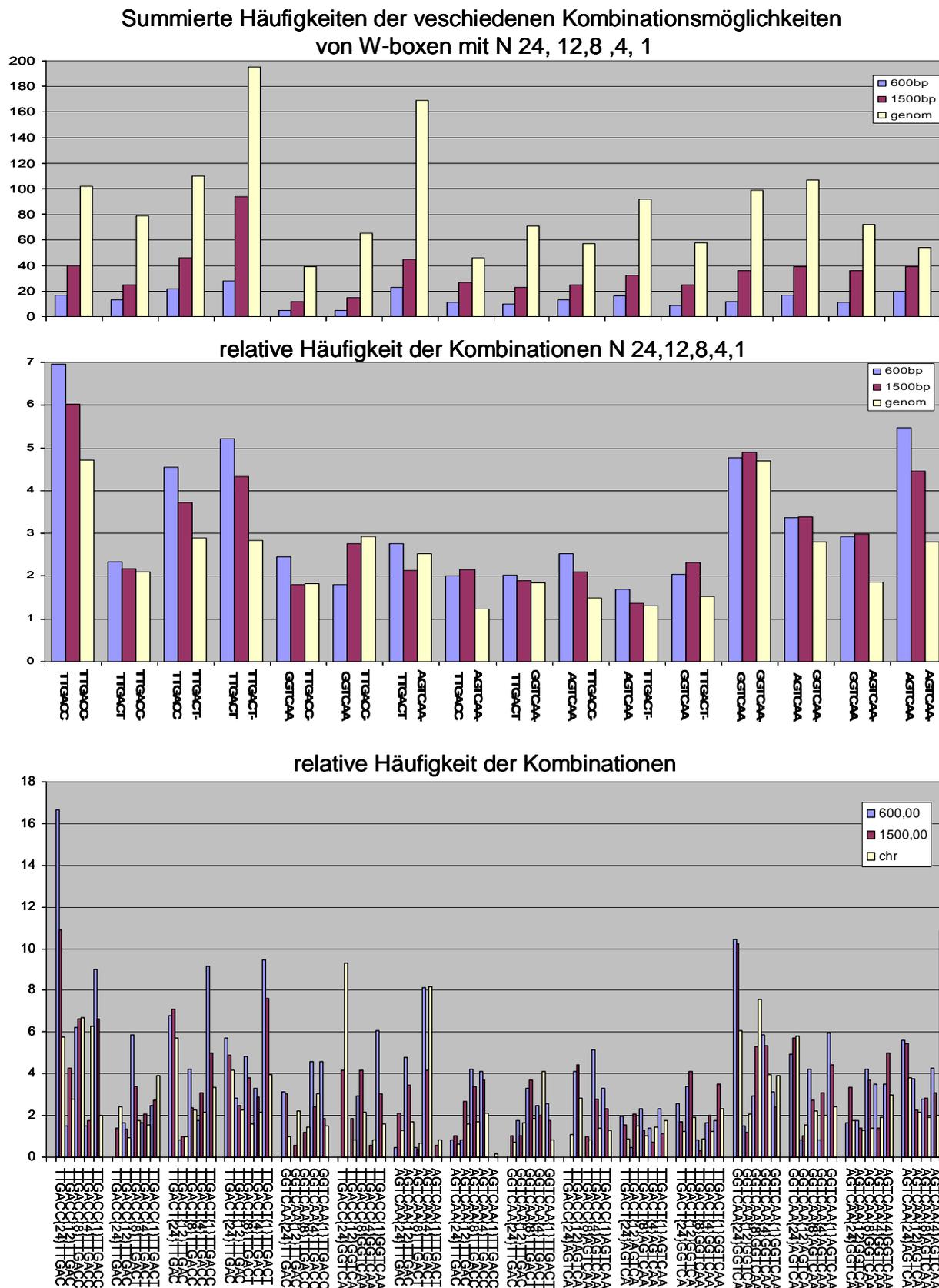
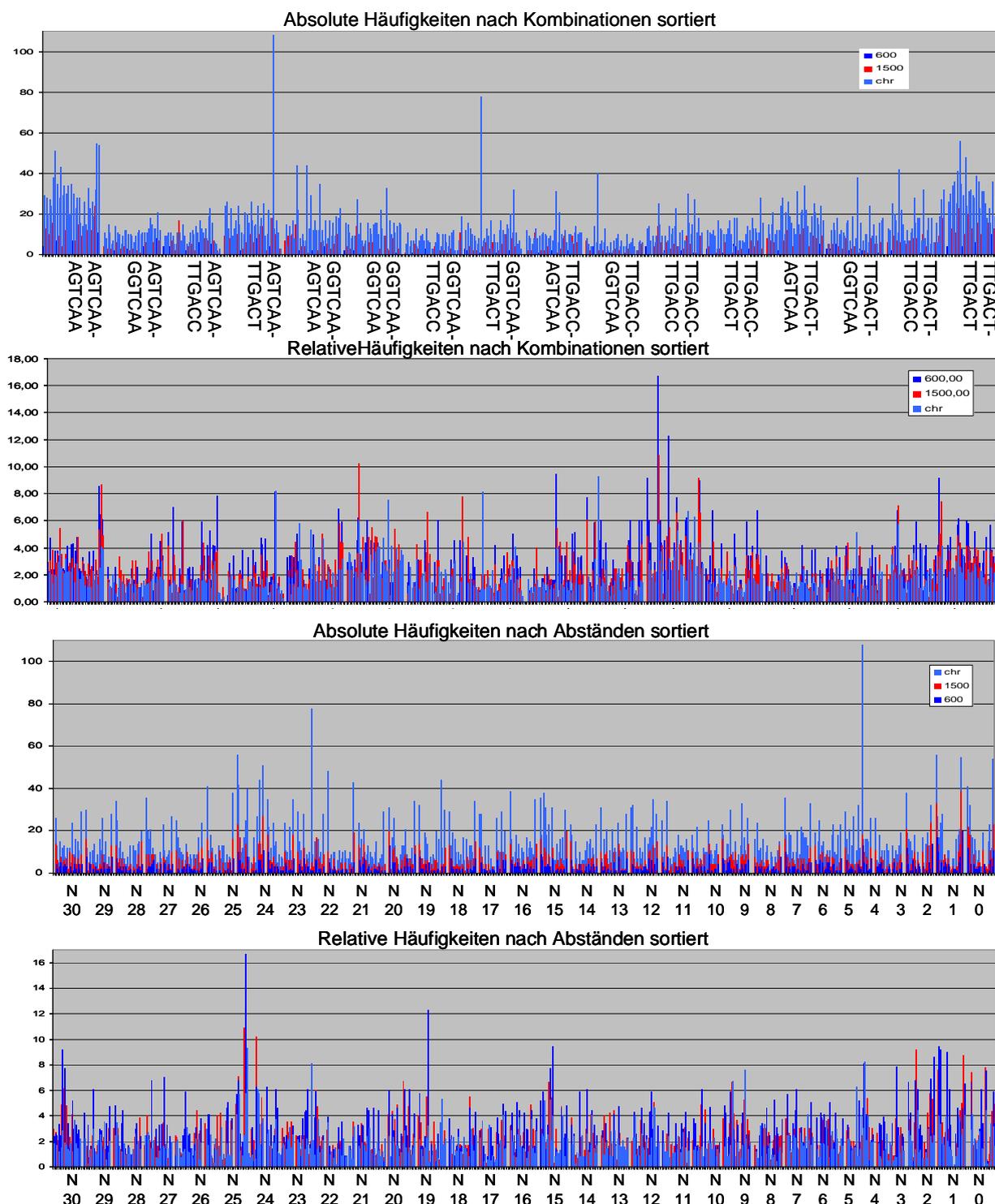


Abbildung A8: Häufigkeiten der einzelnen kombinierten W-Boxen in den Abständen von 0 bis 30 Basen

A Absolute Häufigkeiten nach Kombinationen sortiert, Reihenfolge der Kombinationen unterhalb der Grafik **B** relative Häufigkeiten nach Kombinationen sortiert, Reihenfolge der Kombinationen oberhalb der Grafik **C** absolute Häufigkeiten der einzelnen Kombinationen nach Abständen (N) sortiert **D** relative Häufigkeiten der einzelnen Kombinationen nach Abständen (N) sortiert


Abbildung A9 (folgende Seite): Alignment der WRKY-Domäne aller *Ath*WRKY-Faktoren, inclusive N-terminaler Domäne

65 bis 70 AS dienen als Basis für das mit ClustalW erstellte Alignment. Absolut konservierte Positionen in rot, hoch konservierte Positionen in orange. NTD im Namen bedeutet N-terminale Domäne

AtWRKY7	ADIPSDDEFSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERALDD-AMMLIVTYEGD--HNHALV
AtWRKY15	SDVPPDDYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERAADDD-SSMLIVTYEGD--HNHSL
AtWRKY39	ADIPPDEYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERCIDE-TSMLIVTYEGE--HNHSRI
AtWRKY74	ADIPPDEYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERCIVE-TSMLIVTYEGE--HNHSRI
AtWRKY11	ADIPPDEYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERALDD-PAMLIVTYEGE--HRHNQS
AtWRKY17	ADIPPDEYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSVR--GCPARKHVERALDD-STMLIVTYEGE--HRHQ
AtWRKY21	ADIPPDDYSWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSMR--GCPARKHVERCLED-PAMLIVTYEAE--HNHPKL
AtWRKY14	EVVPSDLWAWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSSK--GCSARKQVERSRTD-PNMLIVTYTSE--HNHPWP
AtWRKY35	EVVPSDLWAWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSSK--GCSARKQVERSRTD-PNMLIVTYTSE--HNHPWP
AtWRKY65	TTPPSDSWAWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSTK--GCPARKQVERSRRD-PTMLIVTYTSE--HNHPWP
AtWRKY16	GSRSSDLWVWRKYGQKPIKGSPPRYYRCASSK--GCFARKQVERSRTD-PNVSVITYISE--HNHPFP
AtWRKY27	EALNSDVWAWRKYGQKPIKGSPPRGYYKCSSSK--GCLARKQVERNRSDD-PKMFIVTYTAE--HNHPAP
AtWRKY22	ENLSSDLWAWRKYGQKPIKGSPPRNYRCASSK--GCLARKQVERNRSDD-PNIFIVTYTGE--HHPRP
AtWRKY29	ENLSSDAWAWRKYGQKPIKGSPPRYYRCASSK--GCLARKQVERNRSDD-PEKFTITYTNE--HNHELP
AtWRKY45	VDILDDGYRWRKYGQKAVKNNPFRYYRCCTEE--GCRVKKQVQRQWGD-EGVVVTTYQGV--HHTAVD
AtWRKY24	DDVLDGGRWRKYGQKSVKHNAPRYYRCCTYH--TCNVKKQVQRLAKD-PNVVVTTYEGV--HNHPCE
AtWRKY56	DDVLDGGRWRKYGQKSVKHNAPRYYRCCTYH--TCNVKKQVQRLAKD-PNVVVTTYEGV--HNHPCE
AtWRKY43	ADILDDGYRWRKYGQKSVKNSLYRYYRCCTYH--MCNVKKQVQRLSKE-TSIVETTYEGI--HNHPCE
AtWRKY12	VDVLDGGRWRKYGQKVVKNSLHPRYYRCCTHN--NCRVKKRVERLSEDD-CRMVITTYEGR--HNHIPS
AtWRKY13	VDVLDGGRWRKYGQKVVKNTQHPRYYRCCTQD--KCRVKKRVERLADD-PRMVITTYEGR--HLHSPS
AtWRKY8	VDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPYRYYRCCTTQ--KCNVKKRVERSYQDD-PTVVITTYESQ--HNHPPI
AtWRKY71	IDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPYRYYRCCTTQ--KCNVKKRVERSFQDD-PSIVITTYEGK--HNHPPI
AtWRKY23	VDHLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFRYYRCCTTA--SCNVKKRVERSFRRD-PSTVVTTYEGQ--HHTHISP
AtWRKY48	IDNLDGGRWRKYGQKAVKNSPYRYYRCCTTV--GCGVKKRVERSSDD-PSIVMTTYEGQ--HHTHPPF
AtWRKY57	VDNLEDGYRWRKYGQKAVKNSPFRYYRCCTNS--RCTVKKRVERSSDD-PSIVITTYEGQ--HCHQTI
AtWRKY68	VLHLDDGYRWRKYGQKPVKSDPFRYYRCCTTT--WCDVKKRVERSFSD-SSSIVITTYEGQ--HHTHPRP
AtWRKY50	VEVLDGDFWRKYGQKMMVKNSPHPRNYRCCTSD--GCPVKKRVERDRDD-PSFVITTYEGS--HNHSSM
AtWRKY59	KVALDDGGRWRKYGQKPIKGSPPRHHYKCSSP--DCNVKKIERDTNN-PDYILTTYEGR--HNHPSP
AtWRKY2NTD	GAPAEADGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTNP--NCQVKKVERSER-E-GHITETIYKGA--HNHLKP
AtWRKY34NTD	CAPADDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTHP--NCEAKKVERSER-E-GHITETIYKGA--HNHSPK
AtWRKY20NTD	SILADDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTHP--NCEVKKLFERSH-D-GQITDIIYKGT--HDHPKP
AtWRKY3NTD	DKPADGYNWRKYGQKQVKGSDPFRYYRCCTHP--ACPVKKVERSLD-D-GQVTEIYKQG--HNHELP
AtWRKY4NTD	DKPADGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTNP--GCPVKKVERSLD-D-GQVTEIYKQG--HNHELP
AtWRKY58NTD	DKPADGYNWRKYGQKPIKGSSEYRYYRCCTHV--NCPVKKVERSSD-D-GQITQIYKQG--HDHERP
AtWRKY33NTD	QRKGEDGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTFP--NCPVKKVERSLD-E-GQITETIYKGS--HNHPKP
AtWRKY73	LTQGEDSYLWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTLP--NCPVKKVERSLD-E-GQITETIYKGS--HNHPKP
AtWRKY26NTD	NKTSDDGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTYP--NCLTKKVVETSLVK-GQMIEIYKGS--HNHPKP
AtWRKY25NTD	SRNSNDGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTYP--DCVSKIVETAS-D-GQITETIYKGS--HNHPKP
AtWRKY44NTD	DRSSVDGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTHP--KCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY1NTD	EKVMDDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTHP--NCKAKQLERSA-G-GQVVDTVYEGE--HDHPKP
AtWRKY32NTD	RTPARDGYNWRKYGQKQVKGSEYRYYRCCTYT--ECCAKK-IECSNDS-GNVVEIVNKGK--HHTHEP
AtWRKY18	SLTVKDDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTYP--SCPVKKVERSER-E-GHITETIYKGA--HNHSPK
AtWRKY60	SLTVKDDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTYP--SCPVKKVERSER-E-GHITETIYKGA--HNHSPK
AtWRKY40	TLVVKDDGYNWRKYGQKLVKGSSEYRYYRCCTYP--SCPVKKVERSER-E-GHITETIYKGA--HNHSPK
AtWRKY6	APMISDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY31	AAMI SDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY42	APMLSDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY47	ATTVNDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY9	TATMNDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY72	TPTMNDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY61	RVSMNDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY36	-PSINDGCQWRKYGQKMAKGNPCPRAYRCCTMAT--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY1	FDIVNDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSSP--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY32	VGICDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRNYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY2	VDILDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY20	VDILDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY33	IDILDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY34	IDILDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY26	IDILDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY3	VDLLDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY4	VDLLDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY58	VDLLDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCPVKKVERSER-E-GQVSEIYKQG--HNHSPK
AtWRKY44	SDSLEDGFRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--NCRARKHVERASDD-PRAFITTYEGK--HNHLL
AtWRKY25	IDVLIDGFRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--GCGVKKVERSAAD-ERAVLTYEGR--HNHDI
AtWRKY10	EDNPNDDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--EGRVKKHVERGADN-IKLVVTTYDGI--HNHPS
AtWRKY4	NGMCDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY38	DPYIDGGRWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY62	TPIYHDGFLWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY63	NPRLDGFTWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY64	TPRPDDGFTWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY67	TMCNDDGFTWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY66	TPAHIDGFIWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY41	EGPHDDIFSWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY53	EGPQDDVFSWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY30	DRTLDDGFSWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY46	NGSIDDGHWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY54	AKSSEDRYAWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY70	STILEDAFSWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY55	DLPPDDNHTWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY
AtWRKY52	AIDEGDLWTWRKYGQKSVKGSPPRYYRCCTSA--ICNAKQVERSIDE-SNTYIITYEGF--HFHYTY

Abbildung A10: mit ClustalW erstellter, ungewurzelter phylogenetischer Baum der WRKY Domänen von *AthWRKY* Faktoren

65 bis 70 AS dienen als Basis zur Berechnung für diesen ungewurzeltten, phylogenetischen Baum, basierend auf dem Alignment in Abbildung A9. Die Zugehörigkeit zu Untergruppen ist rechts notiert.

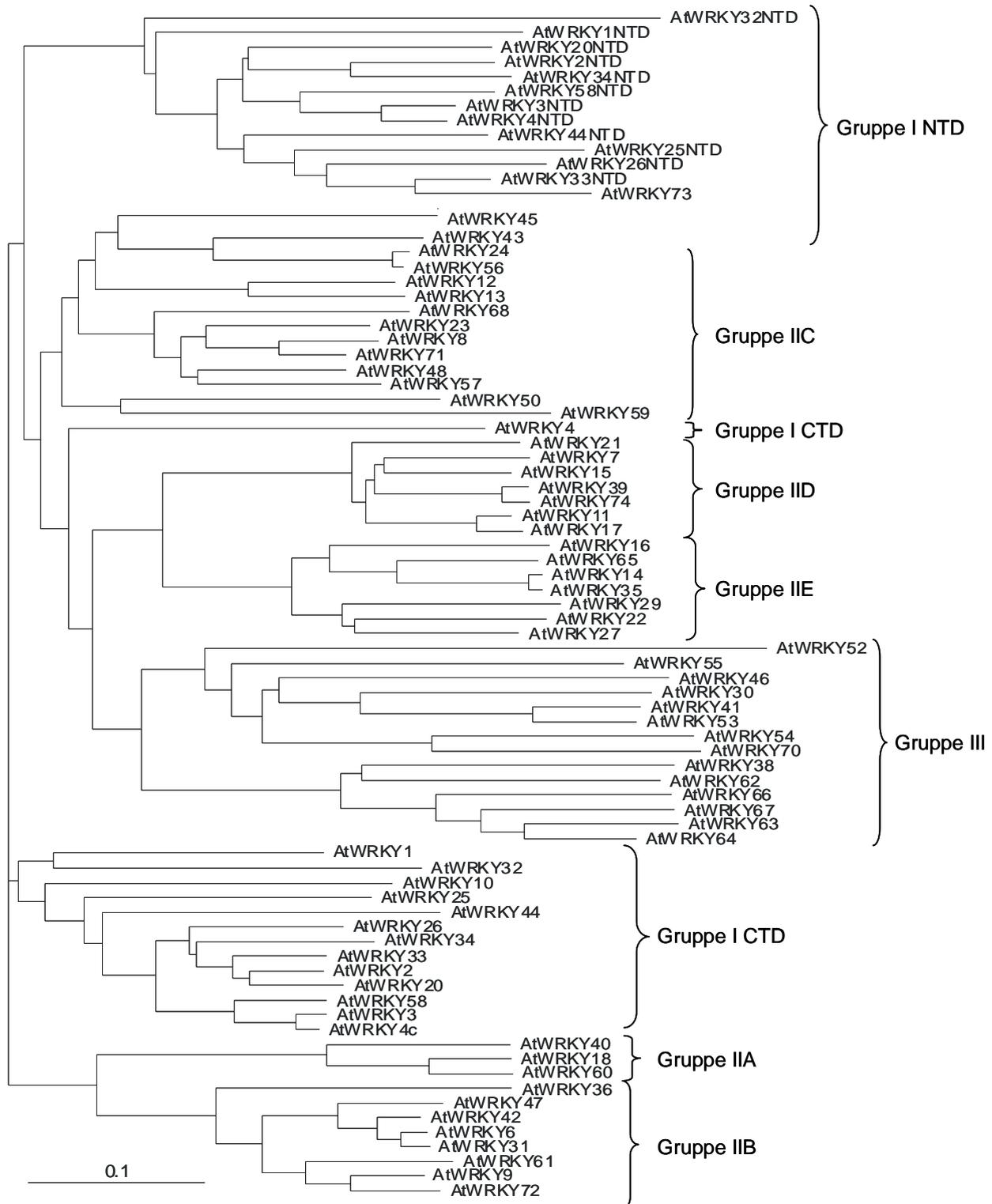


Abbildung A11: Sequenz- und Phylogenetischer Vergleich von N-terminaler und C-terminaler WRKY-Domäne von Gruppe I WRKY Faktoren

65 bis 70 AS dienten als Basis für das mit ClustalW erstellte Alignment und den ungewurzelten phylogenetischen Baum zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Subgruppe. Absolut konservierte Positionen in rot, hoch konservierte Positionen in orange.

Alignment N-terminale WRKY Domäne

```

AtWRKY1      VMEDGYNWRKYGQKLVKGNEFVRSYYRCTHPNCKAKKQLER - SAGGQVVDTVYFGEHDHPKP 101
AtWRKY20     LADDDGYNWRKYGQKHVKGSEFPRSYYKCTHPNCEVKKLFER - SHDGQITDIIYKGTHDHPKP 101
AtWRKY25     NSNDDGYWRKYGQKQVKGSENPRSYFKCTYPDCVSKKIVET - ASDGQITEIIYKGGHNHHPKP 101
AtWRKY26     TSDDDGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYFKCTYPNCLTKKKVETSLVKQMIEIVYKGSHNHPKP 102
AtWRKY44     SSVDDGYNWRKYGQKQVKGSECPRSYYKCTHPKCPVKKKVER - SVEGQVSEIVYQGEHNHNSKP 101
AtWRKY33     KGEDDGYNWRKYGQKQVKGSENPRSYYKCTFPNCPTKKKVER - SLEGQITEIVYKGSHNHPKP 101
AtWRKY2      PAEDDGYNWRKYGQKLVKGSEYPRSYYKCTNPNCQVKKKVER - SREGHITEIIYKGAHNHLKP 101
AtWRKY34     PADDDGYNWRKYGQKLVKGSEYPRSYYKCTHPNCEAKKKVER - SREGHIEIIYTGDIHNSKP 101
AtWRKY3      PADDDGYNWRKYGQKQVKGSDFPRSYYKCTHPACPVKKKVER - SLDGQVTEIIYKQHNHELP 101
AtWRKY4      PADDDGYNWRKYGQKQVKGSEFPRSYYKCTNPGCVPKKKVER - SLDGQVTEIIYKQHNHEPP 101
AtWRKY58     PADDDGYNWRKYGQKPIKGCEYPRSYYKCTHVNCVPKKKVER - SSDGQITQIIYKQHDHERP 101
AtWRKY32     PARDDGYNWRKYGQKQVKSPKGSRSYYRCTYTECCAKKIECS - NDSGNVVEIVNKGLHTHEPP 101

```

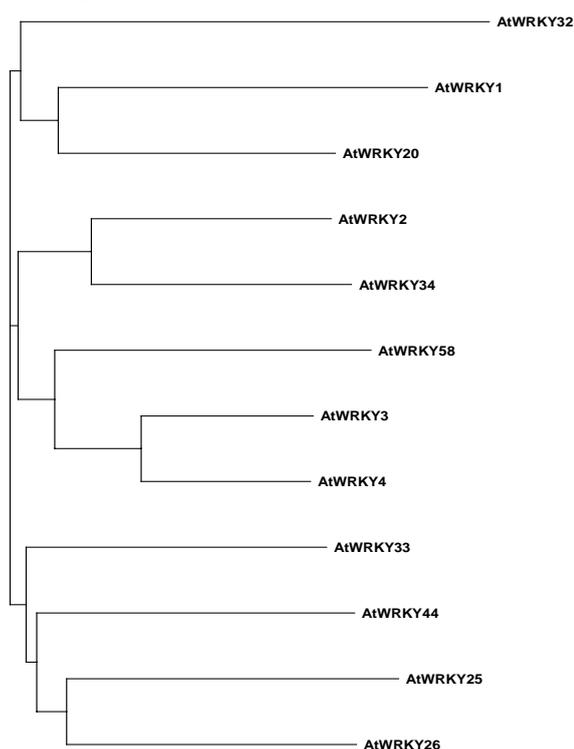
Alignment C-terminale WRKY Domäne Gruppe I

```

AtWRKY3      DLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPYPRSYYKCTTPDCGVRK - HVERAATDPKAVVTTYEGKHNHDVP 101
AtWRKY4      DLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPYPRSYYKCTTPGCGVRK - HVERAATDPKAVVTTYEGKHNHDL 101
AtWRKY58     DLLDDGYRWRKYGQKVVKGNPHPRSYYKCTTPNCTVRK - HVERASTDAKAVITTYEGKHNHDVP 101
AtWRKY44     DSLEDGFRWRKYGQKVVGGNAYPRSYYKCTSANCRARK - HVERASDDPRAFTTYEGKHNHLL 101
AtWRKY73     - - - EDSYLWRKYGQKQVKGSENPRSYYKCTLPNCPTKN - KVERSLEG-QITEIAYKG - - - - - 73
AtWRKY1      DIVNDGYRWRKYGQKSVKGSPYPRSYYRCSSPGCPVKK - HVERSSHDTKLLITTYEGKHDHDM 101
AtWRKY32     GICGDGYRWRKYGQKMVKGNPHPRNYYRCTSAGCPVRK - HIETAVENTKAVITYKGVHNHDM 101
AtWRKY10     DNPNDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTNIECRVKK - HVERGADNIKLVTTYDGIHNHPS 101
AtWRKY26     DIILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTFTGCFVRK - HVERAFQDPKSVITTYEGKHKHQIP 101
AtWRKY33     DIILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTTIGCPVRK - HVERASHDMRAVITTYEGKHNHDVP 101
AtWRKY25     DVLIDGFRWRKYGQKVVKGNTNPRSYYKCTFQCGVKK - QVERSAADERAVLTTYEGRHNHDIP 101
AtWRKY45     DIILDDGYRWRKYGQKAVKNNPFPRSYYKCTEEGCRVKK - QVQRQWGDEGVVTTYQGVHTHAVD 101
AtWRKY2      DIILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTAPGCTVRK - HVERASHDLKSVITTYEGKHNHDVP 101
AtWRKY34     DIILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTTANGCTVTK - HVERASDDFKSVLTTYIGKHTHVVP 101
AtWRKY20     DIILDDGYRWRKYGQKVVRGNPNPRSYYKCTAHGCPVRK - HVERASHDPKAVITTYEGKHDHDP 101

```

Phylogenetischer Baum N-terminale Domäne



Phylogenetischer Baum C-terminale Domäne

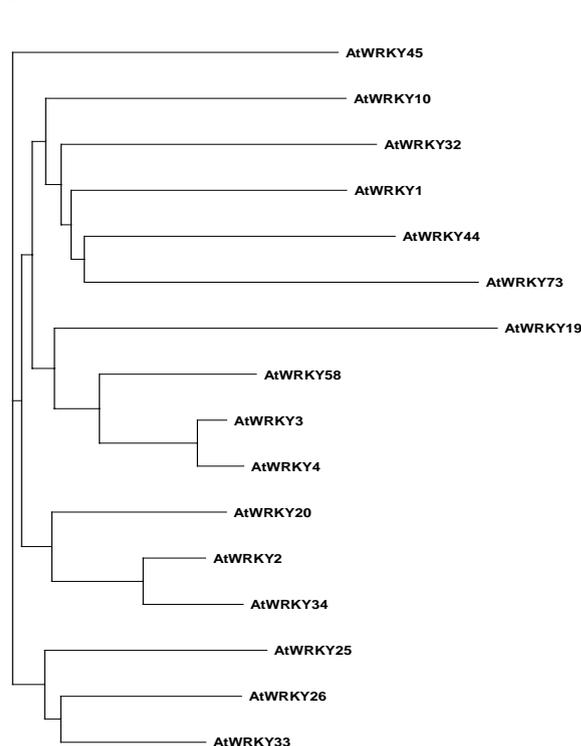
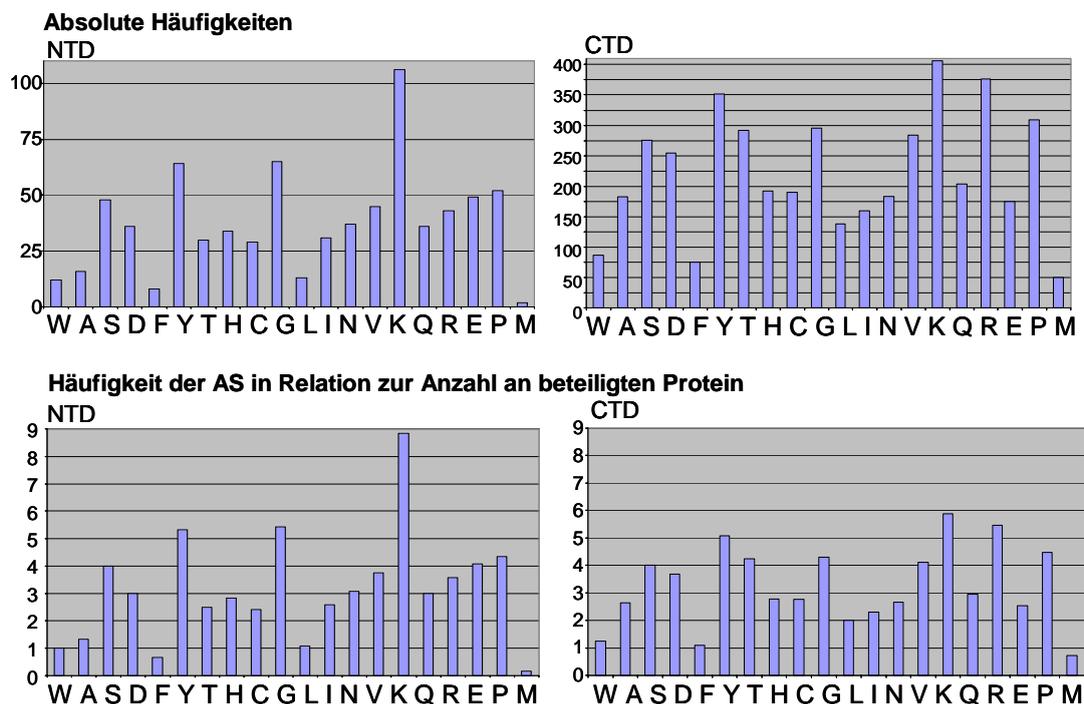


Abbildung A12: Vergleich der AS-Nutzung in C- und N-terminaler WRKY-Domäne

Dargestellt ist die zum einen die Gesamthäufigkeit der einzelnen Aminosäuren in den verschiedenen WRKY-Domänen und zum anderen die Häufigkeit relativ zur Gesamtzahl an vorhandenen Domänen, da nur 12 N-terminale, aber 68 C-terminale WRKY-Domänen ausgezählt wurden.

**Abbildung A13: Darstellung der Ladungsverteilung auf Basis der AS-Sequenz**

Bestimmung der Ladung jeder einzelnen AS, wobei + für positive, - für negative Ladung steht und 0 bedeutet unpolare AS. Besonderes Interesse gilt hier längeren Abschnitten, die eine bestimmte Ladung aufweisen.

WRKY 6

```

1 0-+0000000 -0000-0000 0+000+00++ 00000000+0 -----0+0+0 00000-0+00
61 000000+--- ---0000000 -0-+-000-0 -000-++0+0 0+----00+0 ++--0--+0-
121 0000000+00 000+0--000 --0-00-0-- ++0+0-00+0 0--0+000- 00+0+-0000
181 0000000000 0000000000 0000+00-00 -+0--0000+ 000-0000+0 00-0--0000
241 00--+0+000 0000-++000 ++00+-00- 0-00+00+0 0000000-00 000000+0+0
301 00+0+0-000 00-0000++0 00+00+0000 0+000+0000 00000++000 +00--+0000
361 000-000000 0000000000 0000000000 0000000-00 0000000+0 0000000000
421 0000000000 00-0000000 0000000000 0000000000 0+00000000 0000000000
481 0000000000 +000000000 0000000000 0000-00000 00-0000000 0000000000
541 0000-0-000 +00

```

WRKY 11

```

1 000-00+00+ 0--00000-0 00000000-0 00+0000+0- 00000-00-0 0-0000+0+0
61 000000+000 0+0++00000 0000000+00 0000+0000- 00000000+0 0000000000
121 000000-00+ 000000+0+0 0-0-00+-00 0000000000 00000-0000 00+0000000
181 00000000+0 0000000+++ 00-0-00-00 00+0000000 +000+++++0+ 0++00+0000
241 00+00-000- -000++000+ 00+00000+0 00+0000+00 00++00-+00 --00000000
301 -0-0+00000 00-0000000 0-0000000

```

WRKY 26

```

1 0000-+0+00 0+0+000000 0000000000 00000000-0 0-00000000 0000000000
61 0000000000 00000-+0-0 +0--000000 0000000000 00-00+0-00 000+00--00
121 00++000+00 +00-00+000 +00000000+ ++0-0000+0 000-000+00 0000+0000+
181 +000000000 000000-0+0- 00--0-0+0+ 0+-000+0+0 +0000000-0 -00--00+0+
241 +000+00+00 000+000+00 000000++00 -+000-0+00 0000-0+0+0 00000++000

```

WRKY 38

```

1 00000-+000 00+0000000 +0+++00000 0-0000000- 00+000-000 00000000+0
61 -0---000-0 00+-000000 0000+++++0- 00000-00+- -00-0000-0 000++000+0
121 0++0000+00 0+0000+-00 0-0+0-0+0 +-00000+00 0000000+0- 000-000000
181 0-00--0+00 000+00+-0- 0+-+0+0000 0000+0---0 0+-000-00+ -0000-0-00
241 -00--00000 0000000000 00-00-000- 000-00-00- +0-0000

```

WRKY 43

```

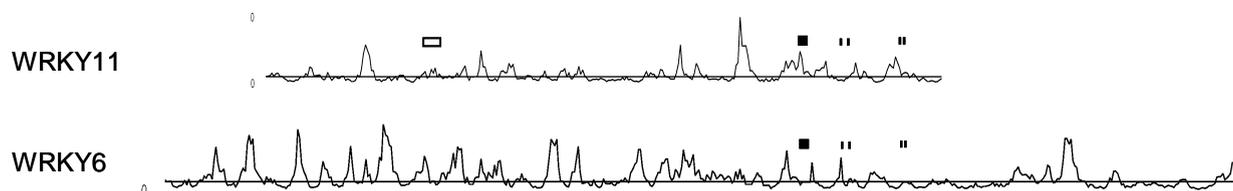
1 000++0000- 00+00+000+ 0+0-0-00-- 00+0++000+ 00+00000+0 00+0000000
61 0++000+00+ -0000-000- 0000000--0 0000000000 00000+00

```

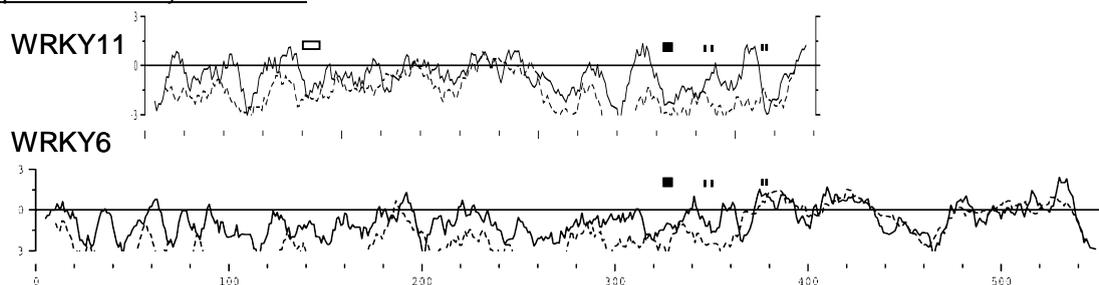
Abbildung A14: Hydropathie und Oberflächenwahrscheinlichkeit mit dem GCG-Paket

Für die AS-Sequenzen der angegebenen WRKY-Proteine wurde berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten an der Oberfläche einer Proteinstruktur oder wie hydrophil/hydrophob ein bestimmter Bereich ist. Die Fenstergrösse zur Berechnung war 9 AS. Die Lage der WRKY-Domäne ist mit einem schwarzen Viereck und senkrechten Strichen für die Cysteine und Histidine des Zinkfingers gekennzeichnet. Diese Abbildung soll die Ergebnisse von Abbildung 24 und 25 ergänzen und Variationen deutlicher aufzeigen.

Oberflächenwahrscheinlichkeit:



Hydropathie nach Kyte-Doolittle

**Abbildung A15: Bestimmung der Polarität von AS-Sequenzen nach Grantham**

Für die Aminosäuresequenzen der angegebenen Proteine wurde Ladung untersucht, Expasy, Fenstergrösse 9AS, WRKY Domänen untereinander angeordnet, je grösser der Wert, desto polarer

Abbildung A16: Bestimmung putativer Phosphorylierungsstellen**Abbildung A17: Bestimmung der durchschnittlich vergrabenen Reste****Abbildung A18: Bestimmung der durchschnittlich vergrabenen Fläche****Abbildung A19: Bestimmung der Sperrigkeit****Abbildung A20: Bestimmung der durchschnittlichen Flexibilität**

Abb. 15: Polarität nach Grantham

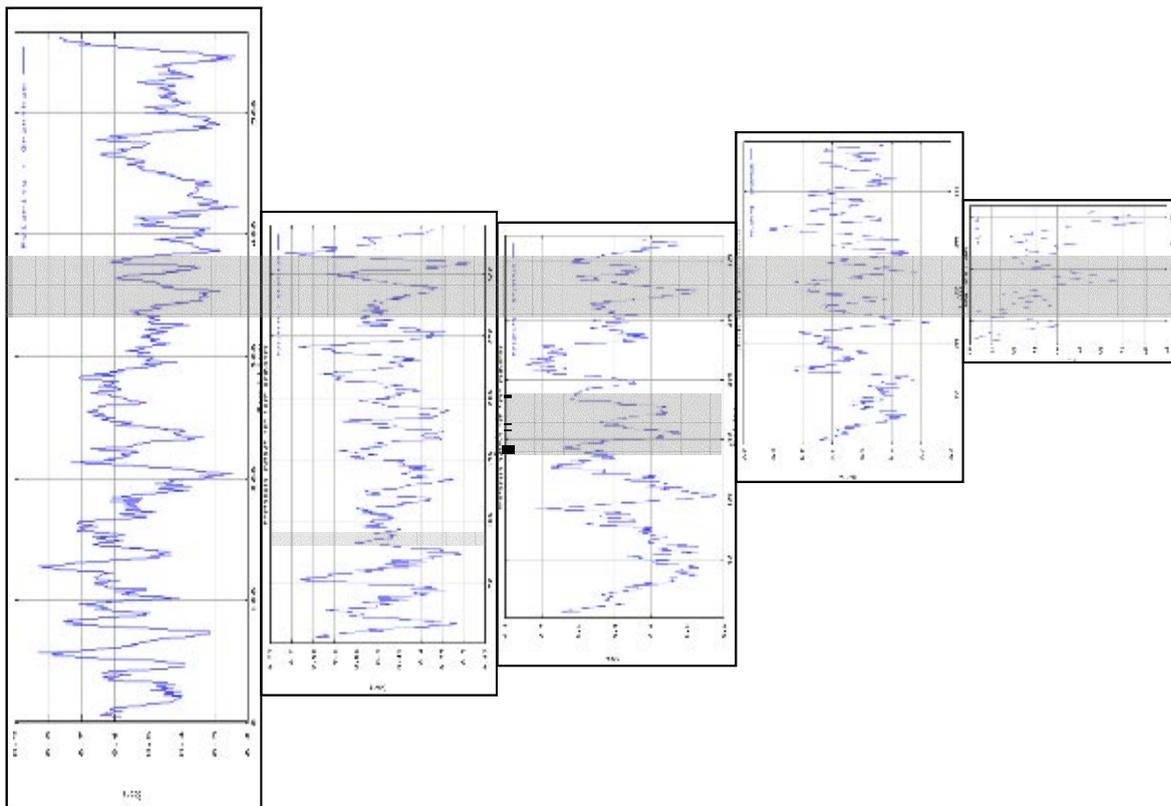
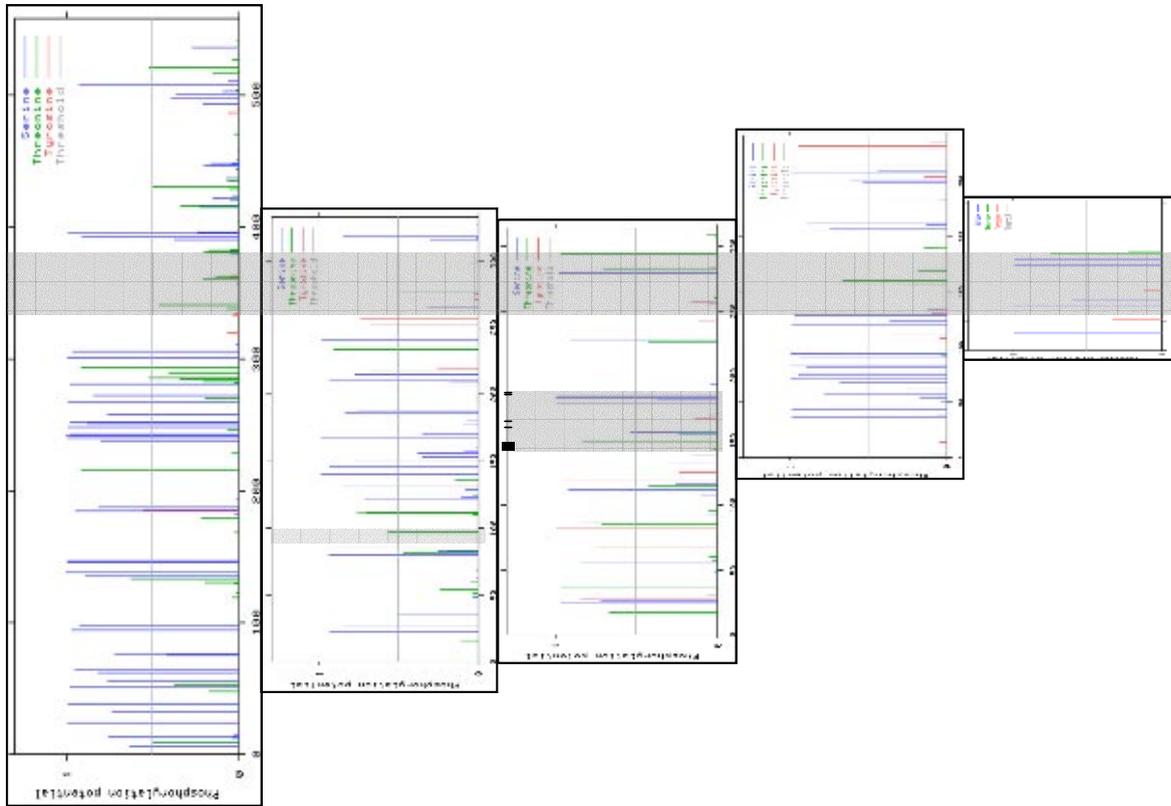


Abb. 16: putative Phosphorylierungsstellen



W6

W11

W26

W38

W43

Abb. 18: durchschnittlich vergrabene Fläche

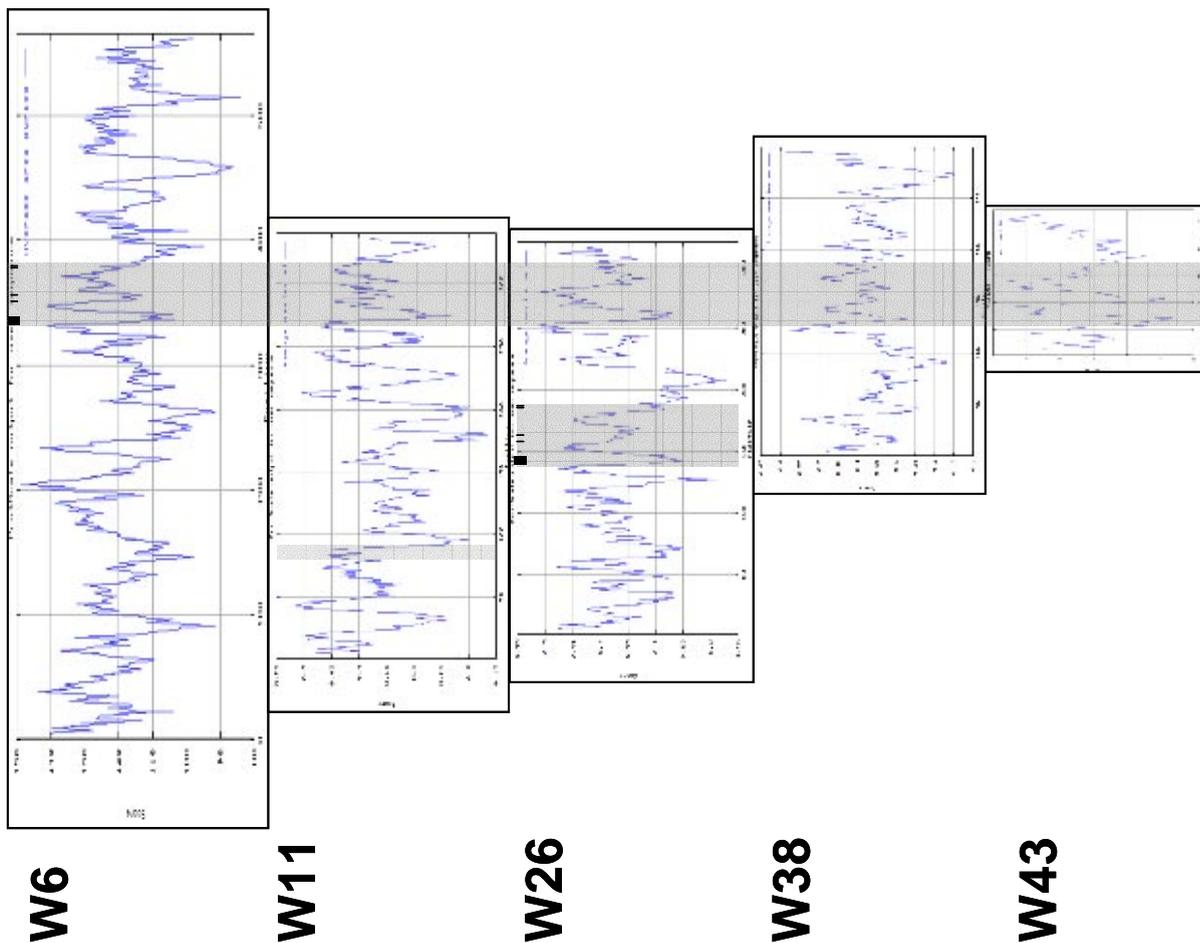


Abb. 17: vergrabene Reste

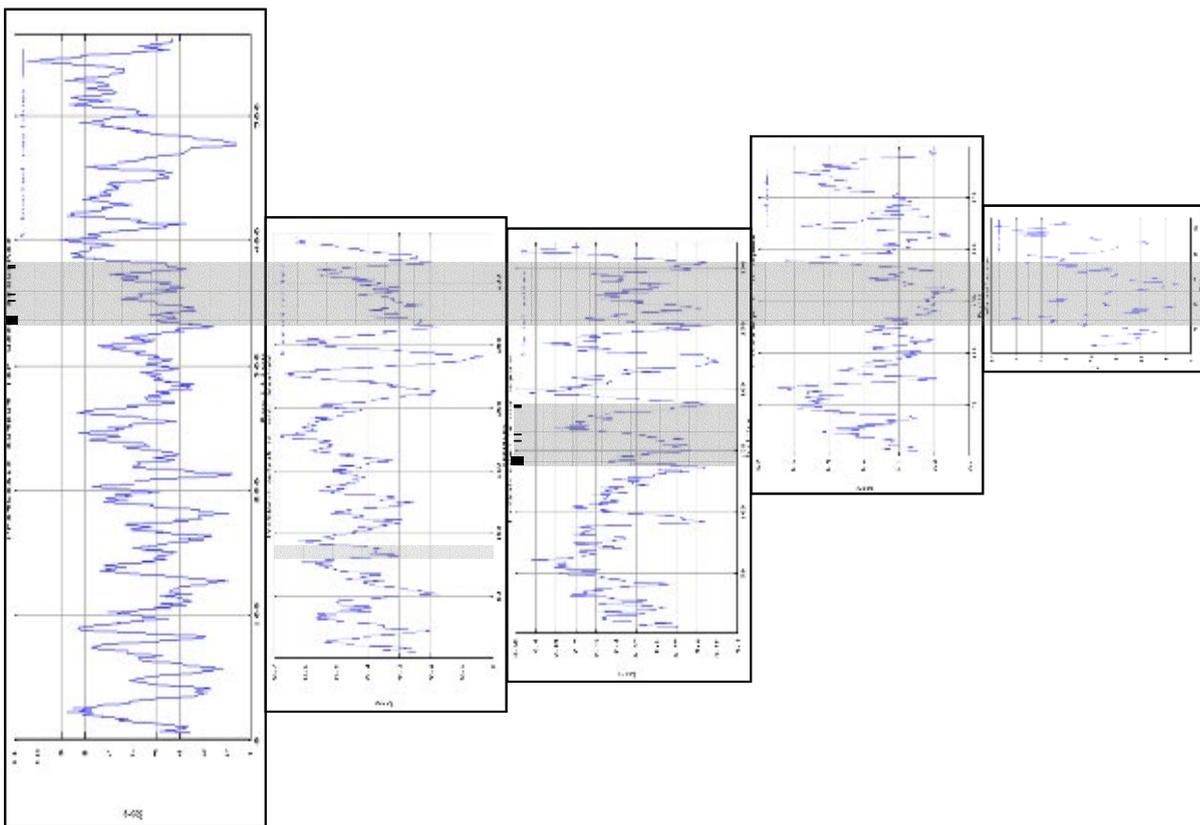


Abb. 20: Sperrigkeit

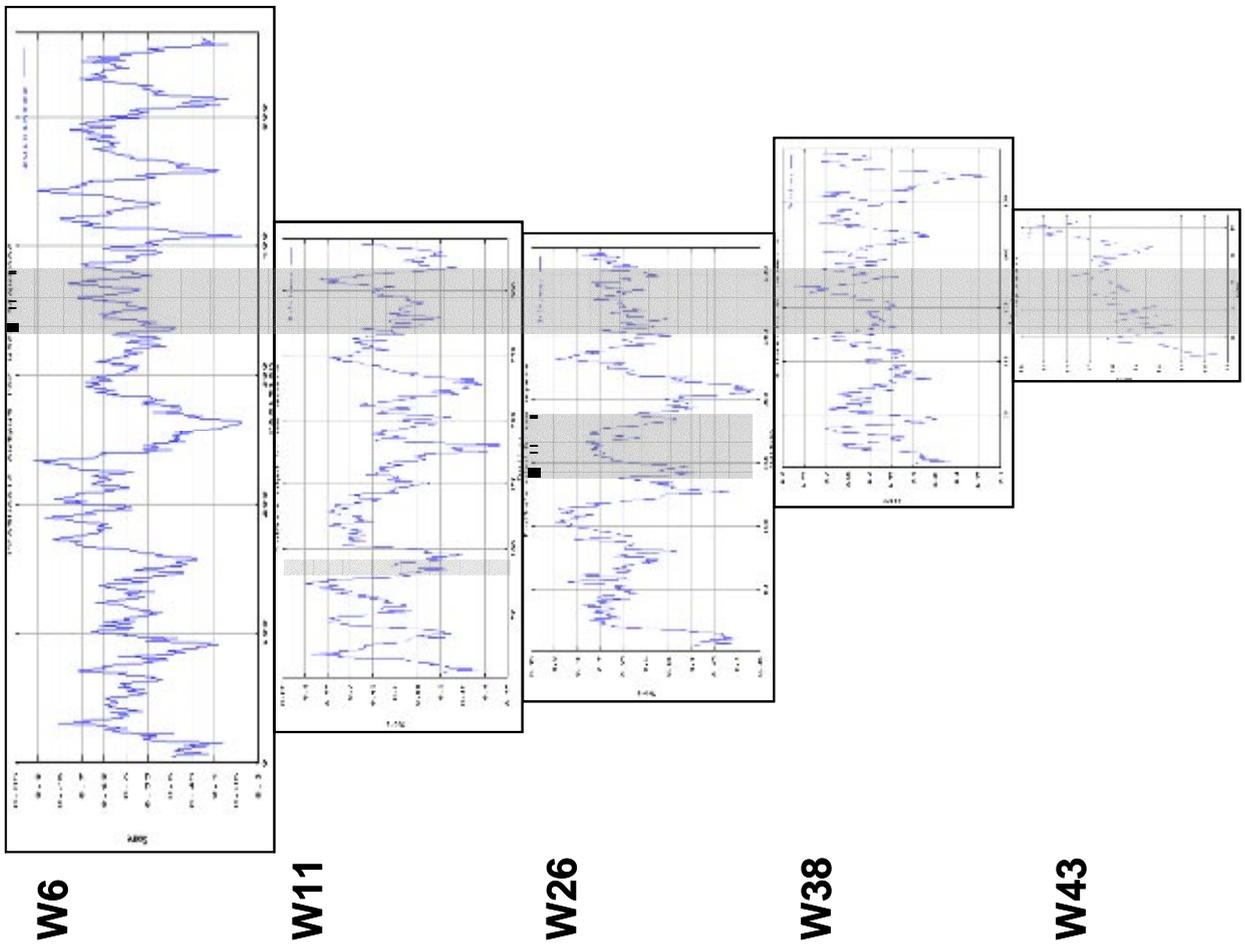
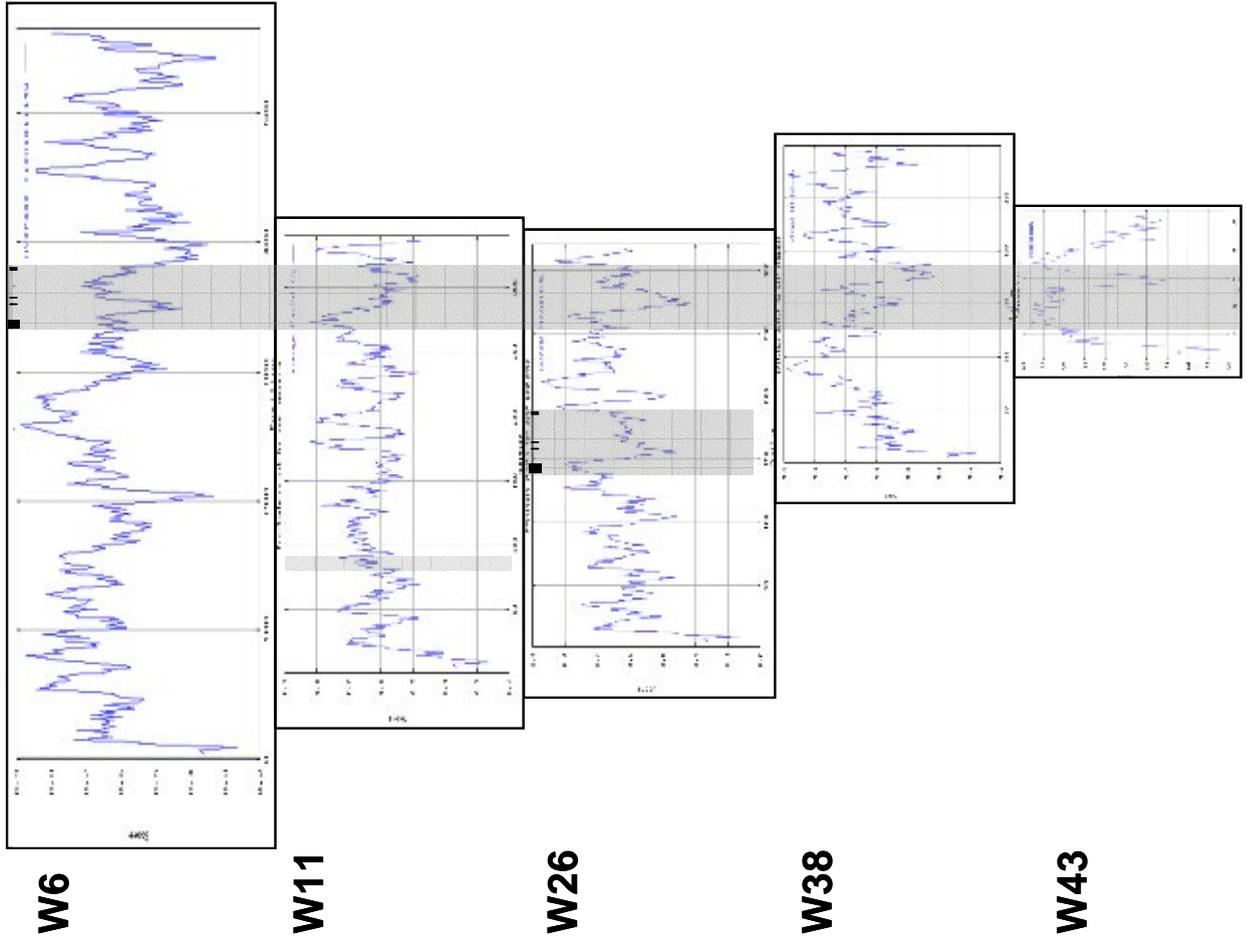


Abb. 19: Flexibilität



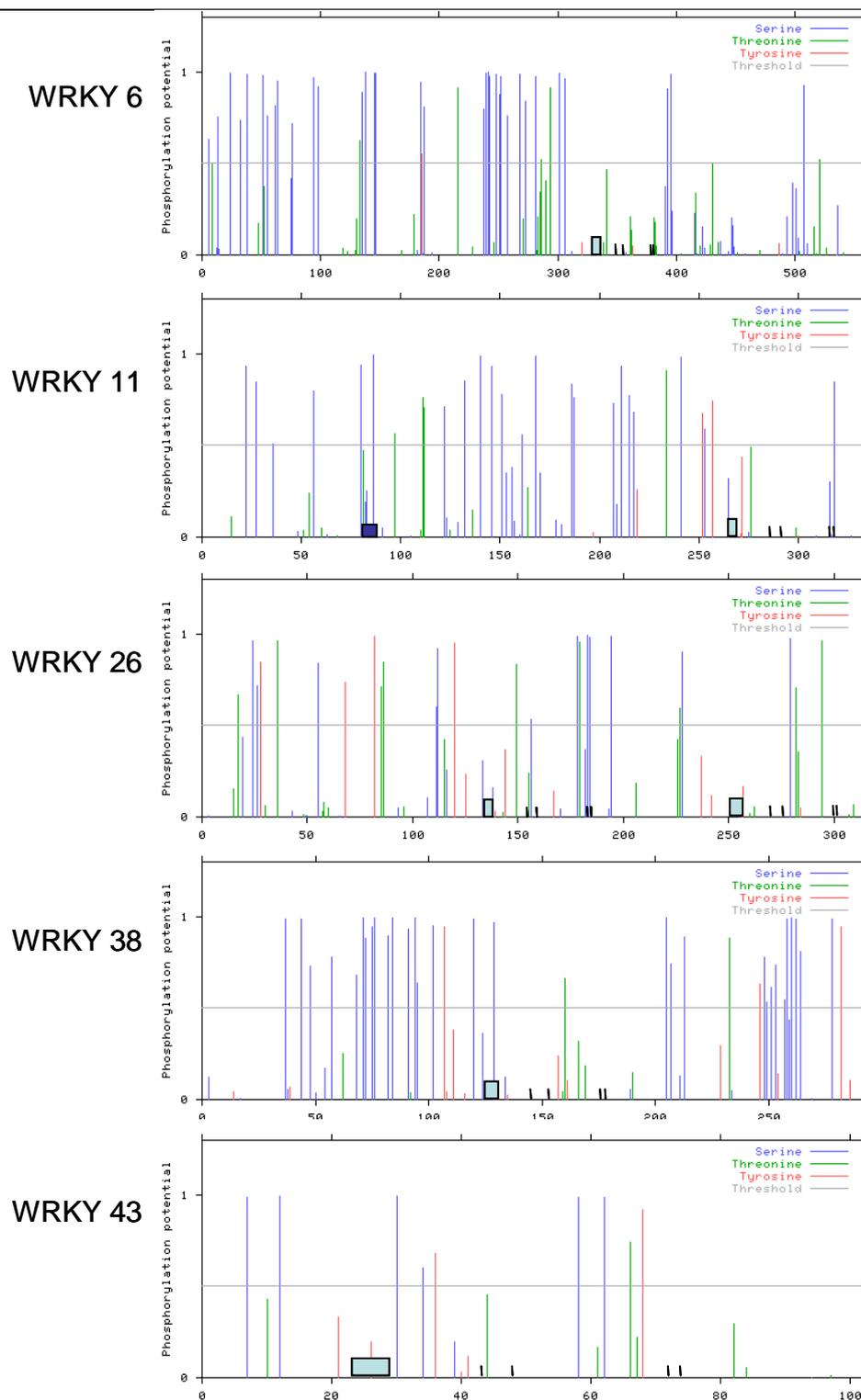


Abbildung A16: Vorhersage von putativen Phosphorylierungsstellen

WRKY Domäne wieder mit offenem Quadrat (WRKYGQK) und senkrechten Strichen (CCHH des ZF) markiert, HARF Domäne von WRKY 11 mit blauem Viereck markiert

blau – Serin, grün – Threonin, rot Tyrosin, grau – Grenzwert, Vorhersagen, die über diese Linie hinaus gehen, können als signifikant angesehen werden

Abbildung A21 (nächsten Seiten): Vorhersage der Sekundärstruktur von WRKY 26, 38 und 43 (und WRKY 6 und WRKY 11) mit JPRED

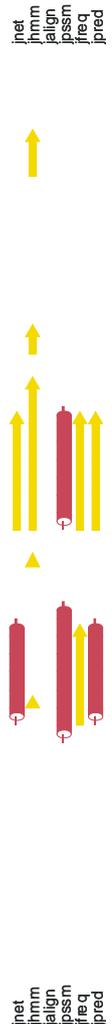
Die AS-Sequenz der WRKY-Proteine wurde mit annotierten Proteinen verglichen und mit dem Alignment eine Vorhersage der Sekundärstruktur getroffen. Der Vorteil dieses Programmes liegt darin, dass die Vorhersage mit verschiedenen Algorithmen getroffen wird. Gelbe Pfeile stellen β -Faltblätter, violette Röhren entsprechen α -Helices dar.

Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm JPRED für WRKY 38

```

1  M N S P H E K K A V Q A R Y G H S C A M R L K R R R L N H P M A D G G P L S S Y D 40
   L N C P T K K K V E T F D G H T E L V Y K G N H N H P K P Q S T K R S S S Q
   N C P T K K K V E R S L E G Q T E L V Y K G S H N H P K P Q D Q P N S N N S
   K L V I N E L E L G K E L A N R L M N N K H T S S V D S N K T
   K A V S A L L L G Q G C A N N L K T L L N H E T G S V S T E P
   Q8ZPL6 C8ZPL6 R N S L E D
   Q8XJ26 C8XJ26 R N S L E D
   C A B82760 M E K L L H G H C A N Q L L T M D Q T E S D S S M E R E D
   Q8SX P5 N C P T K K K V E R S L D G Q T E L V Y K G N H N H P K P Q P T L Q Y T K L
   Q39658 Q39658 S R L E K V A E K L N R G R E L T R R L R E M L K K P E A D G S V L L T E E
   A A F 61864 V N C P V K K V E R S S D G Q T Q L L Y K G Q H D H E R P Q G G R D S T E
   A A F 26166 Q40090 Q40090
   Q8X190 Q8X190
   Q38704 Q38704
   Q8XFF1 Q8XFF1
   Q40829 Q40829
   A A F 61863 N P R K N R V I K E E V D G K R F A T Q L Q T L L Q Q P L A D H G P V S A D E
   O65590 O65590
   Q8SUJ0 Q8SUJ0
   Q8SE29 Q8SE29
   Q8ZPL7 Q8ZPL7
   C A B98043 K V M N Q V E G H D T T Q L Q Q L L S Q P G S G L E E D
   Q8SZ67 S E S G
   O22921 S E S G
   O22921 G K V L A S D M E L D H N E T K A V D D V V A T T D
   Q43388 G K V L A S D M E L D H N E T K A V D D V V A T T D
   Q82511 M N W E R R S L L N E L L H G L K A K Q L Q G S S P S L S A S S Y Y L T T E
   O65556
   Q8ZJU0
   Q8SUJ0
   Q8SX9 K R K V V D Q V E G H I D E T R L S G S G S V S G G P P D P V D E
   Q8SHB4 G K V L A S D M E L D H N E T K A V D D V V A T T D
   Q8S137 G K V L A S D M E L D H N E T K A V D D V V A T T D
   Q8S137

```



```

50  L A K S L V E S F S N A L S L E S A K P E T E D D Q F S D L L S S R D S S P P P D 80
   S Y Q N S I L P T M P E T S L L L E N G H L L P E D D L L F E Q G S M N K Q S R D E
   F H Q S D S F G M Q Q E D N T T S D S V G D D E F E Q G S S H R G E S N
   L T I S D L L R L Y Q N A F M L S F N Q D K N L K R S E A P D S S A S V I Q E
   L L I N S L L D S F S F A L S S Q N E L P S F S S A P S Q I R A S V I Q E
   L M T R Q Q H A N Q Q N E F S T V K T R K S E V A P L Q S F S Q E K M Q S N P A
   L M T R Q Q H A N Q Q N E F S T V K T R K S E V A P L Q S F S Q E K M Q S N P A
   M K S Q L L S S Y S N A T P E N S L S L F G D D D H H E Q S S Q S D D N E E
   T E P L V I R D P S F S L L D D A S Q L A I L P S
   L V I G K L M S S F S E T L S L L R S N E K S E V S Q S S G S K T S L L P A
   V I A G Q M M E S F S F Q T N S A S M T L N Y E D S K R K D E L L N S L Q S P V I T T
   S S G Q A Q I P T S A
   P W S Y Q D A G S M D A T T R P A S F S T P Y E A P D M V G N G G Y N
   P W S Y Q D A G S M D A T T R P A S F S T P Y E A P D M V G N G G Y N
   A L L S I Q E T Y S Q T L S A D Q N G T L S S P R G V N A D N V D G A S P L L R
   L L L K L W R S F S E A L T E N T L E E V D Q A D S G D R K K D S T S E L R
   P F S S T T T S V L A S Q H V N S S A N V S S P R E L L P L L S S
   P L I S N K A S N S D Q I Q S Q I M E V V S R S D Q Q L V
   V I E K V V S P L I S N K A S N S D Q I Q S Q I M E V V S R S D Q Q L V
   V I E K V V S P L I S N K A S N S D Q I Q S Q I M E V V S R S D Q Q L V
   F N G T I N N H S D F P W Q L Q S Q P S N A S S A L Q E T Y G V
   K A E V I P V A V I T R E T S L E S T D K E L E K L S Q S E V D V A S P V S E
   K A E V I P V A V I T R E T S L E S T D K E L E K L S Q S E V D V A S P V S E
   L L H N I V S S F K K A L L M L N G S T L Q H N P T L E A P D P L A H
   S L T V I T P C L S L D P A T A S T A G D
   F S A E K G V R S S N V T P E S R N F Q S V G S V N M E H S G V S Q
   L M S K I L G S H K T L D S F D P V S V I P L A V E G S E V D V A S P V S E
   K A E V I P V A V I T R E T S L E S T D K E L E K L S Q S E V D V A S P V S E
   K A E V I P V A V I T R E T S L E S T D K E L E K L S Q S E V D V A S P V S E

```

160
 VYRTT
 PRRS
 NDND
 KASD
 QRRR
 OEEEE
 HHHH
 KKKK
 AARR
 CCCCC
 HNGC
 YNKD
 YQVQ
 STSQ
 RKRK
 YYYR
 SSSY
 QPPP
 HNNP
 NPNP
 KSGN
 KKKK
 IIVV

150
 VYRTT
 PRRS
 NDND
 KASD
 QRRR
 OEEEE
 HHHH
 KKKK
 AARR
 CCCCC
 HNGC
 YNKD
 YQVQ
 STSQ
 RKRK
 YYYR
 SSSY
 QPPP
 HNNP
 NPNP
 KSGN
 KKKK
 IIVV

140
 VYRTT
 PRRS
 NDND
 KASD
 QRRR
 OEEEE
 HHHH
 KKKK
 AARR
 CCCCC
 HNGC
 YNKD
 YQVQ
 STSQ
 RKRK
 YYYR
 SSSY
 QPPP
 HNNP
 NPNP
 KSGN
 KKKK
 IIVV

130
 VYRTT
 PRRS
 NDND
 KASD
 QRRR
 OEEEE
 HHHH
 KKKK
 AARR
 CCCCC
 HNGC
 YNKD
 YQVQ
 STSQ
 RKRK
 YYYR
 SSSY
 QPPP
 HNNP
 NPNP
 KSGN
 KKKK
 IIVV



120
 KKKK
 YGGG
 KKKK
 YYYR
 WRRR
 RRRR
 DGGY
 DDAV
 YDPS
 PDLN
 PDEE
 DDTS
 ENWR
 VVQQ
 TERN
 KKKK
 RRRR
 KKKK
 PDAK
 GSEV
 KTSI
 GSEV
 KTSI

110
 KKKK
 YGGG
 KKKK
 YYYR
 WRRR
 RRRR
 DGGY
 DDAV
 YDPS
 PDLN
 PDEE
 DDTS
 ENWR
 VVQQ
 TERN
 KKKK
 RRRR
 KKKK
 PDAK
 GSEV
 KTSI
 GSEV
 KTSI

100
 KKKK
 YGGG
 KKKK
 YYYR
 WRRR
 RRRR
 DGGY
 DDAV
 YDPS
 PDLN
 PDEE
 DDTS
 ENWR
 VVQQ
 TERN
 KKKK
 RRRR
 KKKK
 PDAK
 GSEV
 KTSI
 GSEV
 KTSI

90
 KKKK
 YGGG
 KKKK
 YYYR
 WRRR
 RRRR
 DGGY
 DDAV
 YDPS
 PDLN
 PDEE
 DDTS
 ENWR
 VVQQ
 TERN
 KKKK
 RRRR
 KKKK
 PDAK
 GSEV
 KTSI
 GSEV
 KTSI



QUERY
 O81639
 Q9SU1
 O80904
 Q9SKD9
 Q9Z070
 Q9Z070
 AAF27132
 Q9ZPL6
 Q9XJ26
 Q9XJ26
 CAB82760
 Q9SXP5
 Q39658
 Q39658
 AAF61864
 AAF26166
 C40090
 Q9X190
 Q9X190
 Q38704
 Q38704
 Q9XFF1
 Q9XFF1
 C40829
 AAF61863
 O65590
 O65590
 Q9SUJ0
 Q9SUJ0
 Q9SE29
 Q9SE29
 Q9ZPL7
 Q9ZPL7
 CAB88043
 Q9SZ67
 O22921
 O22921
 C43388
 C43388
 O82511
 O82511
 O65556
 O65556
 Q9ZJU0
 Q9ZJU0
 Q9SSX9
 Q9SHB4
 Q9S137
 Q9S137

210 Q E K E R S N G F S S S V K H E E D K E Q A D Q Y R E T S N D Q D C Q
 220 V S S P T S N P M P S A D E S S V A V Q E M S V A E T S T H Q A A G
 230 H V N Y T T O S E D M K E A S T K S E E E E V M S E D E N K N F S N E E N G
 240 T S Q V T T T E C M S E A S D S S E E E V M A E T S V I G E R H E E D T S T H Q A A G
 250 N S K D S M P S Y S L R M T D Q E S D O V S S G T S E G E V G D T E N L A D G M
 260 A F L D N A O R D S F A G T D N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 270 S F S S S T S N S F A G T D N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 280 Q A G K S S E N V Q L G S S D S E G R A T E T T D D R D E D E P P N P K
 290 H T G S V I A P E N S S L S V G D D E F F E E Q S S O K R E S G G E F D E D E P D A K
 300 M D S V I A T T E H L S S E A S D G E E E V G N O G E T D V R E K D D E N E P D P K
 310 V S O A T T T E H L S S E A S D G E E E V G N O G E T D V R E K D D E N E P D P K
 320 F A P V S T T P E N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 330 S S A S D E T N G V S S S A L G Q F G G G E E F A D D N E P D S K
 340 H D S T V K E E A E L E Y G S E D D R R T S H M S V S L T Y D G E V E E S E S K
 350 N I L E W T S P V S A E L E Y G S E D D R R T S H M S V S L T Y D G E V E E S E S K
 360 S G V Y N L S N P N E Q T G N P E V P P L A S D D G G N K D D E P D D D D P F S K
 370 Y S G K F K A N D G G P S S R R R G D R G E E Q S S D S K H Q G E E E V K V E E G
 380 T V P G E T T E P S K P S L D I V S P A M Q V T P L K P H L E N E V D K N R G
 390 H F S S N K T L E Q E A A S L A T T E Y M S E A S D N E E D S N
 400 S E N S S L S F D Y S K S F K S E Y G E I D E E E E Q P E M K R M K R E G G
 410 L R Q T E P P K G L H V S V L P P A D D V K T D L S Q S S R T T H K D A K
 420 T V V E E E L S S G S D P S A S T K E Y I C E E S Q T L V D R K R R R H C E N E A V E E
 430 Q S N D S T Q N R T E K M S E G C V I T P F E F A V P R R S T N S N E P K S S Q S
 440 S A S F P P Q N R T E K M S E G C V I T P F E F A V P R R S T N S N E P K S S Q S
 450 L A A S T A Q N H V N A M V Q E Q E G G A V D V S T P F S D E D D R A G D A G
 460 V F V E K T S G S S V Q T L R Q T E V S V I P P A D D V K T D L S Q S S R T T G

170 T E A N D A C F A G V A G Q R A K P S T T G M R F G K D Q D
 180 P A R R G S G A G T A N T R A N O F O T S N S K M K F D Y T N
 190 P Q K R G S S K N N G G Y N N L Q G P S S E L S S E G V I A G T L N
 200 P Q S S E S S T R R S S S O S D F E E H E C S H M L F G H P N
 210 H A Q Y S P A R R D N L E P A G C T N S S V L L K P E F G Q N
 220 P P A R R S O M L G D S P T S S V L L K P E F G Q N
 230 F P T A A V V G P S D H P T R S M S G N M M S F N G N N N
 240 P A S T L A A O S Y Y N T A A S D V P D Q S Y W S N G N G Q
 250 P Q N T K R G N K D N T S Q F O T N S N K T K R E Q H E A H S
 260 P L S T R R R S G G G G G G A A Q V L Q S S G G G D D A S E E H S
 270 P Q N P R R S A P A S S Y A S P D A S S G G G G D D A S E E H S
 280 P A K T M L T S N H D V S G S A P M V I G M E S P F E K L P N S D E A
 290 K P H R R S G I G S S G T G Q D M Q L D A T E Y E G F A G T N E
 300 P P N R R N S G G M A A Q E E R L D K Y P S S T G R D E K G G
 310 P P Q R R N S G G M A A Q E E R L D K Y P S S T G R D E K G G
 320 P P P K M V A L Y L L N E A A D V S R E K E D A S L R S E Q Q S Q D
 330 P T P S G P Q T P P G M R Q P D L P M L T A S E E A E G E K S
 340 T P D N Q H S T Y L S G S S E L L S S M L S T A S M K E E D N T A S
 350 K P E P S Q S S L P S S V N G R R L F N P A S V V I S E P H D Q
 360 K P E P S Q S S L P S S V N G R R L F N P A S V V I S E P H D Q
 370 K P A G A V P L N Q D K R R S D V F T A V S K E K T S G S S V Q T
 380 T S F S P R E L R V T T A L R P V I S E D D
 390 P P R K A S S S L S S G K P P K S L A S E G S M G Q D P N N N N
 400 P P R R A S S L S S G K P P K S L A S E G S M G Q D P N N N N
 410 P P N R A S L G S T N R K E P P F D O E T H A G A V P L N Q D K R R S D V F T A V S K E K T
 420 T A G A V P L N Q D K R R S D V F T A V S K E K T
 430 L A G A V P L N Q D K R R S D V F T A V S K E K T
 440 L A G A V P L N Q D K R R S D V F T A V S K E K T

210 Q E K E R S N G F S S S V K H E E D K E Q A D Q Y R E T S N D Q D C Q
 220 V S S P T S N P M P S A D E S S V A V Q E M S V A E T S T H Q A A G
 230 H V N Y T T O S E D M K E A S T K S E E E E V M S E D E N K N F S N E E N G
 240 T S Q V T T T E C M S E A S D S S E E E V M A E T S V I G E R H E E D T S T H Q A A G
 250 N S K D S M P S Y S L R M T D Q E S D O V S S G T S E G E V G D T E N L A D G M
 260 A F L D N A O R D S F A G T D N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 270 S F S S S T S N S F A G T D N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 280 Q A G K S S E N V Q L G S S D S E G R A T E T T D D R D E D E P P N P K
 290 H T G S V I A P E N S S L S V G D D E F F E E Q S S O K R E S G G E F D E D E P D A K
 300 M D S V I A T T E H L S S E A S D G E E E V G N O G E T D V R E K D D E N E P D P K
 310 V S O A T T T E H L S S E A S D G E E E V G N O G E T D V R E K D D E N E P D P K
 320 F A P V S T T P E N S S A S F G D E D L D Q G S E D D G N E P E P K
 330 S S A S D E T N G V S S S A L G Q F G G G E E F A D D N E P D S K
 340 H D S T V K E E A E L E Y G S E D D R R T S H M S V S L T Y D G E V E E S E S K
 350 N I L E W T S P V S A E L E Y G S E D D R R T S H M S V S L T Y D G E V E E S E S K
 360 S G V Y N L S N P N E Q T G N P E V P P L A S D D G G N K D D E P D D D D P F S K
 370 Y S G K F K A N D G G P S S R R R G D R G E E Q S S D S K H Q G E E E V K V E E G
 380 T V P G E T T E P S K P S L D I V S P A M Q V T P L K P H L E N E V D K N R G
 390 H F S S N K T L E Q E A A S L A T T E Y M S E A S D N E E D S N
 400 S E N S S L S F D Y S K S F K S E Y G E I D E E E E Q P E M K R M K R E G G
 410 L R Q T E P P K G L H V S V L P P A D D V K T D L S Q S S R T T H K D A K
 420 T V V E E E L S S G S D P S A S T K E Y I C E E S Q T L V D R K R R R H C E N E A V E E
 430 Q S N D S T Q N R T E K M S E G C V I T P F E F A V P R R S T N S N E P K S S Q S
 440 S A S F P P Q N R T E K M S E G C V I T P F E F A V P R R S T N S N E P K S S Q S
 450 L A A S T A Q N H V N A M V Q E Q E G G A V D V S T P F S D E D D R A G D A G
 460 V F V E K T S G S S V Q T L R Q T E V S V I P P A D D V K T D L S Q S S R T T G

inet
 jhmm
 jalign
 jpsm
 jre q
 jpred

↑
 ↑↑
 ↑↑↑

↑
 ↑↑
 ↑↑↑

Tabelle A4: Putative cis-Elemente in den Promotoren von WRKY 26, 38 und 43

Die PLACE Datenbank wurde nach bekannten Promotorelementen durchsucht und alle Treffer sind in der folgenden Tabelle für jeden Promotor alphabetisch aufgelistet. Die Position der Sequenz ist gekennzeichnet, sowie deren Orientierung

WRKY 26 Promotor, 2 kb stromaufwärts ab ATG

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
-300 CORE	46	(+)	TGTAAAG
-300 ELEMENT	46	(+)	TGHAAARK
-300 ELEMENT	721	(+)	TGHAAARK
-300 ELEMENT	1528	(-)	TGHAAARK
2S SEED PROT BANAPA	566	(-)	CAAACAC
AACA CORE OSGLUB1	972	(-)	AACAAAC
ABREL ATERD1	1231	(+)	ACGTG
ACGT A-BOX	1987	(+)	TACGTA
ACGT A-BOX	1987	(-)	TACGTA
ACGT ATERD1	932	(+)	ACGT
ACGTATERD1	1231	(+)	ACGT
ACGTATERD1	1240	(+)	ACGT
ACGTATERD1	1988	(+)	ACGT
ACGT T-BOX	1239	(+)	AACGTT
AGC-BOX NPGLB	1818	(+)	AGCCGCC
AMY-BOX2	880	(+)	TATCCAT
AMY-BOX2	183	(-)	TATCCAT
ARFAT	155	(+)	TGTCTC
ARFAT	508	(+)	TGTCTC
ARFAT	1411	(+)	TGTCTC
ARFAT	1547	(+)	TGTCTC
ARFAT	1320	(-)	TGTCTC
ASF1-MOTIF CAMV	1229	(+)	TGACG
BOXII NTP ATPB	1932	(-)	ATAGAA
BS1 EGCCR	1157	(-)	AGCGGG
C8GCARGAT	359	(+)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	580	(+)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	1602	(+)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	359	(-)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	580	(-)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	1602	(-)	CWWWWWWWWWG
CAAT-BOX1	112	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	131	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	192	(+)	CAAT

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
CAAT-BOX1	224	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	306	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	452	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	516	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	535	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	896	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1324	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1384	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	308	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	365	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	369	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	428	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	466	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	853	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1019	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1033	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1209	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1449	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1900	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1997	(-)	CAAT
CANBNNAPA	566	(-)	CNAACAC
CAREOSREP1	1939	(+)	CAACTC
CARGAT CONSENSUS	130	(+)	CCWWWWWWWGG
CARGAT CONSENSUS	130	(-)	CCWWWWWWWGG
CCA1 ATLHCB1	1207	(-)	AAMAATCT
CCAAT-BOX1	130	(+)	CCAAT
CCAAT-BOX1	895	(+)	CCAAT
CCAAT-BOX1	466	(-)	CCAAT
CCAAT-BOX1	1019	(-)	CCAAT
CIACADIAN LELHC	1883	(+)	CAANNNNATC
CIACADIAN LELHC	563	(-)	CAANNNNATC
DOF COREZM	49	(+)	AAAG
DOF COREZM	443	(+)	AAAG
DOF COREZM	724	(+)	AAAG
DOF COREZM	747	(+)	AAAG
DOF COREZM	968	(+)	AAAG
DOF COREZM	1301	(+)	AAAG
DOF COREZM	1392	(+)	AAAG
DOF COREZM	1400	(+)	AAAG
DOF COREZM	1421	(+)	AAAG
DOF COREZM	1428	(+)	AAAG
DOF COREZM	1493	(+)	AAAG
DOF COREZM	1802	(+)	AAAG
DOF COREZM	1834	(+)	AAAG
DOF COREZM	32	(-)	AAAG

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
DOF COREZM	329	(-)	AAAG	GATA-BOX	880	(-)	GATA
DOF COREZM	359	(-)	AAAG	GATA-BOX	1088	(-)	GATA
DOF COREZM	392	(-)	AAAG	GATA-BOX	1889	(-)	GATA
DOF COREZM	688	(-)	AAAG	GATA-BOX	1935	(-)	GATA
DOF COREZM	793	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	1755	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	820	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	27	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1043	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	122	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1071	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	296	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1316	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	800	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1505	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	801	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1528	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	1044	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1570	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	1658	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1622	(-)	AAAG	GT1-CONSENSUS	1909	(-)	GRWAAW
DOF COREZM	1693	(-)	AAAG	GTGANTG10	352	(+)	GTGA
DOF COREZM	1710	(-)	AAAG	GTGANTG10	408	(+)	GTGA
DOF COREZM	1715	(-)	AAAG	GTGANTG10	700	(+)	GTGA
DOF COREZM	1892	(-)	AAAG	GTGANTG10	1016	(+)	GTGA
DOF COREZM	1908	(-)	AAAG	GTGANTG10	1245	(+)	GTGA
DOF COREZM	1926	(-)	AAAG	GTGANTG10	1251	(+)	GTGA
DPBF COREDCDC3	12	(+)	ACACNNG	GTGANTG10	1284	(+)	GTGA
DPBF COREDCDC3	1861	(+)	ACACNNG	GTGANTG10	1297	(+)	GTGA
DPBF COREDCDC3	1872	(+)	ACACNNG	GTGANTG10	1558	(+)	GTGA
DPBF COREDCDC3	520	(-)	ACACNNG	GTGANTG10	1654	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	87	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1805	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	306	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1810	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	347	(+)	CANNTG	GTGANTG10	629	(-)	GTGA
E-BOX BNNAPA	403	(+)	CANNTG	GTGANTG10	841	(-)	GTGA
E-BOX BNNAPA	545	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1870	(-)	GTGA
E-BOX BNNAPA	1171	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1880	(-)	GTGA
E-BOX BNNAPA	1499	(+)	CANNTG	HEX AT	1229	(+)	TGACGTGG
E-BOX BNNAPA	1672	(+)	CANNTG	HEXMOTIF TAH3H4	1229	(-)	ACGTCA
E-BOX BNNAPA	1679	(+)	CANNTG	I-BOX	1887	(-)	GATAAG
E-BOX BNNAPA	1873	(+)	CANNTG	I-BOX CORE	354	(+)	GATAA
ELRE COREPCRP1	387	(+)	TTGACC	I-BOX CORE	706	(-)	GATAA
ERELEE4	1588	(+)	AWTTCAAA	I-BOX CORE	1888	(-)	GATAA
GATA-BOX	37	(+)	GATA	INRNTPSADB	110	(+)	YTCANTYY
GATA-BOX	186	(+)	GATA	INRNTPSADB	1550	(+)	YTCANTYY
GATA-BOX	354	(+)	GATA	INRNTPSADB	426	(-)	YTCANTYY
GATA-BOX	1749	(+)	GATA	INTRON LOWER	415	(+)	TGCAGG
GATA-BOX	174	(-)	GATA	MART-BOX	794	(+)	TTWTWTTWTT
GATA-BOX	400	(-)	GATA	MART-BOX	795	(+)	TTWTWTTWTT
GATA-BOX	573	(-)	GATA	MYB1AT	612	(+)	WAACCA
GATA-BOX	707	(-)	GATA	MYB1AT	1992	(+)	WAACCA
GATA-BOX	713	(-)	GATA	MYB1AT	137	(-)	WAACCA
GATA-BOX	731	(-)	GATA	MYB1AT	207	(-)	WAACCA

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
MYB1AT	776	(-)	WAACCA	POLLEN1 LELAT52	1567	(-)	AGAAA
MYB1AT	862	(-)	WAACCA	POLLEN1 LELAT52	1572	(-)	AGAAA
MYB2AT	806	(-)	TAACTG	POLLEN1 LELAT52	1757	(-)	AGAAA
MYB2 CONSENSUSAT	1499	(+)	YAACKG	POLLEN2 LELAT52	1638	(-)	TCCACCATA
MYB2 CONSENSUSAT	57	(-)	YAACKG	PROLAMIN-BOXOSGLUB1	721	(+)	TGCAAAG
MYB2 CONSENSUSAT	806	(-)	YAACKG	PROLAMIN-BOXOSGLUB1	1071	(-)	TGCAAAG
MYB2 CONSENSUSAT	1145	(-)	YAACKG	PYRIMIDINE-BOX HVEPB1	799	(+)	TTTTTTCC
MYB2 CONSENSUSAT	1679	(-)	YAACKG	PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	391	(+)	CCTTTT
MYB ATRD22	207	(-)	CTAACCA	PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	819	(+)	CCTTTT
MYB CORE	57	(+)	CNGTTR	Q-ELEMENTZM13	388	(-)	AGGTCA
MYB CORE	379	(+)	CNGTTR	RAV1AAT	10	(+)	CAACA
MYB CORE	806	(+)	CNGTTR	RAV1AAT	1342	(+)	CAACA
MYB CORE	1145	(+)	CNGTTR	RAV1AAT	289	(-)	CAACA
MYB CORE	1679	(+)	CNGTTR	RAV1AAT	380	(-)	CAACA
MYB CORE	1342	(-)	CNGTTR	RAV1AAT	559	(-)	CAACA
MYB CORE	1499	(-)	CNGTTR	RAV1AAT	598	(-)	CAACA
MYB PZM	1366	(-)	CCWACC	RAV1AAT	875	(-)	CAACA
MYBST1	185	(+)	GGATA	RAV1AAT	975	(-)	CAACA
MYBST1	731	(-)	GGATA	RAV1AAT	1211	(-)	CAACA
MYBST1	880	(-)	GGATA	RAV1AAT	1579	(-)	CAACA
MYBST1	1088	(-)	GGATA	RAV1AAT	1582	(-)	CAACA
MYBST1	1935	(-)	GGATA	RAV1AAT	1730	(-)	CAACA
MYC CONSENSUSAT	87	(+)	CANNTG	RBCS CONSENSUS	1584	(-)	AATCCAA
MYC CONSENSUSAT	306	(+)	CANNTG	REALPHALGLHCB21	136	(-)	AACCAA
MYC CONSENSUSAT	347	(+)	CANNTG	REALPHALGLHCB21	206	(-)	AACCAA
MYCCONSENSUSAT	403	(+)	CANNTG	ROOT-MOTIF TAPOX1	187	(+)	ATATT
MYC CONSENSUSAT	545	(+)	CANNTG	ROOT-MOTIF TAPOX1	1750	(+)	ATATT
MYC CONSENSUSAT	1171	(+)	CANNTG	ROOT-MOTIF TAPOX1	1952	(-)	ATATT
MYC CONSENSUSAT	1499	(+)	CANNTG	SEBF CONSST PR10A	507	(+)	YTGTCWC
MYC CONSENSUSAT	1672	(+)	CANNTG	SEBF CONSST PR10A	1546	(+)	YTGTCWC
MYC CONSENSUSAT	1679	(+)	CANNTG	SEBF CONSST PR10A	1320	(-)	YTGTCWC
MYC CONSENSUSAT	1873	(+)	CANNTG	SEF3-MOTIFGM	1595	(+)	AACCCA
NAPIN-MOTIFBN	1375	(-)	TACACAT	SEF4-MOTIFGM7S	581	(+)	RTTTTTR
POLASIG1	362	(-)	AATAAA	SEF4-MOTIFGM7S	525	(+)	RTTTTTR
POLASIG3	1752	(-)	AATAAT	SV40 CORE-ENHAN	1324	(-)	GTGGWWHG
POLLEN1 LELAT52	1263	(+)	AGAAA	TAAAG STKST1	48	(+)	TAAAG
POLLEN1 LELAT52	29	(-)	AGAAA	TAAAG STKST1	442	(+)	TAAAG
POLLEN1 LELAT52	115	(-)	AGAAA	TATA-BOX4	39	(+)	TATATAA
POLLEN1 LELAT52	124	(-)	AGAAA	TATA-BOX4	395	(-)	TATATAA
POLLEN1 LELAT52	214	(-)	AGAAA	TATA-BOX5	1753	(+)	TTATTT
POLLEN1 LELAT52	240	(-)	AGAAA	TATA-PVTRNALEU	394	(+)	TTTATATA
POLLEN1 LELAT52	298	(-)	AGAAA	TATCCA OSAMY	731	(+)	TATCCA
POLLEN1 LELAT52	593	(-)	AGAAA	TATCCA OSAMY	880	(+)	TATCCA
POLLEN1 LELAT52	1046	(-)	AGAAA	TATCCA OSAMY	1088	(+)	TATCCA
POLLEN1 LELAT52	1525	(-)	AGAAA	TATCCA OSAMY	1935	(+)	TATCCA

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
TATCCA OSAMY	184	(-)	TATCCA
TATCCAY-MOTIF OSRAMY3D	880	(+)	TATCCAY
TATCCAY-MOTIF OSRAMY3D	183	(-)	TATCCAY
T-BOX ATGAPB	746	(-)	ACTTTG
TGACGT VMAMY	1229	(+)	TGACGT
WB-BOX PCWRKY1	331	(+)	TTTGACT
WB-BOX PCWRKY1	689	(+)	TTTGACT
WB-BOX PCWRKY1	1836	(-)	TTTGACT
W-BOX ATNPR1	302	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	332	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	387	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	475	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	690	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	997	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	1228	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	345	(-)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	1837	(-)	TTGAC

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
ACGTC-BOX	671	(+)	GACGTC
ACGTC-BOX	722	(+)	GACGTC
ACGTT-BOX	58	(+)	AACGTT
ARFAT	1715	(+)	TGTCTC
ASF1-MOTIF CAMV	670	(+)	TGACG
ASF1-MOTIF CAMV	721	(+)	TGACG
ASF1-MOTIF CAMV	673	(-)	TGACG
ASF1-MOTIF CAMV	710	(-)	TGACG
BOXII NTPATPB	211	(+)	ATAGAA
BOXII NTPATPB	849	(-)	ATAGAA
BOXII NTPATPB	1464	(-)	ATAGAA
C8GCARGAT	983	(+)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	1277	(+)	CWWWWWWWWWG
C8GCARGAT	1722	(+)	CWWWWWWWWWG
CAAT-BOX1	12	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	22	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	157	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	303	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	676	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	792	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1129	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1270	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1592	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	199	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	320	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	330	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	358	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	372	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	655	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	757	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	821	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	994	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1028	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1079	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1346	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1358	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1396	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1605	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1788	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1842	(-)	CAAT
CACGTG MOTIF	83	(+)	CACGTG
CANBNNAPA	1010	(-)	CNAACAC
CATATGG MSAUR	1005	(+)	CATATG
CATATGG MSAUR	1160	(+)	CATATG
CATATGG MSAUR	1682	(+)	CATATG

WRKY38 Promotor, 2 kb stromaufwärts ab ATG

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
WRKY 38 Promotor 2kb			
-10PEHVPSBD	847	(+)	TATTCT
-10PEHVPSBD	1297	(+)	TATTCT
-300 CORE	226	(-)	TGTAAG
-300 ELEMENT	815	(+)	TGHAAARK
-300 ELEMENT	1092	(+)	TGHAAARK
-300 ELEMENT	523	(-)	TGHAAARK
AACA CORE OSGLUB1	1949	(+)	AACAAAC
ABREL ATERD1	84	(+)	ACGTG
ABREL ATERD1	1089	(+)	ACGTG
ABREL ATERD1	1862	(+)	ACGTG
ABREL ATERD1	83	(-)	ACGTG
ABREL ATERD1	1053	(-)	ACGTG
ACGT A-BOX	418	(+)	TACGTA
ACGT ATERD1	59	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	84	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	419	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	672	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	709	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	723	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	1054	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	1089	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	1167	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	1862	(+)	ACGT

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
CCAAT-BOX1	1128	(+)	CCAAT	E-BOX BNNAPA	1682	(+)	CANNTG
CCAAT-BOX1	372	(-)	CCAAT	E-BOX BNNAPA	1757	(+)	CANNTG
CCAAT-BOX1	757	(-)	CCAAT	E-BOX BNNAPA	1853	(+)	CANNTG
CCAAT-BOX1	1788	(-)	CCAAT	ELRE COREPCRP1	331	(+)	TTGACC
CCAAT-BOX1	1842	(-)	CCAAT	GATA-BOX	148	(+)	GATA
CGACG OSAMY3	735	(+)	CGACG	GATA-BOX	185	(+)	GATA
CGACG OSAMY3	724	(-)	CGACG	GATA-BOX	210	(+)	GATA
CIACADIANLELHC	185	(-)	CAANNNNATC	GATA-BOX	309	(+)	GATA
DOF COREZM	78	(+)	AAAG	GATA-BOX	315	(+)	GATA
DOF COREZM	91	(+)	AAAG	GATA-BOX	934	(+)	GATA
DOF COREZM	493	(+)	AAAG	GATA-BOX	952	(+)	GATA
DOF COREZM	499	(+)	AAAG	GATA-BOX	1264	(+)	GATA
DOF COREZM	530	(+)	AAAG	GATA-BOX	1578	(+)	GATA
DOF COREZM	949	(+)	AAAG	GATA-BOX	133	(-)	GATA
DOF COREZM	1368	(+)	AAAG	GATA-BOX	150	(-)	GATA
DOF COREZM	1378	(+)	AAAG	GATA-BOX	154	(-)	GATA
DOF COREZM	1506	(+)	AAAG	GATA-BOX	429	(-)	GATA
DOF COREZM	1637	(+)	AAAG	GATA-BOX	437	(-)	GATA
DOF COREZM	1848	(+)	AAAG	GATA-BOX	520	(-)	GATA
DOF COREZM	1911	(+)	AAAG	GATA-BOX	866	(-)	GATA
DOF COREZM	1943	(+)	AAAG	GATA-BOX	954	(-)	GATA
DOF COREZM	226	(-)	AAAG	GATA-BOX	1002	(-)	GATA
DOF COREZM	235	(-)	AAAG	GATA-BOX	1234	(-)	GATA
DOF COREZM	381	(-)	AAAG	GATA-BOX	1413	(-)	GATA
DOF COREZM	412	(-)	AAAG	GATA-BOX	1425	(-)	GATA
DOF COREZM	467	(-)	AAAG	GATA-BOX	1440	(-)	GATA
DOF COREZM	523	(-)	AAAG	GATA-BOX	1481	(-)	GATA
DOF COREZM	805	(-)	AAAG	GATA-BOX	1707	(-)	GATA
DOF COREZM	869	(-)	AAAG	GATA-BOX	1768	(-)	GATA
DOF COREZM	1063	(-)	AAAG	GATA-BOX	1784	(-)	GATA
DOF COREZM	1108	(-)	AAAG	GATA-BOX	1901	(-)	GATA
DOF COREZM	1447	(-)	AAAG	GT1 CONSENSUS	283	(+)	GRWAAW
DOF COREZM	1492	(-)	AAAG	GT1 CONSENSUS	315	(+)	GRWAAW
DOF COREZM	1531	(-)	AAAG	GT1 CONSENSUS	496	(+)	GRWAAW
DOF COREZM	1710	(-)	AAAG	GT1 CONSENSUS	816	(+)	GRWAAW
DOF COREZM	1722	(-)	AAAG	GT1 CONSENSUS	934	(+)	GRWAAW
DPBF COREDCDC3	1975	(+)	ACACNNG	GT1 CONSENSUS	1072	(+)	GRWAAW
DPBF COREDCDC3	727	(-)	ACACNNG	GT1 CONSENSUS	1381	(+)	GRWAAW
DPBF COREDCDC3	1809	(-)	ACACNNG	GT1 CONSENSUS	1578	(+)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	49	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	1831	(+)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	83	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	1940	(+)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	1005	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	511	(-)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	1143	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	853	(-)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	1160	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	864	(-)	GRWAAW
E-BOX BNNAPA	1310	(+)	CANNTG	GT1 CONSENSUS	973	(-)	GRWAAW

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
GT1 CONSENSUS	1181	(-)	GRWAAW	MYB2AT	516	(-)	TAACTG
GT1 CONSENSUS	1322	(-)	GRWAAW	MYB2 CONSENSUSAT	516	(-)	YAACKG
GT1 CONSENSUS	435	(-)	GRWAAW	MYB ATRD22	374	(-)	CTAACCA
GT1 CONSENSUS	462	(-)	GRWAAW	MYB CORE	516	(+)	CNGTTR
GT1 CONSENSUS	486	(-)	GRWAAW	MYBST1	314	(+)	GGATA
GT1 CONSENSUS	940	(-)	GRWAAW	MYBST1	437	(-)	GGATA
GT1 CONSENSUS	1411	(-)	GRWAAW	MYBST1	954	(-)	GGATA
GT1 CONSENSUS	1782	(-)	GRWAAW	MYBST1	1901	(-)	GGATA
GT1 CORE	166	(-)	GGTTAA	MYC ATERD1	49	(+)	CATGTG
GTGANTG10	1120	(+)	GTGA	MYC ATERD1	1757	(-)	CATGTG
GTGANTG10	1620	(+)	GTGA	MYC ATRD22	49	(-)	CACATG
GTGANTG10	64	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	49	(+)	CANNTG
GTGANTG10	82	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	83	(+)	CANNTG
GTGANTG10	604	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	1005	(+)	CANNTG
GTGANTG10	609	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	1143	(+)	CANNTG
GTGANTG10	920	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	1160	(+)	CANNTG
GTGANTG10	1734	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	1310	(+)	CANNTG
GTGANTG10	1983	(-)	GTGA	MYC CONSENSUSAT	1682	(+)	CANNTG
HDZIP2 ATATHB2	859	(+)	TAATMATTA	MYC CONSENSUSAT	1757	(+)	CANNTG
HDZIP2 ATATHB2	1534	(-)	TAATMATTA	MYC CONSENSUSAT	1853	(+)	CANNTG
HEXMOTIF TAH3H4	672	(+)	ACGTCA	PALINDROMIC C-BOXGM	670	(+)	TGACGTCA
HEXMOTIF TAH3H4	709	(+)	ACGTCA	POLASIG1	1247	(+)	AATAAA
HEXMOTIF TAH3H4	670	(-)	ACGTCA	POLASIG1	1336	(+)	AATAAA
HEXMOTIF TAH3H4	721	(-)	ACGTCA	POLASIG1	1649	(+)	AATAAA
I-BOX	309	(+)	GATAAG	POLASIG1	896	(-)	AATAAA
I-BOX CORE	309	(+)	GATAA	POLASIG1	1295	(-)	AATAAA
I-BOX CORE	315	(+)	GATAA	POLASIG1	1723	(-)	AATAAA
I-BOX CORE	934	(+)	GATAA	POLASIG2	568	(+)	AATTAAT
I-BOX CORE	1578	(+)	GATAA	POLASIG2	1221	(+)	AATTAAT
I-BOX CORE	436	(-)	GATAA	POLASIG2	1593	(+)	AATTAAT
I-BOX CORE	519	(-)	GATAA	POLASIG2	1518	(-)	AATTAAT
I-BOX CORE	865	(-)	GATAA	POLASIG2	1532	(-)	AATTAAT
I-BOX CORE	1412	(-)	GATAA	POLASIG3	860	(+)	AATAAT
I-BOX CORE	1783	(-)	GATAA	POLASIG3	794	(-)	AATAAT
INRNTPSADB	987	(-)	YTCANTYY	POLASIG3	1043	(-)	AATAAT
LTRE CORE ATCOR15	734	(+)	CCGAC	POLASIG3	1178	(-)	AATAAT
MART-BOX	1109	(+)	TTWTWTTWTT	POLASIG3	1197	(-)	AATAAT
MART-BOX	1110	(+)	TTWTWTTWTT	POLASIG3	1536	(-)	AATAAT
MART-BOX	1328	(-)	TTWTWTTWTT	POLLEN1 LELAT52	495	(+)	AGAAA
MART-BOX	1331	(-)	TTWTWTTWTT	POLLEN1 LELAT52	1380	(+)	AGAAA
MART-BOX	1333	(-)	TTWTWTTWTT	POLLEN1 LELAT52	1571	(+)	AGAAA
MART-BOX	1336	(-)	TTWTWTTWTT	POLLEN1 LELAT52	1939	(+)	AGAAA
MYB1AT	1226	(+)	WAACCA	POLLEN1 LELAT52	1945	(+)	AGAAA
MYB1AT	167	(+)	WAACCA	POLLEN1 LELAT52	1957	(+)	AGAAA
MYB1AT	374	(-)	WAACCA	POLLEN1 LELAT52	464	(-)	AGAAA

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
POLLEN1 LELAT52	798	(-)	AGAAA	SEF3 MOTIFGM	1835	(+)	AACCCA
POLLEN1 LELAT52	1463	(-)	AGAAA	SEF4 MOTIFGM7S	893	(+)	RTTTTTTR
PROLAMIN-BOX OSGLUB1	527	(+)	TGCAAAG	SEF4 MOTIFGM7S	1522	(+)	RTTTTTTR
PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	1491	(+)	CCTTTT	SEF4 MOTIFGM7S	1515	(+)	RTTTTTTR
PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	498	(-)	CCTTTT	SEF4 MOTIFGM7S	701	(-)	RTTTTTTR
QARBNEXTA	1861	(+)	AACGTGT	SEF4 MOTIFGM7S	1596	(-)	RTTTTTTR
QARBNEXTA	1052	(-)	AACGTGT	SURE1 STPAT21	1462	(-)	AATAGAAAA
RAV1AAT	651	(+)	CAACA	TAAAG STKST1	492	(+)	TAAAG
RAV1AAT	698	(+)	CAACA	TAAAG STKST1	948	(+)	TAAAG
RAV1AAT	1274	(+)	CAACA	TAAAG STKST1	226	(-)	TAAAG
RAV1AAT	1695	(+)	CAACA	TAAAG STKST1	805	(-)	TAAAG
RAV1AAT	144	(-)	CAACA	TAAAG STKST1	1531	(-)	TAAAG
RAV1AAT	245	(-)	CAACA	TAAAG STKST1	1722	(-)	TAAAG
RAV1AAT	629	(-)	CAACA	TATA-BOX2	543	(+)	TATAAAT
RBCS CONSENSUS	326	(-)	AATCCAA	TATA-BOX2	1211	(+)	TATAAAT
RBCS CONSENSUS	368	(-)	AATCCAA	TATA-BOX2	1883	(+)	TATAAAT
REALPHALGLHCB21	911	(+)	AACCAA	TATA-BOX3	536	(+)	TATTAAT
REALPHALGLHCB21	373	(-)	AACCAA	TATA-BOX4	638	(+)	TATATAA
REBETALGLHCB21	437	(-)	CGGATA	TATA-BOX4	1609	(+)	TATATAA
REBETALGLHCB21	1901	(-)	CGGATA	TATA-BOX4	1642	(+)	TATATAA
ROOT MOTIF TAPOX1	14	(+)	ATATT	TATA-BOX4	96	(-)	TATATAA
ROOT MOTIF TAPOX1	398	(+)	ATATT	TATA-BOX5	795	(+)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	423	(+)	ATATT	TATA-BOX5	897	(+)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1026	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1044	(+)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1176	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1179	(+)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1195	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1724	(+)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1241	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1246	(-)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1255	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1335	(-)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1320	(+)	ATATT	TATA-BOX5	1648	(-)	TTATTT
ROOT MOTIF TAPOX1	1356	(+)	ATATT	TATA-BOX OSPAL	15	(+)	TATTTAA
ROOT MOTIF TAPOX1	1825	(+)	ATATT	TATA-BOX OSPAL	898	(+)	TATTTAA
ROOT MOTIF TAPOX1	13	(-)	ATATT	TATA-BOX OSPAL	1256	(+)	TATTTAA
ROOT MOTIF TAPOX1	352	(-)	ATATT	TATA-BOX OSPAL	1244	(-)	TATTTAA
ROOT MOTIF TAPOX1	574	(-)	ATATT	TATA PVTRN ALEU	95	(+)	TTTATATA
ROOT MOTIF TAPOX1	643	(-)	ATATT	TATA PVTRN ALEU	1642	(-)	TTTATATA
ROOT MOTIF TAPOX1	1097	(-)	ATATT	TATCCA CHVAL21	954	(+)	TATCCAC
ROOT MOTIF TAPOX1	1173	(-)	ATATT	TATCCA OSAMY	954	(+)	TATCCA
ROOT MOTIF TAPOX1	1240	(-)	ATATT	TATCCAY MOTIF OSRAMY3D	954	(+)	TATCCAY
ROOT MOTIF TAPOX1	1254	(-)	ATATT	T-BOX ATGAPB	234	(+)	ACTTTG
ROOT MOTIF TAPOX1	1436	(-)	ATATT	T-BOX ATGAPB	1446	(+)	ACTTTG
ROOT MOTIF TAPOX1	1801	(-)	ATATT	T-BOX ATGAPB	77	(-)	ACTTTG
S1F-BOX SORPS1L21	288	(-)	ATGGTA	T-BOX ATGAPB	1847	(-)	ACTTTG
S1F-BOX SORPS1L21	942	(-)	ATGGTA	TGACGT VMAMY	670	(+)	TGACGT
S1F SORPL21	286	(-)	ATGGTATT	TGACGT VMAMY	721	(+)	TGACGT
SEBF CONSST PR10A	1714	(+)	YTGTCWC	TGACGT VMAMY	672	(-)	TGACGT

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
TGACGT VMAMY	709	(-)	TGACGT
W-BOX ATNPR1	331	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	620	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	674	(-)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	1693	(-)	TTGAC

WRKY 43 Promotor, 2 kb stromaufwärts ab ATG

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
WRKY 43 Promotor 2kb			
-300CORE	121	(+)	TGTAAG
-300CORE	414	(+)	TGTAAG
-300 ELEMENT	426	(-)	TGHAAARK
-300 ELEMENT	260	(-)	TGHAAARK
ABREL ATERD1	1810	(+)	ACGTG
ABREL ATERD1	1822	(+)	ACGTG
ABREL ATERD1	1809	(-)	ACGTG
ACGT ATERD1	1810	(+)	ACGT
ACGT ATERD1	1822	(+)	ACGT
ARE1	869	(-)	RGTGACNNGC
ARFAT	1787	(+)	TGTCTC
ASF1 MOTIF CAMV	1820	(+)	TGACG
ASF1 MOTIF CAMV	994	(-)	TGACG
C8GCARGAT	1703	(+)	CWWWWWWWWG
CAAT-BOX1	26	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	32	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	230	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	239	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	471	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	524	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	608	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	704	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	803	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1097	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1204	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1286	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1327	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1900	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	1931	(+)	CAAT
CAAT-BOX1	130	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	399	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	480	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	554	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	561	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	598	(-)	CAAT

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
CAAT-BOX1	604	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1121	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1303	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1540	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1612	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1715	(-)	CAAT
CAAT-BOX1	1722	(-)	CAAT
CACGTG MOTIF	1809	(+)	CACGTG
CANBNNAPA	1923	(+)	CNAACAC
CARE OSREP1	1646	(-)	CAACTC
CCAAT-BOX1	25	(+)	CCAAT
CCAAT-BOX1	31	(+)	CCAAT
CCAAT-BOX1	229	(+)	CCAAT
CCAAT-BOX1	523	(+)	CCAAT
CDT-DER HVCBF2	1977	(+)	GTCGAC
CEREGLUB OX1PSLEGA	145	(-)	TGTTAAAGT
CGACG OSAMY3	945	(+)	CGACG
CGACG OSAMY3	1976	(-)	CGACG
CIACADIAN LELHC	1344	(+)	CAANNNNATC
CIACADIAN LELHC	1534	(-)	CAANNNNATC
D4GM AUX28	151	(-)	TAGTGCTGT
DOF COREZM	13	(+)	AAAG
DOF COREZM	124	(+)	AAAG
DOF COREZM	417	(+)	AAAG
DOF COREZM	446	(+)	AAAG
DOF COREZM	697	(+)	AAAG
DOF COREZM	1556	(+)	AAAG
DOF COREZM	1774	(+)	AAAG
DOF COREZM	146	(-)	AAAG
DOF COREZM	260	(-)	AAAG
DOF COREZM	427	(-)	AAAG
DOF COREZM	506	(-)	AAAG
DOF COREZM	1001	(-)	AAAG
DOF COREZM	1021	(-)	AAAG
DOF COREZM	1080	(-)	AAAG
DOF COREZM	1190	(-)	AAAG
DOF COREZM	1440	(-)	AAAG
DOF COREZM	1567	(-)	AAAG
DOF COREZM	1681	(-)	AAAG
DOF COREZM	1703	(-)	AAAG
DOF COREZM	1883	(-)	AAAG
DPBF COREDCDC3	464	(+)	ACACNNG
DPBF COREDCDC3	1806	(+)	ACACNNG
DPBF COREDCDC3	1808	(+)	ACACNNG
DPBF COREDCDC3	967	(-)	ACACNNG

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz	Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
DPBF COREDCDC3	1809	(-)	ACACNNG	GTGANTG10	1106	(+)	GTGA
DRE2 COREZMRAB17	877	(+)	ACCGAC	GTGANTG10	1110	(+)	GTGA
DER-CRT COREAT	877	(+)	RCCGAC	GTGANTG10	1127	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	222	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1153	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	536	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1213	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	747	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1217	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	900	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1306	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	1241	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1725	(+)	GTGA
E-BOX BNNAPA	1809	(+)	CANNTG	GTGANTG10	1814	(+)	GTGA
EVENINGAT	1433	(+)	AAAATATCT	GTGANTG10	1824	(+)	GTGA
GATA-BOX	829	(+)	GATA	GTGANTG10	527	(-)	GTGA
GATA-BOX	895	(+)	GATA	GTGANTG10	758	(-)	GTGA
GATA-BOX	1308	(+)	GATA	GTGANTG10	875	(-)	GTGA
GATA-BOX	1375	(+)	GATA	GTGANTG10	996	(-)	GTGA
GATA-BOX	1424	(+)	GATA	GTGANTG10	1265	(-)	GTGA
GATA-BOX	1595	(+)	GATA	GTGANTG10	1387	(-)	GTGA
GATA-BOX	1727	(+)	GATA	GTGANTG10	1804	(-)	GTGA
GATA-BOX	1992	(+)	GATA	GTGANTG10	1909	(-)	GTGA
GATA-BOX	42	(-)	GATA	HEXAMER ATH4	945	(-)	CCGTCCG
GATA-BOX	344	(-)	GATA	HEX MOTIF TAH3H4	1820	(-)	ACGTCA
GATA-BOX	494	(-)	GATA	I-BOX	1992	(+)	GATAAG
GATA-BOX	513	(-)	GATA	I-BOX	656	(-)	GATAAG
GATA-BOX	658	(-)	GATA	I-BOX	1146	(-)	GATAAG
GATA-BOX	683	(-)	GATA	I-BOX CORE	1992	(+)	GATAA
GATA-BOX	1148	(-)	GATA	I-BOX CORE	512	(-)	GATAA
GATA-BOX	1437	(-)	GATA	I-BOX CORE	657	(-)	GATAA
GATA-BOX	1892	(-)	GATA	I-BOX CORE	1147	(-)	GATAA
GATA-BOX	1949	(-)	GATA	INRNTPSADB	702	(+)	YTCANTYY
GCN4 OSGLUB1	871	(+)	TGAGTCA	INRNTPSADB	1202	(+)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	103	(+)	GRWAAW	INRNTPSADB	1251	(+)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	546	(+)	GRWAAW	INRNTPSADB	1466	(+)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	692	(+)	GRWAAW	INRNTPSADB	1610	(-)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	927	(+)	GRWAAW	INRNTPSADB	547	(-)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	622	(-)	GRWAAW	INRNTPSADB	552	(-)	YTCANTYY
GT1 CONSENSUS	716	(-)	GRWAAW	LTRE1 HVBLT49	101	(+)	CCGAAA
GT1 CONSENSUS	511	(-)	GRWAAW	LTRE ATLTI78	877	(+)	ACCGACA
GT1 CONSENSUS	1043	(-)	GRWAAW	LTRE CORE ATCOR15	878	(+)	CCGAC
GT1 CONSENSUS	1575	(-)	GRWAAW	MART-BOX	1570	(+)	TTWTWTTWTT
GT1 CONSENSUS	1576	(-)	GRWAAW	MYB1AT	184	(+)	WAACCA
GT1 CORE	1481	(-)	GGTTAA	MYB1AT	1781	(+)	WAACCA
GTGANTG10	271	(+)	GTGA	MYB1AT	1004	(-)	WAACCA
GTGANTG10	458	(+)	GTGA	MYB1AT	1473	(-)	WAACCA
GTGANTG10	583	(+)	GTGA	MYB2AT	939	(-)	TAACTG
GTGANTG10	847	(+)	GTGA	MYB2 CONSENSUSAT	792	(+)	YAACKG
GTGANTG10	950	(+)	GTGA	MYB2 CONSENSUSAT	1417	(+)	YAACKG

Anhang

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
MYB2 CONSENSUSAT	939	(-)	YAACKG
MYB2 CONSENSUSAT	1353	(-)	YAACKG
MYB CORE	939	(+)	CNGTTR
MYB CORE	1294	(+)	CNGTTR
MYB CORE	1353	(+)	CNGTTR
MYB CORE	1622	(+)	CNGTTR
MYB CORE	98	(-)	CNGTTR
MYB CORE	347	(-)	CNGTTR
MYB CORE	792	(-)	CNGTTR
MYB CORE	1417	(-)	CNGTTR
MYB CORE	149	(-)	CNGTTR
MYB CORE	233	(-)	CNGTTR
MYB CORE	335	(-)	CNGTTR
MYB PLANT	1049	(-)	MACCWAMC
MYB PZM	36	(-)	CCWACC
MYB PZM	1049	(-)	CCWACC
MYBST1	1374	(+)	GGATA
MYC ATERD1	222	(-)	CATGTG
MYC CONSENSUSAT	222	(+)	CANNTG
MYC CONSENSUSAT	536	(+)	CANNTG
MYC CONSENSUSAT	747	(+)	CANNTG
MYC CONSENSUSAT	900	(+)	CANNTG
MYC CONSENSUSAT	1241	(+)	CANNTG
MYC CONSENSUSAT	1809	(+)	CANNTG
NTBBF1ARROLB	145	(+)	ACTTTA
POLASIG1	1571	(-)	AATAAA
POLASIG2	672	(-)	AATTA AA
POLLEN1LELAT52	11	(+)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	691	(+)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	1137	(+)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	1600	(+)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	166	(-)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	1496	(-)	AGAAA
POLLEN1LELAT52	1583	(-)	AGAAA
PROLAMIN-BOX OSGLUB1	427	(-)	TGCA AAG
PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	1566	(+)	CCTTTT
PYRIMIDINE-BOX OSRAMY1A	1882	(+)	CCTTTT
RAV1AAT	140	(+)	CAACA
RAV1AAT	361	(+)	CAACA
RAV1AAT	661	(+)	CAACA
RAV1AAT	1344	(+)	CAACA
RAV1AAT	579	(-)	CAACA
RAV1AAT	838	(-)	CAACA
RAV1AAT	1123	(-)	CAACA
RAV1AAT	1838	(-)	CAACA

Name des Elementes	Position	Sinn/ Gegensinn	Sequenz
RAV1AAT	1841	(-)	CAACA
RAV1AAT	1844	(-)	CAACA
RBCS CONSENSUS	520	(+)	AATCCAA
REALPHALGLHCB21	1003	(-)	AACCAA
REALPHALGLHCB21	1462	(-)	AACCAA
ROOT MOTIF TAPOX1	1329	(+)	ATATT
ROOT MOTIF TAPOX1	1447	(+)	ATATT
ROOT MOTIF TAPOX1	666	(-)	ATATT
ROOT MOTIF TAPOX1	1328	(-)	ATATT
ROOT MOTIF TAPOX1	1435	(-)	ATATT
ROOT MOTIF TAPOX1	1901	(-)	ATATT
SEF3 MOTIFGM	370	(+)	AACCCA
SEF3 MOTIFGM	1483	(+)	AACCCA
SEF3 MOTIFGM	1517	(+)	AACCCA
SEF3 MOTIFGM	1009	(-)	AACCCA
SEF3 MOTIFGM	1259	(-)	AACCCA
SEF3 MOTIFGM	1587	(-)	AACCCA
SEF4 MOTIFGM7S	972	(+)	RTTTTTT
SEF4 MOTIFGM7S	632	(-)	RTTTTTT
SV40 CORE ENHAN	80	(+)	GTGGVWHG
TAAAG STKST1	123	(+)	TAAAG
TAAAG STKST1	416	(+)	TAAAG
TAAAG STKST1	445	(+)	TAAAG
TAAAG STKST1	1773	(+)	TAAAG
TAAAG STKST1	146	(-)	TAAAG
TAAAG STKST1	1440	(-)	TAAAG
TAAAG STKST1	1681	(-)	TAAAG
TATA-BOX2	1319	(+)	TATAAAT
TATA-BOX2	1903	(+)	TATAAAT
TATA-BOX4	1887	(-)	TATATAA
TATA-BOX5	1572	(+)	TTATTT
TATA PVTRNALEU	1886	(+)	TTTATATA
T-BOX ATGAPB	426	(+)	ACTTTG
TELO-BOX ATEEF1AA1	329	(+)	AAACCCTAA
TGACGT VMAMY	1820	(+)	TGACGT
TRANSINIT DICOTS	1118	(-)	AMNAUGGC
TRANSINIT MONOCOTS	127	(-)	RMNAUGGC
TRANSINIT MONOCOTS	1118	(-)	RMNAUGGC
W-BOX ATNPR1	400	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	481	(+)	TTGAC
W-BOX ATNPR1	732	(+)	TTGAC

Abbildung A22: Expression von WRKY Genen nach SA und MeJA Behandlung

Dargestellt ist die Stärke der Expression in 4-5 Wochen alten Pflanzen, nach Sprühen mit SA (A) oder MeJA (B). Proben wurden zu den angegebenen Zeiten genommen. Das obere Bild jeder Behandlung zeigt die normalisierte Expression und das zweite Bild die x-fache Induktion der Expression im Vergleich zur unbehandelten Pflanze.

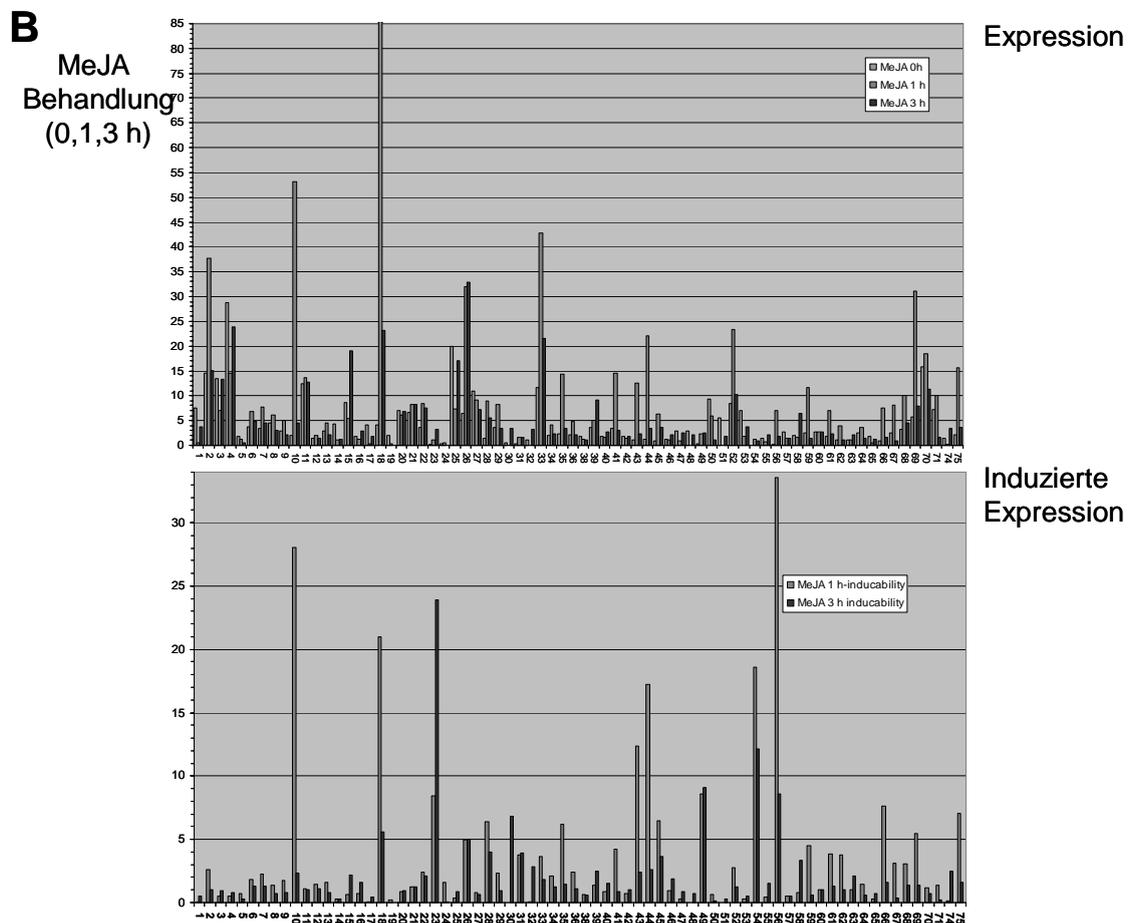
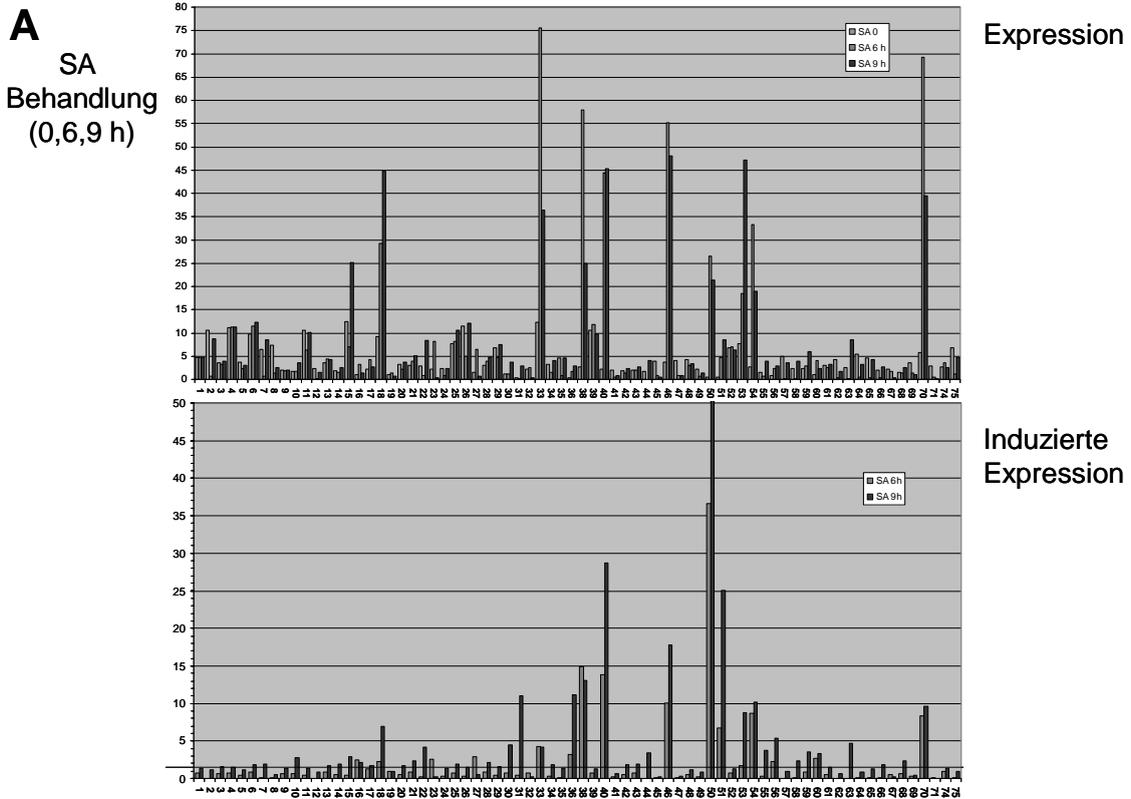


Abbildung A23: Expression von WRKY Genen nach flg22 Behandlung

Dargestellt ist die Stärke der Expression in 4-5 Wochen alten Pflanzen, nach Sprühen mit flg22. Proben wurden zu den angegebenen Zeiten genommen. Das obere Bild zeigt die Expressionwerte und das zweite Bild die x-fache Induktion der Expression im Vergleich zur unbehandelten Pflanze.

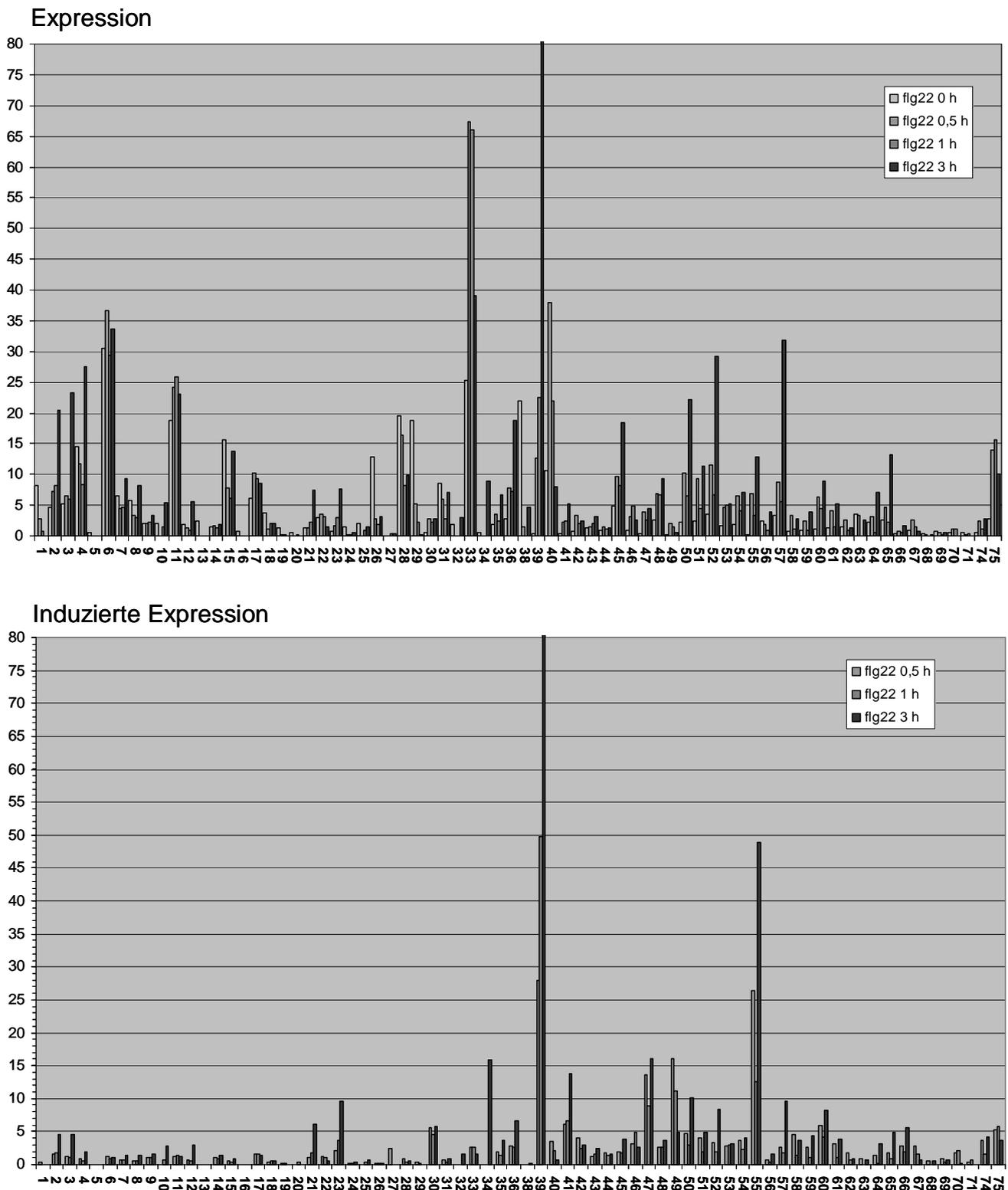
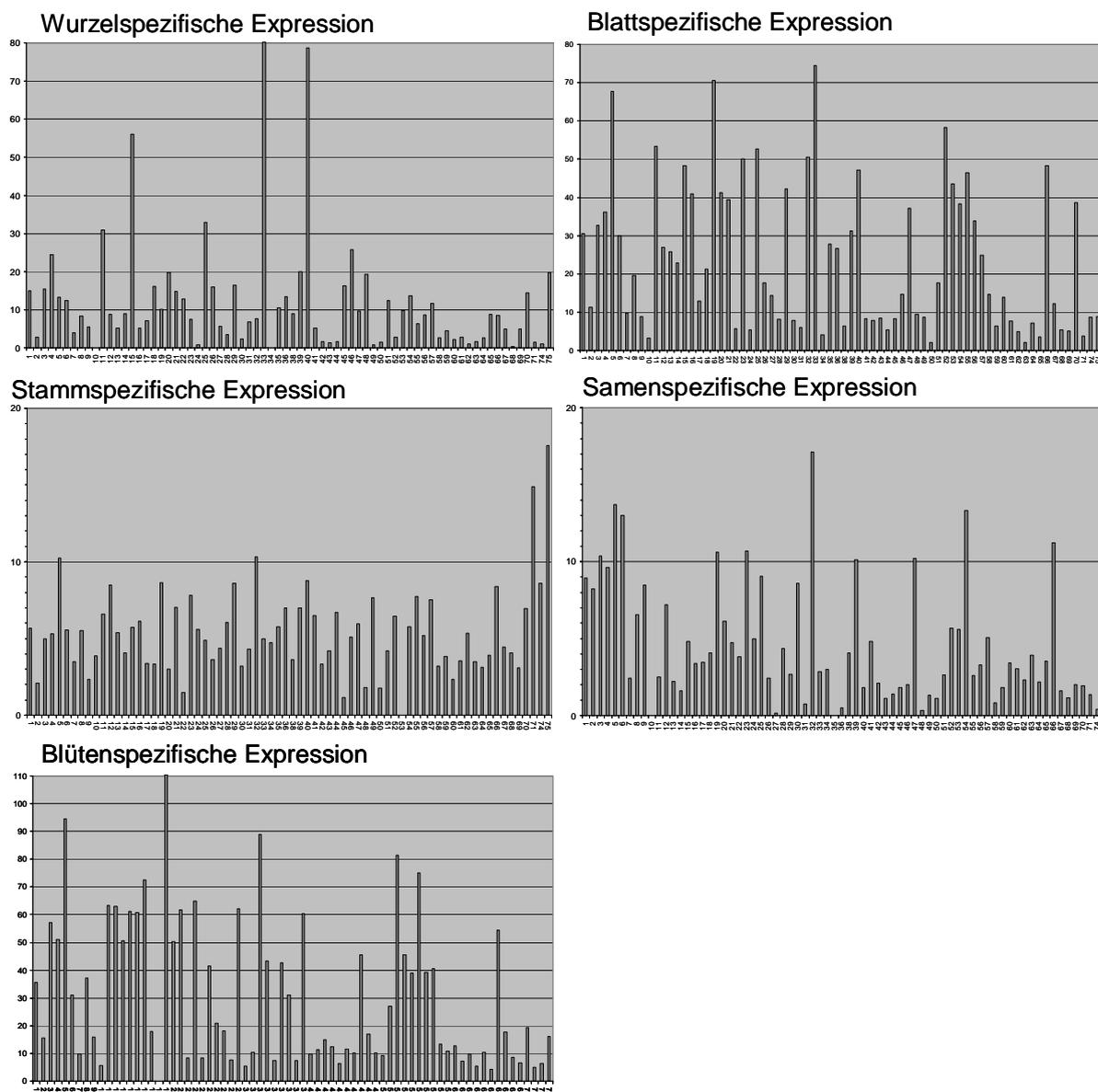


Abbildung A24: Gewebe spezifische Expression der WRKY-Faktoren

Dargestellt ist die Expressionsstärke in adulten Pflanzen in den angegebenen Geweben. Für die einzelnen Gewebe wurden getrennte Grafiken erstellt, da die Daten nicht normalisiert wurden und so die absoluten Werte nicht zwischen den verschiedenen Filtern verglichen werden sollten. Die Skalierung ist für alle Filter gleich.

**Tabelle A5 (folgende Seite): Vergleich der Gewebespezifischen Expression**

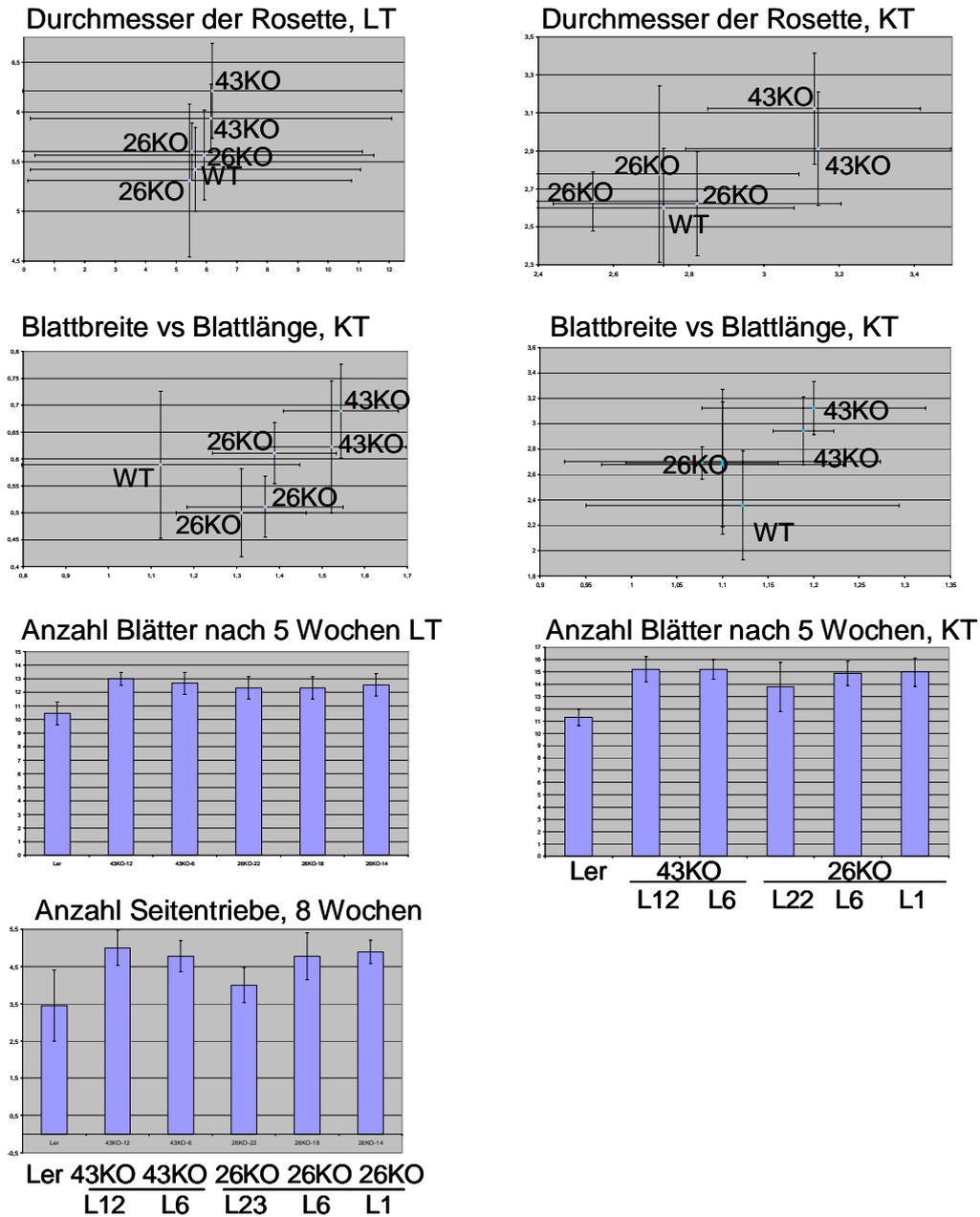
Innerhalb eines Filter ist der Vergleich der Expressionsstärke durchgeführt worden, indem etwa von der grössten Expressionsstärke aus der Bereich bis Null in vier gleich grosse Abschnitte eingeteilt wurde. Die unterste Klasse entspricht dann der schwächsten Expression (Klasse 1) und die oberste Klasse der stärksten Expression (Klasse 4). Falls einzelne Werte sehr von den restlichen Maximalwerten abwichen, wurden sie bei der Einteilung der Klassen nicht berücksichtigt und dafür wegen über die Klasse 4 hinausgehenden Expression mit der entsprechenden Anzahl an + gekennzeichnet

Anhang

WRKY	Blatt	Wurzel	Stamm	Blüte	Samen	40	4+	4+++	3	1	1
1	4	2	2	2	3	41	1	1	2	1	2
2	2	1	1	1	3	42	1	1	1	1	1
3	4	2	2	3	3	43	1	1	2	1	1
4	4	3	2	3	3	44	1	1	2	1	1
5	4+++	2	3	4+	4	45	1	2	1	1	1
6	3	2	2	2	4	46	2	3	2	1	1
7	1	1	1	1	1	47	4	1	2	3	3
8	2	1	2	2	2	48	1	2	1	1	1
9	1	1	1	1	3	49	1	1	2	1	1
10	1	0	2	1	0	50	1	1	1	1	1
11	4++	4	2	4	1	51	2	2	2	2	1
12	3	1	3	4	2	52	4+++	1	2	2	2
13	3	1	2	3	1	53	4+	1	0	3	2
14	3	1	2	4	1	54	4	2	2	2	4
15	4+	4+	2	4	2	55	4+	1	2	4	1
16	4	1	2	4	1	56	4	1	2	2	1
17	2	1	1	1	1	57	3	2	2	3	2
18	3	2	1	0	2	58	2	1	1	1	1
19	4+++	2	3	4+++	3	59	1	1	1	1	1
20	4	2	1	3	2	60	2	1	1	1	1
21	4	2	2	4	2	61	1	1	2	1	1
22	1	2	1	1	1	62	1	1	1	1	1
23	4	1	2	4	3	63	1	1	1	1	1
24	1	1	2	1	2	64	1	1	1	1	3
25	4+	4	2	3	3	65	1	1	2	1	1
26	2	2	1	2	1	66	4+	1	3	3	1
27	2	1	2	1	1	67	2	1	2	1	1
28	1	1	2	1	2	68	1	0	2	1	1
29	4+	2	3	4	1	69	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	3	70	4	2	2	1	1
31	1	1	2	1	1	71	1	1	4	1	1
32	4+	1	3	4+	4	74	1	1	3	1	1
33	4+++	4+++	2	3	1	75	1	2	4	1	2
34	1	0	2	1	1						
35	3	2	2	3	0						
36	3	2	2	2	1						
38	1	1	1	1	2						
39	4	2	2	4	3						

Abbildung A25: Untersuchung der WRKY-KO-Mutanten bzgl. Blatt- und Rosettenwachstum

Vergleich der angegebenen Parameter. Gemessen wurden jeweils neun Pflanzen bzw. Blätter und dann Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. KT: Wachstum unter Kurztag Bedingungen, LT: Wachstum unter Langtag Bedingungen. Skalierung der Grafiken mit Anzahl der Blätter bzw. Seitentriebe in Einerschritten



Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit Juli 2000 bis November 2003 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung Molekulare Phytopathologie unter der Leitung von Herrn Dr. Imre Somssich angefertigt.

Ich bedanke mich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die fantastischen Arbeitsbedingungen. Das entspannte und kreative Umfeld ermöglichte das Entstehen dieser Arbeit. Durch die guten Bedingungen war auch in stressigen Zeiten und Termindruck ein erfolgreiches Arbeiten möglich. Besonders aber war es auch die wissenschaftliche Freiheit, die ich in den letzten Jahren sehr genossen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock und Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die Übernahme des Prüfungsausschusses und Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp für die Leitung der Prüfung.

Allen Mitgliedern unserer Abteilung danke ich für die wertvollen Diskussionen, und Anregungen, Hilfestellungen und das großartige Miteinander. All dies trug entscheidend mit zum Gelingen dieser Arbeit bei. Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ein außerordentlich herzliches Laborklima und für die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Auch Bekir Ülker gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit, viele Diskussionen und die Bereitschaft neue Erkenntnisse und Ideen mitzuteilen.

Allen Freunden und Bekannten danke ich für fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, was auch dazu beitrug, gewisse Dürreperioden besonders zu Beginn der Laborarbeit zu überwinden.

Herrn Dierk Wanke danke ich für die Bereitstellung des Motif Mapper Programms und Hilfe bei der Durchführung der Analysen. Bei der Auswertung war deine Erfahrung mit dieser Analyse von unschätzbarem Wert. Deine immerwährende Diskussionsbereitschaft brachte so manche Idee an die Oberfläche und erweiterte meinen Horizont.

Wichtig für das Gelingen dieser Arbeit war auch der Einsatz von Elke Wetzig, die meine Rechtschreibung und andere Sprachschwierigkeiten unter die Lupe genommen hat. Danke, liebe Elke, für die sehr zügigen und professionellen Korrekturen. Janna Brümmer danke ich auch für Verbesserungen, besonders aber Danke für deine wertvollen inhaltlichen Vorschläge, die mir geholfen haben, meine Arbeit auch für andere verständlich darzustellen.

Einen ganz lieben Dank an Uwe, dein Photoshop-Wissen war von großem Wert, da mir so langes Suchen nach den richtigen Werkzeugen erspart blieb. Ausserdem Danke dafür, dass du auch längere Arbeitsperioden klaglos toleriert hast, besonders wenn ich mal wieder meine „halbe Stunde“ im Labor verschwand.

Und zu guter Letzt, meiner lieben Mutter. Die Kombination aus der tollen Unterstützung und dem absoluten Rückhalt gaben mir die Freiheit, die das hier alles erst möglich machte.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus Hahlbrock betreut worden.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. and Tan, J. (2003), Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. PNAS 10: 1073-1081

Lebenslauf



Name, Vorname Ciolkoswski Ingo
Geburtsdatum, -ort 24.04.1975 in Wuppertal
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig
Eltern Gundel Krauß-Ciolkowski, geb. Krauß und Horst Ciolkowski

Schulausbildung

1982 - 1985 Grundsschule Obermoschel
1985 - 1991 Realschule Rockenhausen,
Abschluss: Mittlere Reife
1991 - 1994 Wilhelm-Erb-Gymnasium Winnweiler
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium

Oktober 1994 bis März 2000 Studium der Biologie an der Universität
Kaiserslautern
Oktober 1996 Vordiplomprüfungen
April 1999 Diplomprüfungen
Schwerpunkte (Prüfungsfächer): Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie, Zoologie,
Biochemie

Zusätzlich belegte Praktika:

Genetik I&II, Humancytogenetik, spezielle
Humanbiologie I&II, Molekularbiologie, Ökologie,
Einführung in die Pädagogik
April 1999 bis März 2000 Diplomarbeit unter der Leitung von Dr. Uwe
Conrath in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.
Kauss.
Titel: "Identifizierung von induzierten DNA-
Bindeproteinen für den PAL-1-Promotor aus
Petersilie-Suspensionszellen"

Promotion

Ab Juli 2000 Erstellen der Doktorarbeit in der Abteilung von
Prof. Dr. Hahlbrock und Prof. Dr. Paul Schulze-
Lefert am Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung in Köln.