

Das Metallbindeprotein HIPP3 als regulatorische Komponente pflanzlicher Stressantworten und Entwicklung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Wiebke Zschiesche

geb. am 16. April 1978 in Hoyerswerda

Gutachter 1: Prof. Dr. Klaus Humbeck
Gutachter 2: Prof. Dr. Markus Pietzsch
Gutachter 3: Prof. Dr. Kiriakos Kotzabasis

Tag der öffentlichen Promotionsverteidigung: 17.12.2013

I ZUSAMMENFASSUNG	1
I SUMMARY	3
II EINLEITUNG	5
1. Pflanzliche Entwicklung ist abhängig von den Umweltbedingungen	5
2. Regulation der Blüten- und Samenentwicklung	5
3. Pflanzliche Antwort auf Pathogenbefall	8
4. HIPP-Proteine	11
4.1 HIPP-Proteine haben eine Schwermetallbindedomäne (HMA)	13
4.2 HIPP-Proteine besitzen eine Isoprenylierungs-Sequenz	14
III ZIELSETZUNG	16
IV ERGEBNISSE	17
1. HIPP3, Gen und Protein	17
2. Subzelluläre Lokalisation von HIPP3	20
3. Potentielle Interaktionspartner von HIPP3	23
4. Metallbindung von HIPP3	28
5. Expressionsmuster von <i>HIPP3</i>	32
5.1 Abiotischer Stress: Trockenstress	33
5.2 ABA-Behandlung	34
5.3 Biotischer Stress	35
5.4 Informationen zur Expression von <i>HIPP3</i> aus der Arabidopsis-eFP-Browser Datenbank	38
5.5 Co-Expressionsnetzwerk um <i>HIPP3</i>	40
5.6 Vorhersage von cis-Elementen im Promotor	42

6. Überexpression und <i>knockdown</i> von <i>HIPP3</i>	43
6.1 <i>knockdown</i> von <i>HIPP3</i>	43
6.2 Überexpression von <i>HIPP3</i>	44
6.3 Vergleich der <i>HIPP3</i> Transkriptgehalte in den <i>HIPP3-oe</i> Linien und der <i>hipp3-1</i> Mutante	46
7. Gene, die durch <i>HIPP3 knockdown</i> und Überexpression differentiell reguliert werden	47
7.1 Überblick über differentiell regulierte Gene	48
7.2 Funktionelle Einordnung der differentiell regulierten Gene.....	49
7.3 Detaillierte Analyse der 100 am stärksten differentiell regulierten Gene	50
7.4 Detaillierte Charakterisierung der am stärksten regulierten Gene und Verifizierung der Expressionsunterschiede mittels quantitativer <i>realtime</i> -PCR.....	52
7.5 Co-Expressionsanalyse der am stärksten regulierten Gene	57
8. Die Überexpression von <i>HIPP3</i> bewirkt eine verzögerte Entwicklung der Infloreszenz	63
V DISKUSSION	65
1. <i>HIPP3</i> ist ein isoprenyliertes Protein, das Zink bindet und im Kern lokalisiert ist	65
2. <i>HIPP3</i> interagiert mit regulatorischen Proteinen der Blüten- und Samenentwicklung	67
3. <i>HIPP3</i> wird bei Pathogenbefall induziert und bei abiotischem Stress reprimiert	69
4. <i>HIPP3</i> als möglicher Regulator in Signalwegen der Blüten- und Samenentwicklung, und der Pathogenabwehr	70
VI MATERIAL UND METHODEN	76
1. Material	76
1.1 Pflanzenmaterial.....	76

1.2 Bakterien und Hefe Stämme.....	76
1.3 Chemikalien, Enzyme, „Kits“	78
1.4 Oligonukleotide.....	78
2. Methoden	82
2.1 Generelle molekularbiologische Methoden und Datenbanken	82
2.2 Pflanzenanzucht und Stressbehandlungen.....	82
2.3 Lokalisationsstudien im heterologen Zwiebelepidermis-System	84
2.4 Hefe-Zwei-Hybrid Experimente.....	86
2.5 Identifizierung des von HIP3 gebundenen Metalls.....	87
2.6 Expressionsstudien	90
VII LITERATURVERZEICHNIS.....	93
VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	108
IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS	111
X TABELLENVERZEICHNIS	113
APPENDIX	114

I ZUSAMMENFASSUNG

HIPP Proteine (Heavy Metal associated Isoprenylated Plant Proteins) sind durch ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv und durch mindestens eine Schwermetall bindende HMA-Domäne (PFAM accession number: PF00403.6) gekennzeichnet. In *Arabidopsis thaliana* konnten auf der Basis von Sequenzanalysen 46 HIPP-Proteine identifiziert werden. Über die Funktionen der Proteine dieser für Pflanzen spezifischen Proteinfamilie ist bis jetzt wenig bekannt. Für einige HIPP-Proteine konnte eine Funktion in der Schwermetallhomöostase gezeigt werden. Andere Publikationen deuten aber auch auf eine regulatorische Funktion in Signalwegen der biotischen und abiotischen Stressantwort hin.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht ein bisher noch nicht näher untersuchtes HIPP Protein, HIPP3 (At5g60800), das sich neben dem Vorhandensein von zwei HMA-Domänen und dem Isoprenylierungsmotiv zusätzlich durch vier Kernlokalisierungssequenzen (NLS) auszeichnet. Die Kernlokalisation von HIPP3 konnte über transiente Expression eines chimären GFP::HIPP3 Proteins in Epidermiszellen der Zwiebel gezeigt werden. Zusätzliche Signale im Cytoplasma deuten auf eine duale subzelluläre Lokalisation hin. In einem ersten Ansatz wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System die Arogenat-Dehydratase (At1g11790), die Serin/Threonin Proteinkinase WNK8 (At5g41990) und der Transkriptionsrepressor ASIL1 (At1g54060) als potentielle Interaktionspartner von HIPP3 identifiziert. Um zu klären, ob und welche Schwermetalle von HIPP3 gebunden werden, wurde HIPP3 mit N-terminalem hexa-His-Tag in *E. coli* exprimiert und die gebundenen Metalle nach chromatographischer Aufreinigung des Proteins mittels ICP-MS analysiert. Diese Experimente belegen eine Bindung von Zink. Die Zink-Bindung an HIPP3 unterbleibt, wenn die für die Schwermetallbindung essentiellen Cysteine der HMA-Domänen durch Glycine ersetzt wurden.

Eigene Expressionsstudien zeigen für *HIPP3* ein komplexes Expressionsverhalten. Während Trockenstress und die Zugabe von ABA den Transkriptgehalt von *HIPP3* herunter regulieren, kommt es nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* zu einer deutlichen Induktion der Expression des Gens. *HIPP3* verhält sich wie andere Pathogen-regulierte Gene mit einer langsameren Induktion bei der PTI (PAMP triggered immunity) und einer schnelleren Induktion bei einer durch das Avirulenzprotein AvrRpm1 ausgelösten ETI (effector triggered immunity). Unter Nutzung der eFP-Browser Datenbank konnte gezeigt werden, dass *HIPP3* auch bei der Blüten- und Samenbildung reguliert wird. Co-Expressionsanalysen deuten auf eine Beteiligung an regulatorischen Netzwerken der Pathogen- und Trockenstressantwort hin. Im Promotorbereich von *HIPP3* befinden sich drei konservierte Sequenzmotive für bekannte *cis*-Elemente (TATA-Box, DRE2, Dof-Element). Um mögliche Funktionen dieses

interessanten Proteins zu untersuchen, wurden Mutantanalysen durchgeführt. Während eine vorliegende *knockdown* Mutante keine phänotypischen Änderungen im Entwicklungsverlauf zeigt, konnte bei zwei Überexpressionslinien von HIPP3 eine deutliche Verzögerung der Blütenbildung beobachtet werden. Zur Identifikation möglicher Zielgene einer regulatorischen Wirkung von HIPP3 wurden Array-Analysen durchgeführt. Die Überexpression von HIPP3 bewirkt eine deutliche Veränderung im Genexpressionsmuster von *Arabidopsis thaliana*. Etwa 400 Gene sind in der Überexpressionslinie deutlich herauf- oder herunter reguliert. Interessant ist, dass die Überexpression von HIPP3 etwa gleichermaßen eine Induktion wie auch eine Reprimierung von Genen zur Folge hat, was auf eine bidirektionale regulatorische Wirkung hinweist. Ein hoher Prozentsatz der differentiell regulierten Gene ist den funktionellen Klassen Pathogenantwort, Entwicklungsprozesse, regulatorische Prozesse und Transportvorgänge zuzuordnen, was eine Beteiligung von HIPP3 an der Regulation dieser Prozesse nahe legt. Eine vertiefte Datenbankrecherche zu den 100 am stärksten differentiell regulierten Genen untermauert diesen Befund. Sie belegt, dass viele dieser in der *HIPP3* Überexpressionslinie differentiell regulierten Gene mit biotischem und auch abiotischem Stress, mit der Samen- und Blütenentwicklung und mit Prozessen bei Eisen-, Schwefel- und Phosphatmangel assoziiert sind. Außerdem werden viele dieser Gene in Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren LEAFYCOT/LEC2 und LEAFY reguliert. Es zeigt sich auch, dass ein großer Anteil der Gene jeweils mit mehreren der genannten Prozesse assoziiert ist. Eine Co-Expressionsanalyse der bei HIPP3 Überexpression am stärksten differentiell regulierten Gene belegt ein kohärentes Expressionsverhalten, das auf eine inhibitorische Wirkung von HIPP3 auf die über PAD4 regulierte Salicylsäure abhängige Pathogenantwort und auf eine Interaktion mit Prozessen der Samen- und Blütenentwicklung hindeutet.

Meine Untersuchungen legen eine regulatorische Funktion von HIPP3 in verschiedenen pflanzlichen Signalwegen der Blüten- und Samenentwicklung, und der Antworten auf biotischen und abiotischen Stress nahe. Insbesondere konnte eine funktionelle Einbindung in den Salicylsäure abhängigen Signalweg der Pathogenantwort gezeigt werden. Der zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismus ist bisher noch unbekannt und muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden. Interessant ist, dass zwei zentrale Komponenten des Salicylsäuresignalweges ebenfalls Schwermetalle binden. Das sind der übergeordnete Zink bindende Regulator LSD1 und das zentrale, Salicylsäure bindende NPR1, das Kupfer enthält. In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell vorgestellt, welches die mögliche Wirkung von HIPP3 über diese beiden Proteine im Salicylsäuresignalweg der Pathogenantwort darstellt.

SUMMARY

HIPP proteins (heavy metal associated isoprenylated plant proteins) are defined by a C-terminal isoprenylation motif and by the presence of at least one metal binding HMA domain (PFAM accession number: PF00403.6). Via sequence analyses 46 genes encoding HIPP proteins could be identified in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The functions of most members of the HIPP protein family are up to now unknown. While a few HIPP proteins have been shown to be involved in maintenance of heavy metal homeostasis, some others seem to play a role in regulation of biotic and abiotic stress responses.

In my study I focus on a so far unknown member of the HIPP family, HIPP3 (At5g60800). This protein besides the C-terminal isoprenylation motif comprises two HMA domains and in addition, also four nuclear localization signals (NLS). The nuclear localization of HIPP3 could be confirmed via microscopy of onion epidermis cells after transient expression of a chimeric GFP::HIPP3 protein. Additional signals in cytoplasm could indicate a dual localization. Using a yeast two-hybrid approach, three putative interaction partners of HIPP3 could be identified: the arogenate dehydratase (At1g11790), the C-terminus protein kinase WNK8 (At5g41990) and the transcriptional repressor ASIL1 (At1g54060). But further experiments using other techniques are needed to verify these interactions. To determine the nature of the heavy metal bound to the HMA domains, HIPP3 was overexpressed in *E. coli*, purified using IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) and analyzed concerning bound metals via ICP-MS. These experiments prove binding of zinc. Accordingly, a modified HIPP3 protein lacking the essential four cysteine groups in the two HMA domains does not bind zinc.

Expression studies using quantitative realtime-PCR reveal a complex regulation of *HIPP3*. While drought stress and treatment with ABA repress its expression, it is clearly induced after infection with *Pseudomonas syringae pv. tomato*. *HIPP3* behaves like other pathogen related genes, showing a slow induction in PTI (PAMP triggered immunity), and a fast induction in ETI (effector triggered immunity) sparked by the avirulence protein AvrRpm1. In addition, eFP-browser database shows expression of *HIPP3* during flowering and seed development. Co-expression analyses indicate a link to regulatory pathways of pathogen and drought stress responses. Sequence analyses of the promoter region of *HIPP3* revealed the presence of *cis*-elements (TATA box, DRE2, Dof-element). To further investigate functions of HIPP3, mutant analyses were performed. While a *knockdown* mutant of the *Arabidopsis* stock centre did not show anomalies, two overexpression lines were impaired in flowering. In order to identify genes dependent on HIPP3 function, array analyses were performed. Overexpression of HIPP3 resulted in major alterations of the transcriptome with more than 400 genes being clearly up- or down- regulated. Interestingly, the amount of genes either up-

or down-regulated is similar, indicating a bidirectional regulatory effect of HIPP3. A high percentage of the differentially regulated genes belong to the functional classes, pathogen response, development, regulation and transport, indicating a complex regulatory function of HIPP3. A detailed analysis of the 'TOP100' differentially regulated genes further substantiates this, showing that many of these genes are involved in biotic and abiotic stress pathways, in seed and flower development and in responses to Fe-, S- and P- deprivation. Furthermore, a sub-set of these genes is under control of transcription factors LEAFYCOT/LEC2 and LEAFY. A detailed co-expression analysis of those genes most seriously affected by HIPP3 overexpression discloses a coherent pattern indicating an inhibitory effect of HIPP3 on the PAD4 regulated salicylate dependent pathogen response pathway and an involvement of HIPP3 in seed and flower development.

My studies document a regulatory function of HIPP3 in distinct regulatory pathways of flowering, seed development and biotic and abiotic stress responses. In particular, the results indicate a function in the salicylate pathway of pathogen response. Underlying molecular mechanisms of these interesting regulatory functions of HIPP3 have to be clarified in future experiments. Interestingly, two central regulators of the salicylate pathway also bind heavy metals. These are the zinc binding upstream regulator LSD1 and the central, salicylate binding NPR1 which contains copper. Based on these findings, in the present thesis a model is presented discussing possible molecular mechanisms of HIPP3 action in the salicylate pathway.

II EINLEITUNG

1. Pflanzliche Entwicklung ist abhängig von den Umweltbedingungen

Pflanzen entwickeln sich in Abhängigkeit von ihrer Umgebung. Sie detektieren die Umweltbedingungen und können auf Veränderungen reagieren. Dies kann z.B. eine Anpassung an eine veränderte Nährstoff- oder Wasserzufuhr, eine Reaktion auf widrige abiotische Umweltfaktoren wie geringes Lichtangebot oder hohe Temperaturen oder auch die Ausbildung von Resistenz bei einem Pathogenbefall sein. Die im Lauf der Evolution erworbene Fähigkeit, ihr Entwicklungsprogramm flexibel und umweltsensitiv zu modulieren, sichert das Überleben der Pflanzen in verschiedensten Lebensräumen. Grundlage dieser Fähigkeit ist das konzertierte Zusammenspiel von Proteinen, Nukleinsäuren und weiteren Biomolekülen, das die Perzeption der Umweltsignale, die inter- und intrazelluläre Signalweiterleitung, die Umsetzung der Signale im Rahmen der Genexpression und die interaktive Regulation und Modulation miteinander verknüpfter Signalwege ermöglicht. Das Verständnis der molekularen Basis dieser Prozesse, also die Identifikation von Komponenten der Signalwege und die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen und Regulation ist ein faszinierendes Forschungsgebiet. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Signalwege zur Realisierung umweltsensitiver Entwicklung komplex aufgebaut sind und oft eng mit anderen Signalwegen zu großen regulatorischen Netzwerken verknüpft sind (Friedel et al. 2012, Bolouri Moghaddam und van den Ende 2013). Vielfältige Interaktionen auf verschiedenen Ebenen innerhalb eines solchen regulatorischen Netzwerks, die positiv, also stimulierend, oder auch negativ, also bremsend, wirken können, ermöglichen es der Pflanze, ihr Entwicklungsprogramm schnell und effizient an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit einer möglichen Komponente solcher regulatorischen Netzwerke, dem Protein HIPP3, das bei der Steuerung pflanzlicher Entwicklungsprozesse wie Blüten- und Samenbildung und bei der Pathogenantwort eine Rolle spielt. Das Untersuchungsobjekt ist die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

2. Regulation der Blüten- und Samenentwicklung

Die Entwicklung von Blüten und nach der Befruchtung die Ausbildung von Samen mit dem darin enthaltenen Embryo sind wichtige Schritte in der Aufeinanderfolge der Lebenszyklen vieler Pflanzen. In Abhängigkeit von externen und internen Faktoren kommt es zunächst beim Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase zu einer Umprogrammierung der Genexpression im Sproß-Apikalmeristem (SAM = *shoot apical meristem*), das dabei zu

einem blütenbildenden Meristem umfunktioniert wird, aus dem sich dann die Blüte entwickelt. Diesem Umschalten im Entwicklungsprogramm liegt ein komplexes genetisches und epigenetisches Netzwerk zugrunde (Amasino 2010, Andrés und Coupland 2012, Ietswaart et al. 2012). Dabei kann die Blütenbildung durch verschiedene externe und interne Signale wie z.B. Tageslänge und Lichtqualität, Kälteperioden oder Änderungen in der Gibberellin-Konzentration ausgelöst werden. Man unterscheidet deswegen verschiedene Signalwege, die in der englischsprachigen Literatur mit *photoperiod pathway*, *gibberellin pathway*, *autonomous pathway* und *vernalization pathway* bezeichnet werden (Srikanth und Schmid 2011). Es wurde schon früh postuliert, dass die Umprogrammierung des Apikalmeristems durch ein Signal der Blätter ausgelöst wird, das Florigen genannt wurde (Chailakhyan 1936). Heute weiß man, dass ein solches auslösendes Signal, das von den Blättern über das Phloem zum Apikalmeristem transportiert wird, das Protein FLOWERING LOCUS T (FT) ist (Taoka et al. 2013, Turnbull 2011). Kürzlich wurde ein weiteres Protein, das TWIN SISTER OF FT (TSF) genannt wurde, identifiziert, dem eine ähnliche Funktion wie FT zugesprochen wird (Yamaguchi et al. 2005). Die Expression von FT, die in den Geleitzellen des Phloems nachgewiesen werden konnte (Takada und Goto 2003), unterliegt einer komplexen Regulation, wobei die Lichtbedingung detektiert über Photorezeptoren, Komponenten der circadianen Uhr, aber auch miRNAs eine Rolle spielen (Srikanth und Schmid 2011). Im Apikalmeristem löst FT einen regulatorischen Signalweg zur Blütenbildung aus, bei dem Phytohormone, insbesondere Gibberelline, verschiedene regulatorische Proteine wie die Transkriptionsfaktoren SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), LEAFY (LFY), FLOWERING LOCUS C (FLC) und auch epigenetische Regulationsmechanismen involviert sind (Andrés und Coupland 2012, Ietswaart et al. 2012, Taoka et al. 2013). Weiter unten im Signalweg werden die Blütenorgane durch die Interaktion der regulatorischen ABC-Gene festgelegt (Coen und Meyerowitz, 1991).

Die fertige Blüte beinhaltet die Fortpflanzungsorgane, die in den Pollensäcken vorliegenden Pollenkörner und die Eizelle im Embryosack. Bei der Befruchtung vereinigen sich die haploide Eizelle und ein ebenfalls haploider männlicher Gametophyt aus dem Pollenkorn und bilden eine Zygote, mit der ein neues Lebewesen entsteht. Bei der Samenbildung spielt eine zweite Befruchtung eine Rolle, bei der eine weitere haploide Spermazelle aus dem Pollenschlauch mit dem diploiden Embryosackkern zu einer triploiden Zelle verschmilzt, aus der sich das Endosperm bildet. Die Entwicklung des Samens mit Embryo und Endosperm unterliegt ebenfalls einem komplexen regulatorischen Netzwerk. Einige der beteiligten Regulatoren sind mittlerweile bekannt (Wobus und Weber 1999, Brady und McCourt 2003, Santos-Mendoza et al. 2008, Zhang und Ogas 2009), aber ein genaues Verständnis der komplexen Signalwege fehlt noch immer. Als zentrale Regulatoren der Embryogenese sind

neben ABA INSENSITIVE 3 (ABI3) auch die LEAFY COTYLEDON Proteine LEC1, LEC2 und FUS3 bekannt (Braybrook und Harada 2008).

Die Signalwege zur räumlichen und zeitlichen Realisierung der Blüten- und Samenbildung, bei der regulatorische Faktoren, wie oben beschrieben, hintereinander agieren, wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Obwohl wir noch weit von einem vollständigen Verständnis der komplex vernetzten Wechselwirkungen entfernt sind, erlauben diese neuen Erkenntnisse einen Blick auf die grundlegende Struktur und Wirkungsweise solcher regulatorischen Signalwege pflanzlicher Entwicklung. Dabei zeigt sich auch, dass einzelne Signalwege nicht unabhängig, also einem starren Programm folgend, ablaufen, sondern über Schaltstellen miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig beeinflussen können. Solch ein *cross-talk* zwischen verschiedenen Signalwegen ermöglicht eine koordinierte, und fein modulierbare Entwicklung auch bei sich ändernden Umweltbedingungen und ist deswegen für Pflanzen lebenswichtig. So kann eine Pflanze zum Beispiel ihr Entwicklungsprogramm in Abhängigkeit von einer auftretenden Stresssituation wie Trockenstress modulieren, um Ressourcen für die Trockenstressantwort bereit zu stellen (Cutler et al. 2010). Hier spielen unter anderem Phytohormone, wie die Abscisinsäure (ABA), eine wichtige Rolle. Eine Reihe von Publikationen zeigt, dass auch biotische Stresssituationen einen Einfluss auf Entwicklungsvorgänge haben (z.B. Herms und Mattson 1994, Develey-Riviere und Galiana 2007, Winter et al. 2011, Bolouri Moghaddam und van den Ende 2013). Es konnte belegt werden, dass regulatorische Netzwerke, die auf Veränderungen im Kohlenhydrathaushalt reagieren und in Abhängigkeit von der circadianen Uhr und von DELLA-Proteinen, die in Gibberellin-abhängige Signalwege involviert sind, den Blühzeitpunkt regulieren, auch mit dem Netzwerk der Pathogenabwehr verknüpft sind (Bolouri Moghaddam und van der Ende 2013). In der letzten Zeit konnten verschiedene Wissenschaftler auch Faktoren identifizieren, die an dem *cross-talk* zwischen Signalwegen der Blütenbildung und der Pathogenantwort beteiligt sind. Li et al. konnten 2012 zeigen, dass die U-Box/ARM E3 Ligase PUB13 sowohl im Salicylsäure (SA)- abhängigen Weg der Pathogenabwehr über die dort beteiligten Komponenten SID2 (SA INDUCTION DEFICIENT 2) und PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4) als auch im Signalweg zur Blütenbildung wirkt. Ein anderes Beispiel wurde 2011 von Winter et al. beschrieben. Diese Autoren konnten zeigen, dass der zentrale Regulator der Blütenbildung LEAFY (LFY) auch einen Link zur Pathogenantwort herstellt, die durch LFY reprimiert wird. Winter et al. (2011) diskutieren, dass Pflanzen auf diesem Weg Ressourcen, die sonst für den Aufbau der Pathogenresistenz verbraucht würden, in die sich ausbildende Blüte leiten, um so die reproduktive Fitness zu maximieren. Eine übergeordnete Rolle der für biotische Stressantworten zentralen Regulatoren LSD1 (LESIONS SIMULATING DISEASE RESISTANCE 1), EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) und PAD4 auch bei anderen umweltabhängigen Signalwegen pflanzlicher Entwicklung

wird ebenfalls in einem 2013 veröffentlichten Übersichtsartikel von Wituszynska et al. diskutiert. Diese Befunde zeigen, dass Pflanzen zur Optimierung ihrer Fitness Entwicklungsprozesse in Abhängigkeit von Umweltfaktoren modulieren können. Einige Faktoren, die auf molekularer Ebene diese Modulation bewirken, sind bereits bekannt. Es zeigt sich, dass Signalwege zur Steuerung von Entwicklung und Stressantworten in Netzwerken eng verzahnt sind. Die Identifizierung von regulatorischen Komponenten und ihrer Wirkmechanismen in verschiedenen Signalwegen ist ein hochaktuelles Forschungsgebiet.

3. Pflanzliche Antwort auf Pathogenbefall

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung dem vielfältigen Angriff anderer Lebewesen ausgesetzt. Pathogene wie z.B. Pilze oder Bakterien kann man aufgrund ihrer „Angriffsweise“ in nekrotrophe und biotrophe Pathogene einteilen, wobei nekrotrophe Pathogene die Wirtszellen zerstören und sich biotrophe Pathogene Nährstoffe aus den noch lebenden Wirtszellen holen. Oftmals durchlaufen Pathogene auch sukzessive biotrophe und nekrotrophe Lebensphasen, und werden dann entsprechend als hemibiotrophe Pathogene eingestuft. Pflanzen besitzen als präformierte Schutzmaßnahmen strukturelle Barrieren und antimikrobielle Metabolite. Allerdings gelingt es vielen Pathogenen trotzdem die Pflanzen erfolgreich anzugreifen. Befallene Pflanzen haben wiederum die Möglichkeit als Antwort auf einen Pathogen-Angriff eine ganze Palette effektiver Abwehrmaßnahmen in Gang zu setzen, die post-invasiv die Ausbreitung des Pathogens verhindern, oder zumindest bremsen können (Pieterse et al. 2009, Faulkner und Robatzek 2012, Zhang et al. 2013). Man unterscheidet dabei zwischen Abwehrreaktionen, die durch die Erkennung allgemeiner Strukturen mikrobieller Pathogene, wie z.B. Flaggelin, Chitin oder Glycoproteine ausgelöst werden. Solche Strukturen nennt man PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) und die ausgelöste Immunantwort *PAMP-triggered immunity (PTI)*. Allerdings haben Pathogene im Lauf der Co-Evolution wiederum Mechanismen entwickelt, um diese *PTI* durch in die Pflanzenzellen eingebrachte Effektor-Moleküle auszubremsen. Manche Pflanzen erkennen aber auch diese eingebrachten Effektor-Moleküle und antworten darauf mit einer weiteren, verstärkten Immunantwort, der sogenannten *effector-triggered immunity (ETI)* (Chisholm et al. 2006, Dodds und Rathjen 2010). Als Antwort auf einen Pathogenbefall können Pflanzen im Rahmen der *PTI* und *ETI* eine Reihe von Abwehrmaßnahmen, wie z.B.: Zellwandverstärkung, Produktion antimikrobieller Metabolite, die Akkumulation von Abwehrproteinen (*pathogenesis-related (PR) Proteine*), die z.B. pilzliche Zellwände angreifen, in Gang setzen. *PTI* und *ETI* zeigen dabei, wenn auch im Ausmaß und in der Zeitkinetik unterschiedlich, große Überlappungen. Eine starke Reaktion auf den Angriff

(hemi)biotropher Pathogene ist die mit einer raschen Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen einher gehende Hypersensitive Reaktion (HR), die zum Zelltod an der Angriffsstelle führt und so die weitere Ausbreitung verhindert (Heath 2000, Mur et al. 2008). Eine solche Reaktion könnte die Ausbreitung von nekrotrophen Pathogenen eher fördern. Pflanzen haben deswegen unterschiedliche, auf den Typ des Pathogens ausgerichtete Signalwege entwickelt, die im *cross-talk* miteinander stehen und sich dadurch gegenseitig beeinflussen können. Eine zentrale Rolle spielen dabei Phytohormone. Während die Abwehrmechanismen gegen biotrophe Pathogene über Salicylsäure (SA) -abhängige Signalwege gesteuert werden, spielen Jasmonate (JAs) und Ethylen (ET) eine wichtige Rolle bei Antworten gegen den Befall mit nekrotrophen Pathogenen und bei Verwundungsreaktionen, die auch beim Befall mit Herbivoren auftreten (Dong 1998, Kunkel und Brooks 2002, Glazebrook et al. 2003, Pieterse et al. 2009). Ein weiterer Aspekt pflanzlicher Pathogenabwehr ist, dass Pflanzen nach der Detektion des Pathogenangriffs und der Reaktion an der Infektionsstelle auch oft eine systemische Antwort (*systemic acquired resistance*, SAR) auslösen, um auch in weit entfernten Zellen gegen einen Angriff gewappnet zu sein (Durrant und Dong 2004). Mutantanalysen belegen, dass Salicylsäure (SA) bei der SAR ein zentraler Regulator ist. Dabei spielt das Protein NPR1 (NONREPRESSOR OF PR GENESIS 1) eine wichtige Rolle, welches SA binden kann und in Interaktion mit weiteren Faktoren, wie z.B. TGA-Transkriptionsfaktoren, die Expression von *PR*-Genen reguliert (Boatwright und Pajeroska-Mukhtar 2013, Fu und Dong 2013, Pajeroska-Mukhtar et al. 2013).

In den letzten Jahren gelang die Aufklärung grundlegender Strukturen der über die Hormone SA, JA und ET gesteuerten und eng vernetzten Signalwege pflanzlicher Pathogenantworten. Während der SA-Weg und der JA-Weg auf verschiedenen Ebenen antagonistisch interagieren, scheinen JA-Weg und ET-Weg eher synergistisch zu wirken (Glazebrook et al. 2003, Pieterse et al. 2009). Die Abbildung 1, die nach Pieterse et al. (2009) modifiziert wurde, gibt einen Überblick über die identifizierten Komponenten der drei Signalwege der pflanzlichen Pathogenantwort, über ihre Wirkmechanismen und über beteiligte Komponenten des extensiven *cross-talks*. Wie in dem Modell dargestellt, führt die Aktivierung des SA-Signalweges durch biotrophe Pathogene zur Reprimierung des JA-Signalweges, was mit einer Reprimierung Jasmonat-responsiver Gene wie *VSP1/2* (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1/2) und *PDF1.2* (PLANT DEFENSIN 1.2) einhergeht (Wasternack 2007). In der Abbildung 1 sind wichtige Komponenten der verschiedenen Signalwege dargestellt. Das Zink-Finger-Protein LSD1 (LESION SIMULATING DISEASE RESISTANCE 1) ist ein übergeordneter negativer Regulator der SA-abhängigen Pathogenantwort (Rustérucci et al. 2001, Wiermer et al. 2005, Mühlenbock et al. 2008), die über die Lipase-ähnlichen Proteine EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) und PAD4 (PHYTOALEXIN

DEFICIENT4), dem zentralen Regulator NPR1 (NONREPRESSOR OF PR GENESIS 1) und weiter unten im Signalweg über Glutharedoxin (GRX480) und WRKY-Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY70), zur SA-abhängigen Genexpression (z.B. von PR-1) führt (Wiermer et al. 2005). Im JA-abhängigen Signalweg bewirkt die Akkumulation von Jasmonat über die Interaktion mit dem im reprimierenden E3 Ubiquitin-Ligase Komplex SCF^{COI1} vorliegenden Protein COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) die Ubiquitinierung und anschließende Degradation des Jasmonat ZIM-Domänen-Proteins (JAZ) und somit die Aktivierung von weiter unten im Signalweg lokalisierten Transkriptionsfaktoren (MYC2, ERF1, ORA59) Jasmonat-responsiver Gene (Wasternack und Hause 2013, Gimenez-Ibanez und Solano 2013). In der ET-Signalkette spielen EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2) und EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3) eine Rolle, wobei über EIN2 der proteolytische Abbau von EIN3 durch die E3 Ubiquitin Ligase SCF^{EBF1/2} unterbunden wird. Zielgene weiter unten in der Signalkette angesiedelter Transkriptionsfaktoren wie ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) sind z.B. wie im JA-Weg PDF1.2 (Kendrick und Chang 2008, Shan et al. 2012).

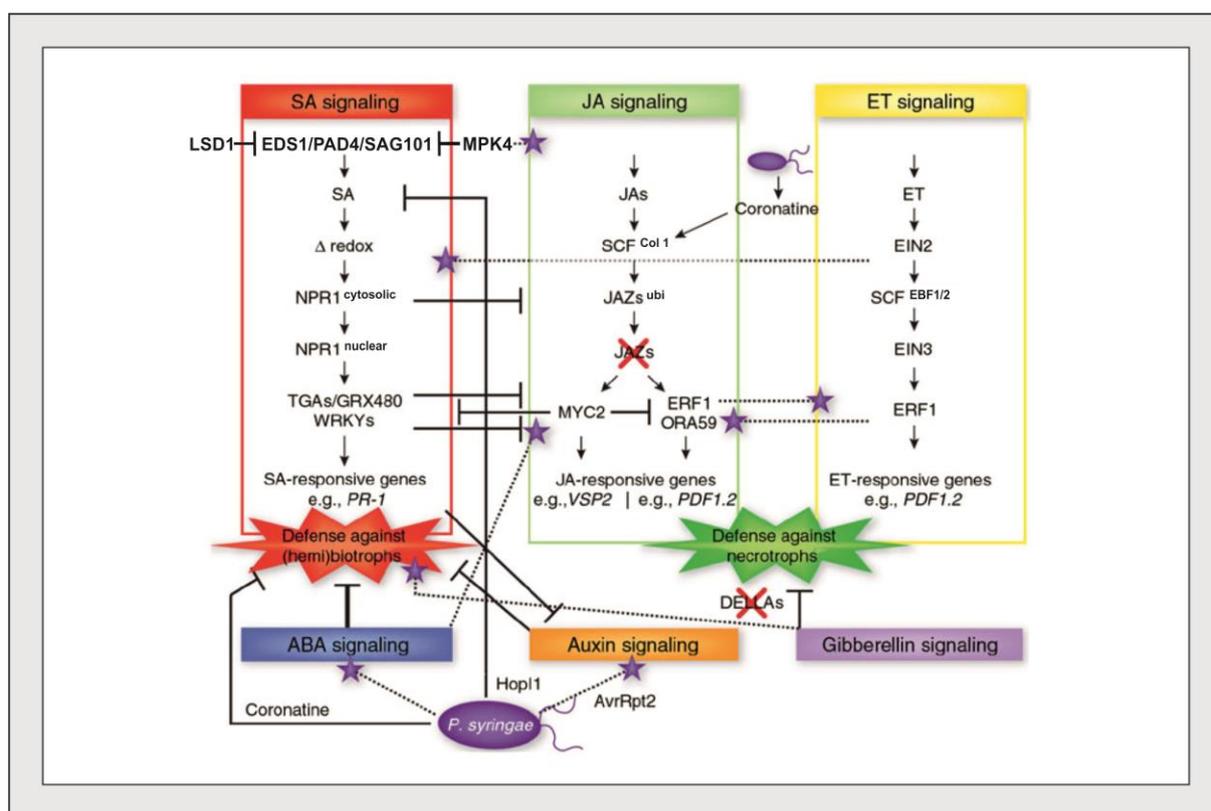


Abbildung 1: Topologie der Signalwege pflanzlicher Pathogenabwehr. Über *cross-talk* auf verschiedenen Ebenen kommt es zu gegenseitiger negativer oder positiver Interaktion. Das zentrale Netzwerk der drei Pathogensignalwege (SA-JA-ET) ist mit weiteren Phytohormon-basierten Signalwegen vernetzt. Abgeändertes Schema nach Pieterse et al. 2009

Dieses regulatorische Netzwerk ist abhängig von weiteren Phytohormonen. Während Abscisinsäure (ABA) und Auxine den SA-Weg inhibieren, können Gibberelline über die

Inaktivierung der als negative Wachstumsregulatoren fungierenden DELLA Proteine positiv auf den SA-Weg und negativ auf den JA- und ET-Weg einwirken (Yang et al. 2013).

4. HIPP-Proteine

Proteine, die neben einem C-terminalen Isoprenylierungsmotiv auch eine oder mehrere als HMA (Heavy Metal Associated) bezeichnete Schwermetallbindedomänen aufweisen, sind spezifisch für Pflanzen und wurden 1999 erstmals von Dykema et al. beschrieben. Sie werden unter dem Oberbegriff HIPP-Proteine (Heavy Metal associated Isoprenylated Plant Proteins) zusammengefasst (Barth et al, 2004). Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick über den prinzipiellen strukturellen Aufbau aller Proteine dieser Familie. 26 dieser HIPP-Proteine weisen zusätzlich zu der HMA-Domäne und dem Isoprenylierungsmotiv noch ein oder mehrere Kernlokalisierungssignale (NLS) auf, die eine Kernlokalisierung dieser putativen Schwermetallbindepoteine nahelegen. In *Arabidopsis thaliana* konnten auf der Basis von Sequenzanalysen 46 HIPP-Proteine identifiziert werden. Anhand der HMA-Aminosäuresequenzen der 76 HMA-Domänen enthaltenden Proteine aus *Arabidopsis thaliana* wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung 3), der auch die 46 Proteine der HIPP-Familie mit zusätzlicher Isoprenylierungsstelle umfasst.

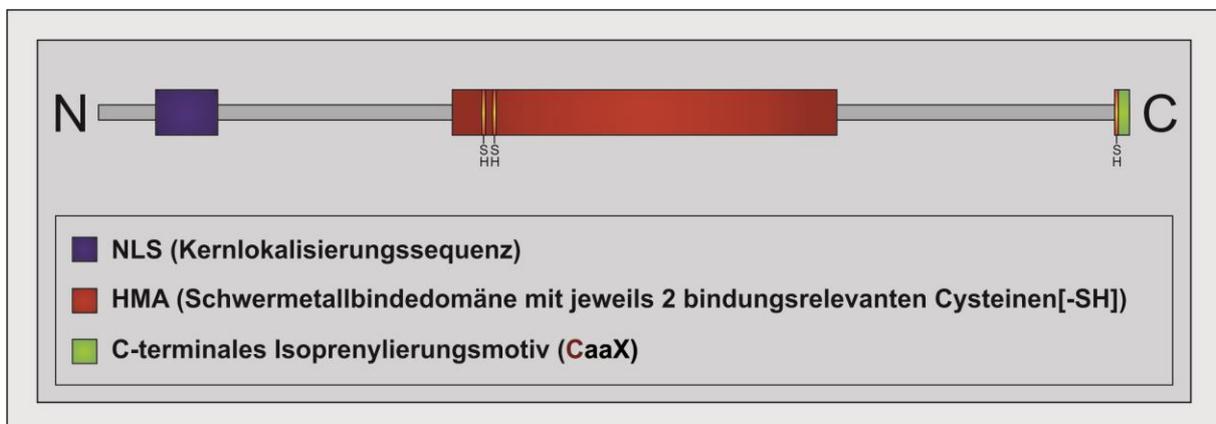


Abbildung 2: Strukturelle Merkmale der HIPP-Proteine. HIPP-Proteine sind durch ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (grün dargestellt), das an der viertletzten Position ein Cystein aufweist (-SH) und eine oder mehrere Schwermetallbindedomänen (HMA, rot dargestellt) mit zwei bindungsrelevanten Cysteinen (-SH) gekennzeichnet. Viele Vertreter der HIPP-Proteine besitzen außerdem noch eine oder mehrere Kernlokalisierungssequenzen (NLS, blau dargestellt).

Aufgrund der Ähnlichkeiten in der HMA-Sequenz konnten diese Proteine in acht Cluster eingeteilt werden. Über die Funktionen der meisten HIPP-Proteine ist bis heute wenig bekannt. Bis jetzt wurde die Beteiligung von HIPP-Proteinen an drei Prozessen beschrieben. Dazu gehören die Schwermetallhomöostase und -entgiftung, die Regulation von Kälte- und Trockenstressantworten und die Beteiligung an Pflanzen-Pathogen-Interaktionen (de Abreu-

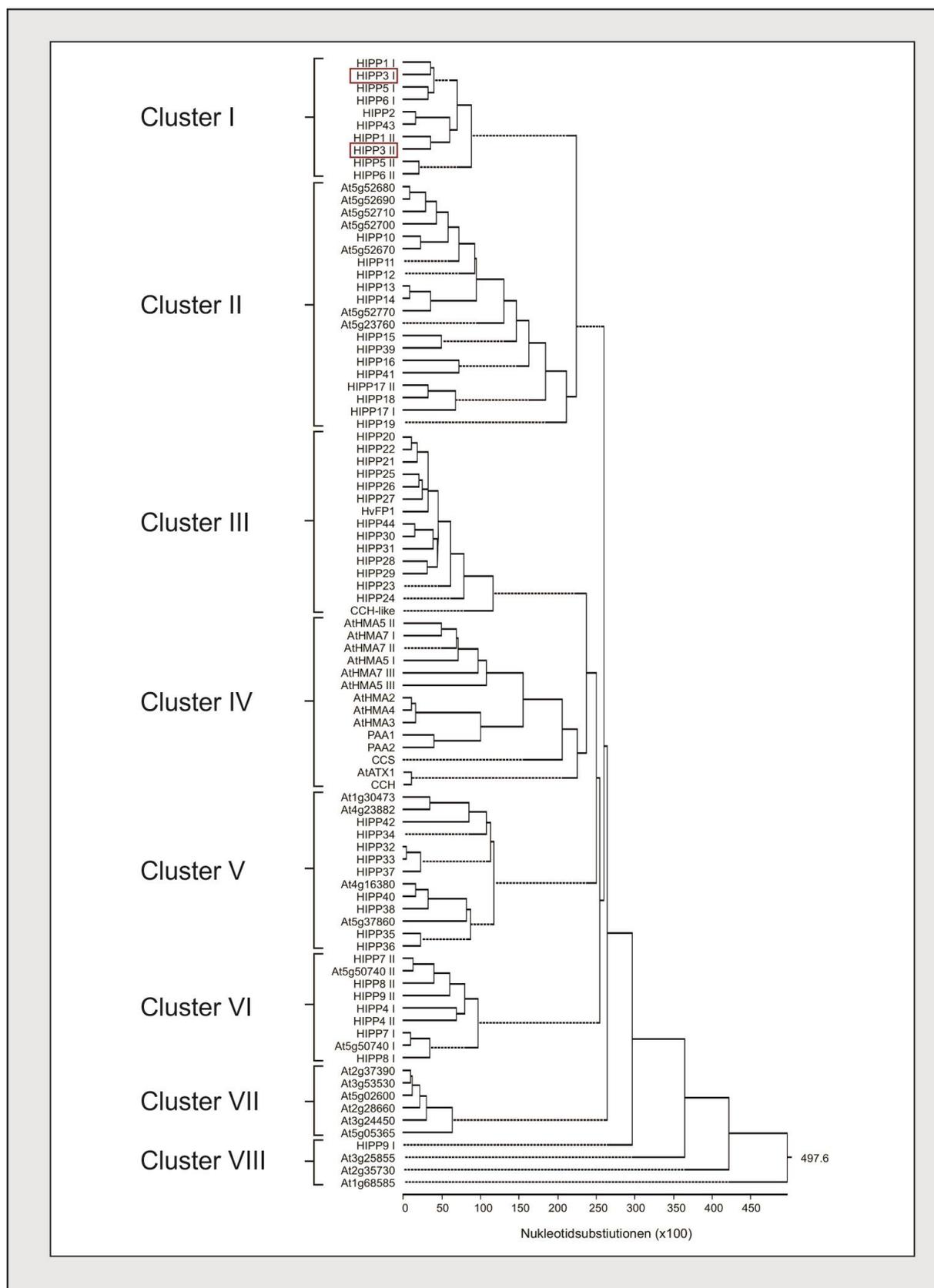


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum aller Arabidopsis-Proteine mit HMA-Domäne. Er wurde unter Verwendung der Clustal W Algorithmen des MegAlign Modules der Lasergene Software (DNASTAR Inc., Madison, USA) auf der Basis der Aminosäuresequenz der HMA-Domänen erstellt. Die Proteine clustern in VIII Gruppen. HIPP3 (rot markiert) besitzt, wie auch einige andere HIPP-Proteine, zwei HMA-Domänen, die dementsprechend zweimal im zugehörigen Cluster I auftauchen.

Neto et al. 2013). Eine Beteiligung von bakteriellen, tierischen oder pflanzlichen Proteinen mit einer schwermetallbindenden HMA-Domäne an Prozessen der Schwermetallhomöostase und der Schwermetallentgiftung ist bereits vielfach beschrieben worden (Robinson und Winge 2010, Tehseen et al. 2010). 2002 konnten Suzuki et al. zeigen, dass auch das pflanzliche HIPP-Protein HIPP6 (identisch mit CDI19) bei Schwermetallstress akkumuliert und eine erhöhte Expression von HIPP6 zu einer verbesserten Cadmium-Toleranz führt. Ein weiteres gut untersuchtes HIPP ist das kernlokalisierte HIPP26 (Barth et al. 2009), das unter abiotischen Stressbedingungen induziert wird und mit dem in der Trockenstress-Antwort involvierten Zink-Finger Transkriptionsfaktor ATHB29 (Tran et al. 2007) interagiert. Entsprechend konnten de Abreu-Neto et al. 2013 zeigen, dass *OsHIPP41*, ein HIPP-Gen aus Reis, bei Kälte und Trockenstress induziert wird. Kürzlich wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Quegwer 2013) für ein weiteres HIPP-Protein aus *Arabidopsis thaliana*, dem HIPP37, Hinweise für eine Beteiligung an der Phosphatmangel-Antwort der Pflanzen gefunden. Arbeiten an HIPP-Proteinen aus Reis belegen darüber hinaus auch einen Einfluss von HIPP-Proteinen bei biotischem Stress. *OsHIPP05* wurde als Komponente der Stressantwort auf Befall mit dem Pilz *Magnaporthe oryzae* beschrieben (Fukuoka et al. 2009, Nakao et al. 2011). Dieses HIPP-Protein verlangsamt die primären Stressantworten und wird im Zusammenhang mit der Ausbildung dauerhafter Resistenz diskutiert.

4.1 HIPP-Proteine haben eine Schwermetallbindedomäne (HMA)

Schwermetalle wie Eisen, Kupfer oder Zink haben in Lebewesen eine ambivalente Bedeutung. Zum einen können sie in Zellen aufgrund ihrer Reaktivität die Bildung von schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies bewirken oder direkt mit Proteinen interagieren und so erhebliche Schädigungen hervorrufen (Clemens et al. 2002, Hall 2002, Lin und Aarts 2012). Zum anderen sind sie essentieller Bestandteil vieler Proteine und haben dort katalytische oder strukturelle Funktionen (Sinclair und Krämer 2012). Man nimmt an, dass ein Drittel bis die Hälfte aller Proteine Metallionen entweder als katalytische Komponente oder als strukturgebendes Merkmal benötigen (Tainer et al. 1992, Degtyarenko 2000, Huffman und Halloran 2001, Rosenzweig 2002, Dupont et al. 2010). Damit Schwermetalle zum einen entgiftet werden, zum anderen aber auch aufgenommen und zum richtigen Protein transportiert werden und dort ihre Funktion ausüben können, gibt es eine Vielzahl von schwermetallbindenden Proteinen und Metaboliten. Die HMA-Domäne (PFAM accession number: PF00403.6) ist eine typische Proteindomäne zur Bindung von Schwermetallen wie Kupfer oder Zink, die in vielen bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Proteinen zu finden ist (z.B. Sahlmann und Skärfstad 1993, Lin und Culotta 1995, Tsay et al. 2004). Sie besteht aus 66 Aminosäuren, wobei am zentralen Motiv mit der Sequenz M/L/IxCxxC (M: Methionin, L:

Leucin, I: Isoleucin, C: Cystein, x: beliebige Aminosäure) über die beiden Cysteine die Bindung von Schwermetallen erfolgt (Hung et al. 1998, Dykema et al. 1999). Direkt hinter dem ersten Cystein befindet sich meist eine negativ geladene, direkt hinter dem zweiten Cystein eine hydrophobe Aminosäure. Dies trägt vermutlich zur Stabilisierung der Metallbindung bei (Hung et al. 1998, Dykema et al. 1999). Bei einer Reihe von Proteinen mit HMA-Domäne konnten Funktionen als Metallchaperon oder Metalltransporter nachgewiesen werden. So transportiert ATX1 (ANTIOXIDANT 1) aus *Saccharomyces cerevisiae* z.B. Kupfer-Ionen und überträgt sie auf den ebenfalls eine HMA-Domäne aufweisenden P-Typ-Kupfertransporter Ccc2p (Lin et al. 1997). Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass Proteine mit HMA-Domänen als Metallchaperone fungieren, wie z.B. CCH (COPPER CHAPERONE) (Himmelblau et al. 1998), AtATX1 (Puig et al. 2007) und AtCCS, das Kupfer auf die Kupfer/Zink Superoxid-Dismutase (Chu et al. 2005) überträgt. Neben Funktionen im Metalltransport und in der Metallentgiftung (Suzuki et al. 2002) konnte im bakteriellen System aber auch eine regulatorische Funktionen eines HMA-Domäne enthaltenen Proteins nachgewiesen werden. Das HMA-Domänenprotein CopZ überträgt in *Enterococcus hirae* Kupfer auf den Transkriptionsrepressor CopY. Dabei wird das im CopY strukturell für die DNA-Bindung benötigte Zink verdrängt. Durch diese Inaktivierung des Repressors CopY wird die Transkription des cop-Operons mit Genen für die Kupfer-Homöostase induziert (Cobine et al. 1999, Solioz und Stoyanov 2003).

4.2 HIPP-Proteine besitzen eine Isoprenylierungs-Sequenz

Bei der post-translationalen Isoprenylierung wird an das C-terminale Ende eines Proteins eine hydrophobe Gruppe (entweder ein Farnesyl- oder ein Geranylgeranyl-Rest) angehängt. Dieser hydrophobe Rest ermöglicht die Verankerung des Proteins an Membranen oder erlaubt Interaktionen mit anderen hydrophoben Proteinen (Zhang und Casey 1996). Isoprenylierte Proteine spielen oft eine regulatorische Rolle in Signaltransduktionswegen oder sind am Vesikeltransport, an der Organisation des Zytoskeletts, im Zellzyklus oder bei der Assemblierung und Deassemblierung der Kernmembran beteiligt (Crowell 2000).

Prenyltransferasen, die die Isoprenylierung katalysieren, erkennen die C-terminale Aminosäuresequenz CaaX (C: Cystein, a: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure). Die letzte Aminosäure (X) scheint die Art der Isoprenylierung zu steuern. Handelt es sich um ein Cystein, Glutamin, Methionin oder Serin, wird an das Cystein der CaaX-Sequenz bevorzugt über Farnesyltransferasen (FTasen) ein C15-Farnesylrest über eine Thioetherbindung angehängt, während die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin an der Position X bevorzugt von Geranyl-Geranyltransferasen (GGTasen)

erkannt werden, die an das an viertletzter Position stehende Cystein einen C20-Geranylgeranylrest anhängen (Zhu et al. 1993, Yang et al. 2000). Anschließend werden die letzten drei Aminosäuren (aaX) nach Transport zum Endoplasmatischen Retikulum durch eine Endopeptidase abgespalten und die terminale Carboxylgruppe wird durch eine Prenyl-Cystein-Methyl Transferase methyliert (Rodríguez-Concepción et al. 1999).

III ZIELSETZUNG

HIPP-Proteine besitzen zwei funktionell interessante Domänen: das C-terminale Isoprenylierungsmotiv und die Schwermetallbindedomäne (HMA). Bis jetzt ist nur wenig über die Funktion von HIPP-Proteinen bekannt. Arbeiten von Suzuki et al. (2002) belegen, dass das zu dieser Familie gehörende HIPP6 Schwermetalle binden kann und eine Rolle bei Schwermetall-Stress ausübt. Für ein weiteres HIPP, das kernlokalisierte HIPP26, konnten Barth et al. (2009) eine Interaktion mit dem Zink-Finger Transkriptionsfaktor ATHB29, der bei der Trockenstressantwort eine Rolle spielt, nachweisen. In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion von HIPP3, einem weiteren Vertreter dieser Proteinfamilie, untersucht werden. HIPP3 hat eine besondere Struktur. Es besitzt neben dem Isoprenylierungsmotiv noch zwei Schwermetallbindedomänen und vier NLS-Motive, die für eine Kernlokalisierung sprechen. Das Vorhandensein der zwei Schwermetallbindedomänen deutet auf eine Funktion als Metallchaperon hin. Es stellt sich die Frage, welche Funktionen ein solches Schwermetall bindendes Protein, das einen hydrophoben Anker für Interaktionen mit Membranen oder anderen Proteinen besitzt, im Zellkern ausübt.

Um Aussagen zur Funktion von HIPP3 zu erhalten, sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Ist HIPP3, wie das Vorhandensein der vier NLS-Motive nahelegt, im Zellkern lokalisiert?
- Mit welchen anderen Proteinen interagiert HIPP3?
- Welche Metallionen werden von HIPP3 gebunden?
- Unter welchen Bedingungen wird HIPP3 exprimiert?
- Hat HIPP3 eine regulatorische Funktion?
- Welche Gene zeigen in HIPP3-Mutanten eine veränderte Expression und damit eine Abhängigkeit von der molekularen Funktion des HIPP3-Proteins?
- Zeigen HIPP3-Mutanten phänotypische Veränderungen, die Hinweise zur molekularen Funktion von HIPP3 liefern können?

Die in den Experimenten zur Klärung dieser Fragen gewonnenen Daten sollen in ein Modell einfließen, welches mögliche Funktionen von HIPP3 im zellulären Kontext beschreibt.

IV ERGEBNISSE

1. HIPP3, Gen und Protein

HIPP-Proteine (Hheavy Metal associated Isoprenylated Plant Proteins; Barth et al. 2009) stellen eine bisher noch wenig bekannte, für Pflanzen spezifische Proteinfamilie dar, die sowohl eine Schwermetallbindedomäne (HMA; Hheavy Metal Associated Domain) (PFAM accession number: PF00403.6), als auch ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (Rodríguez-Concepción et al. 1999) besitzen. Bis jetzt konnten in *Arabidopsis thaliana* 46 Vertreter dieser Proteinfamilie identifiziert werden.

HIPP3 (At5g60800) gehört zum Cluster I der HIPP-Proteinfamilie (siehe phylogenetischer Stammbaum, Abbildung 3), zu dem neben HIPP3 auch HIPP1, HIPP2, HIPP5, HIPP6 und HIPP43 gehören. Über die Funktionen der HIPP-Proteine aus Cluster I war bisher noch sehr wenig bekannt.

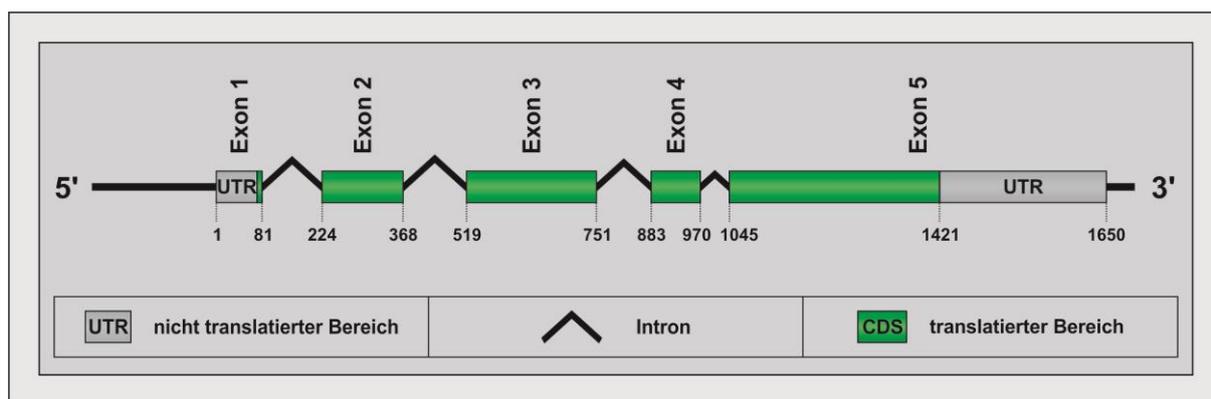


Abbildung 4: HIPP3 Genstruktur. Das *HIPP3* Gen liegt auf Chromosom 5 und ist in fünf Exons strukturiert, die von vier Introns unterbrochen werden. Die gesamte Gensequenz, zusammen mit den 5'- und 3'- nicht translateren Bereichen, umfasst 1650bp. Davon gehören 852bp zur codierenden *HIPP3* Sequenz (*HIPP3* cDNA).

Die aus der Gensequenz von *HIPP3* abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst 283 Aminosäuren. Das Protein besitzt charakteristische Sequenzbereiche (Abbildung 5). Auffallend sind vier NLS-Motive, die durch eine Anhäufung positiv geladener Aminosäuren wie Lysin und Arginin charakterisiert sind (Kalderon et al. 1984, Robbins et al. 1991). Diese Dominanz von NLS-Motiven, die eine Erkennungssequenz für den Import eines im Cytosol an den Ribosomen translatierten Proteins in den Zellkern darstellen (Moroianu 1997), ist innerhalb der HIPP-Proteinfamilie einzigartig und weist auf eine Kernlokalisierung von HIPP3 hin. Des Weiteren besitzt HIPP3 zwei HMA-Domänen (Hheavy Metal Associated Domain) (PFAM accession number: PF00403.6; pfam.sanger.ac.uk/). Die Kernsequenz der HMA-Domänen (M/L/IxCxxC [M: Methionin, L: Leucin, I: Isoleucin, C: Cystein, x: beliebige

Aminosäure]) beinhaltet zwei Cysteine, die an der Bindung von Schwermetallen beteiligt sind (Hung et al. 1998; Dykema et al. 1999). HIPP3 gehört zum Cluster I der HIPP-Proteinfamilie (Abbildung 3). Typisch für HIPPs aus Cluster I ist die HMA-Sequenz M/LHCxxC. Es fällt auch auf, dass die HIPP-Proteine aus Cluster I vielfach im Gegensatz zu den meisten anderen HIPP-Proteinen zwei HMA-Domänen besitzen. Das Histidin vor dem ersten Cystein könnte eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung der Metallbindung ausüben (Rubino und Franz 2012). Direkt hinter dem ersten Cystein befindet sich meist eine negativ geladene, direkt hinter dem zweiten Cystein eine hydrophobe Aminosäure. Dies trägt vermutlich ebenfalls zur Stabilisierung der Metallbindung bei (Rubino und Franz 2012). Bekannte Proteine mit HMA-Domäne sind Schwermetalltransportproteine, Detoxifikationsproteine und Metallchaperone.

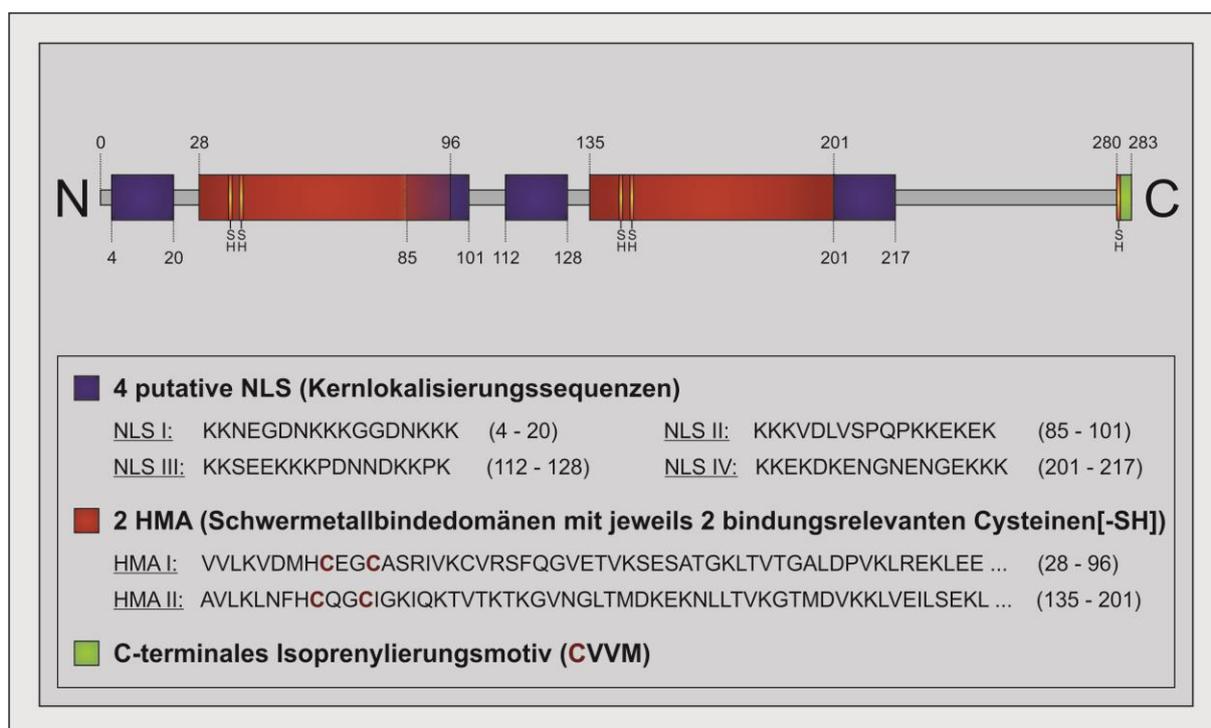


Abbildung 5: HIPP3 Proteinstruktur. Wie alle HIPP-Proteine besitzt HIPP3 ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (grün dargestellt), das an der viertletzten Position ein Cystein (-SH) aufweist. HIPP3 gehört zu den wenigen HIPPs, die durch zwei Schwermetallbindedomänen (HMA, rot dargestellt) mit jeweils zwei zentralen Cysteinen (-SH) gekennzeichnet sind. Bemerkenswert ist, dass HIPP3 im Gegensatz zu anderen HIPP-Proteinen gleich vier putative Kernlokalisierungssequenzen (NLS, blau dargestellt) hat.

Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich ein Isoprenylierungsmotiv: CaaX (C: Cystein, a: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure). Prenyltransferasen können dieses Motiv erkennen und entweder einen Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Rest an das Cystein des CaaX-Motivs über eine Thioetherbindung heften (Crowell 2000). Nach der Prenylierung wird der aaX-Rest durch eine Endopeptidase proteolytisch abgespalten und es erfolgt eine Methylierung der entstandenen terminalen Carboxylgruppe (-COOH) durch eine Prenyl-Cystein-Methyl-Transferase (PCM) (Rodríguez-Concepción et al. 1999). Es gibt

Hinweise, dass die letzte Aminosäure des CaaX-Motivs die Art der Isoprenylierung determiniert (Gerber et al. 2009). Das in HIPP3 vorliegende Methionin (M) deutet auf eine Farnesylierung hin. Durch die post-translationale Isoprenylierung wird dem Protein ein hydrophober Anker angehängt, der Interaktionen mit Membranen oder hydrophoben Proteinen ermöglichen kann. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Rausche 2012) konnte eine Isoprenylierung von HIPP3 mittels Coimmunopräzipitationsexperimenten bestätigt werden. Dabei konnte erstmalig die Isoprenylierung eines HIPP Proteins *in planta* durch die Bindung von HIPP3 aus *Arabidopsis thaliana* Überexpressionspflanzen an anti-Farnesylantikörper nachgewiesen werden.

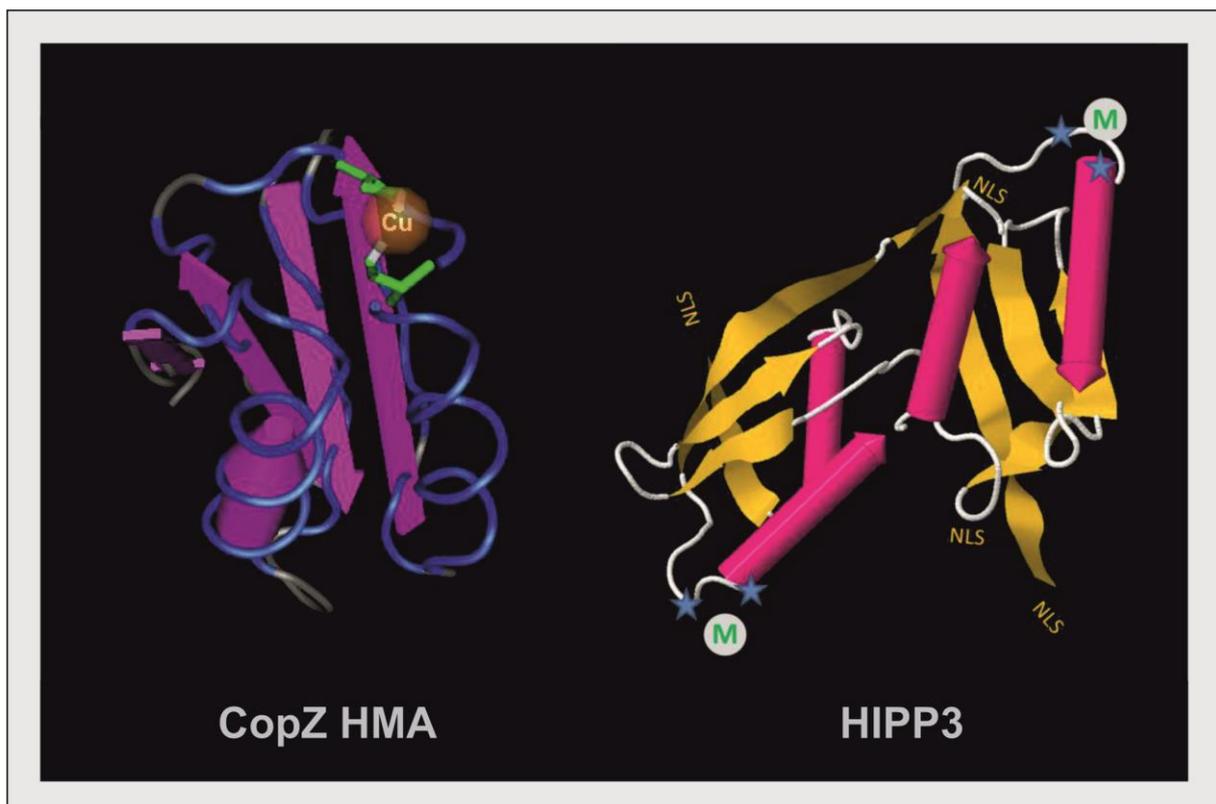


Abbildung 6: Proteinstrukturmodelle von CopZ mit der HMA-Domäne und dem gebundenen Kupfer (links) und von HIPP3 (rechts) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=2947> und <http://bar.utoronto.ca/eplant/>). Die Cysteine in den Schwermetallbindestellen von HIPP3 sind mit blauen Sternchen und das bindende Metall als ein weißer Kreis (mit grünem „M“) gekennzeichnet. Die Bereiche der Kernlokalisierungssequenzen (NLS) sind ebenfalls angegeben.

Die Abbildung 6 zeigt rechts dargestellt ein Strukturmodell von HIPP3, das basierend auf der Aminosäuresequenz unter Nutzung der ePlant Plattform (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>) erstellt wurde. Das Protein ist in zwei ähnlich strukturierten Bereichen aufgebaut, die jeweils aus drei β -Faltblattstrukturen und zwei gegenüber liegenden helikalen Bereichen bestehen. Links dargestellt ist die HMA-Domäne des CopZ-Proteins aus *B. subtilis* mit dem gebundenen Cu-Ion, die eine ähnliche Struktur aufweist (Marchler-Bauer et al. 2013). Die beiden HMA-Domänen von HIPP3 liegen nach diesem Modell an entgegengesetzten

Positionen des Proteins. Ebenfalls dargestellt sind die Positionen der vier nach außen liegenden NLS-Motive.

***HIPP3* kodiert für ein Protein mit interessanten Domänen**

HIPP3 weist zwei HMA-Domänen, die für eine Metallbindung sprechen, vier NLS-Motive, die auf eine Kernlokalisierung hinweisen, und ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv auf.

2. Subzelluläre Lokalisation von *HIPP3*

Wie im vorigen Kapitel erläutert, weist die Proteinstruktur von *HIPP3* neben der Schwermetallbindedomäne und dem Isoprenylierungsmotiv auch vier putative NLS-Sequenzen auf ('WoLF PSORT', www.wolfpsort.org/). Diese lysinreichen Sequenzbereiche weisen sehr stark auf eine Kernlokalisierung von *HIPP3* hin (siehe Abbildung 5).

Um die subzelluläre Lokalisation des Proteins zu überprüfen, wurde ein Fusionskonstrukt, bei dem *HIPP3* am N-terminalen Ende mit dem C-Terminus des grün fluoreszierenden Proteins GFP verbunden ist, mittels transienter biolistischer Transformation (*particle gun*) in Zwiebelepidermis-Zellen (*Allium cepa* L.) gebracht und dort heterolog exprimiert. Dazu wurde der ORF der *HIPP3* cDNA als *Bgl*I-*Bam*HI Fragment in den mit *Bgl*I geöffneten Vektor pKEx-GFP02-4 ligiert, bei dem die Expression des chimären Proteins unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors steht (Abbildung 7A). Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen. Die Verifizierung positiv transformierter Zellen erfolgte durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bgl*I und *Bam*HI. Der in Abbildung 7B abgebildete Restriktionsverdau eines positiven Klons (K) zeigt zwei Fragmente definierter Größe. Bei dem kleineren Fragment (717bp) handelt es sich um das smRS-GFP ('solubility modified, red shifted'-GFP, Davis und Vierstra, 1998) und das größere (4775bp) besteht aus dem übrigen GFP-Vektor mit dem ligierten *HIPP3*-ORF. Dieser positiv getestete Klon wurde für die biolistische Transformation der Zwiebelepidermen eingesetzt. Beim biolistischen Transformationsverfahren wurde die aus den transformierten *E. coli* Zellen isolierte DNA-Plasmid-Lösung wie in Material und Methoden beschrieben mit Wolframpartikeln versetzt und dann mithilfe einer Partikelkanone in die Zwiebelepidermiszellen geschossen.

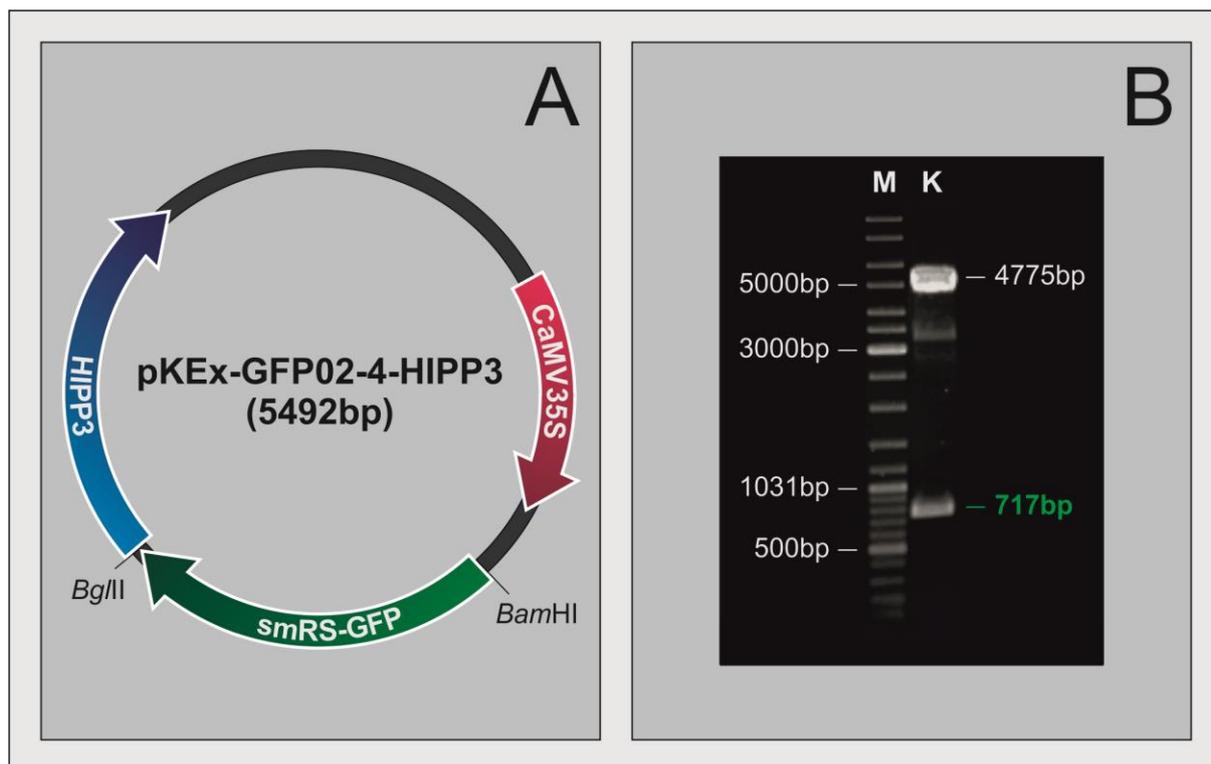


Abbildung 7: Konstrukt pKEx-GFP02-4-HIPP3. A: Schematische Darstellung des für die biolistische Transformation eingesetzten Konstruktes pKEx-GFP02-4-HIPP3. B: Qualitative Restriktionsanalyse mit *Bgl*II und *Bam*HI nach Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mit pKEx-GFP02-4-HIPP3; M=Marker. Bei der elektrophoretischen Auftrennung des rechts dargestellten Klons (K) sind zwei Fragmente der erwarteten Größe entstanden (smRS-GFP: 717bp und Restvektor inklusive *HIPP3*: 4775bp). Dieser 'Positiv-Klon' wurde für die weiteren Arbeiten verwendet.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte 14 Stunden nach der biolistischen Transformation. Als Kontrolle wurden auch Zwiebelzellen untersucht, die mit dem GFP-Vektor ohne *HIPP3* (pKEx-GFP01-1) transformiert wurden. Die Transformation mit GFP alleine zeigt das charakteristische Verteilungsmuster mit heller, grüner Fluoreszenz im Zellkern und im Cytoplasma (Abbildung 8A). Nach Transformation der Zwiebelzellen mit dem Konstrukt pKEx-GFP02-4-*HIPP3* kann die GFP-Fluoreszenz verstärkt im Zellkern beobachtet werden (Abbildung 8B). Interessant ist, dass das chimäre GFP-*HIPP3* Protein, im Gegensatz zum GFP alleine, auch deutlich im Bereich der Nukleoli akkumuliert. Diese Befunde weisen auf eine Kernlokalisierung von *HIPP3* hin und unterstützen die Annahme, dass *HIPP3* mit seinen vier NLS-Motiven tatsächlich im Kern lokalisiert ist. Da die grüne Fluoreszenz teilweise auch im Cytoplasma zu beobachten war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *HIPP3* eine duale Lokalisation im Kern und im Cytoplasma aufweist. Das Vorhandensein eines 'Kern-Export-Signals', welches laut *in silico* Analysen ('NetNES'; www.cbs.dtu.dk/services/NetNES) 11 Aminosäuren umfasst (Position 187 bis 197), deutet ebenfalls an, dass *HIPP3* aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert werden kann.

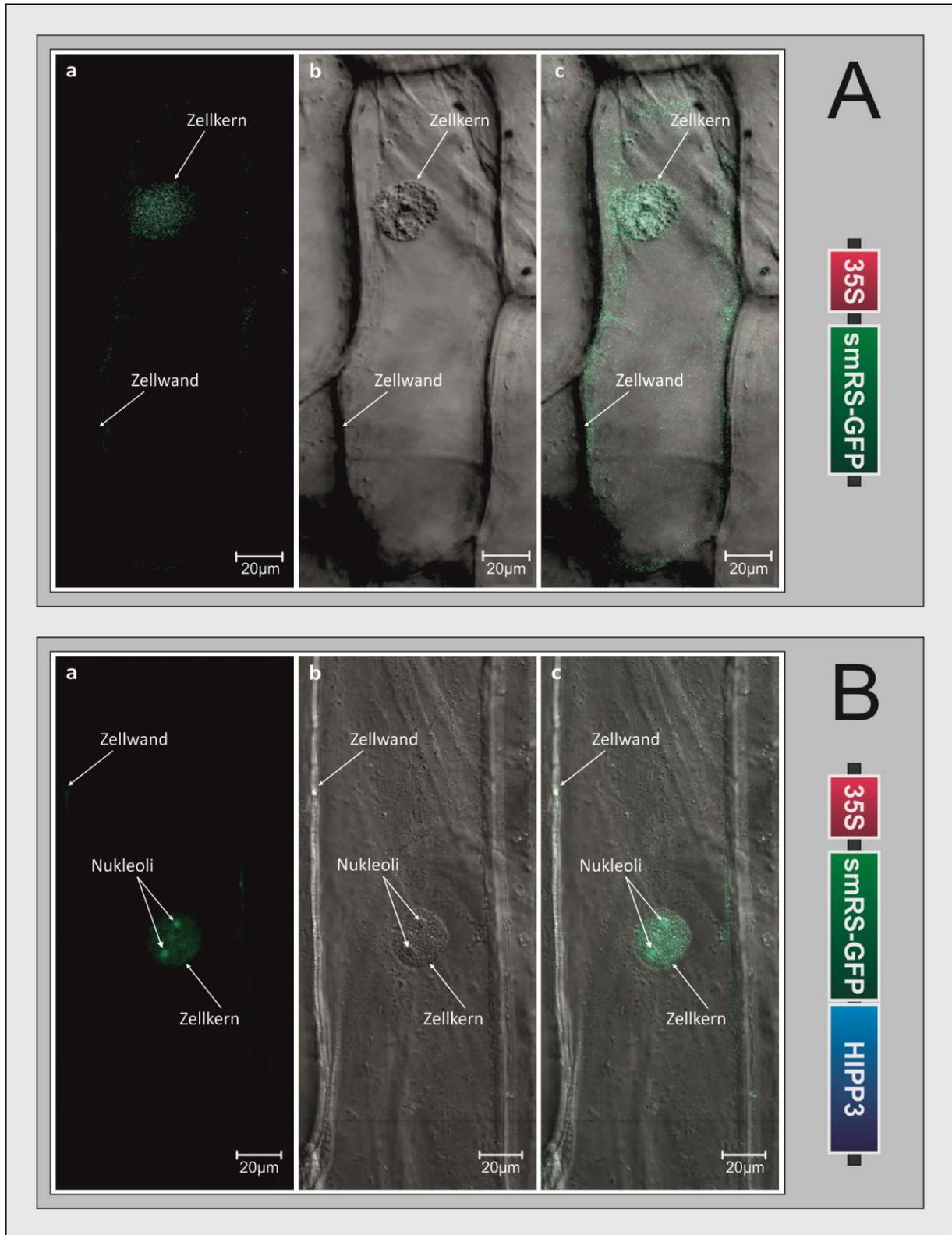


Abbildung 8: Vergleichende konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von transformierten Zwiebelepidermiszellen. A: Expression von smRS-GFP nach biolistischer Transformation mit dem Vektor pKEx-GFP01-1 (schematische Darstellung des Vektors auf der rechten Seite). B: Expression von Fusionsprotein smRS-GFP-HIPP3 nach biolistischer Transformation mit dem Vektor pKEx-GFP02-4-HIPP3 (schematische Darstellung des Vektors auf der rechten Seite). Abgebildet sind die Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz (a), des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC) (b), und die Überlagerung der GFP-Fluoreszenz und des differentiellen Interferenzkontrastes (c).

Subzelluläre Lokalisation von HIPP3

Die vier NLS-Motive in der Sequenz von HIPP3 weisen auf eine Kernlokalisation hin. Auch die mikroskopische Analyse der Lokalisation von chimären GFP-HIPP3 Proteinen in Zwiebelepidermiszellen untermauert diese Annahme. Allerdings kann auch eine duale Lokalisation von HIPP3 im Zellkern und im Cytoplasma nicht ausgeschlossen werden.

3. Potentielle Interaktionspartner von HIPP3

Um potentielle Interaktionspartner von HIPP3 zu identifizieren, wurde das GAL4-Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet (Warbrick 1997). Unter Nutzung des Hefe kompatiblen Expressionsvektors pGBKT7 wurde HIPP3 als Hybridprotein mit der GAL4 Bindedomäne (GAL4-BD) in den verwendeten Hefestämmen (AH109 oder Y187) exprimiert. Zum *Screening* wurden diese Hefezellen mit Hefezellen gepaart, die mit cDNA-Bibliotheken transformiert waren, bei denen cDNA-Sequenzen der *Arabidopsis*-Gene mit der Gensequenz für die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) fusioniert vorliegen. Dies war zum einen die im Hefestamm Y187 vorliegende CD4-30 Bibliothek (ABRC stock center, Ohio, USA) und zum anderen eine cDNA-Bibliothek, die freundlicherweise von der AG Prof. Reuter (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurde, und im Hefestamm AH109 vorliegt. Beide cDNA-Bibliotheken beruhen auf mRNAs, die aus *Arabidopsis thaliana* Blütenständen isoliert wurden.

Eine Interaktion der an die GAL4-AD fusionierten *Arabidopsis*-Proteine mit dem GAL4-BD-HIPP3 Köder führt in den entsprechenden Hefestämmen zur Expression der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*. Diese Induktion der Reportergene komplementiert die Auxotrophien der verwendeten Hefestämme und befähigt sie zur Bildung der Aminosäure Histidin und der organischen Base Adenin. Die Aktivierung des *lacZ* Reportergens ermöglicht durch die Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) den Nachweis der Protein-HIPP3 Wechselwirkung anhand einer Blaufärbung. Die Reporteragenaktivierung wird so zur Suche nach Vektoren der cDNA-Bibliotheken verwendet, welche für potentielle HIPP3-Proteinbindungspartner codieren. Dabei wachsen idealerweise nur solche Hefezellen und zeigen die X-Gal-Farbreaktion, welche sowohl das Köderplasmid als auch einen Vektor der cDNA-Bibliothek mit den jeweiligen Selektionsmarkergenen (*TRP1* und *LEU2*) enthalten und bei denen das an die GAL4 AD fusionierte Protein mit dem GAL4-BD-HIPP3 Köder

interagiert. Nach den entsprechenden Hefepaarungen wurden pro cDNA-Bibliothek jeweils mehr als 1 Million diploide Nachkommen analysiert. Die im ersten *Screening* identifizierten positiven Einzelkolonien sind zur Kontrolle nochmals auf Selektionsmedium ausplattiert worden. Auf diese Weise konnten aus den beiden cDNA-Bibliotheken nach den beiden Selektionsrunden 29 positive Hefestämme identifiziert werden. Die in diesen Hefezellen vorliegenden cDNA-Klone wurden isoliert, in *E. coli* transformiert und kloniert. Nach anschließender Sequenzierung konnten die Gene in Datenbankrecherchen (BLAST; Altschul et al. 1990) identifiziert werden. Einige cDNA-Klone lagen dabei in mehreren positiven Hefestämmen vor. Einen Überblick gibt die Tabelle 1.

ID-Nummer	Anzahl der Klone	AGI Code	DNA-Sequenzvergleich (%Identität) identische Basenpaare/ verglichene Basenpaare	kodiertes Protein
K1	17	At1g11790	762/764 (99%)	Arogenat-Dehydratase1 (ADT1)
K2	2	At3g27930	801/804 (99%)	unbekanntes Protein
K3	2	At5g41990	616/644 (95%)	Proteinkinase WNK8
K4	2	At1g54060	730/735 (99%)	Transkriptionsrepressor ASIL1
K5	1	At1g78780	798/803 (99%)	Pathogen-assoziiertes Protein
K6	3	At1g61170	528/549 (96%)	unbekanntes Protein
K7	2	At1g70800	453/458 (98%)	C2-Protein

Tabelle 1: Potentielle Interaktionspartner von HIPP3. Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner von HIPP3 wurde das GAL4-Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. In den Hefeklonen, die in zwei Screening-Runden auf Mangelmedium (-Leu, -Trp, -Ade, -His) gewachsen sind, wurde die Sequenz des entsprechenden cDNA-Klons analysiert und das Gen in Datenbankrecherchen (BLAST; Altschul et al. 1990) identifiziert. Einige Klone der verwendeten cDNA Bibliotheken sind mehrfach identifiziert worden.

Um die Interaktion der in den zwei Selektionsrunden identifizierten Proteine mit HIPP3 zu testen, wurden die Expressionsvektoren mit den entsprechenden an die Gensequenz der GAL4-AD fusionierten cDNA-Sequenzen wiederum in Hefezellen transformiert. Bei positiver Interaktion mit dem an die GAL4-BD fusionierten HIPP3 sollten die Hefezellen auf Selektivmedium ohne Adenin oder Histidin wachsen, bzw. eine Farbreaktion aufgrund der β -Galactosidase Aktivität zeigen. Außerdem wurde 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zugesetzt, das die Bildung von Histidin inhibiert und so den Selektionsdruck im Histidinmangelmedium

steigert (Joshi et al. 2007). Als Negativkontrollen wurden die Hefezellen mit untersucht, die auf den beiden Plasmiden nur die GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) oder die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) aufweisen. Da die GAL4-AD Vektoren das Selektionsmarkergen *LEU2* und die GAL4-BD Vektoren das Selektionsmarkergen *TRP1* tragen, ist eine Selektion der jeweiligen Hefestämme auf Leucin oder Tryptophan Mangelmedium möglich. Tragen die Hefen beide Vektoren, sollten diese Zellen auf -Leu/-Trp -Medium wachsen. Sowohl die Negativkontrollen als auch Stämme, in denen keine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen HIPP3 und den potentiellen Interaktoren stattfindet, sind jedoch unfähig auf -His oder -Ade Mangelmedien zu wachsen. Um eine direkte Interaktion von HIPP3 mit der GAL4-Aktivierungsdomäne und eine Autoaktivierung der Reportergene durch HIPP3 selbst auszuschließen, wurden zusätzlich Hefezellen untersucht, die neben dem GAL4BD-HIPP3 Köderprotein auch die GAL4-Aktivierungsdomäne exprimieren (siehe Abb. 9, AD HIPP3). Da diese Zellen nicht auf -Ade oder -His Mangelmedien wachsen, bzw. eine X-Gal-Farbreaktion zeigen, liegen für das GAL4BD-HIPP3 Köderprotein weder eine Autoaktivierung noch eine direkte Proteinbindung an die GAL4-Aktivierungsdomäne vor. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pGAL4 in Kombination mit dem Leervektor pGBKT7 benutzt (GAL4 BD). Der Vektor pGAL4 befähigt zur Expression des vollständigen GAL4-Transkriptionsfaktors und erlaubt so diesen Zellen das Wachstum auch auf -Ade und -His Mangelmedien sowie eine positive X-Gal-Farbreaktion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Zur Kontrolle, ob der potentielle HIPP3 Bindepartner nicht direkt mit der GAL4-BD oder den Promotoren der Reportergene interagiert, wurden die entsprechenden cDNA-Bibliotheksklone zusätzlich mit der GAL4-BD ohne fusioniertem HIPP3 getestet (siehe Abb. 9, K1 bis K7 mit BD).

Die Ergebnisse bestätigen die Interaktion von HIPP3 mit der Arogenat-Dehydratase1 (ADT1) (K1) und dem Transkriptionsrepressor ASIL1 (K4). Eine schwächere Reaktion im -Leu/-Trp/-Ade- Medium und eine schwache Farbreaktion sind auch bei der Proteinkinase WNK8 (K3) zu beobachten. Das vom cDNA-Klon K6 codierte Protein mit bisher unbekannter Funktion zeigt ebenfalls eine schwache Reporteraktivierung. Allerdings ist dieses Protein auch in Abwesenheit von HIPP3 in der Lage das *lacZ*-Reportergen zu aktivieren, was zur detektierten X-Gal-Farbreaktion im Stamm mit cDNA-Klon K6 und der GAL4-BD Negativkontrolle führt. Das C2-Protein (K7) dagegen zeigt bei allen verwendeten Selektionsmedien eine eindeutige Aktivierung aller getesteten Reportergene sowohl in den Hefezellen die das GAL4-BD-HIPP3 Köderprotein als auch die GAL4-BD Negativkontrolle exprimieren. Aufgrund dieser Reporteraktivierung in den Negativkontrollen können die von den cDNA-Klonen K6 und K7 codierten Proteine nicht eindeutig als positive Interaktionspartner von HIPP3 bezeichnet werden. Bei dem unbekanntem Protein K2 und dem Pathogen-assoziierten Protein K5 lassen sich in diesem Ansatz keine Interaktionen mit HIPP3 nachweisen.

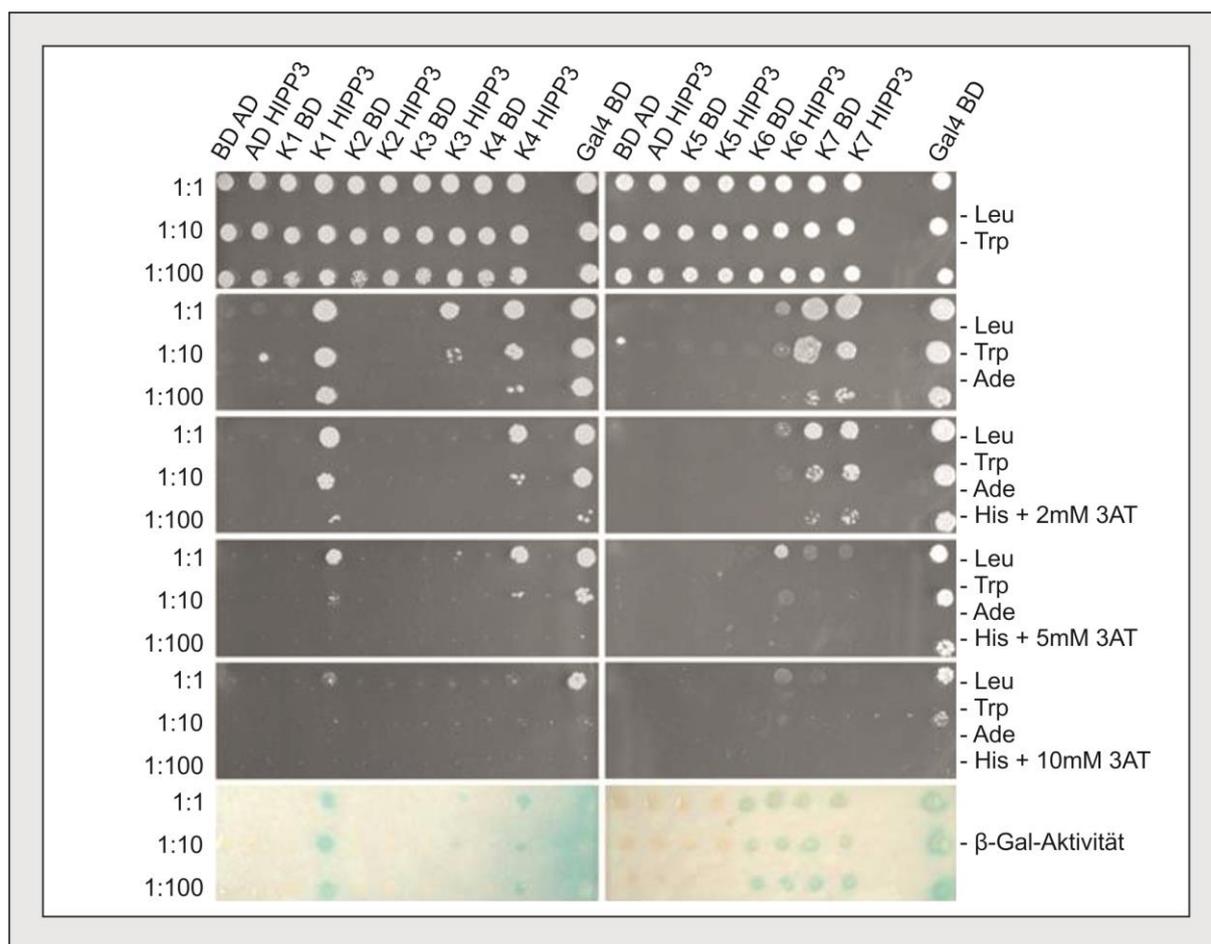


Abbildung 9: Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsstudien. Die Interaktion von HIPP3 mit 7 Proteinen, die im Hefe-Zwei-Hybrid *Screening* als potentielle Interaktionspartner von HIPP3 identifiziert wurden, ist anhand der Aktivierung der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* überprüft worden. Nur Hefezellen, die den Ködervektor mit dem Fusionsprotein GAL4-BD-HIPP3 und den Vektor der cDNA-Bibliothek mit dem „Beute“-Protein besitzen und bei denen HIPP3 mit dem „Beute“-Protein interagiert, wachsen auf den -His und -Ade Medien und zeigen die X-Gal-Farbreaktion. Um den Selektionsdruck im Histidin-Mangelmedium zu steigern, wurde 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) in zunehmender Konzentration zugesetzt.

Die hier dargestellten Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass HIPP3 mit der Arogenat-Dehydratase1 (At1g11790), der Proteinkinase WNK8 (At5g41990) und dem Transkriptionsrepressor ASIL1 (At1g54060) interagieren kann.

Diese Studien liefern erste Hinweise auf potentielle HIPP3 Proteinbindungspartner. Die entsprechenden Protein-HIPP3 Wechselwirkungen sollten mit weiteren molekularen Techniken wie z.B. Immunopräzipitation oder FRET *in vitro* aber vor allem auch *in planta* verifiziert werden. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System, bei dem die Proteine im heterologen System exprimiert, gefaltet und modifiziert werden, bietet nur begrenzte Möglichkeiten, interagierende Proteine zu identifizieren. Außerdem kann in den Hefezellen eine Interaktion vorgetäuscht werden, die aufgrund unterschiedlicher zellulärer Lokalisation, unterschiedlicher Gewebespezifität oder unterschiedlicher Expressionsmuster in den Pflanzen gar nicht stattfinden kann.

Die Arogenat-Dehydratase1 (At1g11790) kodiert für ein Plastiden-lokalisiertes Enzym, das in der Phenylalanin-Biosynthese involviert ist (Rippert et al. 2009). Die Proteinkinase WNK8 (with-no-lysine; At5g41990) ist im Kern lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Blütenbildung und bei verschiedenen Stressreaktionen (Wang et al. 2008, Tsuchiya und Eulgem 2010, Park et al. 2011, Zhang et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass sie mit EMBRYONIC FLOWER1 (EMF1) (Park et al. 2011) und mit dem an der Pathogenabwehr beteiligten Protein ENHANCED DOWNY MILDEW2 (EDM2) (Tsuchiya und Eulgem 2010) interagiert. ASIL1 (Arabidopsis 6b-interacting protein1 -like1) gehört zu der Trihelix Familie pflanzlicher Transkriptionsfaktoren und wurde als Regulator der Samenentwicklung beschrieben (Gao et al. 2009, Gao et al. 2011). Mutantanalysen zeigten einen Einfluss auf die Expression wichtiger Gene der Samenentwicklung, z.B. LEAFY COTYLEDON1 und 2 (Gao et al. 2009).

Interaktionspartner von HIPP3

Unter Nutzung des Hefe- Zwei- Hybrid- Systems konnten drei potentielle Interaktionspartner von HIPP3 identifiziert werden. Das sind die Arogenat-Dehydratase1 (At1g11790), die Proteinkinase WNK8 (At5g41990) und der Transkriptionsrepressor ASIL1 (At1g54060). Allerdings müssen diese Interaktionen noch mit anderen Techniken verifiziert werden.

4. Metallbindung von HIPP3

HIPP3 besitzt zwei Schwermetallbindedomänen (HMA), für die in anderen Proteinen eine Bindung von Metallen wie Kupfer, Zink oder Cadmium nachgewiesen werden konnte (Hung et al. 1998, Dykema et al. 1999). Einige der Proteine mit HMA-Domänen wurden funktionell als Metallchaperone charakterisiert (Lin et al. 1997, Himelblau et al. 1998, Puig et al. 2007).

cDNA HIPP3 (852bp)

```
atgggcgagaagaagaacgaaggagataacaagaagaaggaggagataacaagaagaagaacgaaacgct
tccatcaccgctgtttgaaggctgacatgcattgtgaaggttgtgcttctcgaatcgcaaatgtgttcgatcttccaaggtg
ttgagactgtgaaatcggagtcggctacagggaaacttacggtgaccggagcattagatccggtgaagtaagggaga
aactgaagagaagacaaagaagaagtcgatttggttctcctcaacccaaaaaggaaaaagagaaagagaaca
aaacaaaaacgatgaagacaaaaaaaatcagaggagaagaagaaccagacaacaatgacaaaaaaccaa
agagactccggaacaacggcgggtggaagctgaactccattgtcaaggttgtatcgggaaaatccaaaagactgtc
acaaaaaccaaaggtgtaatggttaacaatggacaaagagaagaattgctgacggtaaaaggaacaatggatgta
aaaagctcgttgagattttgagtgagaagctcaaacgtgcggtggagattgtgcccggaagaagagaaaagataaag
agaatggaacgaaaatggcgagaagaagaaggtggcggcggagacgggtggtgggaaagagaaaaccggtaa
caaagcggtggtgagggagtgaatatgatggagtacatggcggctcagccagcttacgggtatgggtattaccgggt
ggccttatggatatccgattcaggcccacgcgcccagattttagcgtatgagaatccgaatgctgtgtgttatgtga
```

Proteinsequenz HIPP3 (283aa)

```
mgekknegdnkkkggdnkkknetpsitvvlkvdmhcegcasrivkcvrsfqqvetvksesatgklvtgaldpvklrekl
eektkkkvdlvspqpkkekekenknkndedkkkseeekkpndkkpketpvtavlklnfhcggcgigkiqktvtktkg
vngltmdkeknlltvkgmtdvkkveilseklkraveivppkkekdkengekkkggggdgggkektgnkgggeg
vnmmeymaaqpaygyypggyypgypiqahapqifsdenpnacvmm
```

cDNA HIPP3-2 (852bp)

```
atgggcgagaagaagaacgaaggagataacaagaagaaggaggagataacaagaagaagaacgaaacgct
tccatcaccgctgtttgaaggctgacatgcatggtgaaggtggtgcttctcgaatcgcaaatgtgttcgatcttccaaggt
ggtgagactgtgaaatcggagtcggctacagggaaacttacggtgaccggagcattagatccggtgaagtaagggag
aactgaagagaagacaaagaagaagtcgatttggttctcctcaacccaaaaaggaaaaagagaaagagaaca
aaaacaaaaacgatgaagacaaaaaaaatcagaggagaagaagaaccagacaacaatgacaaaaaaccaa
aagagactccggaacaacggcgggtggaagctgaactccatggtcaaggtggtatcgggaaaatccaaaagactg
tcacaaaaaccaaaggtgtaatggttaacaatggacaaagagaagaattgctgacggtaaaaggaacaatggatgtt
aaaaagctcgttgagattttgagtgagaagctcaaacgtgcggtggagattgtgcccggaagaagagaaaagataaa
gagaatggaacgaaaatggcgagaagaagaaggtggcggcggagacgggtggtgggaaagagaaaaccggta
acaaagcggtggtgagggagtgaatatgatggagtacatggcggctcagccagcttacgggtatgggtattaccggg
tgggccttatggatatccgattcaggcccacgcgcccagattttagcgtatgagaatccgaatgctgtgtgttatgtga
```

Proteinsequenz HIPP3-2 (283aa)

```
mgekknegdnkkkggdnkkknetpsitvvlkvdmhgeggasrivkcvrsfqqvetvksesatgklvtgaldpvklrekl
eektkkkvdlvspqpkkekekenknkndedkkkseeekkpndkkpketpvtavlklnfhggggigkiqktvtktkg
vngltmdkeknlltvkgmtdvkkveilseklkraveivppkkekdkengekkkggggdgggkektgnkgggeg
vnmmeymaaqpaygyypggyypgypiqahapqifsdenpnacvmm
```

Abbildung 10: cDNA- und daraus abgeleitete Proteinsequenz der durch Überexpression generierten HIPP3-Proteine. Oben abgebildet sind die Sequenzen von HIPP3 mit intakten HMA-Motiven. Vergleichend dazu befinden sich im unteren Teil der Abbildung die Sequenzen des modifizierten Proteins (HIPP3-2 (C36G, C39G, C143G, C146G)). Die Modifizierungen sind rot hervorgehoben. Durch den Austausch der Cysteine gegen Glycine sind beide HMA-Motive von HIPP3-2 defekt.

Um eine mögliche Metallbindung von HIPP3 zu untersuchen, sollte HIPP3 in *E. coli* exprimiert, anschließend aufgereinigt und das gebundene Metall mittels ICP-MS analysiert werden. Als Kontrolle sollte zusätzlich ein modifiziertes Protein (HIPP3-2 (C36G, C39G, C143G, C146G)) erzeugt und analysiert werden, bei dem die vier für die Metallbindung essentiellen Cysteine der zwei HMA-Domänen durch Glycine ersetzt wurden (Abbildung 10). Die für diese beiden Proteine kodierenden cDNAs sind mit für *E. coli* optimierter *Codon-Usage in vitro* synthetisiert (ShineGene Molecular Biotech, Inc., Shanghai, China) und anschließend in den Vektor pCold™II ligiert worden. Durch die Verwendung des Expressionvektors pCold™II weisen die entsprechend exprimierten HIPP3 Proteine am N-terminalen Ende sechs zusätzliche Histidine auf (hexa-His-Tag), welche zur biochemischen Identifizierung und Aufreinigung genutzt werden können. Die Bildung der Proteine wurde im *E. coli* Stamm BL21/pG-Tf2 nach Transformation mit den entsprechenden Vektoren durch Zugabe von IPTG induziert.

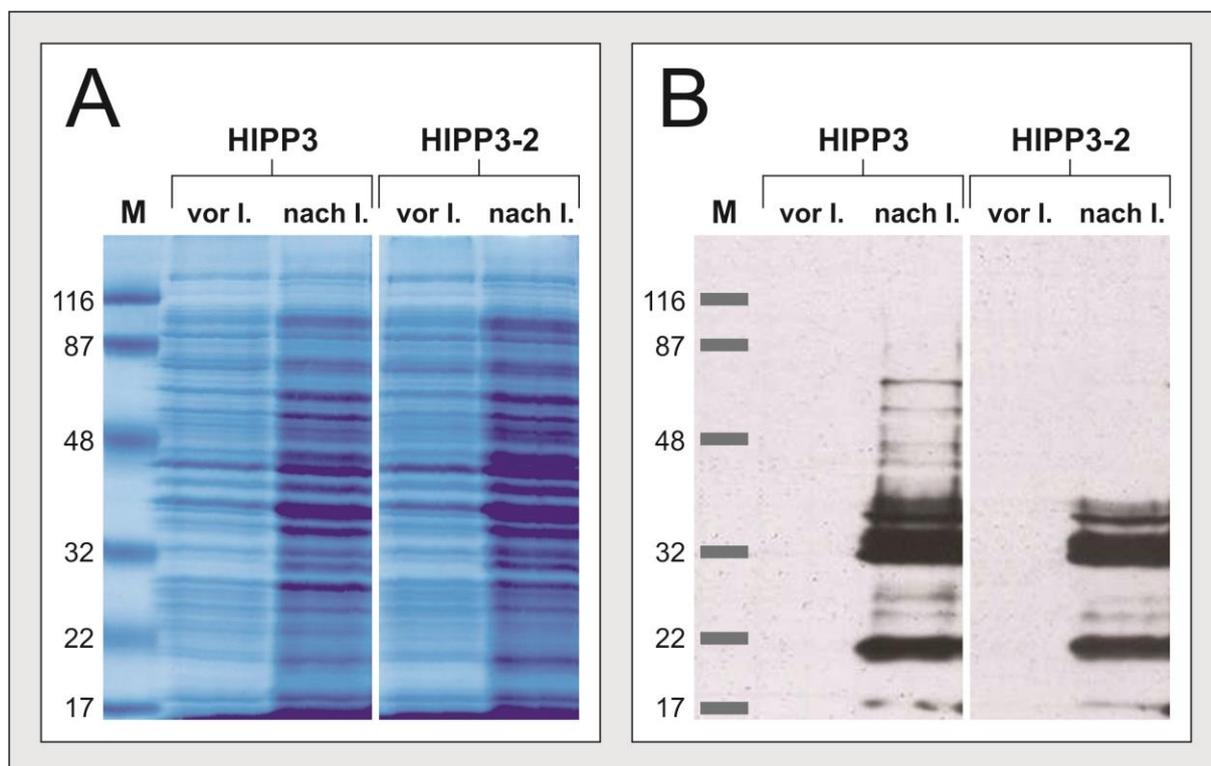


Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteinextrakte aus *E. coli* Zellen, die mit dem Vektor pCold™II-HIPP3 bzw. pCold™II-HIPP3-2 transformiert wurden, vor (vor I.) und nach (nach I.) der Induktion mit IPTG. A: Coomassie-Blue-Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden. B: Western-Blot-Analyse der wie in A dargestellt aufgetrennten Proteingestamtextrate mit dem α -His-HRP Antikörper, der das N-terminale hexa-His-Tag der überexprimierten Proteine erkennt. M= Marker (Größenangabe in kDa).

Die Abbildung 11A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteinextrakte der transformierten *E. coli* Zellen. Unter Verwendung eines Antikörpers (α -His-HRP), der an das hexa-His-Tag spezifisch bindet, konnten im Western-Blot-Verfahren mit einer

immunologischen Detektion vier deutliche Banden bei 40, 36, 32 und 19 kDa identifiziert werden (Abbildung 11B). Die theoretischen Größen von HIPP3 und HIPP3-2 betragen 32,4 und 32,0 kDa, jeweils inklusive dem hexa-His-Tag.

Um für die ICP-MS-Analyse ausreichende Mengen des aufgereinigten HIPP3 Proteins zu erhalten, wurden die mit dem His-Tag markierten Proteine aus dem Gesamtproteinextrakt der transformierten *E. coli* Zellen über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) isoliert. Abbildung 12 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der von der Ni-NTA-Säule eluierten Proteine.

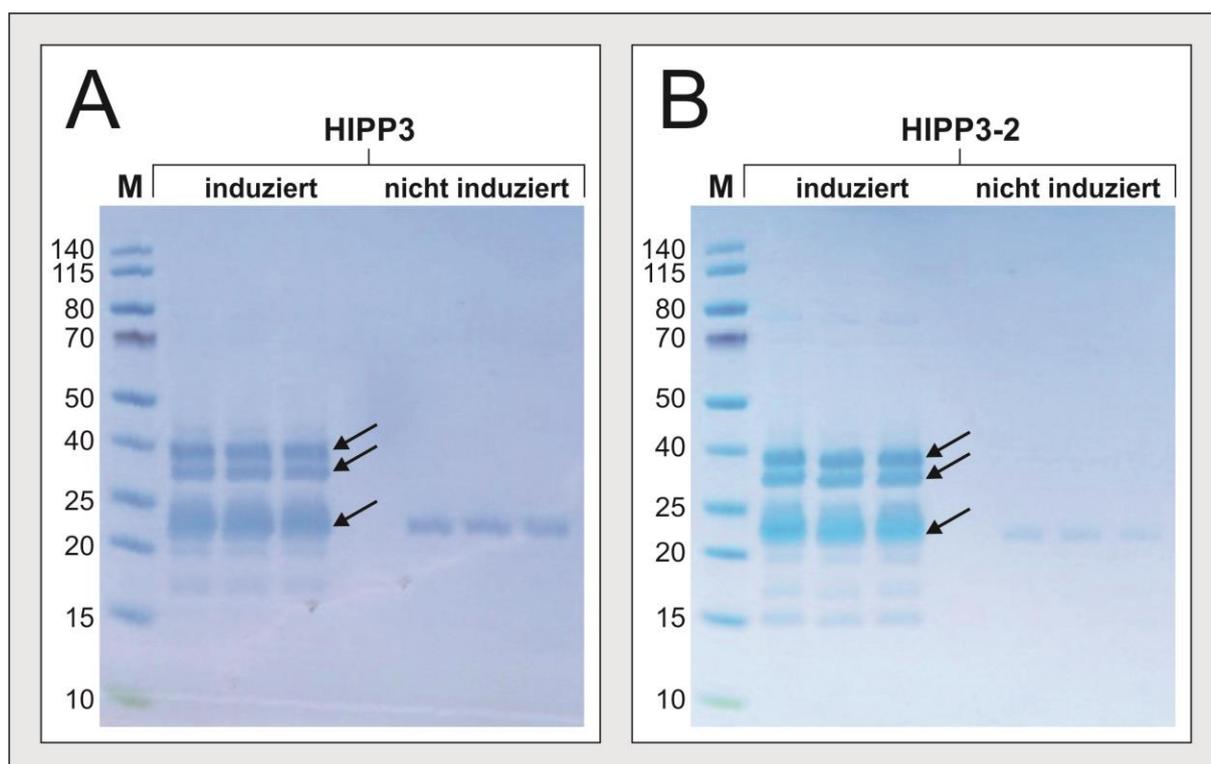


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der mittels IMAC isolierten Proteine aus transformierten *E. coli* Zellen, die entweder mit IPTG induziert wurden, oder nicht induziert wurden. A: Auftrennung der Proteine aus *E. coli*-Zellen, die mit dem Vektor pCold™II-HIPP3 transformiert wurden. B: Auftrennung der Proteine aus *E. coli*-Zellen, die mit dem Vektor pCold™II-HIPP3-2 transformiert wurden. Die Proteinisolierung erfolgte über immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden wurden durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. M = Marker (Größenangabe in kDa).

Nach der Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels sind drei dominante Proteinbanden zu erkennen. Die beiden oberen Banden mit Molekulargewichten von etwa 34 und 30 kDa liegen nur nach Induktion der Überexpression mittels IPTG vor. Dagegen ist die untere Bande bei 22 kDa auch in den nicht induzierten Proben vorhanden. Diese Beobachtung konnte sowohl in der Fraktion von HIPP3 (Abbildung 12A) als auch in der des modifizierten HIPP3-2 (Abbildung 12B) gemacht werden.

Die Frage, warum im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 32,4kDa für HIPP3 nach Induktion der Überexpression von HIPP3 und HIPP3-2 zwei Proteine identifiziert wurden, kann in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es ist denkbar, dass es sich entweder um nicht vollständig translatierte oder in *E. coli* nach der Translation modifizierte Formen des HIPP3 bzw. HIPP3-2 Proteins handelt. Da das pflanzliche HIPP3 Protein für die beschriebenen Metallbindestudien heterolog im prokaryotischen System exprimiert und gefaltet wurde, birgt dies auch die Gefahr in sich, dass die produzierten Proteine teilweise falsch gefaltet und weniger stabil sind. Die drei Proteinbanden treten unabhängig vom Vorhandensein der vier für die Schwermetallbindung wichtigen Cysteinreste (C36, C39, C143 und C146) sowohl bei HIPP3 als auch bei HIPP3-2 in gleichem Umfang auf.

Um eine mögliche Bindung von Schwermetallen an HIPP3 und HIPP3-2 zu untersuchen, wurden die Proteine aus den entsprechend transformierten *E. coli*-Zellen mit und ohne IPTG-Induktion extrahiert, über IMAC-Säulen gereinigt und anschließend mittels ICP-MS (*i*nductively *c*oupled *p*lasma *m*ass *s*pectrometry) analysiert.

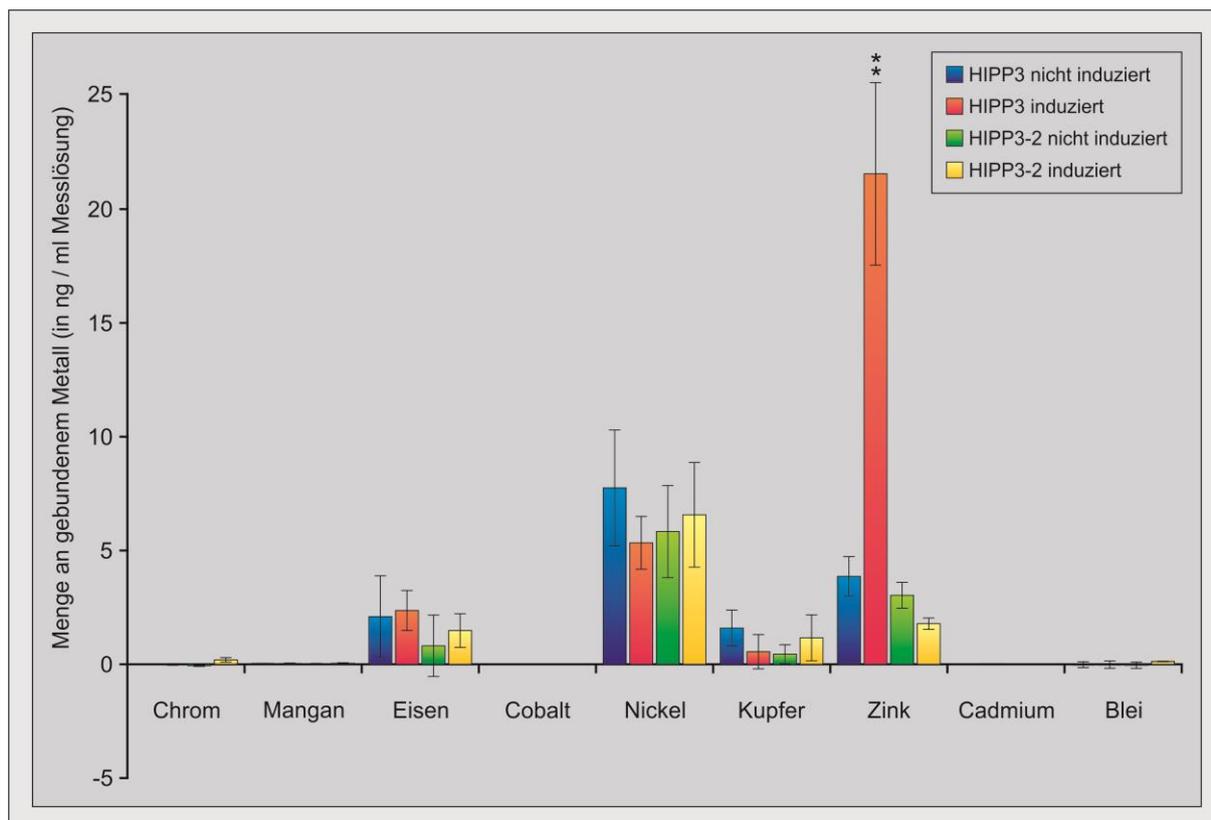


Abbildung 13: ICP-MS-Analyse der über IMAC gereinigten Proteine aus transgenen *E. coli* Zellen, bei denen die Überexpression von HIPP3 und dem in den HMA-Domänen modifizierten HIPP3-2 entweder mit IPTG induziert, oder nicht induziert wurde. Dargestellt sind die jeweiligen Mengen an gebundenem Metall, die in der ICP-MS unter Verwendung von Multi-Element-Kalibrierstandards ermittelt wurden (n=3). Sowohl von der HIPP3- als auch von der HIPP3-2- Probe sind pro Messung 35µg Protein analysiert worden. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Proben an (students T-test: $p < 0,005$ (**)).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Während die Mengen aller untersuchten Schwermetalle niedrig sind und sich in allen untersuchten Proben nicht signifikant unterscheiden, ist der Wert für Zink in der Probe aus den Zellen, die das intakte HIPP3 gebildet haben, signifikant erhöht gegenüber den Proben aus Zellen, in denen die Überexpression nicht induziert wurde, aber auch gegenüber den Proben aus Zellen, die das in der Metallbindedomäne modifizierte HIPP3-2 (C36G, C39G, C143G, C146G) gebildet haben. Unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten Proteinmenge (ca.35µg) und der molaren Massen von Zink (65,4g/mol) und HIPP3, inklusive hexa-His-Tag (32416g/mol), wurde berechnet, dass in der untersuchten HIPP3-Probe ungefähr 0,6 Zink-Atome an einem Molekül HIPP3 gebunden sind (0,59mol Zn pro mol HIPP3). Allerdings könnte der tatsächliche Wert auch deutlich höher liegen, da ein Teil des Proteins entweder durch Abbau oder während der Aufreinigung Zink verloren haben könnte. Dass pro HMA-Domäne jeweils ein Zink-Atom gebunden wird, ist somit eine durchaus realistische Annahme. Für das modifizierte HIPP3-2, dessen Schwermetallbindestellen durch den Austausch der Cysteine gegen Glycine defekt sind, wurden nur 0,05mol Zn pro mol HIPP3-2 berechnet. Dieses Ergebnis belegt, dass die Cysteine der HMA-Domänen für die Bindung des Zinks essentiell sind.

HIPP3 bindet Zink

HIPP3 mit N-terminalem hexa-His-Tag wurde in *E. coli* überexprimiert. Nach Ankonzentration der Proteine mit His-Tag über Metall-Affinitätschromatographie konnte mittels ICP-MS eine Bindung von Zink nachgewiesen werden. In den Proben aus Zellen, in denen die HIPP3-Bildung nicht induziert wurde, wird kein Zink gebunden. Ebenfalls unterbleibt die Zink-Bindung, wenn die für die Schwermetallbindung essentiellen Cysteine der HMA-Domänen durch Glycine ersetzt werden.

5. Expressionsmuster von *HIPP3*

Bereits bekannte Daten zur Expression von verschiedenen HIPP-Proteinen belegen unterschiedliche, entwicklungs- und umweltabhängige Expressionsmuster (Barth et al. 2009). Um zu analysieren, ob die Expression von *HIPP3* in Abhängigkeit von abiotischen oder biotischen Stressoren reguliert ist, wurden *Arabidopsis* Pflanzen unter verschiedenen

Bedingungen kultiviert und die relativen Transkriptgehalte im Vergleich zu Kontrollbedingungen mittels quantitativer *realtime*-PCR analysiert.

5.1 Abiotischer Stress: Trockenstress

Die Abbildung 14 belegt, dass der Transkriptgehalt von *HIPP3* durch Trockenstress herunter reguliert wird. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter standardisierten Bedingungen (16h Licht bei 23°C/ 8h Dunkelheit bei 18°C, 60% Luftfeuchtigkeit und 100 μ Em⁻²s⁻¹ Lichtintensität) auf Erde kultiviert. Ab dem 30. Tag nach Aussaat wurde ein Teil der Pflanzen nicht mehr gegossen. 15 Tage später war der relative Wassergehalt der Blätter dieser Pflanzen um etwa 18% gefallen. Ab diesem Zeitpunkt begann auch die Photosystem II-Effizienz, die zur physiologischen Charakterisierung von Stressreaktionen in Pflanzen dient, abzusinken und erreichte bereits 18 Tage nach Beginn der Trockenstressbehandlung nur noch etwa 30% der normal bewässerten Kontrollpflanzen (Daten nicht gezeigt).

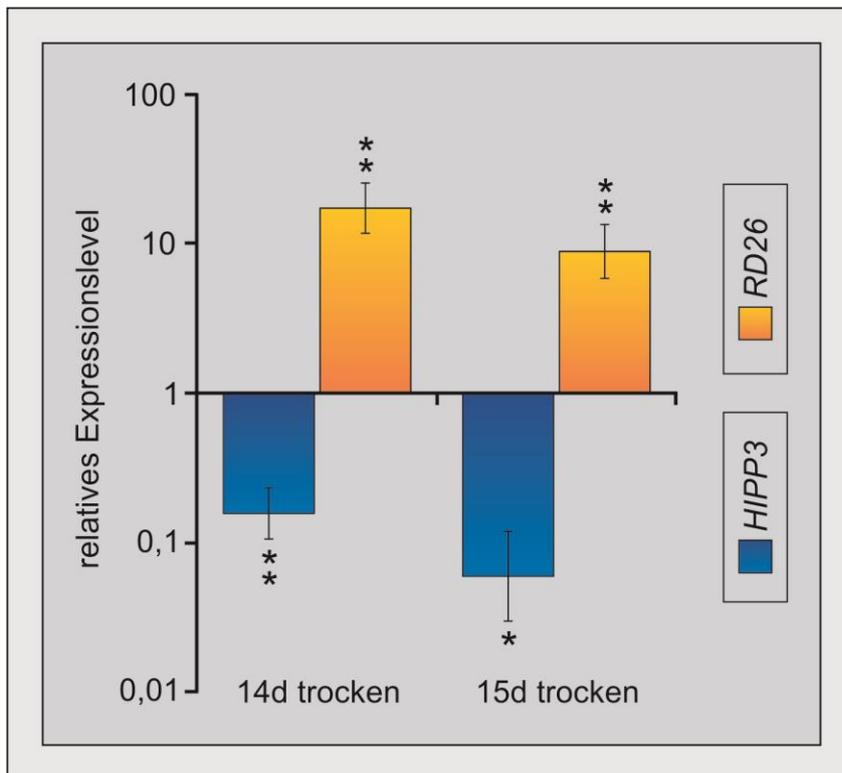


Abbildung 14: Unter Trockenstress wird der *HIPP3* Transkriptgehalt herunter reguliert. Mittels quantitativer *realtime*-PCR wurden die Transkriptgehalte von trocken-gestressten Pflanzen und gleich alten Kontrollpflanzen (normal weiter bewässert) bestimmt. Dargestellt ist die Veränderung in den trocken-gestressten Pflanzen relativ zu den Kontrollpflanzen, deren Expressionslevel gleich 1 gesetzt wurde (Verlauf der X-Achse). Für das Trockenstress-Marker-Gen *RD26* (*At4g27410*) konnte eine deutliche Zunahme im Transkriptgehalt ermittelt werden. Die Analyse der Daten erfolgte

in Bezug auf das Referenz-Gen *PP2AA3* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl *et al.* 2002); n=3; p \leq 0,05 (*), p \leq 0,01 (**).

Der Transkriptgehalt von *HIPP3* wurde 14 und 15 Tage nach Unterlassung der normalen Bewässerung bestimmt. Unter Trockenstressbedingungen ist in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* ein deutliches Absinken des *HIPP3*-Transkriptlevels zu beobachten. Dagegen wird ein typisches Markergen für Trockenstress, *RD26* (*RESPONSIVE TO DESICCATION 26*, *At4g27410*), in den untersuchten Blättern deutlich induziert (Abbildung 14). Es kodiert für einen an der Trockenstressantwort beteiligten NAC-Transkriptionsfaktor (Tran *et al.* 2004).

5.2 ABA-Behandlung

Um zu überprüfen, ob die Reprimierung von *HIPP3* unter Trockenstressbedingungen von ABA abhängig ist, wurden die Pflanzen in Hydrokultur mit 50µM ABA behandelt. Schon nach 8 Stunden war der Transkriptgehalt von *HIPP3* in diesen Pflanzen im Bezug zu den unbehandelten Kontrollen deutlich verringert. Innerhalb von 48 Stunden ist der Transkriptgehalt von *HIPP3* auf etwa 1/10 der Kontrolle herabgesunken (Abbildung 15). Ebenfalls dargestellt ist die Induktion des ABA regulierten Kontroll- Gens *ABF3* (*ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3*, At4g34000), mitunter auch als *DPBF5* bekannt (Sirichandra et al. 2010). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Phytohormon Abscisinsäure eine Reprimierung der Expression von *HIPP3* verursacht.

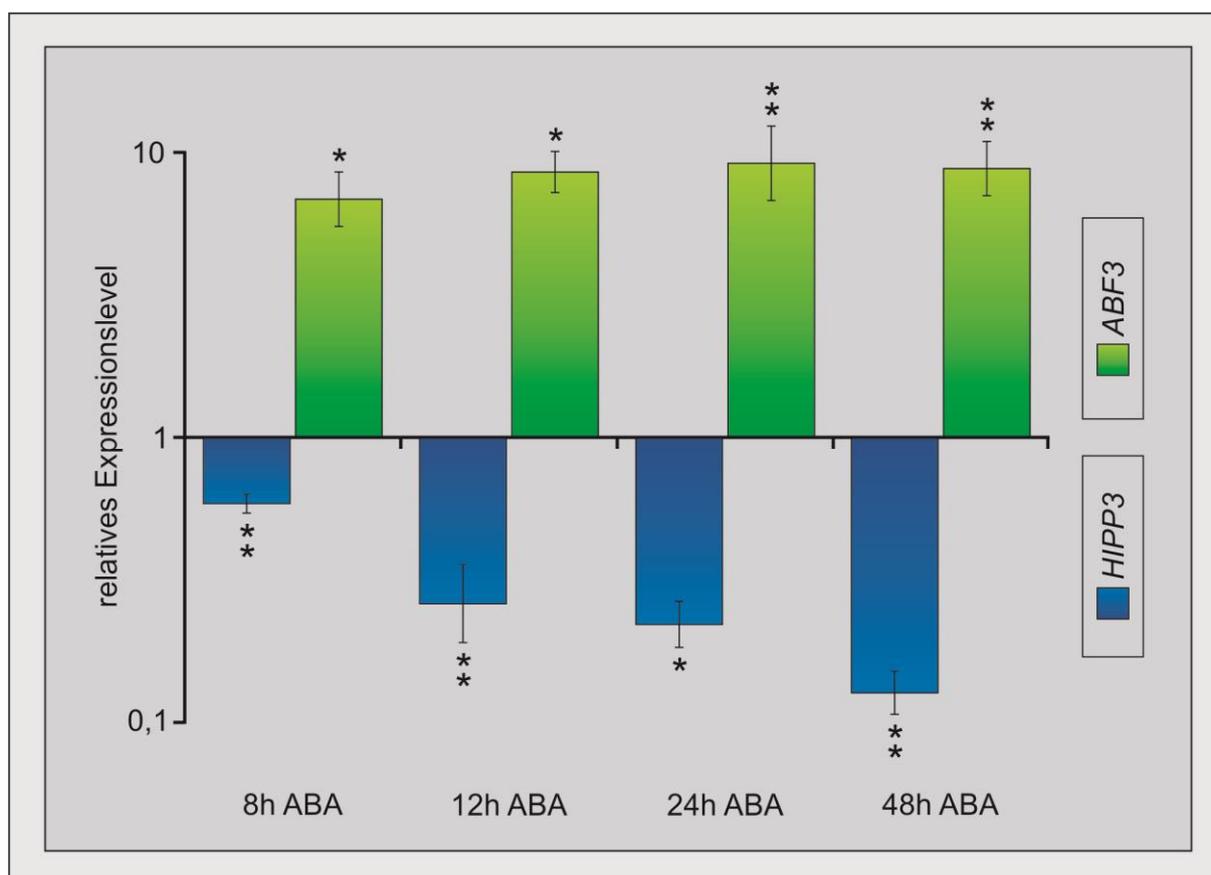


Abbildung 15: Absinken der *HIPP3*-Transkriptlevel nach ABA-Behandlung. Die Pflanzen wurden in Hydrokultur mit 50µM ABA behandelt und die Verringerung im Transkriptgehalt von *HIPP3* mittels quantitativer *realtime*-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Veränderung nach ABA-Zugabe relativ zu den nur mit dem zur ABA-Applikation verwendeten Lösungsmittel (0,05% Ethanol) behandelten Kontrollpflanzen, deren Expressionslevel gleich 1 gesetzt wurde (Verlauf der X-Achse). Für das ABA-induzierte Markergen *ABF3* (At4g34000) konnte eine Zunahme im Transkriptgehalt nachgewiesen werden. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenzgen *18SrRNA* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl et al. 2002); n=3; p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**).

5.3 Biotischer Stress

Neben abiotischen Umweltfaktoren beeinflussen auch Wechselwirkungen mit anderen Lebewesen ganz erheblich die pflanzliche Entwicklung und Fitness. In diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit, den Angriff eines Pathogens abzuwehren, eine wichtige Voraussetzung im Überlebenskampf der Pflanzen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass ein HIPP Protein (OsHIPP05, Fukuoka et al. 2009, Nakao et al. 2011) in biotische Stressantworten involviert ist. Deswegen sollte untersucht werden, ob *HIPP3* auch in Reaktion auf biotischen Stress reguliert wird. Dazu wurden Blätter von *Arabidopsis*-Pflanzen entweder nur mit 10mM MgCl₂-Lösung, mit dem virulenten Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000) oder mit dem avirulenten Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000 + *AvrRpm1*) mittels einer 1ml Einwegspritze ohne Kanüle inokuliert. Das vom avirulenten Bakterienstamm (*Pst* DC3000 + *AvrRpm1*) in die Pflanzen eingebrachte Avirulenzprotein *AvrRpm1* wird von den Pflanzen erkannt und löst eine starke Abwehrreaktion (ETI; *effector triggered immunity*) aus (Chisholm et al. 2006, Dodds und Rathjen 2010). Die Expression von *HIPP3* wurde innerhalb von 24 Stunden nach Inokulation (*hpi*, *hours post-infection*) mittels *realtime*-PCR quantifiziert, wobei die Transkriptgehalte von *HIPP3* in den behandelten Pflanzen (applizierte Bakterien in 10mM MgCl₂ gelöst) relativ zu den *HIPP3*-Transkriptmengen der Kontrollpflanzen (Inokulation nur mit 10mM MgCl₂-Lösung) berechnet wurden. Die Abbildung 16A zeigt die langsame Induktion von *HIPP3* als Antwort auf die Inokulation mit dem virulenten Stamm *Pst* DC3000. Dagegen bewirkt die Inokulation mit dem avirulenten Stamm eine rasche Induktion von *HIPP3* bereits 3 Stunden nach Inokulation (Abbildung 16 B). Außerdem wurden auch Experimente durchgeführt, bei denen *Arabidopsis*-Blätter mit dem Stamm *Pst* DC3000 *hrpA*⁻ inokuliert wurden. Dieser Stamm, der kein Typ-III-Sekretionssystem ausbilden kann und somit keine bakteriellen Effektorproteine in die Pflanzenzelle bringt, löst nur eine basale PTI (PAMP [Pathogen Associated Molecular Pattern] *triggered immunity*) aus. Unter diesen Bedingungen wird *HIPP3* nicht induziert. In der Abbildung 16A wurde für diesen Stamm deshalb nur das relative Expressionslevel bei 24hpi gezeigt.

Neben *HIPP3* wurden in den beschriebenen Versuchsansätzen auch bekannte Markergene der Pathogenantwort von *Arabidopsis thaliana* untersucht (Abbildung 17). *MMP2* (Matrix-Metallo Proteinase 2; At1g70170) und *MLP* (Mitochondrial Localised Protein; At1g13340) sind in Publikationen als Gene beschrieben, die in der pflanzlichen Pathogenabwehr induziert werden (Widjaja et al. 2010; de Torres et al. 2003). *FRK1* (FLG22-induced Receptor-like Kinase 1; At2g19190) wird spezifisch durch die Perzeption des Epitopes FLG22 aus dem Flagellin des bakteriellen Flagellums induziert (Asai et al. 2002). Bei *PAD3* (Phytoalexin Deficient 3; At3g26830) handelt es sich um ein weiteres durch PAMPs induzierbares Gen. Es wird jedoch auch bei Infektion mit dem avirulenten Stamm *Pst*

DC3000 + *AvrRpm1* vermehrt exprimiert, wobei die Stärke der Induktion durch *AvrRpm1* die durch reine PAMPs übersteigt (Qiu et al. 2008).

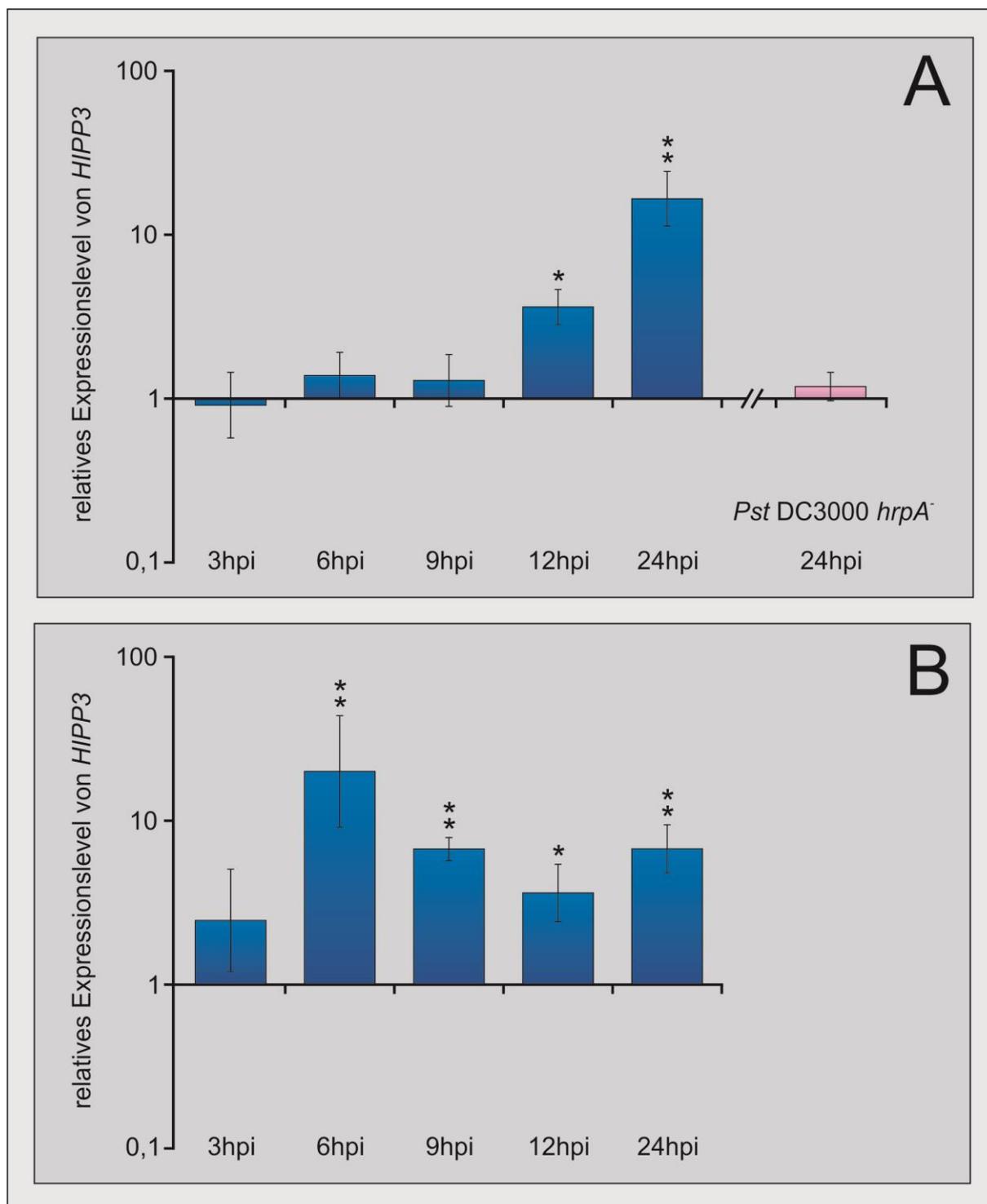


Abbildung 16: Expression von HIPP3 nach Inokulation mit *Pst* DC3000 (A) und *Pst* DC3000 + *AvrRpm1* (B). Gezeigt sind die relativen Transkriptlevel 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach Inokulation (hpi, *hours past infiltration*). Die Werte wurden auf mit 10mM MgCl₂ behandelte Kontrollpflanzen zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen, deren relativer Transkriptgehalt gleich 1 gesetzt wurde (Verlauf der X-Achse). Ebenfalls abgebildet ist das relative HIPP3 Transkriptlevel 24 Stunden nach Inokulation mit dem Stamm *Pst* DC3000 *hrpA*⁻ (A, ganz rechts, rosa Balken). Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenzgen *PP2AA3* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl et al. 2002); n=4; p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**).

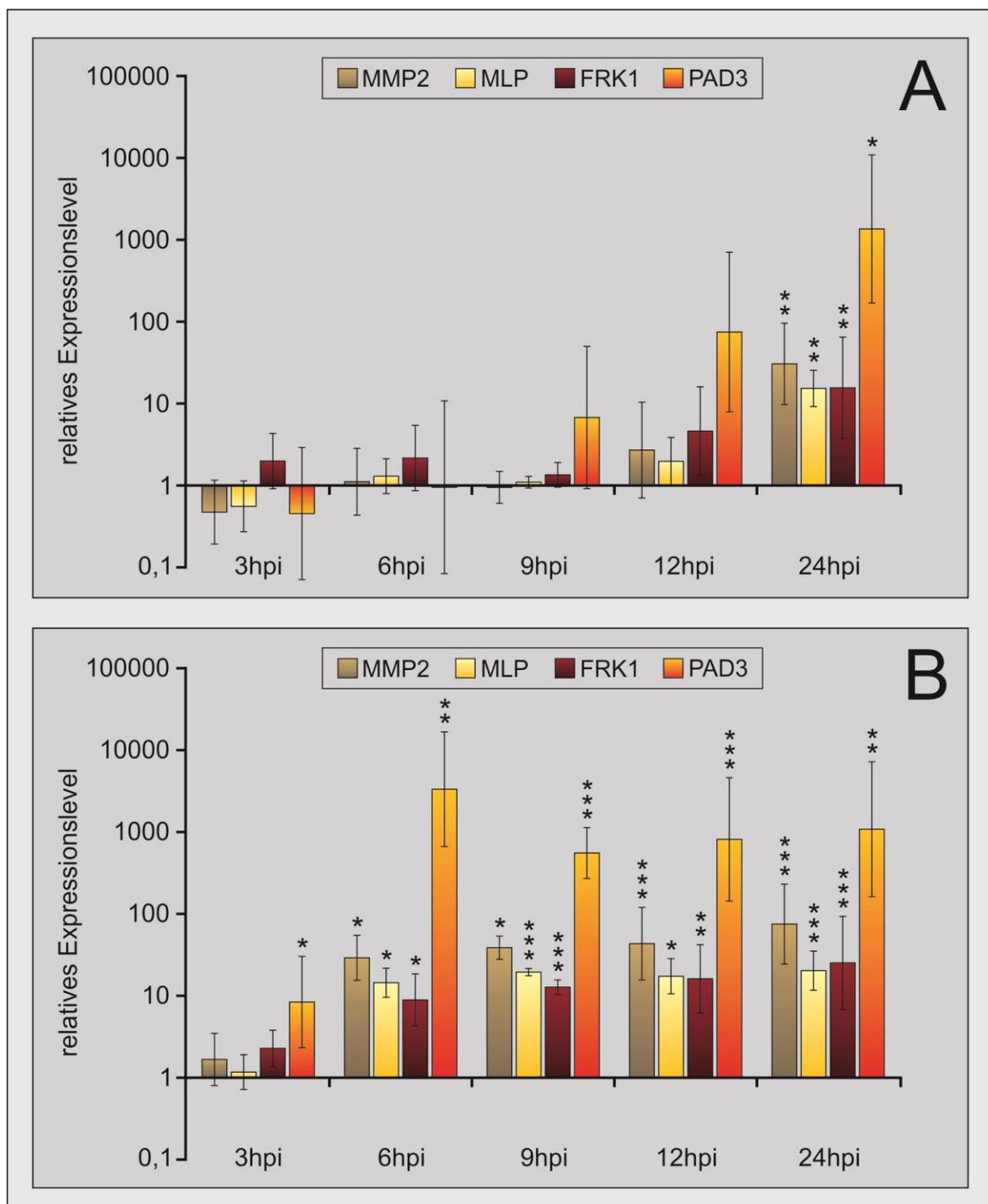


Abbildung 17: Expression von *MMP2*, *MLP*, *FRK1* und *PAD3* nach Inokulation mit *Pst* DC3000 (A) und *Pst* DC3000 + *AvrRpm1* (B). Gezeigt sind die relativen Transkriptlevel 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach Inokulation (hpi, *hours past infiltration*). Die Werte wurden auf mit 10mM MgCl₂ behandelte Kontrollpflanzen zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen, deren relativer Transkriptgehalt gleich 1 gesetzt wurde (Verlauf der X-Achse). Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenzgen *PP2AA3* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl et al. 2002); n=4; p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**), p ≤ 0,001 (***).

PAD3 kodiert für ein Enzym der Biosynthese von Camalexin, einer antimikrobiell wirksamen Substanz aus der Gruppe der Phytoalexine. Diese vier Markergene werden durch *Pst*

DC3000 mit einer ähnlichen Kinetik wie *HIPP3* induziert. Die Inokulation mit dem avirulenten Stamm *Pst* DC3000 + *AvrRpm1* führt wie bei *HIPP3* zu einer sehr schnellen Induktion. Dies belegt, dass die Inokulation mit den Bakterienstämmen die erwarteten Abwehrreaktionen ausgelöst hat, wobei *HIPP3* wie die ebenfalls untersuchten Markergene der Pathogenantwort ein typisches Induktionsmuster zeigt und ebenfalls bei der durch den avirulenten Stamm ausgelösten ETI deutlich schneller induziert wird.

5.4 Informationen zur Expression von *HIPP3* aus der Arabidopsis-eFP-Browser Datenbank

Die Arabidopsis-eFP-Browser Datenbank (Winter et al. 2007) wurde genutzt, um in Ergänzung der durchgeführten Expressionsstudien nach weiteren *HIPP3*-Expressionsdaten zu suchen. Abbildung 18 zeigt das aus der Datenbank generierte relative Expressionsmuster von *HIPP3* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen von *Arabidopsis thaliana*.

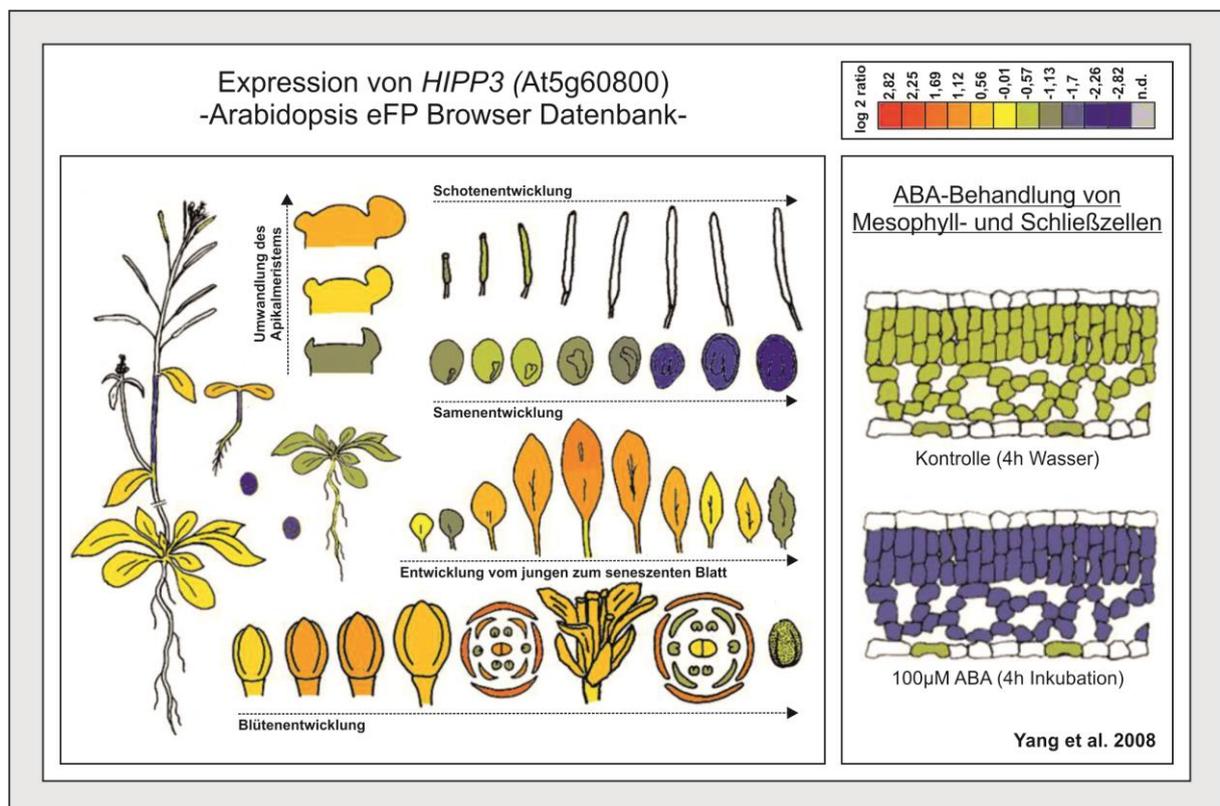


Abbildung 18: Expressionsmuster von *HIPP3* in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen von *Arabidopsis thaliana*. Die Informationen stammen aus der 'eFP-Browser Datenbank' (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Links dargestellt sind die relativen Transkriptgehalte von *HIPP3* in verschiedenen Entwicklungsstadien des Apikalmeristems, der Blätter, Blüten, Schoten und der Samen. Auf der rechten Seite ist die Veränderung des *HIPP3* Transkriptlevels in Blattzellen nach der Behandlung mit 100µM ABA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen abgebildet. Die Farbgebungen spiegeln das Niveau des *HIPP3*-Transkriptgehaltes wider (log₂-Werte, siehe Legende).

Diese publizierten Daten zeigen für *HIPP3* eine Induktion bei der Umwandlung des Apikalmeristems im Spross zum blütenbildenden Meristem, bei der Entwicklung zum reifen

Blatt und bei der Blütenbildung. Dabei fällt auf, dass in der Blüte hohe Transkriptlevel in den Kelchblättern vorliegen, während insbesondere die Staubblätter niedrigere *HIPP3* Transkriptlevel aufweisen. Außerdem ist der Transkriptgehalt von *HIPP3* in den Samen, und da besonders in den späteren Stadien, wenn der Wassergehalt in den Samen absinkt, sehr niedrig. Rechts dargestellt sind die vom eFP-Browser ermittelten Ergebnisse für die relativen Transkriptgehalte von *HIPP3* in Blattzellen. Es wird deutlich, dass der Gehalt an *HIPP3* Transkripten nach der Behandlung mit Abscisinsäure in den Mesophyllzellen absinkt.

In Abbildung 19 sind die in der eFP-Browser Datenbank publizierten Expressionsmuster von *HIPP3* in Blättern von *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora infestans* und nach Behandlung mit Elicitoren zusammengefasst.

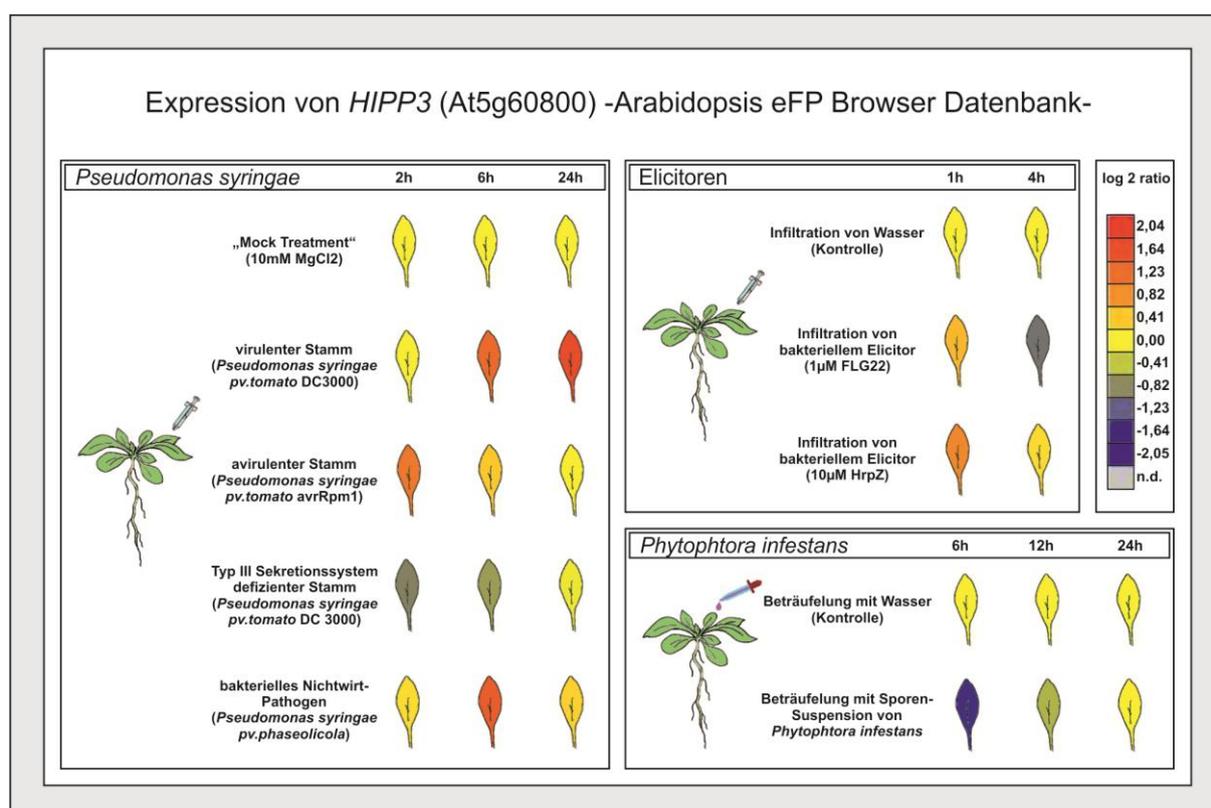


Abbildung 19: Expressionsmuster von *HIPP3* nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen und Elicitoren. Die Informationen stammen aus der 'eFP-Browser Datenbank' (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) und basieren zum größten Teil auf veröffentlichten Daten der AG Nünberger (ZMBP Tübingen). Die Farbgebungen spiegeln das Niveau des *HIPP3*-Transkriptgehaltes wider (log2-Werte, siehe Legende).

Die publizierten Daten (Bethke et al. 2009, Willmann et al. 2011) bestätigen die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse. Die Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 führt zu einer langsamen Induktion von *HIPP3*, während der avirulente Stamm, der zusätzlich das Avirulenzprotein AvrRpm1 exprimiert, eine schnelle Induktion von *HIPP3* bewirkt. TypIII-Sekretionssystem-defiziente Bakterien rufen keine Induktion sondern eher eine Verringerung im Transkriptlevel von *HIPP3* hervor und das bakterielle Nichtwirtpathogen

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* bewirkt eine schwächere Induktion als *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Die Infiltration mit den Elicitoren FLG22 und HrpZ führt zu einem Anstieg des *HIPP3*-Expressionslevels. Ein gegensätzliches Bild zeigt sich nach Behandlung mit einem Oomyceten, dem Nichtwirtpathogen *Phytophthora infestans*. Hier wird *HIPP3* nach der Behandlung sehr rasch drastisch herunter reguliert.

5.5 Co-Expressionsnetzwerk um *HIPP3*

Der 'Co-Expression Viewer' von ATTED II (<http://atted.jp/>) bildet auf der Basis von 1388 publizierten Genchip-Datensätzen Netzwerke von co-exprimierten Genen ab. Für *HIPP3* ergibt sich bei Verwendung dieser Software das in Abbildung 20 dargestellte Netzwerk. Darin sind die Gene, deren Expressionsmuster am meisten mit dem *HIPP3* Expressionsverhalten übereinstimmen, in kürzester Distanz zu *HIPP3* und nah beieinander positioniert. Diese Co-Expressionsanalyse von *HIPP3* zeigt sehr ähnliche Expressionsmuster zwischen *HIPP3* und den drei Genen At1g43910, At1g02450 und At5g52760. Das erste Gen At1g43910 kodiert für eine durch ABA regulierte AAA-Typ ATPase und ist wiederum mit dem Gen At5g17760 verknüpft, was für eine durch SA regulierte AAA-Typ ATPase kodiert (NCBI, Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Das ebenfalls in diesem Cluster angeordnete Gen At1g33560 kodiert für das an der Pathogenantwort beteiligte *disease resistance protein* ADR1, das auch bei der Ausbildung von Trockentoleranz eine Rolle spielt (Chini et al. 2004, Grant et al. 2003). Das zweite in dem Co-Expressionsnetzwerk direkt mit *HIPP3* verknüpfte Gen At1g02450 kodiert für das über eine Interaktion mit NPR1 an der SAR (*systemic acquired resistance*)-Reaktion beteiligte, SA abhängige Protein NIMIN-1 (Hermann et al. 2013, Fonseca et al. 2010, Weigel et al. 2005, Weigel et al. 2001). Mit diesem verbunden in dem dargestellten Co-Expressionsnetzwerk um *HIPP3* ist das Gen At2g26400, das für eine Acireducton Dioxygenase (ARD3) kodiert und zwei weitere Gene, die für WRKY-Transkriptionsfaktoren kodieren At2g40750 (WRKY54) und At5g22570 (WRKY38). Der durch SA regulierte Transkriptionsfactor WRKY54 spielt eine Rolle bei der Regulation der Blattseneszenz (Besseau et al. 2012) und WRKY38 interagiert mit dem Protein NPR1 bei der SAR (Xie et al. 2010, Kim et al. 2008, Wang et al. 2006). Das dritte in dem Co-Expressionsnetzwerk direkt mit *HIPP3* verbundene Gen At5g52760 kodiert für ein weiteres HIPP-Protein (HIPP14), das wiederum mit At5g52750 (HIPP13) vernetzt ist. Beide sind mit dem Gen At4g14365 verknüpft, das für die putative E3 Ubiquitin-Protein Ligase XBAT34 kodiert. Interessanterweise wird für XBAT34 die Bindung von Zink vorhergesagt (NCBI, Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Für alle drei Gene sagt die NCBI-Datenbank auch eine Beteiligung an Pathogenabwehr-Reaktionen voraus (NCBI, Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Auch weitere Gene in dem mit *HIPP14* verknüpften

Cluster kodieren für Proteine, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind. At2g46400 kodiert für den putativen WRKY-Transkriptionsfaktor WRKY46, der an der SA abhängigen SAR beteiligt ist (van Verk et al. 2011) und At1g01560 kodiert für die MAP Kinase 11, die durch den Elicitor FLG22 aktiviert wird (Bethke et al. 2012).

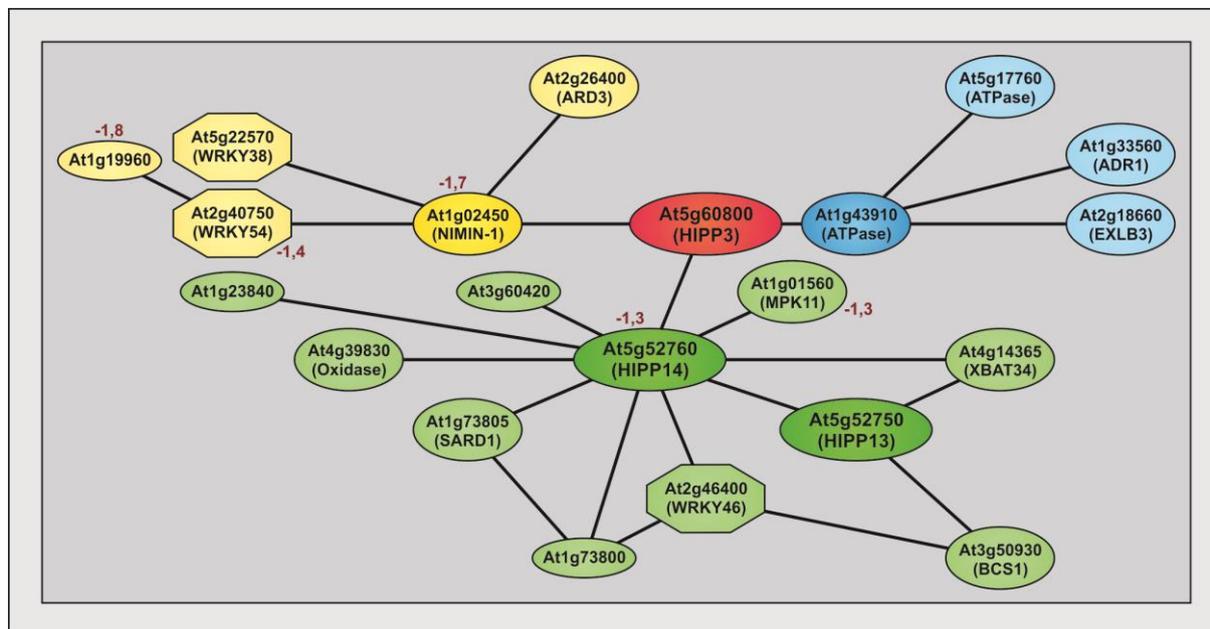


Abbildung 20: Co-Expressionsnetzwerk um *HIPP3*. Es wurde mit dem Co-Expression Viewer, von ATTED II (<http://atted.jp/>) auf der Basis von 1388 publizierten Genchip-Datenbanken errechnet. Das Netzwerk zeigt sehr ähnliche Expressionsmuster zwischen *HIPP3* (rot dargestellt) und den Genen At1g43910 (*ATPase*, blau dargestellt), At1g02450 (*NIMIN-1*, gelb dargestellt) und At5g52760 (*HIPP14*, grün dargestellt). *HIPP3* steht bezüglich seines Expressionsverhaltens auch indirekt mit Genen in Beziehung, die um eines dieser drei 'direkten Beziehungsgene' clustern. Zahlreiche Gene dieses Co-Expressionsnetzwerks sind in die Abwehr von Pathogenen und/oder auch in Trockenstressantworten involviert, was eine funktionelle Einbindung von *HIPP3* in die Regulation dieser Prozesse nahelegt. Mit roten Zahlenwerten (\log_2 -Werte) sind die Gene versehen, die in der Array-Analyse (Kapitel 7) in der *HIPP3-oe* Linie relativ zum Wildtyp einen veränderten Transkriptgehalt aufwiesen. Die negativen Werte deuten darauf hin, dass diese Gene in der *HIPP3-oe* Linie herunter reguliert werden.

Das auf der Basis von 1388 publizierten Genchip-Datenbanken errechnete Co-Expressionsnetzwerk um *HIPP3* deutet auf eine funktionelle Einbindung von *HIPP3* in regulatorische Netzwerke zur Pathogenabwehr, insbesondere SA abhängiger Wege, aber auch in Trockenstressantworten hin. Die in Abbildung 20 zusätzlich abgebildeten roten Zahlenwerte kennzeichnen die Gene, die in der im Kapitel 7 beschriebenen Array-Analyse in der Überexpressionslinie von *HIPP3* (*HIPP3-oe* Linie) relativ zum Wildtyp einen veränderten Transkriptgehalt aufweisen. Es fällt auf, dass alle diese Gene deutlich herunter reguliert werden (dargestellt sind die \log_2 -Werte).

5.6 Vorhersage von *cis*-Elementen im Promotor

Mit Hilfe der ATTED II Datenbank (<http://atted.jp/>) wurde auch nach putativen *cis*-Elementen von *HIPP3* gesucht (Abbildung 21). Dieses Programm identifiziert im nahen Promotorbereich (200 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart) anhand von Heptamer-Sequenzen putative *cis*-Elemente und korreliert diese mit den in der Datenbank vorliegenden Expressiondaten (*Cis element prediction using CEG (correlation between expression and a defined group of genes)*; <http://atted.jp/>). Dabei wurden drei Sequenzmotive im Promotorbereich von *HIPP3* identifiziert, die Übereinstimmungen mit bekannten Elementen aufweisen. Als Bezugspunkt für die Position dieser Sequenzmotive wurde der Transkriptionsstart von *HIPP3* definiert. Laut der durchgeführten *in silico* Analysen befindet sich 28 bis 21 Basen vor dem Transkriptionsstart (Position 0) im *HIPP3*-Promotorbereich ein typisches TATA-Box-Motiv, 64 bis 57 Basen vor dem Transkriptionsstart ein ABA-abhängiges DRE2-Element (*drought responsive element*, Kizis und Pagès 2002) und 186 bis 179 Basen vor dem Transkriptionsstart ein Erkennungsmotiv für pflanzenspezifische Dof Transkriptionsfaktoren, die mit einem C₂-C₂ Zinkfinger an der DNA binden und in pflanzliche Entwicklungsprozesse, wie z.B. die Samenentwicklung involviert sind (Yanagisawa 2004). Für einen detaillierten Überblick über alle im gesamten Promotor von *HIPP3* vorliegenden *cis*-Elemente müssten allerdings weitere Sequenzanalysen durchgeführt werden.

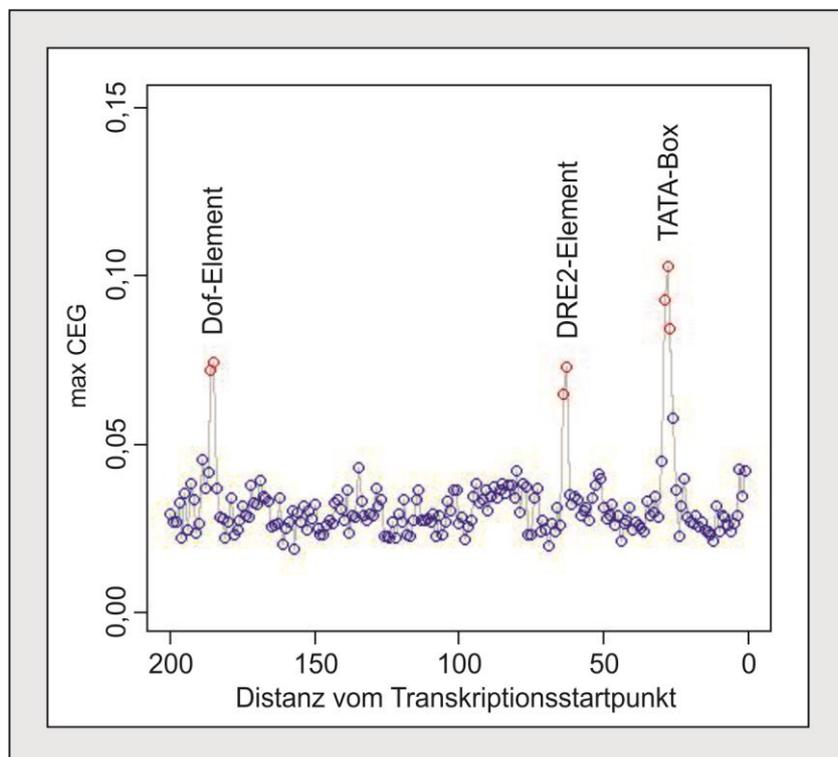


Abbildung 21: Konservierte *cis*-Elemente im Promotorbereich von *HIPP3*. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der ATTED II Datenbank (<http://atted.jp/>) durchgeführt. Bei diesen *in silico* Analysen wurden für den *HIPP3*-Promotor drei bekannte *cis*-Elemente vorhergesagt. In der Position 28 bis 21 Basen vor dem Transkriptionsstart (dieser liegt bei 0) befindet sich ein typisches TATA-Box-Motiv, 67 bis 57 Basen entfernt ein DRE2-Element und in größerer Distanz (186 bis 179 Basen vor dem Transkriptionsstart) wurde per Sequenzanalyse das pflanzenspezifische Dof-Erkennungsmotiv identifiziert.

Expressionsmuster von *HIPP3*

HIPP3 zeigt ein komplexes Expressionsverhalten. Während Trockenstress und die Zugabe von Abscisinsäure *HIPP3* herunter regulieren, kommt es nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* zu einer deutlichen Induktion. *HIPP3* verhält sich wie andere Pathogen-regulierte Gene mit einer langsameren Induktion bei Inokulation mit dem virulenten Stamm *Pst* DC3000 und einer schnelleren Induktion bei Inokulation mit dem avirulenten Stamm *Pst* DC3000 + *AvrRpm1*, der durch das Avirulenzprotein *AvrRpm1* eine ETI (*Effector Triggered Immunity*) auslöst. Unter Nutzung der 'eFP-Browser Datenbank' konnte gezeigt werden, dass *HIPP3* auch bei der Blüten- und Samenbildung reguliert ist. Co-Expressionsanalysen deuten auf eine Beteiligung an regulatorischen Netzwerken der Pathogenabwehr und von Trockenstressantworten hin. Im Promotorbereich von *HIPP3* befinden sich laut *in silico* Analysen konservierte Sequenzmotive für bekannte cis-Elemente (TATA-Box, DRE2, Dof-Element).

6. Überexpression und *knockdown* von *HIPP3*

Um Aussagen zu möglichen Funktionen von *HIPP3* zu erhalten, wurden Mutanten analysiert, bei denen die Expression von *HIPP3* entweder verringert oder gesteigert wurde. Diese Mutanten wurden im Weiteren bezüglich veränderter Gen-Expressionsmuster (Kapitel 7) und bezüglich phänotypisch erfassbarer Veränderungen (Kapitel 8) untersucht.

6.1 *knockdown* von *HIPP3*

Die verwendete *HIPP3 knockdown* (*hipp3-1*) Mutante wurde vom Nottingham Arabidopsis Stock Center bezogen und trägt wie in Abbildung 22 dargestellt eine T-DNA-Insertion kurz vor dem 5'-UTR (*untranslated region*) Bereich des für *HIPP3* kodierenden Gens (At5g60800) zwischen der Position -9 und -10 (Salk-Instituts-Name: SAIL_292_H03_v._1). Die T-DNA beinhaltet auch eine Resistenzkassette (*BAR* Gen) für das Herbizid BASTA® (Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience). Dies konnte zur Selektion der Mutanten genutzt werden. Die Homozygotie der untersuchten *hipp3-1* Mutanten wurde mittels PCR an genomischer DNA getestet. Dazu wurden die in Abbildung 22 gezeigten, innerhalb und außerhalb des inserierten Fragmentes liegenden Primer verwendet.

Bei homozygoten *hipp3-1* Mutanten zeigte die gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte nur dann ein Fragment im Größenbereich von ca. 400bp, wenn der genomische forward Primer 'HIPP3 for02' und der reverse Insert-Primer 'SAIL-LB1' in der PCR kombiniert wurden.

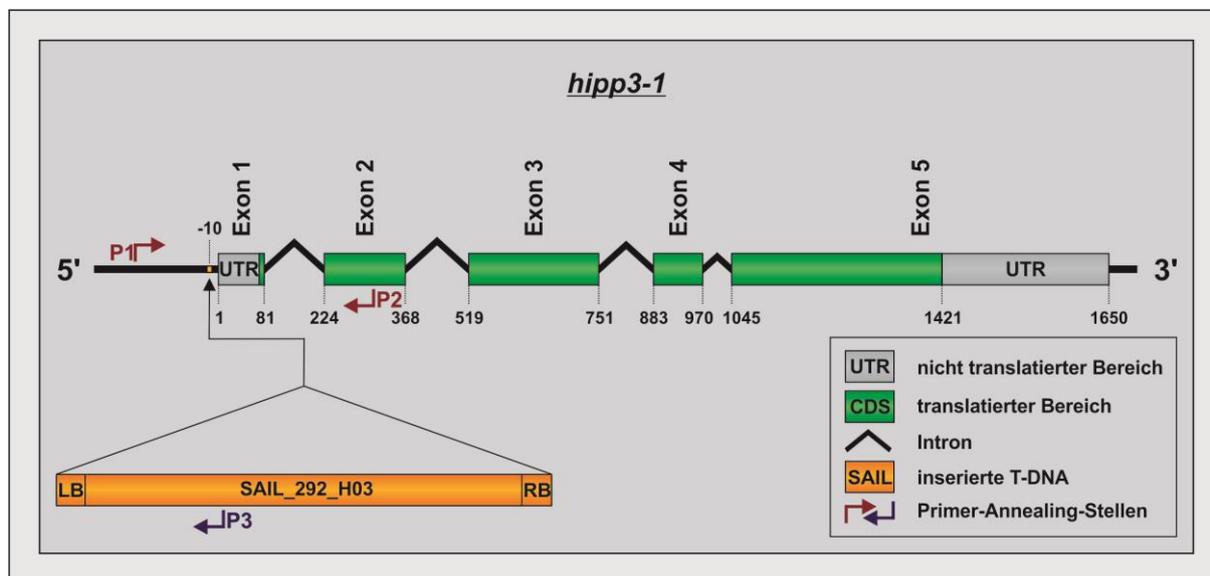


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Genstruktur der HIPP3 knockdown Mutante (*hipp3-1*). Die inserierte T-DNA (SAIL_292_H03) befindet sich zwischen dem 9. und 10. Basenpaar vor der 5'-UTR des *HIPP3* Gens. LB = left border, RB = right border; P1 = genomischer forward Primer 'HIPP3 for02', Annealingstelle in der *HIPP3* Sequenz bei -135bp; P2 = genomischer reverse Primer 'HIPP3 rev', Annealingstelle in der *HIPP3* Sequenz bei 305bp; P3 = Insert-Primer 'SAIL-LB1', Annealingstelle in der Sequenz der T-DNA bei 275bp.

Der Einsatz der Insert-überspannenden genomischen Primer ('HIPP3 for02' und 'HIPP3 rev') ergab in homozygoten *hipp3-1* Mutanten kein Produkt. Letztere Primerkombination führte jedoch im homozygoten Wildtyp (Col-0) zur Bildung eines ca. 440bp großen PCR-Produktes, währenddessen 'HIPP3 for02' zusammen mit 'SAIL-LB1' kein Produkt lieferte (Daten nicht gezeigt).

6.2 Überexpression von *HIPP3*

Für die 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*) wurde die kodierende Sequenz (CDS) des Gens mit dem konstitutiven viralen Promotor CaMV35S gekoppelt. Am 5'-Bereich von *HIPP3* wurde zusätzlich die Sequenz eines dreifachen c-myc-Tag, gefolgt von einem sechsfachen His-Tag (hexa-His-Tag) inseriert. Das Konstrukt, (unterer Teil der Abbildung 23) wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in das pflanzliche Genom transformiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *HIPP3-oe* Linien verwendet. Beide (Linie 131-1 und Linie 133-5) sind aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangen. Zur

Kontrolle wurden Linien eingesetzt, die mit dem pCB-Leervektor, also ohne *HIPP3*, transformiert wurden (Linie 186-78 und Linie 187-2). Alle Überexpressions- und Leervektor-Linien tragen eine Resistenzkassette für das Herbizid BASTA® (Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience) im Bereich der inserierten T-DNA und können somit selektiert werden. Die *HIPP3-oe* Linien wurden ebenfalls über PCR-Screening auf Homozygotie getestet. Die Bindestellen der dafür verwendeten Primer sind in Abbildung 23 dargestellt.

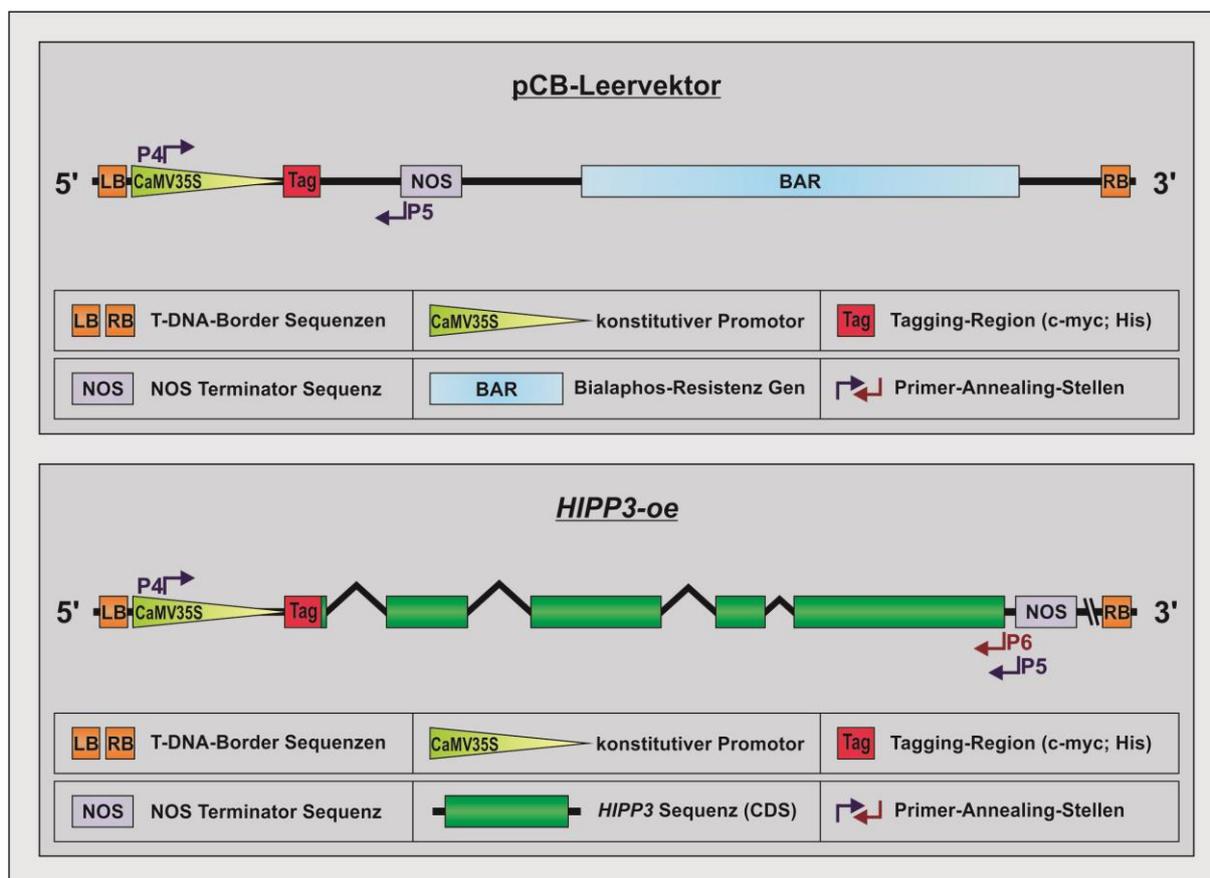


Abbildung 23: Schematische Darstellung der 'Transformationskassette' des pCB-Vektors, der für die Generierung der 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*) genutzt wurde. Oben ist die leere Kasseete des pCB-Leervektors abgebildet. Sie wird von 'left border' (LB)- und 'right border' (RB)- Sequenzen flankiert und enthält unter anderem die Sequenz des Bialaphos-Resistenz Gens (*BAR*), welches den transformierten Pflanzen die Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA® (Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience) vermittelt und somit als Selektionsmarker genutzt werden kann. Das Konstrukt im unteren Teil der Abbildung enthält zusätzlich die inserierte *HIPP3*-CDS (gekoppelt mit dem konstitutiven viralen Promotor CaMV35S und einem dreifachen c-myc- und einem sechsfachen His-Tag) und ist ansonsten identisch mit der oben abgebildeten Transformationskassette. Das *BAR* Gen ist ebenfalls vorhanden und wurde lediglich aus Gründen der Übersichtlichkeit unten nicht abgebildet (siehe Aussparung durch Schrägstriche). Beide Transformationskassetten konnten mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in das pflanzliche Genom inseriert werden. Die Verwendung der oberen Kasseete diente der Herstellung der Kontroll-Linien (Linie 186-78 und Linie 187-2), während das untere Konstrukt eingesetzt wurde, um die 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (Linie 131-1 und Linie 133-5) zu generieren. P4 = vektoreigener forward Primer 'pCB for', P5 = vektoreigener reverse Primer 'pCB rev', P6 = insertspezifischer reverse Primer 'HIPP3 rev01'.

Homozygote *HIPP3-oe* Linien zeichnen sich in der gelelektrophoretischen Auftrennung durch zwei ähnlich große PCR-Produkte aus. Das mit 1478bp etwas größere Fragment entsteht durch die Kombination der vektoreigenen Primer 'pCB for' und 'pCB rev'. Wird der vektoreigene Primer 'pCB for' jedoch mit dem insertspezifischen Primer 'HIPP3 rev01' kombiniert, dann entsteht ein ähnlich großes Produkt mit einer Länge von 1398bp. In homozygoten Leervektor-Kontrolllinien wird mit den vektoreigenen Primern 'pCB for' und 'pCB rev' ein deutlich kleineres DNA-Fragment (173bp) gebildet. Da sich in der Transformationskassette der Kontroll-Linien kein *HIPP3*-CDS Insert befindetet, liefern PCR-Analysen mit dem vektoreigenen Primer 'pCB for' zusammen mit dem insertspezifischen Primer 'HIPP3 rev01' in homozygoten Leervektorlinien kein Amplifikat (Daten nicht gezeigt).

6.3 Vergleich der *HIPP3* Transkriptgehalte in den *HIPP3-oe* Linien und der *hipp3-1* Mutante

Die Expression von *HIPP3* wurde mittels quantitativer *realtime*-PCR in den Blättern der *knockdown* Mutante (*hipp3-1*, Linie 28-23-74) und der beiden untersuchten 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*, Linie 131-1 und Linie 133-5) analysiert. Alle relativen Expressionsanalysen erfolgten im Vergleich zu den *HIPP3* Transkriptgehalten der Leervektorkontrollen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

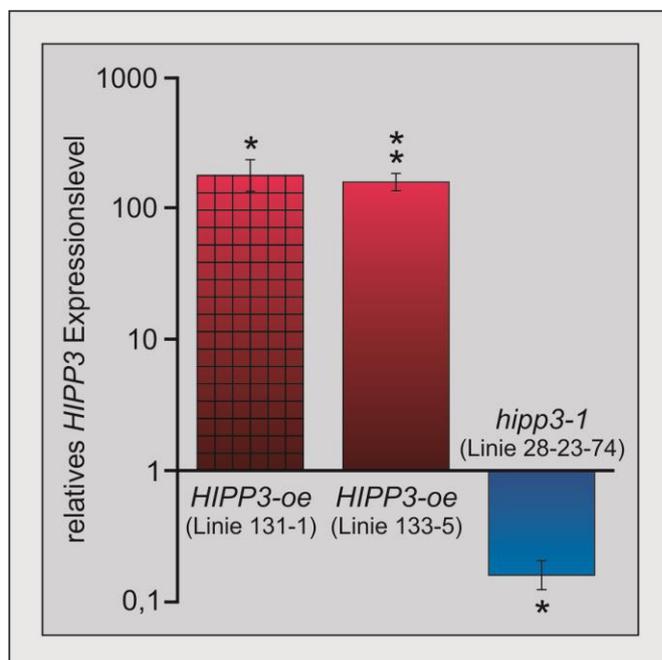


Abbildung 24: Expression von *HIPP3* in der *knockdown* Mutante (Linie 28-23-74) und den beiden in der Arbeit untersuchten *HIPP3* Überexpressionslinien (Linie 131-1 und Linie 133-5) im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (Linie 186-78 und Linie 187-2). Die *HIPP3* Transkriptgehalte der untersuchten Leervektorlinien sind untereinander sehr ähnlich und zeigen auch zu Wildtyp Col-0 Pflanzen keine signifikanten Unterschiede. Sie wurden zu einem Kontrollwert gemittelt und für die Berechnung der relativen *HIPP3* Expressionslevel gleich 1 gesetzt (Verlauf der X-Achse). Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenz-Gen *PP2AA3* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl et al. 2002); n=4; p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**).

Das Transkriptlevel von *HIPP3* liegt in der *hipp3-1* Mutante im Vergleich zur Leervektorkontrolle (entspricht dem Wildtyp) nur noch bei etwa 19%. Allerdings sind in der Mutante, bei der die T-DNA Insertionsstelle im Promotorbereich liegt, immer noch deutlich *HIPP3*-Transkripte nachzuweisen. Es handelt sich somit bei der untersuchten T-DNA

Insertionslinie um eine 'knockdown' Mutante. Die *HIPP3* Expression in den Blättern der beiden verwendeten Überexpressionslinien ist etwa 170mal stärker, als in der Leervektorkontrolle. Die Bezeichnung 'Überexpressionslinie' trifft also auf beide Linien zu.

Überexpression und *knockdown* von *HIPP3*

Die in der Arbeit verwendete Mutante *hipp3-1* besitzt eine T-DNA Insertion im 5'-UTR Bereich des Gens. Es handelt sich um eine *knockdown* Mutante, bei der die Expression von *HIPP3* nur noch etwa 20% des Wildtyps beträgt. In den beiden untersuchten 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*) ist der Transkriptgehalt von *HIPP3* dagegen etwa 170fach erhöht.

7. Gene, die durch *HIPP3 knockdown* und Überexpression differentiell reguliert werden

Um Zielgene zu identifizieren, deren Genexpression durch die molekulare Funktion von *HIPP3* beeinflusst wird, sind Microarray-Analysen durchgeführt worden. Verglichen wurden dabei die Transkriptprofile von reifen Blättern der *knockdown* Mutante *hipp3-1* (Linie 28-23-74) und der Überexpressionslinie *HIPP3-oe* (Linie 133-5) jeweils mit der Leervektorkontrolle (Linie 187-2) (siehe Kapitel 6). Es wurden jeweils drei unabhängige biologische Replikate eingesetzt. Die Array-Analyse erfolgte mit dem Agilent Array (*Arabidopsis* (V4) Gene Expression Microarray, 4x44K), der 43.803 *Arabidopsis thaliana* Gen-Sequenzen umfasst.

Die Tabellen der im Vergleich differentiell exprimierten Gene sind im Anhang gezeigt (A1 und A2). Es wurden nur solche Gene aufgenommen, die signifikante Veränderungen im Expressionslevel aufwiesen. Das heißt, dass sich für die gelisteten Gene bei der statistischen Analyse der jeweils drei unabhängigen Einzelerperimente mittels t-Test (Welch-Test) als „Aufnahmebedingung“ ein p-Wert kleiner 0,05 ergeben musste.

Listen der differentiell exprimierten Gene:

<i>hipp3-1</i> Mutante (Linie 28-23-74) vs. Leervektorkontrolle (Linie 187-2)	Tabelle A1
<i>HIPP3-oe</i> Linie (Linie 133-5) vs. Leervektorkontrolle (Linie 187-2)	Tabelle A2

7.1 Überblick über differentiell regulierte Gene

Die Abbildung 25 gibt einen Überblick über die Array-Ergebnisse, wobei nur solche Gene einbezogen wurden, die in den Proben im Vergleich zur Leervektorkontrolle mehr als zweifach herauf und auf weniger als die Hälfte herunter reguliert waren. In der *knockdown* Mutante *hipp3-1* zeigen nur 69 Gene eine differentielle Regulation, wobei 26 Gene hoch und 43 Gene herunter reguliert sind. Dagegen beeinflusst die Überexpression von *HIPP3* die Expression von 404 Genen, wobei 199 Gene mehr als zweifach induziert, und 205 Gene mehr als zweifach reprimiert werden. 24 dieser Gene werden sogar mehr als vierfach herauf oder herunter reguliert (schraffierte Balkenbereiche).

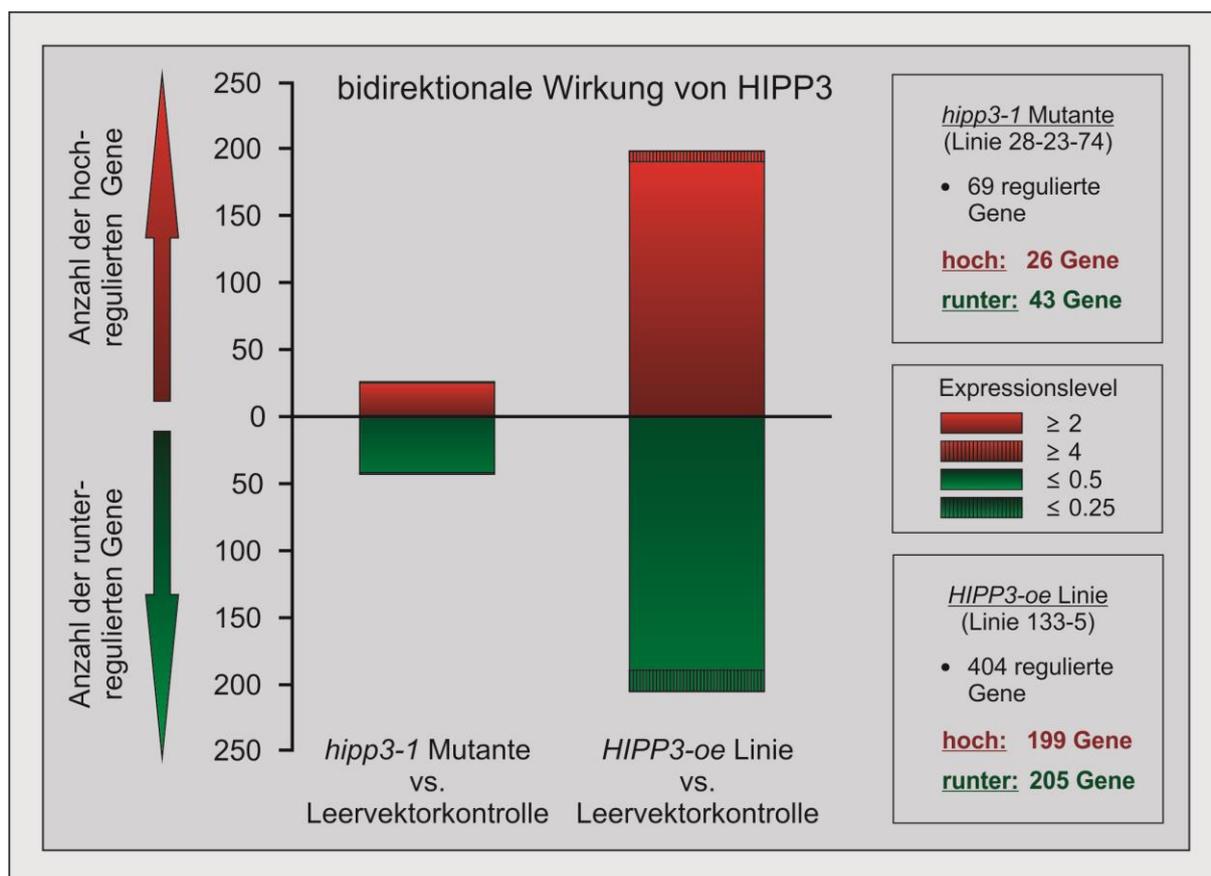


Abbildung 25: Differentiell regulierte Gene in *knockdown* Mutante (*hipp3-1*) und 35S::*HIPP3* Überexpressionslinie (*HIPP3-oe*). Dargestellt ist die Anzahl der Gene, deren Expressionslevel in der *hipp3-1* Mutante (Linie 28-23-74) bzw. in der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2) signifikant unterschiedlich sind (p -Wert kleiner 0,05). Die roten Balken kennzeichnen die Gene deren Transkriptgehalte in *hipp3-1* oder *HIPP3-oe* mindestens doppelt so hoch sind, wie in der Kontroll-Linie (≥ 2). Gene, die in *hipp3-1* oder *HIPP3-oe* mindestens viermal so stark exprimiert werden (≥ 4), sind im rot schraffierten Bereich zusammengefasst. Alle im Vergleich zur Kontroll-Linie herunter regulierten Gene (Transkriptgehalt weniger als halb so groß, $\leq 0,5$) sind hingegen in den beiden grünen Balken erfasst. Die grün schraffierten Bereiche kennzeichnen all die Gene, deren Transkriptgehalte mindestens 4mal geringer sind als in der Leervektorkontrolle ($\leq 0,25$).

Interessant ist, dass etwa gleich viele Gene herauf und herunter reguliert werden, was dafür spricht, dass *HIPP3* bidirektional, also sowohl induzierend als auch reprimierend wirken

kann. Die geringen Unterschiede im Transkriptom der *hipp3-1* Mutante zur Leervektorkontrolle spiegeln wider, dass der *HIPP3*-Transkriptgehalt in der *knockdown* Mutante nur um etwa 80% verringert vorliegt und wahrscheinlich immer noch funktionelles HIPP3 Protein gebildet werden kann. Aufgrund der schwachen Unterschiede (die *knockdown* Mutante zeigt auch im Gegensatz zu der im Kapitel 8 dargestellten Blühverzögerung der Überexpressionslinie keine phänotypischen Unterschiede) wurden im Weiteren nur die bei deutlicher Überexpression von HIPP3 differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie näher analysiert. In zukünftigen Arbeiten zu HIPP3 soll zusätzlich eine mittlerweile vorliegende 'knockout' Mutante untersucht werden, die eine T-DNA Insertion in der kodierenden Sequenz trägt.

7.2 Funktionelle Einordnung der differentiell regulierten Gene

249 Gene der bei Überexpression von *HIPP3* insgesamt 404 differentiell regulierten Gene konnten mit Hilfe des Mapman-Programms (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>; Thimm et al. 2004, Usadel et al. 2006) funktionellen Klassen zugeordnet werden.

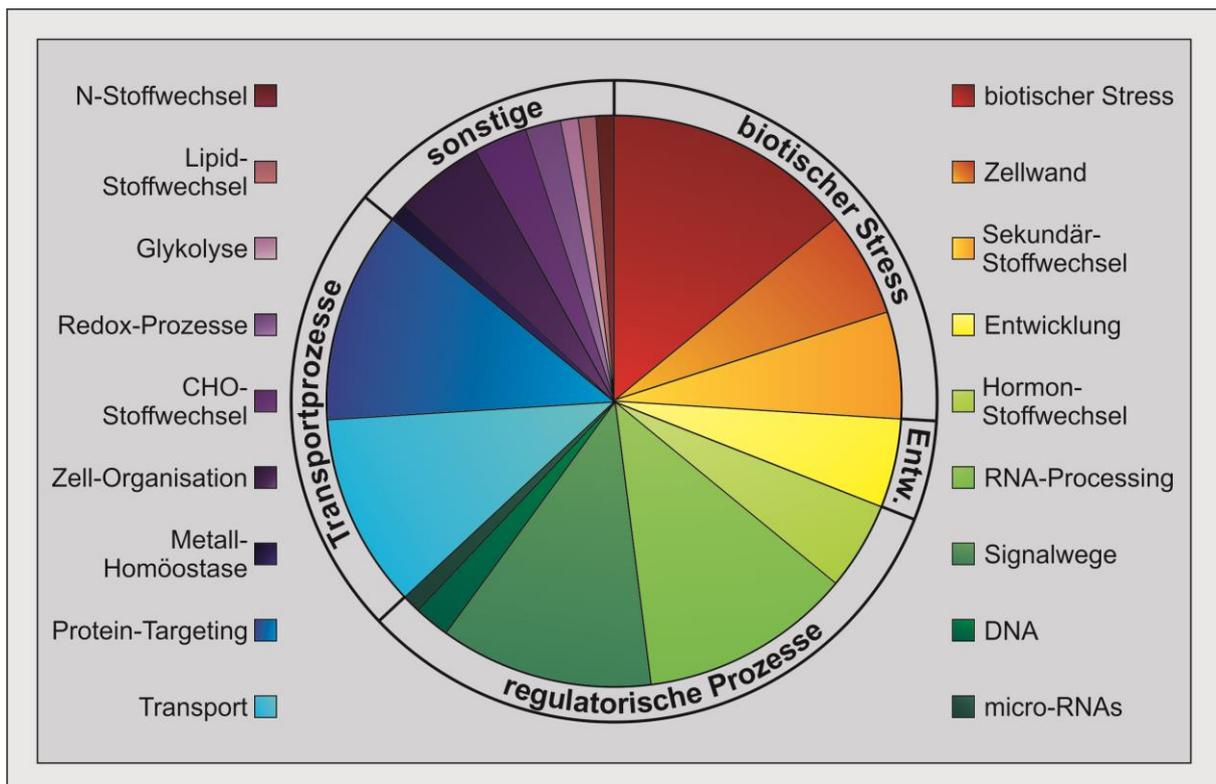


Abbildung 26: Funktionelle Einordnung der durch Überexpression von *HIPP3* differentiell regulierten Gene. Die Zuordnung erfolgte mit dem Mapman Programm (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>). Rechts und links des Torten-Diagramms sind die von Mapman verwendeten Bezeichnungen der funktionellen Klassen aufgelistet. Die Reihenfolge entspricht dabei der im Uhrzeigersinn vergebenen Torten-Areale. (Beginn der Liste: 'biotischer Stress'; Abschluss der Liste: 'N-Stoffwechsel').

Für 154 Gene wurde die Funktion durch Mapman nicht eindeutig zugeordnet. Das Ergebnis der funktionellen Analysen ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Überexpression von *HIPP3* führt zu einer Veränderung der Expression von Genen, die bestimmten funktionellen Klassen zugeordnet werden können. 14% der 249 analysierten Gene werden von Mapman dem Funktionsbereich „biotischer Stress“ zugeordnet. Darüber hinaus werden 6% dem Bereich „Zellwand“ und 6% dem Bereich „Sekundärmetabolismus“ zugeordnet. Beide funktionellen Kategorien sind auch mit biotischem Stress assoziiert. Insgesamt werden diesen drei Funktionsbereichen 26% (65 Gene) aller regulierten und eindeutig funktionell klassifizierbaren Gene durch Mapman zugeordnet. 13% der Gene werden von Mapman dem Funktionsbereich „Entwicklungsprozesse“ und 32% aller regulierten und eindeutig funktionell klassifizierbaren Gene werden „regulatorischen“ Funktionen zugeordnet (Hormone (5%), Regulationsprozesse auf RNA- (12%) und DNA- (2%) Ebene, „Signalwege“ (12%) und micro-RNAs (1%)). Darüber hinaus sind 23% aller regulierten und funktionell klassifizierbaren Gene den Bereichen „Protein-Targeting“ (12%) und „Transportvorgänge“ (11%) zuzuordnen. Eine geringe Anzahl von Genen ist mit weiteren Funktionsklassen assoziiert und wurde in der Abbildung 26 unter „sonstige“ zusammengefasst.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Überexpression von *HIPP3* einen deutlichen (direkten oder indirekten) Effekt auf die Expression von Genen hat, die funktionell in Entwicklungsvorgänge, Transportprozesse und biotische Stressantworten involviert sind. Der große Anteil von Genen, die regulatorischen Prozessen zuzuordnen sind, weist darüber hinaus darauf hin, dass *HIPP3* ein Protein kodiert, welches in regulatorische Prozesse involviert ist.

7.3 Detaillierte Analyse der 100 am stärksten differentiell regulierten Gene

Das Mapman-Programm kann nur eine begrenzte funktionelle Zuordnung der Gene leisten. Deswegen wurde versucht, darüber hinaus für die 'TOP-100' regulierten Gene (das sind die 100 Gene, die in der vergleichenden Array-Analyse am stärksten differentiell reguliert sind) eine Zuordnung zu biologischen Prozessen anhand von funktionalen Daten, die in publizierten Datenbanken vorliegen (NCBI; Gene; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu erzielen. Bei dieser, in Abbildung 27 zusammengefassten, Analyse wurde auch erfasst, unter welchen Bedingungen diese Gene exprimiert werden (Genevestigator, 'conditions search tools, samples', <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>), wobei für die meisten Gene mehrere unterschiedliche Bedingungen zu einer deutlichen Regulation führen. Interessant ist, dass 53% der bei Überexpression von *HIPP3* 'TOP-100' regulierten Gene entweder anhand der zu diesem Gen publizierten Daten oder anhand ihrer Expressionsmuster

(Genevestigator; <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) Prozessen der Pathogenantwort zugeordnet werden können. Einige Gene sind auch Prozessen der Zellwand- Biogenese und -Dynamik zuzuordnen. Es fällt weiter auf, dass viele dieser Gene bei der Blütenbildung, Samenentwicklung und/oder bei abiotischem Stress eine Rolle spielen. Weiterhin werden viele dieser Gene bei Eisen- und Schwefelmangel reguliert. Eine große Zahl dieser Gene wird außerdem durch die Transkriptionsfaktoren LEAFYCOT/LEC2 und/oder LEAFY reguliert, die bei der Samenentwicklung und der Blütenbildung eine zentrale Rolle spielen (Stone et al. 2001, Moyroud et al. 2010). Diese Auflistung zeigt schon, dass viele der in der 35S::HIPP3 Überexpressionslinie (*HIPP3-oe*) differentiell regulierten Gene überlappende Funktionen und Expressionsmuster haben. So sind in der 'TOP-100' Gengruppe von den 53 der Pathogenantwort zuzuordnenden Genen 21 auch mit der Blütenbildung oder der Samenentwicklung assoziiert. Diese Ergebnisse weisen auf eine regulatorische Funktion von HIPP3 bei verschiedenen pflanzlichen Entwicklungs- und Pathogen- abhängigen Prozessen hin.

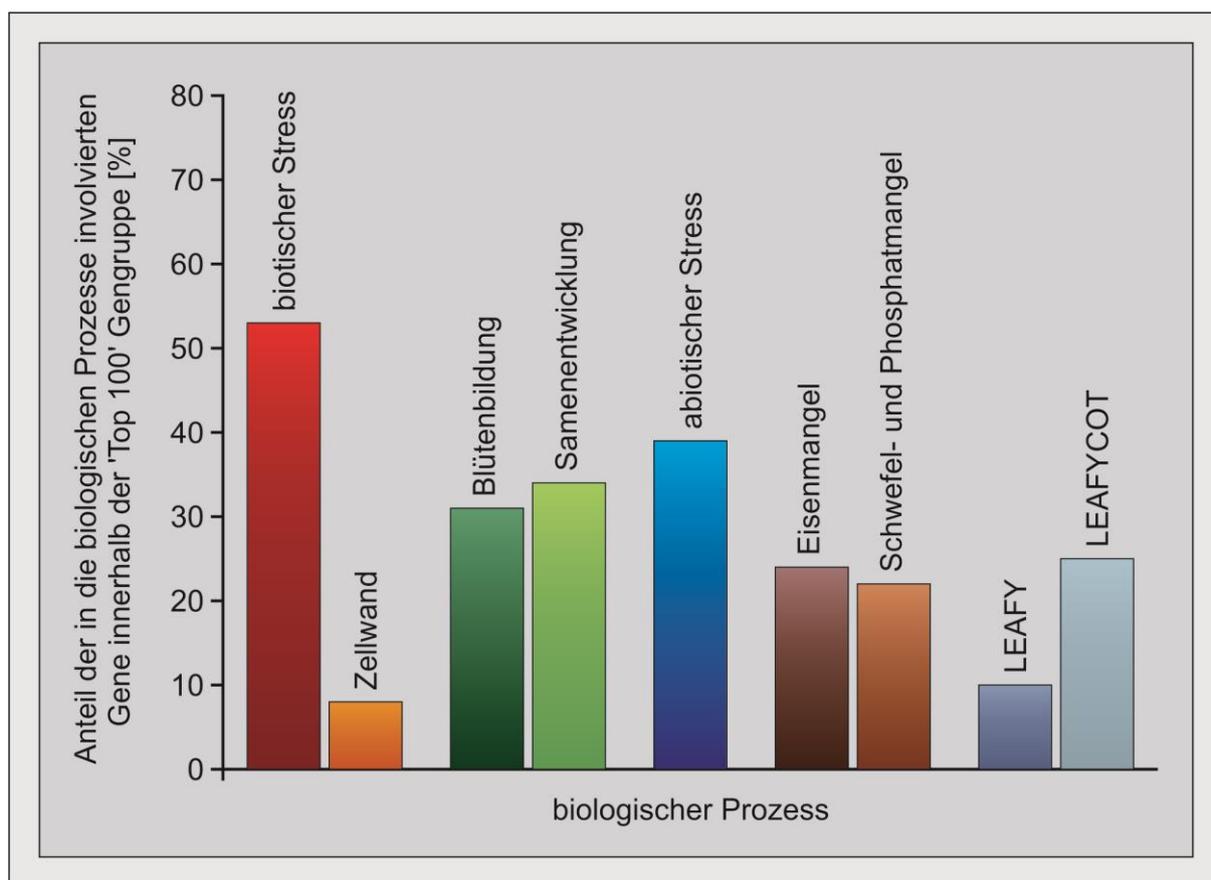


Abbildung 27: Detaillierte funktionelle Zuordnung der 'TOP 100' differentiell regulierten Gene. Die Zuordnung der 100 in der vergleichenden Array-Analyse am stärksten differentiell regulierten Gene zu biologischen Prozessen basiert auf Informationen aus publizierten Datenbanken. Diese *in silico* Analysen stützen sich auf Daten zu bereits vorliegenden funktionellen Klassifizierungen (NCBI; Gene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und publizierten Expressionsdaten (Genevestigator, 'conditions search tools, samples', <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>). Für die meisten dieser Gene können mehrere, unterschiedliche Bedingungen zu einer deutlichen Regulation führen. Diese Gene sind deswegen mehreren Kategorien zuzuordnen.

7.4 Detaillierte Charakterisierung der am stärksten regulierten Gene und Verifizierung der Expressionsunterschiede mittels quantitativer *realtime*-PCR

In Tabelle 2 werden die bei der Array-Analyse in der *HIPP3-oe* Linie 133-5 im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene anhand bekannter Expressionsdaten (Genevestigator; <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) und bekannter funktioneller Zuordnungen (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Literaturdaten) näher charakterisiert. Generell spiegelt diese Zusammenstellung wider, dass die *HIPP3* Überexpression insbesondere Gene, die an der Pathogenantwort beteiligt sind, die bei Samen- und Blütenbildung eine Rolle spielen, die bei Eisen- und Schwefelmangel und abiotischen Stressfaktoren induziert sind und die unter Kontrolle von Regulatoren wie LEAFYCOT/LEC2 und LEAFY stehen, beeinflusst. Die in der Array-Analyse erhaltenen Daten wurden für einige der in Tabelle 2 gelisteten Gene mittels quantitativer *realtime*-PCR überprüft. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 28 dargestellt. Die Expressionsanalysen bestätigen die im Vergleich zur Kontrolle differentielle Expression der untersuchten Gene.

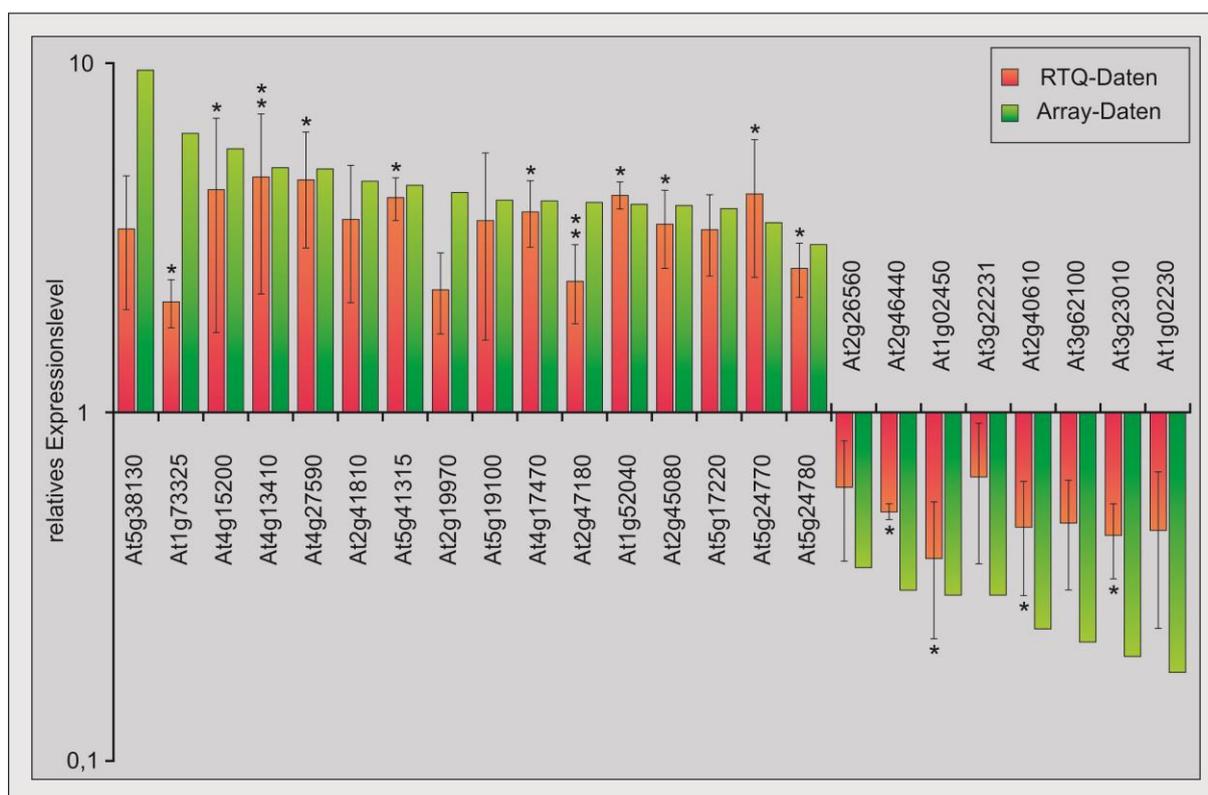


Abbildung 28: Validierung der Expressionsdaten der in der vergleichenden Array-Analyse (*HIPP3-oe* vs. Leervektorkontrolle) am stärksten differentiel regulierten Gene mittels quantitativer *realtime*-PCR (vergleiche Tabelle 2). Das Expressionslevel der gelisteten Gene wurde relativ zur Leervektorkontrolle mittels quantitativer *realtime*-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Veränderung in der *HIPP3-oe* Linie relativ zur Leervektorkontrolle. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenzgen *PP2AA3* anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Statistischer Test: 'Pair wise fixed reallocation randomization test' (Pfaffl *et al.*, 2002); $n=3$; $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**). Neben den Ergebnissen der quantitativen *realtime*-PCR (RTQ-Daten, in rot) sind auch die entsprechenden Daten aus der Micoarray-Analyse (Array-Daten, in grün) dargestellt.

AGI-Code	Gen-Name	Expressionsmuster Genevestigator (Überblick)	Funktionelle Zuordnung	Literatur	lfc
At4g16590	cellulose synthase- like A01 protein (AtCSLA01)	Blütenentwicklung, Pathogenantwort, SAR, Antheren-, Pollen- und Stamenentwicklung, Salzstress	wahrscheinlich an Zellwandbiogenese beteiligt (insbesondere an Mannan-Biosynthese); wahrscheinlich an Pathogenantwort beteiligt	Liepman und Cavalier 2012 Underwood 2012	3,4
At5g38130	HXXXD-type acyl- transferase-like protein	Blütenentwicklung, Pathogenantwort, SAR, Stamenentwicklung	Transferaseaktivität; wahrscheinlich an Blütenentwicklung beteiligt		3,3
At4g11911	unbekannt	keine Daten	unbekannt		2,7
At1g73325	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	keine Daten	Endopeptidase Inhibitoraktivität Ähnlichkeit zu AtDR4: Trockenstress- antwort		2,7
At5g38120	4-coumarate--CoA ligase-like 8	Petalenentwicklung, Stamenentwicklung, Pathogenantwort Ähnlichkeit zu At1g20510: Pathogenantwort, durch LEAFY/COT/LEC2 reguliert , abiotischer Stress, Phosphat- und Eisenmangel, H ₂ O ₂ , LEAFY reguliert	Ähnlichkeit zu At1g20510 (OPCL1): Jasmonatbiosynthese (OPCL1 katalysiert wichtigen Reaktionsschritt: β-Oxidation der Fettsäuren und Verkürzung der Carboxylseitenkette von OPDA), Antwort auf Verwundungsstress	Kienow et al. 2008 Yan et al. 2007 Koo et al. 2006	2,6
At4g15200	formin3 (FH3)	Pollenentwicklung, abhängig von AtMIKC*	reguliert Ausbildung der Actin-Stränge, und hat somit Einfluss auf die Zytoplasmastromung und das gerichtete Wachstum von Pollenschläuchen	Ye et al. 2009	2,5
At4g13410	cellulose synthase- like A15 protein (AtCSLA15)	Elicitoren, Jasmonat, Pathogenantwort, H₂O₂, Oxylipine	wahrscheinlich an Zellwandbiogenese beteiligt (insbesondere an Mannan- Biosynthese); wahrscheinlich an Pathogenantwort beteiligt	Liepman und Cavalier 2012 Underwood 2012	2,3
At4g27590	heavy metal associated domain- containing protein	Somatische Embryogenese, Callus- bildung, Wurzel	Metallbindung (HMA-Domäne); wahrscheinlich Bindung von Kupfer (CCH-like)		2,3

Tabelle 2 (Teil I): Auflistung der in der HIPP3-oe Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene. Dargestellt sind: AGI-Code; Gen-Name; Bedingungen, unter denen das jeweilige Gen laut Genevestigator reguliert ist (fettgedruckte Bedingungen: besonders starke Regulation); funktionelle Zuordnung der Gene (nach Genevestigator, NCBI und Literaturdaten); Literaturquellen und log₂-Wert (lfc) der differentiellen Regulation. Hoch regulierte Gene wurden rot und herunter regulierte Gene blau unterlegt.

AGI-Code	Gen-Name	Expressionsmuster Genevestigator (Überblick)	Funktionelle Zuordnung	Literatur	lfc
At2g41810	unbekannt	Eisenmangel, Oxylipine, Salzstress, Nährstoffangebot, Wurzel, Metalle	wahrscheinlich an Pathogenantwort beteiligt		2,2
At5g41315	GLABRA3 Transkriptionsfaktor (GL3, GLABROUS 3) (basic helix loop helix domain protein)	keine Daten Ähnlichkeit zu At1g63650: Jasmonat, PCD, Blütenentwicklung, Samen- entwicklung, Pestizidbehandlung, Zellwandbiogenese, Hitzestress	Schlüssel-Transkriptionsfaktor der ver- wundungsinduzierten Trichombildung unter Kontrolle von Jasmonat (wirkt „downstream“ von JA-Signalkette); verknüpft induzierbare Abwehrreaktionen mit der Trichombildung in <i>Arabidopsis</i> ; kontrolliert abhängig von der Stickstoff- verfügbarkeit Anthocyanbiosynthese (durch Stickstoffmangel induziert)	Yoshida et al. 2009 Feyissa et al. 2009 Zhou et al. 2012 Patra et al. 2013	2,2
At2g19970	putatives PR-Gen	Samenentwicklung, Sauerstoffmangel, Eisenmangel, ABA / ROS, Verwundung	unbekannt		2,1
At2g45940	unbekannt	De-Etiolierung, Zellwandbiogenese, Jasmonat	unbekannt		2,1
At5g19100	eucaryotic aspartyl protease family protein	Wurzelentwicklung, De-Etiolierung, Salzstress, Nährstoffangebot, Blüten- entwicklung, Auxin	Endopeptidase-Aktivität (Aspartyl- protease); wahrscheinlich an zahlreichen proteolytischen Prozessen beteiligt		2,1
At4g17470	putative palmitoyl- protein thioesterase	Pathogenantwort, SAR, Jasmonat	Hydrolase-Aktivität (Thioesterase); wahrscheinlich an Protein- Modifikations- Prozessen beteiligt		2,0
At2g47180	galactinol synthase 1 (GolS1)	Hitzestress, Samenentwicklung, Oxy- lipine, Pathogenantwort, SAR, Nematoden, Keimung, Samenruhe	Schlüsselenzym bei der Synthese von Oligosacchariden der Raffinose-Familie (Galactinol, Raffinose, Stachyose), die pflanzliche Zellen gegen Schädigungen durch oxidativen Stress schützen	Nishizawa et al. 2008	2,0
At1g52040	myrosinase-binding protein1 (MBP1)	Blüten-, Stamen-, Pollen- und Samen- entwicklung, Pathogenantwort, SAR, Trockenstressantwort, Jasmonat, Auxin, oxidativer Stress	wahrscheinlich an Blütenentwicklung und an Glucosinolat-Myrosinase-System (Abwehr-System gegen Frassfeinde und Phytopathogene) beteiligt	Capella et al. 2001 Rask et al. 2000	2,0

Tabelle 2 (Teil II): Auflistung der in der HIPP3-oe Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene. Dargestellt sind: AGI-Code; Gen-Name; Bedingungen, unter denen das jeweilige Gen laut Genevestigator reguliert ist (fettgedruckte Bedingungen: besonders starke Regulation); funktionelle Zuordnung der Gene (nach Genevestigator, NCBI und Literaturdaten); Literaturquellen und log2-Wert (lfc) der differentiellen Regulation. Hoch regulierte Gene wurden rot und herunter regulierte Gene blau unterlegt.

AGI-Code	Gen-Name	Expressionsmuster Genevestigator (Überblick)	Funktionelle Zuordnung	Literatur	lfc
At2g45080	cyclin p3;1 (cycp3;1)	durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert , Blütenentwicklung, Schwefelmangel, Phosphatmangel	spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Verknüpfung/Koordination von Zellteilung, Zelldifferenzierung und der zellulären Nährstoffversorgung (wird bei Phosphatmangel induziert)	Torres Acosta et al. 2004	2,0
At5g24770	vegetative storage protein 2 (VSP2)	Pathogenantwort, SAR, Cellulose-Synthese Mutanten , Blüten-, Stamen-, Antheren-, Pollen-, Eizellen- und Samenentwicklung, Jasmonat, ABA, Trockenstress, Salzstress, Hitzestress	Saure Phosphatase, Aktivität ist abhängig von zweiwertigen Metall-Ionen (Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺); wahrscheinlich an Pathogenantwort beteiligt (wird durch Verwundung und Jasmonat induziert), hat Anti-Insekten-Aktivität	Berger et al. 2002 Shi et al. 2010 Chen et al. 2012	1,8
At5g24780	vegetative storage protein 1 (VSP1)	keine Daten, Ähnlichkeit zu At5g24770: Pathogenantwort, SAR, Cellulose-Synthese Mutanten , Blüten-, Stamen-, Antheren-, Pollen-, Eizellen- und Samenentwicklung, Jasmonat, ABA, Trockenstress, Salzstress, Hitzestress	Saure Phosphatase (siehe VSP2); wahrscheinlich an Pathogenantwort beteiligt (wird durch Verwundung und Jasmonat induziert), spielt bei lokaler Antwort auf Herbivoren-Angriff eine wichtige Rolle; ist an Blütenentwicklung beteiligt	Berger et al. 2002 Shi et al. 2010 Chen et al. 2012	1,6
At1g19960	unbekannt	keine Daten	unbekannt		-3,1
At1g02230	NAC domain containing protein 4 (ANAC004)	keine Daten	Transkriptionsfaktor (sequenzspezifische DNA-Bindung); wahrscheinlich an Entwicklungsprozessen beteiligt		-2,6
At3g28510	AAA-type ATPase family protein	Pathogenantwort , abiotischer und biotischer Stress	Nucleosid-Triphosphatase-Aktivität (ATPase-Aktivität); wahrscheinlich an diversen, zellulären Prozessen beteiligt	Snider et al. 2008	-2,4
At3g23010	receptor like protein 36 (RLP36)	Pathogenantwort , osmotischer Stress, durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert	besitzt LRR (leucine-rich repeat)-Motiv, welches möglicherweise der Erkennung von Bindungspartnern dient	Kobe und Kajava 2001	-2,3
At1g66960	terpenoid cyclases family protein	Pathogenantwort, Ozon , Photoperiode, Auxin, durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert, osmotischer Stress	Lupeolsynthese-Aktivität; wahrscheinlich an Terpenbiosynthese beteiligt	Herrera et al. 1998 Christianson 2006	-2,3

Tabelle 2 (Teil III): Auflistung der in der *HIPP3-oe* Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene. Dargestellt sind: AGI-Code; Gen-Name; Bedingungen, unter denen das jeweilige Gen laut Genevestigator reguliert ist (fettgedruckte Bedingungen: besonders starke Regulation); funktionelle Zuordnung der Gene (nach Genevestigator, NCBI und Literaturdaten); Literaturquellen und log₂-Wert (lfc) der differentiellen Regulation. Hoch regulierte Gene wurden rot und herunter regulierte Gene blau unterlegt.

AGI-Code	Gen-Name	Expressionsmuster Genevestigator (Überblick)	Funktionelle Zuordnung	Literatur	Ifc
At3g62100	indole-3-acetic acid inducible protein 30 (IAA30)	Hitzestress, Jasmonat, Potyvirus- Infektion , somatische Embryogenese, durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert, Auxin, Salzstress, De-Etiolierung, Pestizid- behandlung	Mitglied der Auxin/IAA Familie, an Auxin- Signalwegen beteiligt (negative Wirkung auf Auxin-induzierte Genexpression); Target von LEC2 und AGL15, fördert somatische Embryogenese; verstärkt im Wurzelspitzen vorhanden	Sato und Yamamoto 2008 Zheng et al. 2009 Jung und Park 2011	-2,2
At5g56368	putative defensin- like protein 282	keine Daten	unbekannt		-2,1
At2g40610	Expansin A8 (α -Expansin 8) (ATEXPA8)	Auxin, Pathogenantwort, De-Etiolierung, UV-Licht; niedriger pH-Wert, circadianer/ diurnaler Rhythmus, Samenkeimung, Stamenenentwicklung, abiotischer Stress	Zellwand-Lockerung (durch Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellwandpolymeren) beim Streckungswachstum, bei der Frucht- reife, in wachsenden Pollenschläuchen	Cosgrove 2000 Lee et al. 2001 Wieczorek et al. 2006	-2,1
At3g22231	pathogen and circadian controlled 1 (PCC1)	Pathogenantwort, Salicylsäure, SAR, Elicitoren, circadianer / diurnaler Rhythmus, durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert, H ₂ O ₂ , oxidativer Stress, UVB, Kältestress, Trockenstress, Salzstress, Seneszenz, Stärkeabbau, Eisenmangel	circadian-rhythmische Induktion (beein- flusst durch innere Uhr) von Salicylsäure abhängig; wahrscheinlich an Pathogen- antwort und Salicylsäure-Signalwegen beteiligt; wahrscheinlich auch an Ent- wicklungsprozessen wie Blütenbildung (stressinduzierte Blütenbildung) beteiligt	Segarra et al. 2010 Mir et al. 2013	-2,1
At2g46440	cyclic nucleotide- gated ion channel protein 11 (CGNC11)	Ähnlichkeit zu At2g46430 (CNGC12) Pathogenantwort, SAR, FLG22, durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert , Seneszenz, osmotischer Stress, Trocken- Salz- und Kältestress, Nährstoffangebot, Phosphat- und Eisenmangel, ROS, Elicitoren, Chitin	durch zyklische Nucleotide (cAMP, cGMP) gesteuerter Kationen-Kanal; über Beteiligung an Ca ²⁺ -Signalwegen in Entwicklungsprozesse (v.a. Seneszenz) aber auch in Pathogenantwort involviert; agiert zusammen im Team mit CNGC12	Chin et al. 2010 Abdel-Hamid et al. 2011 Urquhart et al. 2011	-1,7
At1g02450	NIM1-interacting 1 (NIMIN1) (NIMIN-1)	Pathogenantwort, Elicitoren, Salicyl- säure, SAR , durch LEAFYCOT/LEC2 reguliert, Samenentwicklung, oxidativer Stress	an Pathogenantwort beteiligt, Kontrolle der koordiniert, in Phasen anlaufenden, systemischen Resistenz (zusammen mit NIMIN-2 und NIMIN-3 durch Interaktion mit NPR1 in Feinregulierung der Salicyl- säure- und NPR1- abhängigen Gen- expression involviert)	Weigel et al. 2005 Fonseca et al. 2010 Maier et al. 2011 Hermann et al. 2013	-1,7

Tabelle 2 (Teil IV): Auflistung der in der *HIPP3-oe* Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene. Dargestellt sind: AGI-Code; Gen-Name; Bedingungen, unter denen das jeweilige Gen laut Genevestigator reguliert ist (fettgedruckte Bedingungen: besonders starke Regulation); funktionelle Zuordnung der Gene (nach Genevestigator, NCBI und Literaturdaten); Literaturquellen und log2-Wert (Ifc) der differentiellen Regulation. Hoch regulierte Gene wurden rot und herunter regulierte Gene blau unterlegt.

7.5 Co-Expressionsanalyse der am stärksten regulierten Gene

Die in der Tabelle 2 aufgelisteten Gene wurden unter Verwendung von Genevestigator (Perturbation-Tool; <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) einer Co-Expressionsanalyse unterzogen. Das dabei gewonnene Datenset ist für die hoch regulierten Gene in Abbildung 29 und für die herunter regulierten Gene in Abbildung 30 dargestellt. Einige, der in Tabelle 2 gelisteten Gene (hoch regulierte Gene: At4g11911, At1g73325, At2g41810, At5g41315 At2g19970 und At2g45080; herunter regulierte Gene: At1g19960, At1g02230 und At5g56368), wurden von Genevestigator aufgrund fehlender Daten nicht mit einbezogen.

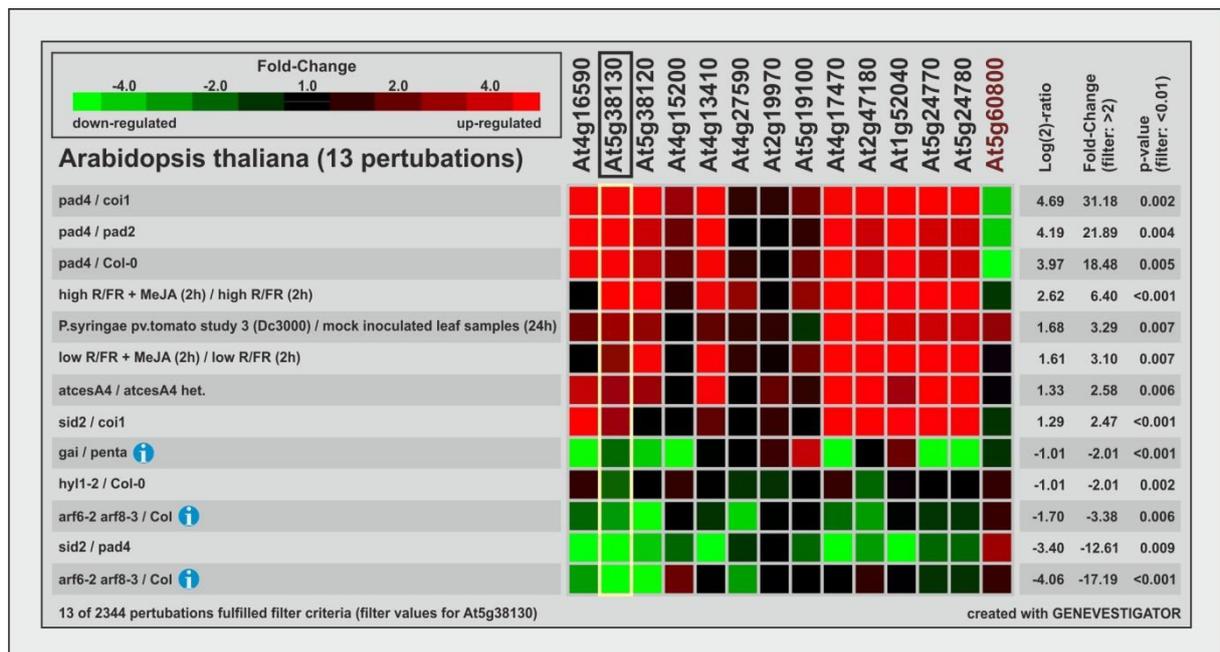


Abbildung 29: Co-Expressionsanalyse der in der *HIPP3-oe* Linie am stärksten hoch regulierten Gene (siehe Tabelle 2). *HIPP3* (At5g60800) ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt (AGI-Code rot hervorgehoben). Mit Hilfe von Genevestigator wurden unterschiedliche Expressionslevel durch unterschiedliche Farben repräsentiert und in Form einer „Heat Map“ dargestellt. Rote Kästchen kennzeichnen zunehmende Expressionslevel, grüne Kästchen hingegen zeigen abfallende Expressionslevel an. Als Vergleichsbasis wurde die differentielle Expression von At5g38130 (eingerahmt) mit den rechts gelisteten Daten gewählt.

Die in der *HIPP3-oe* Linie am stärksten differentiell regulierten Gene zeigen bei einer Reihe von publizierten Array-Analysen ein kohärentes Expressionsmuster. Die herausgefilterten Ergebnisse der komplexen Co-Expressionsanalysen, die auf der Basis von 2344 Datensätzen erstellt wurden, sind in den Tabellen 3A und 3B zusammenfassend dargestellt (Tabelle 3A: in der *HIPP3-oe* Linie hoch regulierte Gene; Tabelle 3B: in der *HIPP3-oe* Linie herunter regulierte Gene). Gene, die bei Überexpression von *HIPP3* am stärksten hoch reguliert sind, werden übereinstimmend induziert, wenn der Salicylatweg der Pathogenantwort durch Mutation beteiligter Komponenten inhibiert wird (PAD4, SID2; Wiermer et al. 2005, Glazebrook et al. 2003) oder wenn der Jasmonatweg durch Zugabe von

Methyljasmonat induziert wird, aber auch, wenn die Pflanzen direkt mit dem hemibiotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae pv. tomato* behandelt werden und wenn durch Mutation von spezifischen Cellulose Synthesen (AtCESA4) die Bildung der sekundären Zellwand inhibiert wird (Betancur et al. 2010).

Dagegen werden die gleichen, in der Überexpressionslinie von *HIPP3* (*HIPP3-oe* Linie) hoch regulierten Gene, übereinstimmend reprimiert, wenn DELLA abhängige Gibberellinsäure-Signalwege beeinflusst werden, die die Samen- und Blütenbildung regulieren (Hauvermale et al. 2012), wenn Auxin abhängige Signalwege inaktiviert werden, die ebenfalls die Samen- und Blütenbildung steuern (Nagpal et al. 2005) und wenn miRNA abhängige Signalwege der Samenentwicklung und Stamen-Entwicklung durch Mutation von HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) gestört werden (Duarte et al. 2013, Lian et al. 2013). Ebenfalls herunter reguliert sind diese Gene in *sid2 knockout* Linien im Vergleich zu *pad4 knockout* Linien (beides sind Komponenten des Salicylsäure-Signalweges, Glazebrook et al. 2003).

	zeigen ähnliche Expressionsmuster bei folgenden Bedingungen:	relevant für folgende biologische Prozesse:
	<i>pad4 knockout</i> (<i>pad4 k.o.</i> vs. <i>coi1 k.o.</i> ; <i>pad4 k.o.</i> vs. <i>pad2 k.o.</i> ; <i>pad4 k.o.</i> vs. Col-0)	Pathogenantwort: PAD4-abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	<i>sid2 knockout</i> (<i>sid2 k.o.</i> vs. <i>coi1 k.o.</i>)	Pathogenantwort: SID2-abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	<i>P. syringae pv. tomato</i> -Behandlung	Pathogenantwort
	Methyljasmonat -Behandlung (bei unterschiedlichen Lichtbedingungen)	Pathogenantwort: Jasmonsäure-Signalweg aktiviert
	<i>atcesA4 knockout</i>	Bildung der sekundären Zellwand: Cellulose-Synthese inhibiert
	<i>gai knockout</i> (<i>gai k.o.</i> vs. <i>penta k.o.</i> [alle DELLA Gene mutiert])	Samen- und Blütenbildung: DELLA abhängige Gibberellinsäure-Signalwege beeinflusst
	<i>arf6-2 arf8-3 double knockout</i> (<i>arf6-2 arf8-3</i> vs. Col-0)	Samen- und Blütenbildung: ARF-TF abhängige Auxin-Signalwege inhibiert
	<i>hyl1-2 knockout</i> (<i>hyl1-2 k.o.</i> vs. Col-0)	Samenentwicklung: miRNA abhängige Signalwege inhibiert
	<i>sid2 knockout</i> (<i>sid2 k.o.</i> vs. <i>pad4 k.o.</i>)	Pathogenantwort: Modulation von Salicylsäure -Signalweg-Komponenten

Tabelle 3A: Zusammenfassung der Co-Expressionsanalysen der Gene, die in der *HIPP3-oe* Linie hoch reguliert werden. Rot unterlegt sind die Bedingungen bzw. biologischen Prozesse, bei denen die Gene dieser Gruppe gleichermaßen induziert werden. Die grün unterlegten Bereiche zeigen hingegen Bedingungen an, bei denen die in der *HIPP3-oe* Linie hoch regulierten Gene übereinstimmend reprimiert werden.

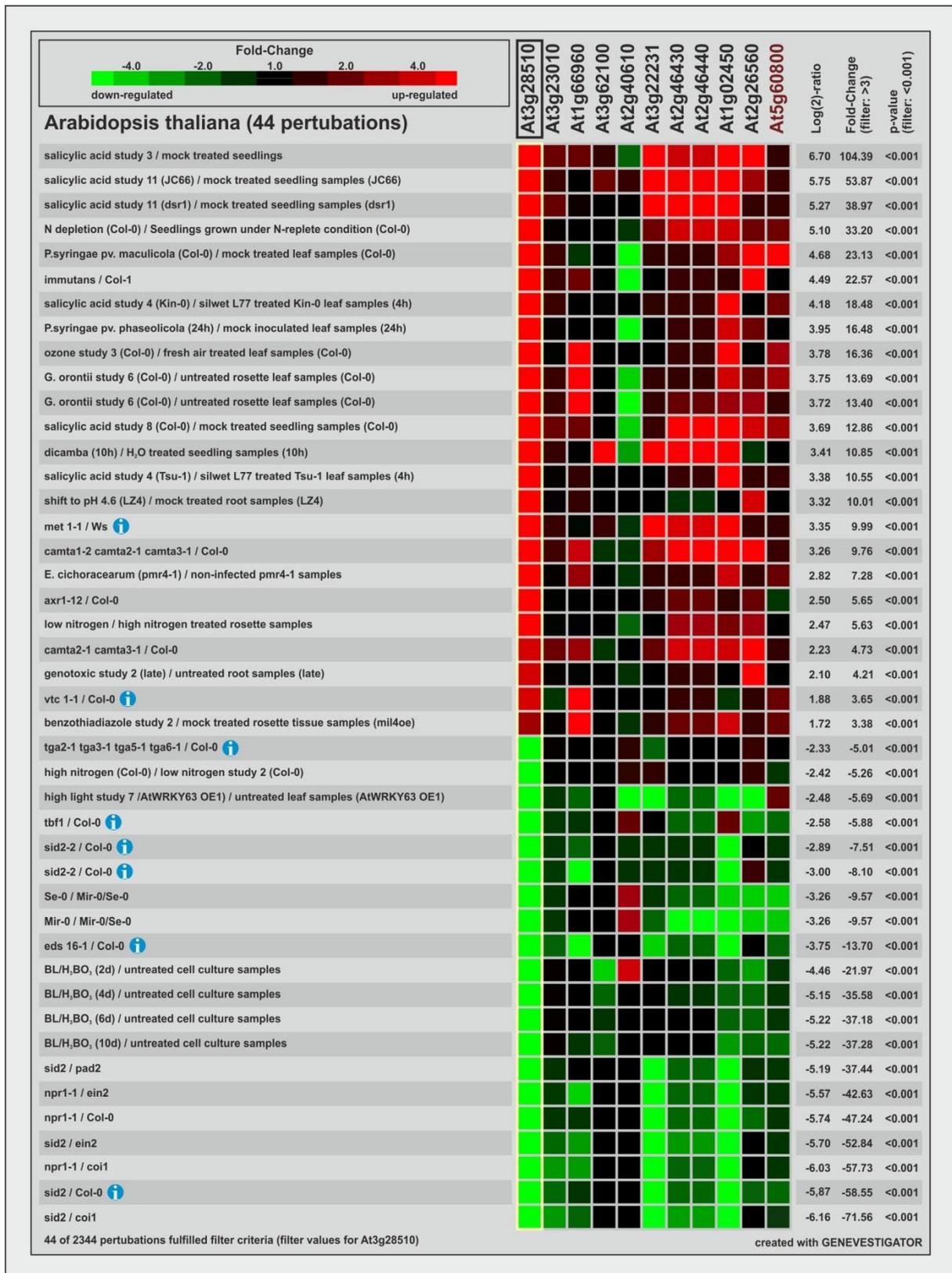


Abbildung 30: Co-Expressionsanalyse der in der *HIPP3-oe* Linie am stärksten herunter regulierten Gene (siehe Tabelle 2). *HIPP3* (At5g60800) ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt (AGI-Code rot hervorgehoben). Mit Hilfe von Genevestigator wurden unterschiedliche Expressionslevel durch unterschiedliche Farben repräsentiert und in Form einer „Heat Map“ dargestellt. Rote Kästchen kennzeichnen zunehmende Expressionslevel, grüne Kästchen hingegen zeigen abfallende Expressionslevel an. Als Vergleichsbasis wurde die differentielle Expression von At3g28510 (eingerahmt) mit den rechts gelisteten Daten gewählt.

	zeigen ähnliche Expressionsmuster bei folgenden Bedingungen:	relevant für folgende biologische Prozesse:
Induktion	Salicylsäure -Behandlung	Pathogenantwort: Salicylsäure-Signalweg aktiviert
	<i>P. syringae pv. maculicola</i> -Behandlung	Pathogenantwort
	<i>P. syringae pv. phaseolica</i> -Behandlung	Pathogenantwort
	<i>E. cichoracearum</i> -Behandlung	Pathogenantwort (Mehltau Pilz)
	<i>G. orontii</i> -Behandlung	Pathogenantwort (Mehltau Pilz)
	Stickstoff-Mangelbedingungen	Stickstoff-Verfügbarkeit reduziert
	<i>immutans</i> (Oxidase Mutante)	Chloroplastenentwicklung gestört
	Ozon -Behandlung	oxidativer Stress: Bildung von ROS
	<i>met1-1 knockout</i> (<i>met1-1 k.o.</i> vs. Ws)	epigenetische Kontrolle: Methyltransferase abhängige Entwicklungsprozesse gestört
	<i>axr1-12 knockout</i> (<i>axr1-12 k.o.</i> vs. Col-0)	Entwicklungsprozesse: AXR1 abhängige Auxin-Signalwege inhibiert
	Dicamba -Behandlung (Herbizid)	Auxin abhängige Signalwege gestört
	<i>camta knockout</i> (<i>camta k.o.</i> vs. Col-0)	Trockenstressantwort: CAMTA-TF abhängige abiotische Stressreaktionen inhibiert
Repression	<i>tbf1 knockout</i> (<i>tbf1 k.o.</i> vs. Col-0)	Pathogenantwort: TBF1-TF abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	<i>sid2 knockout</i> (<i>sid2 k.o.</i> vs. <i>pad2 k.o.</i> ; <i>sid2 k.o.</i> vs. <i>ein2 k.o.</i> ; <i>sid2 k.o.</i> vs. <i>coi1 k.o.</i> ; <i>sid2 k.o.</i> vs. Col-0)	Pathogenantwort: SID2 abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	<i>eds1 6-2 knockout</i> (<i>eds1 6-2 k.o.</i> vs. Col-0)	Pathogenantwort: EDS1 abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	<i>npr1 knockout</i> (<i>npr1 k.o.</i> vs. <i>coi1 k.o.</i> ; <i>npr1 k.o.</i> vs. Col-0)	Pathogenantwort: NPR1 abhängiger Salicylsäure-Signalweg inhibiert
	Starklicht-Bedingungen (<i>AtWRKY63-oe</i>)	abiotische Stressantwort: AtWRKY63-TF abhängiger Starklicht-Signalweg aktiviert
	Brassinolid -Behandlung (BL/H ₃ BO ₃)	Brassinosteroid-Signalwege beeinflusst

Tabelle 3B: Zusammenfassung der Co-Expressionsanalysen der Gene, die in der *HIPP3-oe* Linie herunter reguliert werden. Rot unterlegt sind die Bedingungen bzw. biologischen Prozesse, bei denen die Gene dieser Gruppe gleichermaßen induziert werden. Die grün unterlegten Bereiche zeigen hingegen Bedingungen an, bei denen die in der *HIPP3-oe* Linie hoch regulierten Gene übereinstimmend reprimiert werden.

Bei Betrachtung der Gene, die in der *HIPP3-oe* Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle deutlich herunter reguliert sind (siehe Tabelle 2), zeigt sich ein eher gegenläufiges Bild. Diese Gene werden bis auf eine Ausnahme (*ATEXPA8*; At2g40610) dann einheitlich

induziert, wenn der Salicylsäure-Signalweg der Pathogenantwort durch Zugabe von Salicylat aktiviert wurde und wenn die Pflanzen mit verschiedenen Pathogenen behandelt wurden.

Sie werden fast alle auch unter Stickstoff- Mangelbedingungen, in der *immutans*-Mutante (Aluru et al. 2006), nach Ozon-Behandlung und in der *met1-1* Mutante, bei der die epigenetische Kontrolle von Entwicklungsprozessen beeinflusst ist (Kankel et al. 2003), hoch reguliert. Ebenfalls induziert werden sie, wenn Auxin abhängige Signalwege gestört werden (Timpte et al. 1995) oder in Mutanten der für abiotische Stressreaktionen wichtigen CAMTA Transkriptionsfaktoren (Kim et al. 2013, Pandey et al. 2013).

Gleichermaßen herunter reguliert sind diese Gene in Starklicht behandelten Überexpressionslinien des Transkriptionsfaktors WRKY63, nach Brassinosteroid-Behandlung und in Mutanten, bei denen verschiedene Schritte des Salicylsäure-Signalwegs inhibiert sind (in *tbf1*-Mutanten, *sid2*-Mutanten, *eds1*-Mutanten und *npr1*-Mutanten, Pajerowska-Mukhtar et al. 2012, Pajerowska-Mukhtar et al. 2013).

Die übereinstimmenden Expressionsmuster der durch die Überexpression von HIPP3 beeinflussten Gene legen nahe, dass HIPP3 eine regulatorische Funktion bei der Salicylat abhängigen Pathogenantwort, sowie in Signalwegen der Blüten- und Samenentwicklung und bei abiotischen Stressreaktionen hat. Ein Modell, das auf der Basis dieser und weiterer Ergebnisse einen Erklärungsvorschlag für die funktionelle Einordnung von HIPP3 in diese Prozesse liefert, wird in der zusammenfassenden Diskussion (Abbildung 32) vorgestellt

Überexpression von HIPP3 beeinflusst die Expression von spezifischen Genklassen (Teil I)

Die Überexpression von HIPP3 bewirkt eine deutliche Veränderung im Expressionsmuster von *Arabidopsis thaliana*. Etwa 400 Gene sind im Vergleich zur Leervektor-kontrolle deutlich herauf- oder herunter reguliert. Interessant ist, dass die Überexpression von HIPP3 etwa gleichermaßen eine Induktion wie auch eine Reprimierung von Genen zur Folge hat, was auf eine bidirektionale regulatorische Wirkung hinweist.

Überexpression von HIPP3 beeinflusst die Expression von spezifischen Genklassen (Teil II)

Ein hoher Prozentsatz der differentiell regulierten Gene ist den funktionellen Klassen Pathogenantwort, Entwicklungsprozesse, regulatorische Prozesse und Transportvorgänge zuzuordnen, was eine Beteiligung von HIPP3 an der Regulation dieser Prozesse nahe legt. Eine detaillierte Datenbankrecherche zu den 100 am stärksten differentiell regulierten Genen untermauert diesen Befund. Sie belegt, dass viele dieser in der *HIPP3-oe* Linie differentiell regulierten Gene mit biotischem aber auch abiotischem Stress, mit der Samen- und Blütenentwicklung und Eisen-, Schwefel- und Phosphatmangel assoziiert sind. Außerdem werden viele dieser Gene in Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren LEAFYCOT/LEC2 und LEAFY reguliert. Es zeigt sich auch, dass viele der Gene jeweils mit mehreren der genannten Prozesse assoziiert sind.

Eine Co-Expressionsanalyse der Gene, die bei Überexpression von HIPP3 am stärksten differentiell reguliert werden, belegt ein kohärentes Expressionsverhalten, das auf eine inhibitorische Wirkung von HIPP3 auf die über PAD4 regulierte Salicylat abhängige Pathogenantwort und auf eine Interaktion mit Prozessen der Samen- und Blütenentwicklung und pflanzlicher Stressantworten hindeutet.

8. Die Überexpression von HIPP3 bewirkt eine verzögerte Entwicklung der Infloreszenz

Um einen möglichen Einfluss von HIPP3 auf die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden Wildtyppflanzen (Col-0), zwei pCB Leervektor-Kontrolllinien (Linie 186-78 und Linie 187-2), die *hipp3-1 knockdown* Mutante (Linie 28-23-74) und die beiden Überexpressionslinien (Linie 131-1 und Linie 133-5) unter standardisierten Bedingungen in einer Klimakammer kultiviert und die Entwicklungsverläufe phänotypisch dokumentiert. Nur die Überexpressionslinien von HIPP3 (*HIPP3-oe*) zeigten unter diesen Bedingungen eine Abweichung vom normalen Entwicklungsverlauf, nämlich eine zeitlich verzögerte Ausbildung des Blütenstandes. Die phänotypischen Unterschiede der *HIPP3-oe* Linien sind in Abbildung 30 im Vergleich zu den Leervektorkontrollen exemplarisch dargestellt. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Pflanzen unter standardisierten Langtagbedingungen (14h Licht [100 μ E/m²s] bei 23°C, 10h Dunkelheit bei 18°C und einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 60%) in einer Klimakammer angezogen. Unter diesen Bedingungen ist die Ausbildung der Infloreszenz in den Leervektorkontrollen (Linie 186-78 und Linie 187-2) mit bloßem Auge bei den ersten Pflanzen ca.43 Tage nach der Aussaat zu erkennen. Der Tag, an dem die ersten Pflanzen erkennbare Infloreszenzen aufwiesen, wurde im Diagramm von Abbildung 30 als Tag 1 bezeichnet. Aufgetragen wurde an diesem Tag und den Folgetagen jeweils der prozentuale Anteil der Pflanzen, bei denen die Infloreszenz bereits sichtbar war. Die Grafik zeigt, dass die Blühinduktion der *HIPP3-oe* Linien (Linie 131-1 und Linie 133-5), im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (Linie 186-78 und Linie 187-2), deutlich verzögert stattfindet. Dies wird auch durch die im unteren Teil von Abbildung 30 dargestellten Bilder von repräsentativen Pflanzen der pCB Leervektorlinie 187-2 und der *HIPP3-oe* Linie 133-5 dokumentiert. Die untersuchten Pflanzen der beiden *HIPP3-oe* Linien wiesen zu Beginn der Blütenbildung zudem erkennbar mehr Rosettenblätter auf als die Kontrollpflanzen der beiden Leervektorlinien. Während die Pflanzen der Leervektorkontrollen zum Zeitpunkt der beginnenden Blütenbildung im Durchschnitt 22 Rosettenblätter hatten, wurden bei den Pflanzen der *HIPP3-oe* Linien im Durchschnitt 26 Rosettenblätter gezählt.

Verzögerte Entwicklung der Infloreszenz bei Überexpression von HIPP3

Die Ausbildung der Infloreszenz ist in Pflanzen, die HIPP3 überexprimieren, deutlich verzögert. Dies weist auf eine Beteiligung von HIPP3 an der Regulation der Blühinduktion hin.

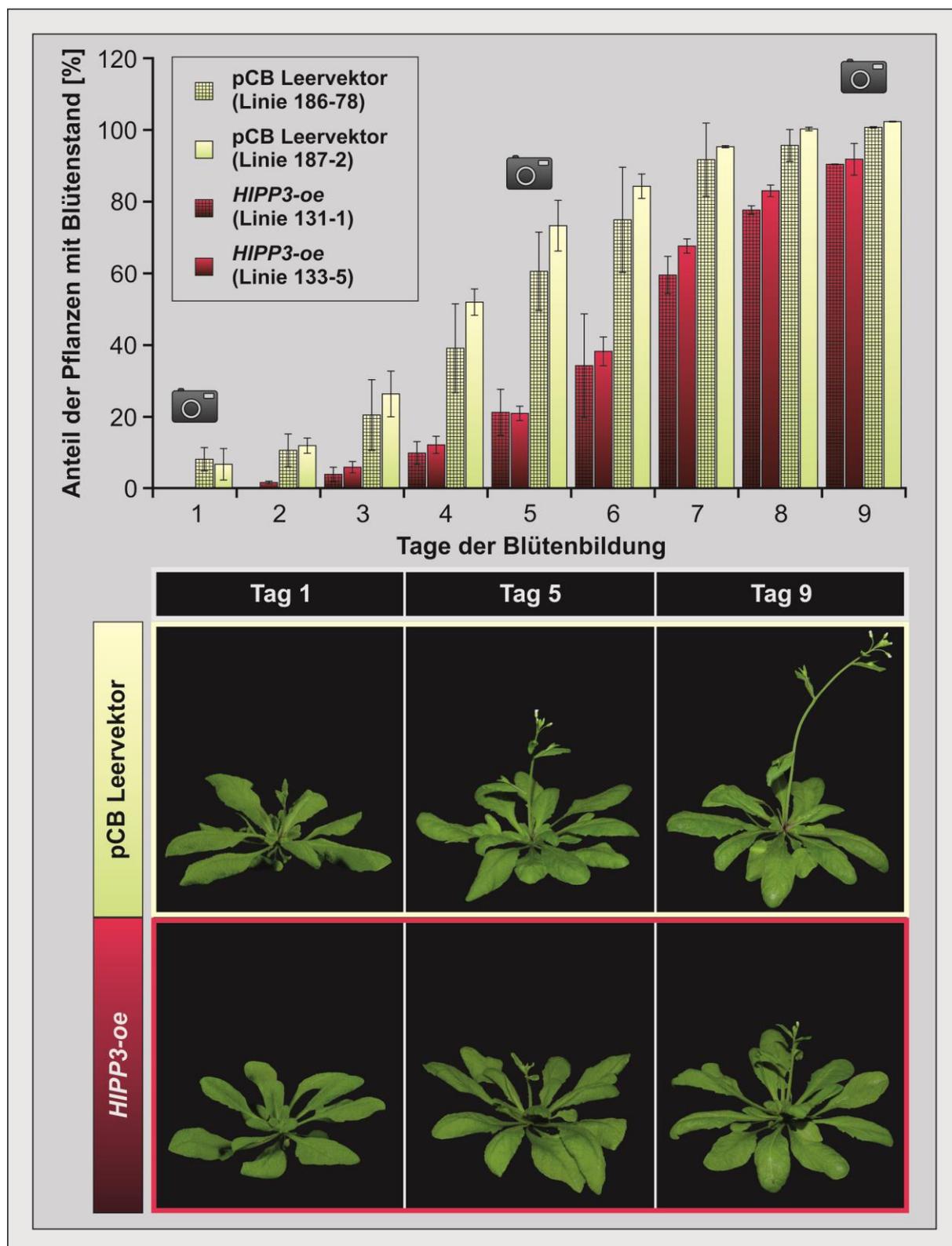


Abbildung 31: Verzögerte Ausbildung der Infloreszenz in den untersuchten *HIPP3-oe* Linien. Der prozentuale Anteil der Pflanzen der Leervektor-Kontrolllinien (Linie 186-78 und Linie 187-2) und der *HIPP3-oe* Linien (Linie 131-1 und Linie 133-5) mit sichtbarer Infloreszenz wurde in drei unabhängigen Experimenten von dem Tag an, als die ersten Infloreszenzen zu erkennen waren (als Tag 1 bezeichnet), dokumentiert. Unten sind zu drei Zeitpunkten (Tag 1, Tag 5 und Tag 9) repräsentative Pflanzen der Leervektorkontrollen und der *HIPP3-oe* Linien dargestellt. Sowohl die Grafik als auch die Fotos der Pflanzen belegen, dass die Blühinduktion der *HIPP3-oe* Linien im Vergleich zu den Leervektorkontrollen deutlich verzögert stattfindet.

V DISKUSSION

1. HIPP3 ist ein isoprenyliertes Protein, das Zink bindet und im Zellkern lokalisiert ist

Alle Proteine der nur in Gefäßpflanzen vorkommenden HIPP-Familie besitzen per Definition ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv und mindestens eine Schwermetallbindedomäne (HMA-Domäne) (Dykema et al. 1999, Barth et al. 2009). HIPP3 zeichnet sich dadurch aus, dass es insgesamt zwei HMA-Domänen mit dem darin enthaltenen für die Schwermetallbindung essentiellen M/L/IxCxxC [M: Methionin, L: Leucin, I: Isoleucin, C: Cystein, x: beliebige Aminosäure] Motiv besitzt. Ein mit der ePlant Plattform (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>) errechnetes HIPP3 Proteinmodell zeigt eine exponierte Lage der beiden Metallbindestellen an zwei gegenüberliegenden Positionen (Abbildung 6). Diese exponierte Lage des Metalls könnte auf Interaktionen von HIPP3 mit anderen Proteinen hindeuten, bei denen das gebundene Schwermetall entweder übergeben wird, oder aber an der Interaktion beteiligt ist. Proteine mit HMA-Domänen sind bekannt als Metall-Transport-Proteine und Metallchaperone, die Metalle zu einem Zielprotein bringen können, mit dem sie interagieren (Tehseen et al. 2010). Bekannte Beispiele sind die Cu, Zn oder Cd transportierenden HMA-ATPasen (Wong und Cobbett 2009, Mikkelsen et al. 2012) und Metallchaperone wie ATX1, die zuerst in Hefe und dann auch in vielen anderen Organismen gefunden wurden (z.B. Puig et al. 2007, Himmelblau et al. 1998). Die Analyse der an in *E. coli* exprimiertem HIPP3 gebundenen Metalle spricht für eine spezifische Bindung von Zink (Abbildung 13). Wenn die zentralen Cysteine der beiden Schwermetallbindedomänen von HIPP3 durch Glycine ersetzt werden, kommt es folgerichtig nicht zur Bindung von Zink. Zink ist ein essentielles Element für alle Lebewesen und liegt in biologischen Systemen oxidiert als Zn(II) vor. Zink fungiert als katalytischer oder struktureller Cofaktor vieler Proteine. Dazu gehören unter anderem Enzyme wie die Carboanhydrase oder die Alkoholdehydrogenase, aber auch DNA-bindende Transkriptinsfaktoren mit einem Zink-Finger Motiv (Sinclair und Krämer 2012). Zink(II) ist eine starke Lewis-Säure, was für die Interaktion mit verschiedenen Liganden von Bedeutung ist, und führt im Gegensatz zu anderen Schwermetallen wie Kupfer oder Eisen im biologischen System keine Redoxreaktionen aus. Es ist also keine Komponente von Elektronentransportketten (Sinclair und Krämer 2012). Zink ist unter den normalen physiologischen Bedingungen in lebenden Zellen chemisch relativ inert gegenüber anderen Makromolekülen wie der DNA. Konsequenterweise findet man Zink auch vermehrt in Proteinen, die im Zellkern lokalisiert sind (Dupont et al. 2010). Auch für HIPP3 konnte die durch die Anwesenheit von vier Kernlokalisierungssequenzen vorhergesagte Kernlokalisierung durch heterologe Expression eines mit GFP markierten Fusionsproteins in Zwiebelepidermiszellen bestätigt werden (Abbildung 8). Zusätzlich waren Signale im Cytoplasma zu sehen, was auf eine duale Lokalisation von HIPP3 hindeutet. Generell sind

die Präsenz von vier NLS-Sequenzen und die Lokalisierung des mit GFP markierten Proteins im heterologen System zwar starke Hinweise, aber keine endgültigen Beweise für die entsprechende Lokalisierung des nativen Proteins im Kern von *Arabidopsis*-Zellen. Unterstützt werden die Befunde durch bereits veröffentlichte Lokalisationsstudien von anderen HIPP-Proteinen. Barth et al. (2009) konnten für HIPP26 in einem ähnlichen Ansatz eine Kernlokalisierung belegen. de Abreu-Neto et al. (2013) konnten in Reisprotoplasten ebenfalls eine Kernlokalisierung von zwei Vertretern der HIPP-Proteinfamilie, OsHIPP21 und OsHIPP41, über gekoppeltes RFP im Mikroskop nachweisen. Diese Autoren konnten für beide Proteine auch eine zusätzliche Lokalisation im Cytoplasma belegen. Das Vorhandensein des C-terminalen Isoprenylierungsmotivs spricht dafür, dass HIPP3 entweder farnesyliert oder geranylgeranyliert vorliegen kann. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Rausche 2012) konnte dies experimentell bestätigt werden. Dabei ist die Bindung von HIPP3, welches aus der *Arabidopsis thaliana* HIPP3-oe Linie isoliert wurde, an einen anti-Farnesylantikörper, der Farnesylreste, aber auch unspezifisch Geranylgeranylreste erkennt, mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen worden. Durch die Isoprenylierung eines Proteins wird ein hydrophober Anker angehängt, der Interaktionen mit Membranen und/oder hydrophoben Proteinen ermöglicht (Rodriguez-Concepcion et al. 1999). Isoprenylierte Proteine spielen aufgrund dieser Eigenschaft oft eine Rolle als regulatorische Komponenten in Signalwegen, sind beteiligt am Vesikeltransport, an der Organisation des Zytoskeletts, im Zellzyklus und bei der Assemblierung und Deassemblierung der Kernmembran (Crowell 2000). In wie weit die Isoprenylierung eine Bedeutung für die Funktion und/oder Lokalisation von HIPP3 hat, müsste in zukünftigen Experimenten, bei denen die Isoprenylierung durch Mutation des für die Bindung essentiellen Cysteins im C-terminalen Isoprenylierungsmotiv unterbunden wird, analysiert werden. In ähnlichen Experimenten konnten Barth et al. (2009) für HIPP26 zeigen, dass eine Mutation im Isoprenylierungsmotiv eine Veränderung im Verteilungsmuster von HIPP26 im Kern hat, was auf eine Rolle der Isoprenylierung bei der exakten Lokalisation von HIPP26 hinweist.

Welche molekulare Funktion hat ein isoprenyliertes Protein, das Zink bindet, im Zellkern und möglicherweise auch noch zusätzlich im Cytoplasma lokalisiert ist? Bis jetzt gibt es nur wenige Veröffentlichungen zur Funktion von HIPP-Proteinen, die entweder auf eine Funktion in der Metallhomöostase bzw. Entgiftung von Schwermetallen oder auf eine regulatorische Funktion bei abiotischen und biotischen Stressbedingungen (de Abreu-Neto et al. 2013) hindeuten. Für ein HIPP-Protein (HIPP6 alias Cd19) konnten Suzuki et al. (2002) eine Beteiligung an der Ausbildung der Toleranz gegenüber Cadmium-Stress belegen. Hinweise für eine Schutzfunktion weiterer HIPP-Proteine (HIPP20, HIPP21, HIPP22) wurden kürzlich von Tehseen et al. (2010) publiziert. Diese Autoren konnten zeigen, dass die *Arabidopsis* Triple-Mutante *hipp20/21/22* sensitiver gegenüber Cadmium-Stress ist und diskutieren eine

Schutzfunktion dieser HIPP-Proteine durch Bindung und damit Detoxifikation von Cadmium. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass HIPP-Proteine auch eine regulatorische Funktion innerhalb von Signalwegen der abiotischen und biotischen Stressantwort ausüben können. So konnten Barth et al. (2009) für das kernlokalisierte HIPP26 eine Interaktion mit dem in die Trockenstressantwort der Pflanzen involvierten Zink-Finger-Transkriptionsfaktor ATHB29 (Tran et al. 2007) belegen. Weiterhin konnten diese Autoren zeigen, dass *HIPP26* unter abiotischen Stressbedingungen (Kälte, Salzstress, Trockenheit) induziert wird und dass in *HIPP26* Mutanten die Expression von Zielgenen von ATHB29 deutlich niedriger als im Wildtyp ist. Auch de Abreu-Neto et al. (2013) diskutieren aufgrund von stressabhängigen Expressionsmustern eine Beteiligung eines HIPP-Proteins aus Reis (OsHIPP41) an der Antwort auf Kälte- und Trockenstress. Arbeiten von Fukuoka et al. (2009) und Nakao et al. (2011) belegen für ein anderes HIPP-Protein aus Reis (OsHIPP05) eine Funktion bei der Pathogenabwehr. Dieses Protein moduliert primäre biotische Stressantworten und scheint eine Rolle bei der Ausprägung dauerhafter Resistenz gegen Pilzbefall zu spielen.

Für das isoprenylierte Protein HIPP3, das Zink bindet und im Kern (und eventuell zusätzlich auch im Cytosol) lokalisiert ist, stellen sich die Fragen, ob es an der Zink-Homöostase beteiligt ist, ob es als Zink-Chaperon wirkt, also Zink zu Zielproteinen wie z.B. Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren bringt und damit als regulatorischer Faktor deren Aktivität beeinflussen kann, oder ob es anderweitig in Signalketten über die entsprechend gebundenen Metalle mit anderen Proteinen interagieren kann. Eine regulatorische Funktion von Proteinen mit HMA-Domänen über den Austausch von Metallionen wurde bereits für die Steuerung bakterieller Gene zur Kupfer-Homöostase beschrieben. Gene für die Kupferhomöostase werden durch das *cop*-Operon gesteuert. Dabei kann das HMA-Domänenprotein CopZ Kupfer an den Repressor CopY abgeben, wobei das für die Repressorfunktion essentielle Zink durch das Kupfer verdrängt wird und damit der Repressor inaktiviert wird (Cobine et al. 1999, Solioz und Stoyanov 2003).

2. HIPP3 interagiert mit regulatorischen Proteinen der Blüten- und Samenentwicklung

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, über einen Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz potentielle Interaktionspartner von HIPP3 zu identifizieren. Dazu wurden cDNA-Bibliotheken verwendet, die mittels RNA aus Blütenständen von *Arabidopsis thaliana* generiert wurden. Diese Experimente führten zur Identifizierung von drei potentiellen Interaktionspartnern (Abbildung 9), der Arogenat-Dehydratase (At1g11790), der Proteinkinase WNK8 (At5g41990) und dem Transkriptionsrepressor ASIL1 (At1g54060). Zum einen sind die Interaktionen dieser Proteine mit HIPP3 aufgrund der Beschränkungen des Hefe-Zwei-Hybridsystems, bei dem

Interaktionspartner mit schwachen und räumlich und zeitlich spezifischen Interaktionen oft nicht detektiert werden, noch mit anderen experimentellen Ansätzen wie z.B. Immunpräzipitation oder FRET zu verifizieren. Zum anderen wurden zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner cDNA-Bibliotheken verwendet, die auf RNA aus Blütenständen basieren. Deswegen könnten weitere Interaktionspartner, die nicht in Blüten exprimiert werden, nicht erfasst worden sein. In weiterführenden Experimenten sollten auch andere cDNA-Bibliotheken zum Einsatz kommen und die Interaktionen dann ebenfalls mit anderen Techniken verifiziert werden. Trotzdem bieten die durchgeführten Experimente erste Hinweise auf mögliche Interaktionspartner, insbesondere in der Blüte.

Die Arogenat-Dehydratase 1 (At1g11790) kodiert für ein Plastiden-lokalisiertes Enzym, das in der Phenylalanin-Biosynthese involviert ist (Cho et al. 2007, Rippert et al. 2009). Phenylalanin ist in Pflanzen neben seiner Rolle als Aminosäure bei der Proteinbiosynthese ein wichtiger Baustein für aromatische Verbindungen, die als Pigmente oder als Schutzstoffe (z.B. Anthocyane, Lignane, Phytoalexine) bei der Antwort auf abiotische und biotische Stresssituationen eine Rolle spielen. Publierte Daten zur Expression der Arogenat-Dehydratase 1 (Genevestigator-Datenbank, <https://www.genevestigator.com>) belegen eine erhöhte Expression bei Pathogenbefall, in Abhängigkeit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und im Zusammenhang mit der Zellwand-Biosynthese. Allerdings konnte für HIPP3 keine Lokalisation in Plastiden nachgewiesen werden. Ob es *in vivo* tatsächlich zu einer Interaktion von HIPP3 und der Arogenat-Dehydratase 1 kommt, ist also unklar. In diesem Zusammenhang sind auch Studien zur Spezifität der Interaktion der Arogenat-Dehydratase 1 von Bedeutung (Diplomarbeit S. Förster). Umfangreiche Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen zeigten eine Interaktion dieses Proteins auch mit weiteren HIPP-Proteinen, was ebenso wie die plastidäre Lokalisation auf eine falsch-positive oder zumindest auf eine unspezifische Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktion hindeutet. Dagegen konnte im Rahmen dieser Studien eine spezifische Interaktion von HIPP3 mit dem Transkriptionsfaktor ASIL 1 (siehe unten) bestätigt werden. Ein weiteres potentielles mit HIPP3 interagierendes Protein ist die Proteinkinase WNK8 (With-No-Lysine, auch EIP1 genannt; At5g41990). Diese Proteinkinase ist im Kern lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Regulation der Blütenbildung und bei der Pathogenabwehr (Wang et al. 2008, Tsuchiya und Eulgem 2010, Park et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass WNK8 mit EMF1 (EMBRYONIC FLOWER 1), einem Regulator für den Blühzeitpunkt und die Samenentwicklung (Park et al. 2011), und mit dem an der Blühinduktion und der Pathogenabwehr beteiligten Protein EDM2 (ENHANCED DOWNY MILDEW 2) (Tsuchiya und Eulgem 2010) interagiert. Die Analyse der Genevestigator Datenbank (<https://www.genevestigator.com>) zeigt für WNK8 insbesondere eine Regulation in Abhängigkeit von der Pollenentwicklung. Das dritte gefundene, potentiell mit HIPP3 interagierende Protein ist ASIL1 (Arabidopsis 6b-interacting protein 1-like 1; At1g54060).

Dieses Protein gehört zu der Trihelix Familie pflanzlicher Transkriptionsfaktoren und wurde als Regulator der Samenentwicklung beschrieben (Gao et al. 2009 und 2011). Mutantanalysen zeigten einen Einfluss von ASIL1 auf die Expression wichtiger Gene der Samenentwicklung, z.B. *LEAFY COTYLEDON1* und 2 (*LEC1*, *LEC2*), *FUSCA3* (*FUS3*) und *ABA INSENSITIVE 3* (*ABI3*) (Gao et al. 2009). ASIL1 wird insbesondere während der Samenentwicklung, und zu einem geringeren Ausmaß auch als Antwort auf einen Pathogenbefall induziert (Genevestigator, <https://www.genevestigator.com>).

Auch wenn die beschriebenen Hefe-Zwei-Hybrid Experimente noch keine umfassenden und abgesicherten Aussagen erlauben, fällt doch auf, dass solche Interaktionspartner identifiziert wurden, die bei der Pathogenabwehr und/oder der Blüten- und Samenentwicklung eine Rolle spielen. Dies deutet auf eine mögliche regulatorische Funktion von HIPP3 bei diesen Prozessen hin.

3. HIPP3 wird bei Pathogenbefall induziert und bei abiotischem Stress reprimiert

Frühere Publikationen belegen einen Anstieg im Transkriptgehalt einiger HIPP-Proteine bei verschiedenen abiotischen Stressbedingungen, wie z.B. Kälte, Salzstress, Trockenstress oder Schwermetallstress (Barth et al. 2009, Suzuki et al. 2002). Dies könnte auf eine Funktion dieser HIPP-Proteine bei der abiotischen Stressantwort hinweisen. HIPP3 zeigt dagegen eine starke Induktion nach Inokulation der Pflanzen mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* (Abbildung 16), und eine Repression bei Trockenstress bzw. bei ABA-Zugabe (Abbildungen 14 und 15). Dieses Expressionsmuster spiegelt sich auch in den in der Genevestigator-Datenbank (<https://www.genevestigator.com>) und der Arabidopsis-eFP-Browser Datenbank (Winter et al. 2007) publizierten Expressionsdaten wider. Die dort publizierten Expressionsdaten belegen darüber hinaus eine erhöhte Expression während der Blütenbildung und eine starke Repression von *HIPP3* während späterer Stadien der Samenentwicklung.

Eine Co-Expressionsanalyse (Abbildung 20, Co-Expression Viewer von ATTED II, <http://atted.jp/>) unter Nutzung von 1388 publizierten Genchip-Datensätzen zeigt auffallend übereinstimmende Expressionsmuster mit Genen, die an der Salicylat abhängigen Pathogenantwort der Pflanzen beteiligt sind (z.B. disease resistance protein 'ADR1', NIM1-interacting protein 1 'NIMIN-1', WRKY-Transkriptionsfaktoren 'WRKY38/54/62'). Ein sehr ähnliches Expressionsverhalten zeigen auch zwei weitere HIPP-Proteine, HIPP13 und HIPP14, und die Zink-haltige E3 Ubiquitin-Protein Ligase XBAT34. Für all diese Proteine wird eine Beteiligung an der Pathogenantwort vorhergesagt (NCBI, Gene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Die starke Induktion von *HIPP3* als Antwort auf Pathogenbefall und die große Übereinstimmung im Expressionsmuster mit Salicylat abhängigen, an der Pathogenantwort beteiligten Genen spricht für eine Beteiligung von *HIPP3* an der pflanzlichen Abwehrreaktion gegen Pathogene. Eine genauere Betrachtung des Expressionsverhaltens von *HIPP3* in Antwort auf Pathogenbefall zeigt ein für viele PR-Gene (*Pathogen Response*-Gene) typisches Verhalten. *HIPP3* wird bei einem Befall mit einem virulenten Stamm nur langsam hoch reguliert. Die Transkriptgehalte steigen jedoch bei einer Inokulation mit einem Stamm, bei dem durch das Avirulenzprotein AvrRpm1 eine ETI (*effector triggered immunity*) ausgelöst wird, sehr rasch an. Die deutliche Repression bei Trockenstress und ABA-Zugabe weisen darüber hinaus auch auf eine Beteiligung an abiotischen Stressreaktionen hin.

4. *HIPP3* als möglicher Regulator in Signalwegen der Blüten- und Samenentwicklung, und der Pathogenabwehr

Zur funktionellen Analyse wurden *Arabidopsis thaliana* Mutanten verwendet, bei denen die Expression von *HIPP3* entweder herunter, oder herauf reguliert ist. Die eingesetzte *hipp3-1 knockdown* Mutante wurde vom Nottingham Arabidopsis Stock Center bezogen und hat eine T-DNA Insertion im Bereich des 5'-UTR (*untranslated region*). Die Expression von *HIPP3* ist in dieser Mutante zwar deutlich herunter reguliert (etwa 19% vom Wildtyp), ist aber nicht vollständig unterbunden (Abbildung 24). Deswegen kann man auch nur von einer 'knockdown' Mutante sprechen. Diese Mutante zeigte unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Micoarray-Analysen zeigten in dieser *knockdown* Mutante im Transkriptom auch nur geringe Unterschiede zum Wildtyp. Überexpressionslinien von *HIPP3* unter Kontrolle des starken 35S-Promotors zeigten dagegen sowohl auf Transkriptebene als auch im Entwicklungsverlauf deutliche Unterschiede zum Wildtyp. Deswegen wurden alle weiteren Arbeiten mit den Überexpressionslinien durchgeführt.

Die Array-Analysen belegen, dass die Überexpression von *HIPP3* eine deutliche Veränderung der Expression von etwa 400 Genen zur Folge hat (Abbildung 25). Interessant ist, dass etwa gleich viele Gene in der Überexpressionslinie induziert und reprimiert werden. Dies spricht dafür, dass *HIPP3* bidirektionale regulatorische Funktionen hat, also sowohl stimulierend als auch reprimierend wirken kann. Eine vertiefte Analyse belegt, dass viele der in der Überexpressionslinie differentiell regulierten Gene funktionell biotischen Stressreaktionen, Entwicklungsprozessen (insbesondere Blüten- und Samenentwicklung), Regulationsprozessen und Transportvorgängen zuzuordnen sind (Abbildung 26). Eine genauere Betrachtung der hundert am stärksten differentiell regulierten Gene unter Verwendung publizierter Datenbanken (NCBI; Gene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>;

Genevestigator, conditions search tools, samples, <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) und soweit vorliegend entsprechender Publikationen zeigt (Abbildung 27 und Tabelle 2), dass mehr als 50% der in der Überexpressionslinie differentiell regulierten Gene in Prozesse der pflanzlichen Pathogenantwort involviert sind. Viele der differentiell regulierten Gene spielen weiterhin eine Rolle bei pflanzlichen Entwicklungsprozessen wie der Blüten- und Samenbildung, bei abiotischem Stress und bei Eisen-, Schwefel- und Phosphatmangelantworten. Die Analyse der Expressionsmuster dieser Gene (Genevestigator, <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) belegt außerdem, dass über 20% der in der *HIPP3* Überexpressionslinie differentiell regulierten Gene auch in Abhängigkeit von dem Transkriptionsfaktor LEAFYCOT/LEC2 und etwa 10% von dem Transkriptionsfaktor LEAFY exprimiert werden, was für eine Beteiligung von HIPP3 an den über LEAFYCOT/LEC2 und LEAFY gesteuerten Signalwegen der Samen- und Blütenentwicklung spricht. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass HIPP3 durch das Phytohormon ABA, das auch bei der Samenentwicklung (während der Embryogenese) akkumuliert, reprimiert wird. Zudem spielt das in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse als potentieller Bindungspartner von HIPP3 identifizierte Trihelix-DNA-Bindeprotein ASIL1 in Verbindung mit LEAFYCOT/LEC2 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Samenentwicklung (Gao et al. 2011). Eine Beteiligung von HIPP3 an Signalwegen der Blütenentwicklung zeigt sich auch bei der phänotypischen Analyse der pflanzlichen Entwicklung von *HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*). Die *HIPP3-oe* Linien weisen im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Verzögerung der Blütenentwicklung auf (Abbildung 31), was die funktionelle Einbindung von HIPP3 in diesen Entwicklungsprozess nahe legt. An welcher Stelle HIPP3 in die Signalwege der Blüten- und Samenentwicklung eingreift, lässt sich allerdings auf der Basis der bisherigen Befunde noch nicht sagen.

In einer Co-Expressionsanalyse auf der Basis der in der Genevestigator-Datenbank publizierten Array-Daten (Perturbation-Tool; <https://www.genevestigator.com/gv/user/gvLogin.jsp>) zeigen die in der *HIPP3-oe* Linie am stärksten regulierten Gene interessante, sehr kohärente Expressionsmuster (Abbildung 29 und 30; Tabelle 3A und 3B). Es fällt auf, dass viele dieser Gene in Abhängigkeit von Signalwegen der Pathogenantwort reguliert werden, insbesondere in Abhängigkeit vom SA-Weg der Pathogenantwort (siehe auch Übersichtsschema der Signalwege in Abbildung 1). Wie schon in der Einleitung besprochen, besitzen Pflanzen effiziente Abwehrmechanismen gegen den Befall mit Pathogenen. Nachdem die Pflanze über typische molekulare Strukturen des Pathogens (PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*) eine PTI (*PAMP-triggered immunity*) oder durch das Erkennen von bakteriellen Effektor-Molekülen eine stärkere ETI (*effector-triggered immunity*) auslöst, können verschiedene Signalwege in Gang gesetzt werden, die auf der Aktion unterschiedlicher Phytohormone beruhen (Dong 1998, Pieterse et al. 2009). Während

ein über Salicylsäure agierender Weg Schutzreaktionen gegen biotrophe Pathogene induziert, resultieren Signalwege über Jasmonate und Ethylen in Abwehrmaßnahmen gegen nekrotrophe Pathogene und in Verwundungsantworten, wobei die verschiedenen Wege über *cross-talk* interagieren (Pieterse et al. 2009). Zentrale Komponenten des SA-Weges sind EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) und PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT4), die über das Salicylsäure-Biosynthesenzym SID2 (SA INDUCTION DEFICIENT 2, *isochorismat synthase*, Lu et al. 2009, Abreu und Munné-Bosch 2009) die Salicylsäure-Synthese stimulieren. EDS1 und PAD4 können strukturell Lipase/Esterase-ähnlichen Proteinen zugeordnet werden, aber eine Lipase-Aktivität konnte biochemisch nicht nachgewiesen werden (Falk et al. 1999, Feys et al. 2001, Feys et al. 2005). Man nimmt an, dass EDS1 über Interaktionen mit Resistenzproteinen, welche ein Toll-interleukin-1 receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat (TIR-NB-LRR) Motiv besitzen, die Pathogenantwort auslösen kann (Bhattacharjee et al. 2011). Einige solcher Resistenzproteine mit TIR-NB-LRR Motiv besitzen interessanterweise auch eine C-terminale, Zink-bindende LIM (Lin-11, Isl-1 und Mec-3) Domäne, die für die Interaktion mit EDS1 wichtig ist (Yang et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass EDS1 mit PAD4 und weiteren Proteinen wie SAG101 (senescence associated gene 101) Komplexe bilden kann, die präferentiell im Kern lokalisiert sind, aber auch im Cytoplasma vorliegen können (Zhu et al. 2011). Die Autoren dieser Publikation diskutieren, dass diese Interaktionen eine Schaltstelle der Salicylat abhängigen und oftmals eine Hypersensitive Reaktion mit Zelltod auslösenden Pathogenantwort in Pflanzen bilden. Kürzlich publizierte Arbeiten belegen, dass ein weiteres Protein, das Zink-Finger Protein LSD1 (LESION SIMULATING DISEASE RESISTANCE 1) eine reprimierende Wirkung auf EDS1 und PAD4 hat und als übergeordneter Regulator und Modulator im *cross-talk* SA abhängiger Signalwege der Pathogenabwehr und anderer Signalwege, wie z.B. ROS (*r*eactive *o*xxygen *s*pecies) abhängige Signalwege, wirkt (Rustérucci et al. 2001, Karpinski et al. 2013, He et al. 2011). Diese Autoren diskutieren, dass verschiedene pflanzliche Prozesse, wie abiotische Stressreaktionen, Anpassung an die Lichtumgebung und unterschiedliche Pathogenantworten über diese Wirkung von LSD1 moduliert und integriert werden können. Nach Induktion der Bildung von Salicylsäure über SID2 werden weiter unten in der Signalkette über die Wirkung eines weiteren regulatorisch wirkenden Proteins, dem als SA-Rezeptor beschriebenen NPR1 (NONREPRESSOR OF PR GENESIS1), SA abhängige Gene induziert (Boatwright und Pajeroska-Mukhtar 2013, Fu und Dong 2013, Pajeroska-Mukhtar et al. 2013). Die gebildete Salicylsäure kann darüber hinaus auch als systemisches Signal wirken, um in weiter entfernten Zellen wiederum über die Interaktion mit NPR1 eine systemische Resistenz (SAR, *s*ystemic *a*cquired *r*esistance) auszulösen (Durrant und Dong 2004). NPR1 bindet dabei Kupfer über zwei Cysteine (cys 521/529), welches dann wiederum die Salicylsäure bindet (Wu et al. 2012). Diese Interaktion

führt zu Konformationsänderungen, die Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren (TGA-TFs) für die SA abhängige Genexpression ermöglichen. Der Salicylsäure-Signalweg (SA-Weg) der Pathogenantwort ist antagonistisch mit dem Jasmonsäure-Signalweg (JA-Weg) vernetzt. Bei der Reprimierung des SA-Weges wird der JA-Weg induziert und *vice versa* (Pieterse et al. 2009, Kunkel und Brooks 2002, Glazebrook et al. 2003).

Die Co-Expressionsanalyse zeigt, dass die in der *HIPP3* Überexpressionslinie (*HIPP3-oe*) hoch regulierten Gene größtenteils auch induziert werden, wenn der Salicylat abhängige Signalweg der Pathogenantwort durch Mutation beteiligter Komponenten (PAD4, SID2) inhibiert wird, wohingegen viele der in der *HIPP3-oe* Linie reprimierten Gene durch Salicylat induziert werden und durch Inaktivierung des Salicylatweges (Mutationen in TBF1, SID2, EDS1, NPR1) reprimiert werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass HIPP3 eine regulatorische Funktion im komplexen, interaktiven Netzwerk der Pathogenantwort bei Pflanzen hat. Die Befunde sind in einem Modell der Wirkungsweise von HIPP3 zusammengefasst (Abbildung 32).

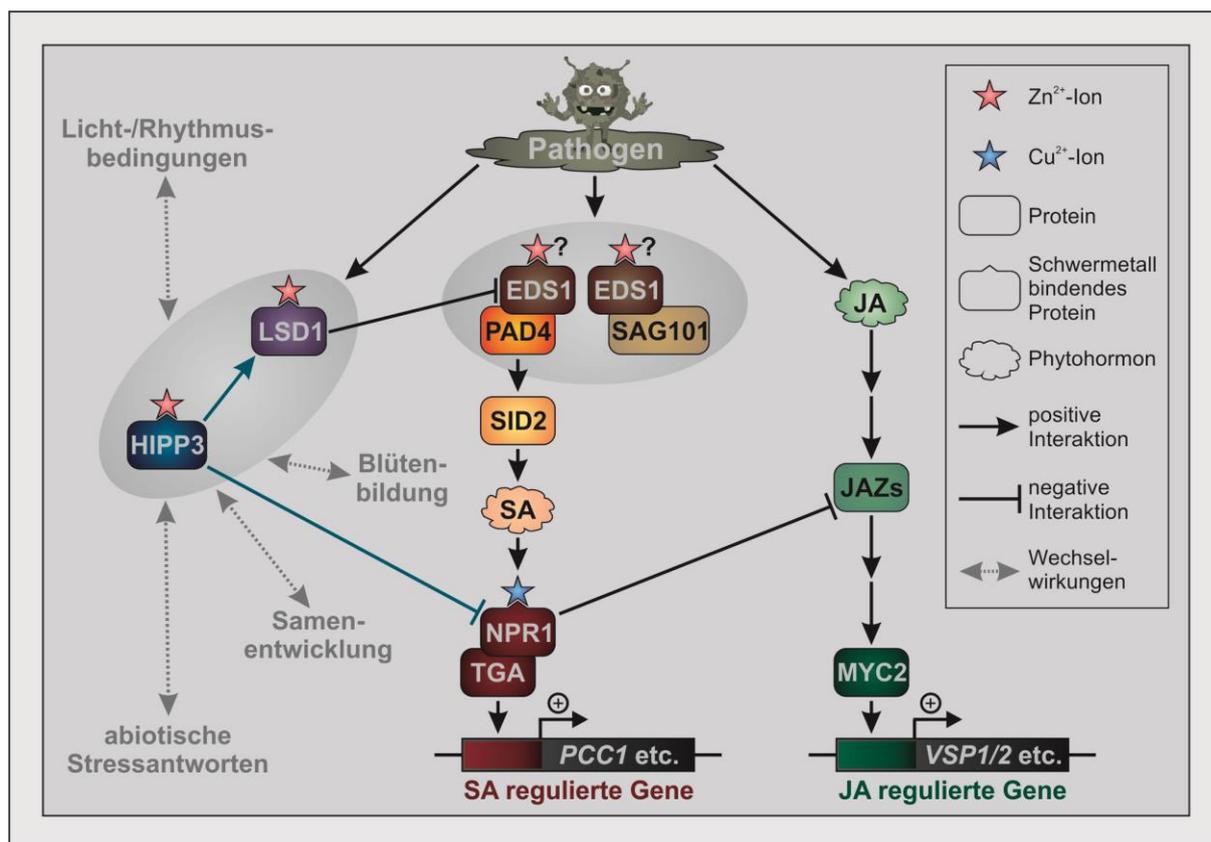


Abbildung 32: Modell der Wirkung von HIPP3 in pflanzlichen Signalwegen, insbesondere der Pathogenantwort.

HIPP3 hat dabei eine inhibitorische Wirkung auf den Salicylat abhängigen Signalweg zur Abwehr biotropher Pathogene, in dem PAD4, SID2 und NPR1 involviert sind, und der zur Induktion von SA abhängigen Genen, wie *PCC1* oder *NIMIN-1* führt (Hermann et al. 2013).

Gleichzeitig stimuliert die Überexpression von HIPP3 die Expression von Zielgenen des JA abhängigen Signalweges zur Abwehr nekrotropher Pathogene wie z.B. *VSP1/VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1/2*).

Eine Reprimierung der Expression von *PCC1* und *NIMIN-1* und eine gesteigerte Expression von *VSP1* und *VSP2* konnte in den Überexpressionslinien von HIPP3 nachgewiesen werden. Wo genau HIPP3 in den SA abhängigen Signalweg eingreift, ist in zukünftigen Arbeiten zu klären. Aufgrund der besonderen Eigenschaften von HIPP3 als putatives Zink-Chaperon können zwei Modelle diskutiert werden. Zum einen könnte HIPP3 mit dem Zink-bindenden LSD1 interagieren, das über EDS1 und in Interaktion mit Resistenzproteinen den SA-Weg inhibiert. Interessanterweise wurde für die Wirkungsweise von EDS1 in Kombination mit einigen Resistenzproteinen auch eine Zink-bindende LIM (Lin-11, Isl-1 und Mec-3)-Domäne als wichtig beschrieben (Yang et al. 2010). Eine zweite Möglichkeit wäre eine Interaktion mit NPR1, wobei eine Hemmung des SA-Weges über Verdrängung des für die Bindung von SA an seinen Rezeptor NPR1 nötigen Kupfers denkbar wäre. Ein entsprechender Wirkmechanismus konnte für das bakterielle cop-Operon gezeigt werden, wo das HMA-Domänenprotein CopZ Kupfer an den Repressor CopY abgibt, wobei das für die Repressorfunktion essentielle Zink durch das Kupfer verdrängt wird und damit der Repressor inaktiviert wird (Cobine et al. 1999, Solioz und Stoyanov 2003). Diese Modelle müssen in zukünftigen Experimenten getestet werden, wobei zum einen die potentiellen Interaktionen zwischen HIPP3 und den möglichen Interaktionspartnern LSD1 oder NPR1 über Immunpräzipitationsexperimente, FRET- oder BIFC-Studien analysiert werden könnten, und zum anderen in den Mutanten über Bestimmung der Salicylsäure-Akkumulation getestet werden könnte, ob HIPP3 in den Signalweg vor oder nach der Induktion der Salicylsäure-Produktion eingreift.

Die im Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz identifizierten potentiellen Interaktionspartner WNK8 und ASIL1, spielen eine Rolle bei der Regulation der Blüten- und Samenbildung, sind aber gleichzeitig auch in Prozessen der Pathogenabwehr involviert (Wang et al. 2008, Tsuchiya und Eulgem 2010, Park et al. 2011, Gao et al. 2009, Gao et al. 2011, Genevestigator, <https://www.genevestigator.com>). Auch viele der in der Microarray-Analyse identifizierten Gene können aufgrund von Literaturdaten und publizierten Expressionsdaten neben Pathogenantworten, Prozessen der Blüten- und Samenentwicklung und auch abiotischen Stressreaktionen zugeordnet werden (siehe Abbildung 27 und Tabelle 2). Auch die Co-Expressionsanalyse der in der Überexpressionslinie am stärksten differentiell regulierten Gene liefert Hinweise auf eine Beteiligung von HIPP3 an DELLA abhängigen GA-Signalwegen der Blüten- und Samenbildung (siehe Abbildung 29 und Tabelle 3A). Diese Daten und auch der in der HIPP3 Überexpressionslinie beobachtete Blühphänotyp

(Abbildung 31) legen eine Beteiligung von HIP3 an Signalwegen der biotischen und abiotischen Stressantworten und an Signalwegen der Blüten- und Samenentwicklung nahe. Ob HIP3 mit seiner besonderen Proteinstruktur und dem gebundenen Zink in den verschiedenen Signalwegen unabhängig als regulatorische Komponente wirkt, oder ob HIP3 sogar im *cross-talk* zwischen den verschiedenen Signalwegen fungiert, muss ebenfalls in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden. Dass Pflanzen ihre Entwicklung in Abhängigkeit von sich verändernden abiotischen und biotischen Umweltbedingungen modulieren können, ist seit langem bekannt und dient der Optimierung ihrer Fitness. So kann im Sinne der Optimierung der reproduktiven Fitness z.B. ein Angriff von Pathogenen zu einer raschen Induktion der Blütenbildung führen (Herms und Mattson 1994, Develey-Rivière und Galiana 2007). Wie der *cross-talk* zwischen den Signalwegen der Blütenbildung und der Pathogenantwort molekular realisiert wird, ist eine spannende Frage. Phytohormone spielen dabei eine wichtige Rolle. So wurde für Gibberelline (GAs) und Jasmonate (JAs) eine antagonistische Wirkungsweise beschrieben, wobei GAs Signalwege der Blütenbildung unterstützen und JAs Abwehrreaktionen gegen Pathogene in Gang setzen können (Kazan und Manners 2012). Bei dieser Interaktion spielen neben JA abhängigen JAZ-Proteinen (JASMONATE-ZIM DOMAIN), auch DELLA Proteine eine wichtige Rolle, die ebenfalls am *cross-talk* zwischen SA und JA Signalwegen der Pathogenantwort beteiligt sind (Navarro et al. 2008). Kürzlich konnte mit dem Transkriptionsfaktor LEAFY eine weitere Komponente des *cross-talks* zwischen Blütenbildung und Pathogenantwort identifiziert werden (Winter et al. 2011). Während die Rolle von LEAFY bei der Umwandlung des Apikalmeristems zum blütenbildenden Meristem seit längerem bekannt ist (Liu et al. 2009, Parcy 2005), konnte kürzlich auch eine regulatorische Funktion in Signalwegen der Pathogenantwort nachgewiesen werden (Winter et al. 2011). Ein weiterer am *cross-talk* zwischen diesen Signalwegen beteiligter Faktor scheint auch die U-Box/ARM E3 Ligase PUB13 zu sein, die den SA abhängigen Signalweg der Pathogenantwort mit den Signalwegen der Blühinduktion verknüpft (Li et al. 2012). Wie oben erwähnt, scheinen durch das übergeordnete LSD1/EDS1/PAD4-Regulon der SA abhängigen Pathogenantwort verschiedene Signalwege der abiotischen und biotischen Stressantworten und von Entwicklungsprozessen wie der Blütenbildung vernetzt zu sein (Karpinski et al. 2013, Wituszynska et al. 2013). Diese Befunde zeigen, dass Pflanzen Entwicklungsprozesse und Stressantworten aufeinander abstimmen können. Ob und welche molekulare Funktion HIP3, das sowohl in Prozesse der Blüten- und Samenentwicklung, als auch in die Pathogenantwort, insbesondere die SA abhängigen Signalwege involviert ist, bei dem *cross-talk* zwischen diesen Signalwegen ausübt, soll in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden.

VI MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Pflanzenmaterial

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia durchgeführt. Neben dem Wildtyp (WT Col-0) wurden auch eine *HIPP3 knockdown* Mutante (*hipp3-1*, Linie 28-23-74) und zwei 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien (*HIPP3-oe*, Linie 131-1 und Linie 133-5) untersucht. Die verwendete *hipp3-1* Mutante wurde vom Nottingham Arabidopsis Stock Center bezogen und trägt kurz vor dem 5'-UTR (*untranslated region*) Bereich des *HIPP3* Gens (At5g60800) eine T-DNA Insertion. Sie ist im Ergebnisteil (Kapitel 6.1) näher beschrieben. Um die Wahrscheinlichkeit anderer Mutationen zu minimieren, wurden bei den Experimenten homozygote Nachkommen (F3 bis F5 Generation, Überprüfung der Allele mittels PCR) aus der Kreuzung der *HIPP3 knockdown* Linie 28 mit dem Wildtyp Col-0 verwendet. Für die 35S::*HIPP3* Überexpressionslinien wurde die kodierende Sequenz von *HIPP3* mit dem konstitutiven viralen Promotor CaMV35S gekoppelt. Im 5'-Bereich des Gens wurde zusätzlich die Sequenz eines dreifachen c-myc-Tag, gefolgt von einem sechsfachen His-Tag (hexa-His-Tag) inseriert (siehe Ergebnisteil, Kapitel 6.2). Das Konstrukt wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 mittels „Floral-Dip-Methode“ (Clough und Bent 1998, Koncz und Schell 1986) in das pflanzliche Genom inseriert. Beide, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, *HIPP3-oe* Linien (Linie 131-1 und Linie 133-5) sind aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangen. Zur Kontrolle wurden Linien eingesetzt, die mit dem Leervektor (Mini-Binary-Vector Serie: pCB-Typ, Xiang et al. 1999), also ohne *HIPP3*, transformiert wurden (Linie 186-78 und Linie 187-2). Der Selektionsmarker aller hier vorgestellten Linien ist eine BASTA[®] (Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience, Deutschland)- Resistenz. Das dafür notwendige *BAR* Gen (*Bialaphos-Resistenz Gen*) ist Bestandteil der inserierten T-DNA.

1.2 Bakterien und Hefe Stämme

Für Klonierungsansätze wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und XL1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet.

Für die Überexpression von HIPP3 zur Analyse des gebundenen Schwermetalls wurde der *E. coli* Stamm BL21/pG-Tf2 eingesetzt. Dieser Stamm enthält neben dem Expressionsvektor pCold™II (Qing et al. 2004) und einer Ampicillin-Resistenz das Chaperon-Plasmid pG-Tf2, welches das Chaperon-Team *groES-groEL*-tig trägt und so zur Unterstützung der Proteinfaltung (Nishihara et al. 2000) beiträgt (Takara Company, Japan; www.takara-bio.com).

Für die Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wurden die Hefe Stämme AH109 und Y187 eingesetzt (Clontech Laboratories, Mountain View, USA). Die Genotypen der verwendeten *E. coli* und Hefe Stämme sind in den zwei nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Genotypen der verwendeten <i>E.coli</i> Stämme	
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^o ZDM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
DH5α	F' $\Phi 80lacZDM15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 $\lambda thi-1$ gyrA96 relA1</i>
TOP10	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZDM15 \Delta lacX74$ <i>recA1 araD139 $\Delta(ara-leu)$ 7697 gal/U gal/K rpsL Str^R</i> <i>endA1 nupG</i>
BL21/pG-Tf2	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> [P _{TC} <i>groES groEL tig</i> (Cm ^R)]

Tabelle 4: Genotypen der verwendeten *E.coli* Stämme

Genotypen der verwendeten Hefe Stämme	
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>

Tabelle 5: Genotypen der verwendeten Hefe Stämme

Die Pflanzentransformationen wurden mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 (Clough und Bent 1998, Koncz und Schell 1986) durchgeführt. Zur Untersuchung der Expression von *HIPP3* unter Pathogenstress wurde der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000, virulenter Stamm, Staskawicz et al. 1987) und ein daraus abgeleiteter avirulenter Stamm (*Pst* DC3000 + *AvrRpm1*), der auf dem Vektor pLAFR5 das Avirulenzgen *AvrRpm1* trägt (Debener et al. 1991), genutzt. Beide Stämme

wurden freundlicherweise von der AG Prof. Bonas (Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde die Wirkung der Mutante *Pst* DC3000 *hrpA*⁻ (Roine et al. 1997) untersucht, die nicht in der Lage ist, das Protein HrpA zu bilden, welches für die Ausbildung des Typ-III-Sekretionssystems notwendig ist. Diese Mutante wurde von der AG Prof. Scheel (IPB, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) bereitgestellt.

1.3 Chemikalien, Enzyme, „Kits“

Alle verwendeten Chemikalien hatten, soweit nicht anders beschrieben, den Reinheitsgrad *pro analysis* (pa) und wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland), Diagonal GmbH & Co. KG (Münster, Deutschland), Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande), ABCR GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Hamburg, Deutschland) und Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden mit autoklaviertem und entionisiertem Wasser (PURELAB PlusTM Wasseraufbereitungsanlage (USF Reinstwassersysteme GmbH, Ransbach, Deutschland) hergestellt.

Von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon Rot, gehört zu Thermo Fisher Scientific Deutschland), Roboklon GmbH (Berlin, Deutschland), Promega (Madison, USA), Invitex GmbH (Berlin, Deutschland), Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt, Deutschland), Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) wurden Taq-DNA-Polymerase, Restriktionsenzyme, DNase I, Pfu-DNA-Polymerase, dNTPs und molekularbiologische „Kits“ für die im Methodenteil beschriebenen Techniken bezogen. Die verwendeten Shuttle-Vektoren sind Produkte der Firmen Clontech Laboratories Europe (St-Germain-en-Laye, Frankreich) und Stratagene (Heidelberg, Deutschland) und die eingesetzten Antikörper wurden von GE Healthcare (München, Deutschland) und Roche Molecular Biochemicals GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die cDNA-Bibliothek CD4-30 stammt vom Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) DNA Stock Center (Ohio State University, USA).

1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer zum Überprüfen der T-DNA Insertion in der <i>hipp3-1 knockdown</i> Mutante	
P1 (HIPP3 for02)	5' - CAC ATA CAT GAT GGA ATG GTC AT - 3'
P2 (HIPP3 rev)	5' - CAA AAC GAC GGT GAT GGA AGG - 3'
P3 (SAIL-LB)	5' - GCC TTT TCA GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TTC C - 3'

Tabelle 6: Primer für die Überprüfung der T-DNA Insertion in der *hipp3-1 knockdown* Mutante

Primer zum Überprüfen der <i>HIPP3</i> -ORF Insertion in den <i>HIPP3-oe</i> Linien	
P4 (pCB for)	5' - CTC AGA AGA AGA CTT GAA CCA C - 3'
P5 (pCB rev)	5' - GGA ACT ACT CAC ACA TTA TTC TG - 3'
P6 (HIPP3 rev01)	5' - GAA TTC TCA CAT AAC AAC ACA AGC ATT CGG - 3'

Tabelle 7: Primer für die Überprüfung der *HIPP3*-ORF Insertion in den *HIPP3-oe* Linien

Primer für die quantitativen <i>realtime</i> -PCR Analysen		
At1g13320 for	5' - TAA CGT GGC CAA AAT GAT GC - 3'	(20bp)
At1g13320 rev	5' - GTT CTC CAC AAC CGC TTG GT - 3'	(20bp)
At3g41768 for	5' - GCA TTT GCC AAG GAT GTT TTC - 3'	(21bp)
At3g41768 rev	5' - GCG GAG TCC TAT AAG CAA C - 3'	(19bp)
At4g27410 for	5' - GCT CCC AAA GGC ACT AAA ACC A - 3'	(22bp)
At4g27410 rev	5' - CGA CAC AAC ACC CAA TCA TCC - 3'	(21bp)
At4g34000 for01	5' - AAC CGT TCT CAA CCT GCA AC - 3'	(20bp)
At4g34000 rev02	5' - TTG GAG TCA GAT CAG GTG ACA T - 3'	(22bp)
At2g19190 for02	5' - CGG TTA CCT TGA CCC CGA GTA - 3'	(21bp)
At2g19190 rev02	5' - TGC AAT AGC AGG TTG GCC TGT A - 3'	(22bp)
At1g13340 for	5' - GGG AAG GGG ATG TGA TGT CAG - 3'	(21bp)
At1g13340 rev	5' - TTC TCC AAT AGC TTC ACA GGG TC - 3'	(23bp)

Tabelle 8: Primer für die quantitativen *realtime*-PCR Analysen

Primer für die quantitativen <i>realtime</i> -PCR Analysen		
At1g70170 for	5' - CAA CGA TCA CGA CAG GGAAAC G - 3'	(22bp)
At1g70170 rev	5' - TGC CGT TGAAGT TAG GGT TTG C - 3'	(22bp)
At3g26830 for02	5' - TGC TCC CAA GAC AGA CAA TG - 3'	(20bp)
At3g26830 rev02	5' - TTT TGG ATC ACG ACC CAT C - 3'	(19bp)
At5g38130 for02	5' - GCC TAG CCC ATG ATC CAA CAG C - 3'	(22bp)
At5g38130 rev02	5' - CTA AAC CGG GAA GAA GAAACA CAA T - 3'	(25bp)
At1g73325 for01	5' - CCC GTA ACA TTC TCC CCA CTA - 3'	(21bp)
At1g73325 rev01	5' - GGT CGA TTC TCC ACA CTT TG - 3'	(20bp)
At4g15200 for01	5' - CCC AGC CCAAGT GAG GAG AC - 3'	(20bp)
At4g15200 rev01	5' - TAG AAG CAA CCG CGA TGA TAA G - 3'	(22bp)
At4g13410 for02	5' - GGA CGA CTT CCG AAA AGA GTA A - 3'	(22bp)
At4g13410 rev02	5' - CCG GAG ATG AGAAAA GCA GTG G - 3'	(22bp)
At4g27590 for01	5' - AGG GCT CTT TCT CAT CTC AA - 3'	(20bp)
At4g27590 rev01	5' - GCT TCT TTT CGC TTC TTT TTC - 3'	(21bp)
At2g41810 for01	5' - ACA GCC CGG TGG TTT TTA CTT C - 3'	(22bp)
At2g41810 rev01	5' - AGC CGC TTT TCA CTT TCA CAT AC - 3'	(23bp)
At5g41315 for02	5' - GTT CAA TCC TCG ACC GGA GAC G - 3'	(22bp)
At5g41315 rev02	5' - TGG TGT CGC TAT TTT TGA CCC CT - 3'	(23bp)
At2g19970 for02	5' - AAG TCT CGG ATG TGG CTC GTT CA - 3'	(23bp)
At2g19970 rev02	5' - CAT ATG GAT CAT TTC TTT GCA TCA - 3'	(24bp)
At5g19100 for02	5' - GTG GAG TTC CCG TGA TCG ACC T - 3'	(22bp)
At5g19100 rev02	5' - CTT CGG CTT CAC ACC TCC GTC C - 3'	(22bp)
At4g17470 for01	5' - ACG GGT TTG GAG GTG AAT - 3'	(18bp)
At4g17470 rev01	5' - CTA AGC GGC ATG AAT AAG G - 3'	(19bp)

Tabelle 8: Primer für die quantitativen *realtime*-PCR Analysen (Fortsetzung)

Primer für die quantitativen <i>realtime</i> -PCR Analysen		
At2g47180 for01	5' - CGC GGT GAT GGA TTG TTT CTG - 3'	(21bp)
At2g47180 rev01	5' - GCT TTT GGC CAC TGG ACT TTG T - 3'	(22bp)
At1g52040 for01	5' - GGC GTA TTT TGC ACC CAT CTC T - 3'	(22bp)
At1g52040 rev01	5' - ATA AGC TAC ACC GGA CTC ACC T - 3'	(22bp)
At2g45080 for01	5' - ATC ATG ATC GCT TCC AAA TAC - 3'	(21bp)
At2g45080 rev01	5' - TAA ATC CCA TCA AGA ACA AGAA - 3'	(22bp)
At5g17220 for02	5' - CGG GGT AGT TTT AAC CGG TGG T - 3'	(22bp)
At5g17220 rev02	5' - GCT TAT TTG GTT CTT CAG ATC ATC A - 3'	(25bp)
At5g24770 for01	5' - CGG GGG CGT ACT GGT TGT G - 3'	(19bp)
At5g24770 rev01	5' - TCC CGA GCT CTA TGA TGT TTT G - 3'	(22bp)
At5g24780 for01	5' - CTT GCC CTA AAG AAC GAT ACC - 3'	(21bp)
At5g24780 rev01	5' - TTG ATT CTC CGG ACT CTA ACC - 3'	(21bp)
At2g26560 for01	5' - CTG CCG TTA TCC TTG GTT TTC T - 3'	(22bp)
At2g26560 rev01	5' - GGT GCT TGT TCC CGC TAT TAC - 3'	(21bp)
At2g46440 for01	5' - CCC AAA TCA CAA ACT CCA CAG A - 3'	(22bp)
At2g46440 rev01	5' - GAC CCC ACC AAA AGC AAT AGA C - 3'	(22bp)
At1g02450 for01	5' - CGT TTC AGC CGG AGG ATT TCT - 3'	(21bp)
At1g02450 rev01	5' - CTT CGT TTC GCT CTT CTG TTT G - 3'	(22bp)
At3g22231 for01	5' - GAC TAG AGA TGC GGT GGT GGG TGA T - 3'	(25bp)
At3g22231 rev01	5' - GAG CAT ACG CCG CAG CAG AAG ATA C - 3'	(25bp)
At2g40610 for01	5' - TGG CGC GTG CTA TGA GAT GAA G - 3'	(22bp)
At2g40610 rev01	5' - GGA GAG GCC AGG GTT AGG TG - 3'	(20bp)
At3g62100 for01	5' - CCT TTG GGC TGA AGA AGA AGA T - 3'	(22bp)
At3g62100 rev01	5' - TCT CAC GCT AGA CAA GAA CAT C - 3'	(22bp)

Tabelle 8: Primer für die quantitativen *realtime*-PCR Analysen (Fortsetzung)

Primer für die quantitativen <i>realtime</i> -PCR Analysen		
At3g23010 for01	5' - TCC CTG GGT CTA TTG GTC TAC TGA - 3'	(24bp)
At3g23010 rev01	5' - GGA TGG TGG GAT ATT GCC TGT GA - 3'	(23bp)
At1g02230 for02	5' - ATA GAC CAA ACT CAA CAT TCT CCT - 3'	(24bp)
At1g02230 rev02	5' - GAA ACT AGC TCT TTT CTT CTT GAC AG - 3'	(26bp)

Tabelle 8: Primer für die quantitativen *realtime*-PCR Analysen (Fortsetzung)

2. Methoden

2.1 Generelle molekularbiologische Methoden und Datenbanken

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie Präparation von Nukleinsäuren und Proteinen, Arbeiten mit Restriktionsenzymen, Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), Blotting-, Klonierungs- und Transformations- Techniken wurden, falls nicht anders erwähnt, nach Sambrook und Russel (2001), Mülhardt (2008) und Rehm (2009) durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger (1977) mit dem ABI377 Sequenzierer von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland). Folgende publizierte Datenbanken wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: 'The Arabidopsis Information Resource' (TAIR; www.arabidopsis.org/), 'GENEVESTIGATOR' (www.genevestigator.com; Zimmermann et al. 2004), 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/), 'Mapman' (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>; Thimm et al. 2004, Usadel et al. 2006), 'eFP Browser' (www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi; Winter et al. 2007), 'Bio-Array Resource for Plant Biology' (BAR; www.bar.utoronto.ca/welcome.htm), 'WoLF PSORT' (*in silico* Proteinvorhersagen, www.wolfpsort.org/), 'NetNES' (Vorhersagen von Leucinreichen NuklearExport Signalen, www.cbs.dtu.dk/services/NetNES), 'PFAM Datenbank' von Proteinfamilien und konservierten Proteindomänen (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) und die 'Lasergene expert sequence analysis' Software (DNASTAR Inc., Madison, USA).

2.2 Pflanzenanzucht und Stressbehandlungen

Die sterilisierten Samen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und Mutanten-Linien wurden auf einem feuchten Erde/Vermikulit-Gemisch (Einheitserde, Typ GS90, pH 5,9) ausgesät und unter einem 10 Stunden Licht (100µE/m²s, 23°C) und 14 Stunden Dunkelheit (18°C) Rhythmus bei etwa 60% Luftfeuchte zehn Tage angezogen. Anschließend erfolgte eine

Vereinzelung der Pflanzen in Töpfe mit dem Erde/Vermikulit-Gemisch. Zum Schutz der Pflanzen erfolgte die Anzucht in den ersten vier Wochen unter einer Schutzhaube.

Trockenstress

Die Pflanzen für die Trockenstressansätze wurden nach der Vereinzelung unter Langtagbedingungen unter einem 16 Stunden Licht ($100\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 23°C) und 8 Stunden Dunkelheit (18°C) Rhythmus weiter kultiviert. Zur Auslösung von Trockenstress wurden die Pflanzen ab dem 30. Tag nach Aussaat nicht mehr gegossen. Lediglich bei den Kontrollpflanzen erfolgte weiterhin eine normale Bewässerung. Der Verlauf des Trockenstress-Experimentes wurde in allen Ansätzen durch Messung der Abnahme des relativen Wassergehaltes in den Blättern und durch Messung des physiologischen Stressparameters PS II-Effizienz (Harbinson et al. 1989) verfolgt. Nach 14 und 15 Tagen Trockenstress (signifikante Abnahme des relativen Wassergehaltes und der gemessenen PSII-Effizienz) wurde Blattmaterial zur Isolierung von Gesamt-RNA geerntet.

ABA-Behandlung

Um den Einfluss des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) auf die Expression von *HIPP3* zu untersuchen, wurden 4 Wochen alte Pflanzen, die unter Langtagbedingungen in Hydrokultur (0,1fach 'Hoagland's No.2 basal salt mixture' Medium -#H2395, Sigma-Aldrich) kultiviert wurden (vergleiche Anzuchtbedingungen für Trockenstressansätze) mit $50\mu\text{M}$ ABA behandelt. Da die ABA-Stammlösung durch Aufnahme von 100mM Abscisinsäure (Duchefa Biochemie B.V.) in hochreinem Ethanol (99%) hergestellt wurde (ABA ist in kristalliner Form nicht in Wasser löslich), erfolgte parallel die Behandlung der Kontrollpflanzen mit 0,05% Ethanol. Die Verdünnung von ABA-Stammlösung und 99%igem Ethanol erfolgte immer 'frisch' (kurz vor Gebrauch) mit autoklaviertem Leitungswasser. Die Ernte von Blattmaterial für die Isolierung von RNA wurde nach 8-, 12-, 24- und 48stündiger Inkubation vorgenommen.

Biotischer Stress

Der 10 Stunden Licht ($100\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 23°C) und 14 Stunden Dunkelheit (18°C) Rhythmus der zehntägigen Voranzucht wurde nach der Vereinzelung der Pflanzen beibehalten. Die Untersuchungen zur Expression von *HIPP3* bei Pathogenbefall wurden an sechs Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Um die Inokulation mit den Bakterienstämmen zu erleichtern, wurden die Pflanzen einen Tag vor der Behandlung mit Plastikhauben abgedeckt. Dadurch erhöhte sich der Anteil der geöffneten Stomata. Die Inokulation erfolgte auf der Blattunterseite mit einer 1ml Einwegspritze ohne Kanüle, wobei die Bakterien- bzw. Kontroll-Suspensionen vorsichtig unter leichtem Druck appliziert wurden. Die Bakterien (*Pst* DC3000, *Pst* DC3000 + *AvrRpm1* und *Pst* DC3000 *hrpA*), die über Nacht in Flüssigkultur gewachsen

waren, wurden unter sterilen Bedingungen in 50ml Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur zentrifugiert (10min, 2500xg). Das Bakterienpellet wurde in 10ml 10mM MgCl₂ suspendiert und diese Suspension anschließend nochmal bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 2500xg zentrifugiert. Nach diesem Reinigungsschritt wurden die Bakterien wieder sorgfältig in 10ml 10mM MgCl₂ suspendiert und die optische Dichte (OD) im Spektralphotometer bei 600nm gemessen. Diese wurde durch Zugabe von 10mM MgCl₂-Lösung auf 0,2 eingestellt (Zelldichte: etwa 10⁸ cfu/ml) und konnte dann zur Infiltration der *Arabidopsis* Blätter eingesetzt werden.

Phänotypische Dokumentation der Entwicklungsverläufe der verwendeten Arabidopsis Linien

Um die Entwicklungsverläufe der Wildtyppflanzen (Col-0), der *HIPP-oe* Linien (Linie 131-1 und Linie 133-5), der pCB Leervektor-Kontrolllinien (Linie 186-78 und Linie 187-2) und der *hipp3-1 knockdown* Mutante (Linie 28-23-74) phänotypisch zu dokumentieren, wurden die Pflanzen nach der zehntägigen Voranzucht vereinzelt und unter standardisierten Langtagbedingungen (14h Licht [100μE/m²s] bei 23°C, 10h Dunkelheit bei 18°C und einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 60%) in einer Klimakammer weiter kultiviert. Es wurden drei unabhängige Dokumentationsansätze, unter identischen Anzuchtbedingungen durchgeführt, wobei von jeder untersuchten Linie jeweils 100 Pflanzen im Entwicklungsverlauf analysiert wurden. Der Tag, bei dem die ersten Pflanzen erkennbare Infloreszenzen aufwiesen, wurde als 'Tag1' definiert. Von diesem Tag an wurde täglich für jede untersuchte *Arabidopsis* Linie die Anzahl der Pflanzen mit sichtbarer Infloreszenz aufgenommen. Gleichzeitig wurde auch untersucht, wieviele Rosettenblätter die Pflanzen zum jeweiligen Zeitpunkt des Blühbeginns aufwiesen. Die Entwicklungsverläufe der analysierten *Arabidopsis* Linien wurden zudem auch photographisch dokumentiert.

2.3 Lokalisationsstudien im heterologen Zwiebelepidermis-System

Um die subzelluläre Lokalisation von HIPP3 zu untersuchen, wurde die codierende Sequenz von *HIPP3* in den Vektor pKEx-GFP02-4 ligiert, bei dem die Expression des chimären Proteins GFP-HIPP3 unter der Kontrolle des 35S-Promotors steht. Die Gensequenz von *HIPP3* lag bereits im Vektor pENTR™/D-TOPO® (Abbildung 33A) vor, konnte mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Bam*HI ausgeschnitten werden und anschließend über die *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pKEx-GFP02-4 (Abbildung 33B) hinein kloniert werden. Dadurch entstand ein Fusionsprotein, bei dem HIPP3 am N-Terminus mit dem modifizierten smRS-GFP ('solubility modified, red shifted', Davis und Vierstra 1998) verbunden ist. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen.

Die Verifizierung positiv transformierter Zellen erfolgte durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI. Ein als positiv getesteter Klon wurde für die biolistische Transformation der Zwiebelepidermen eingesetzt (nach Barth et al. 2009).

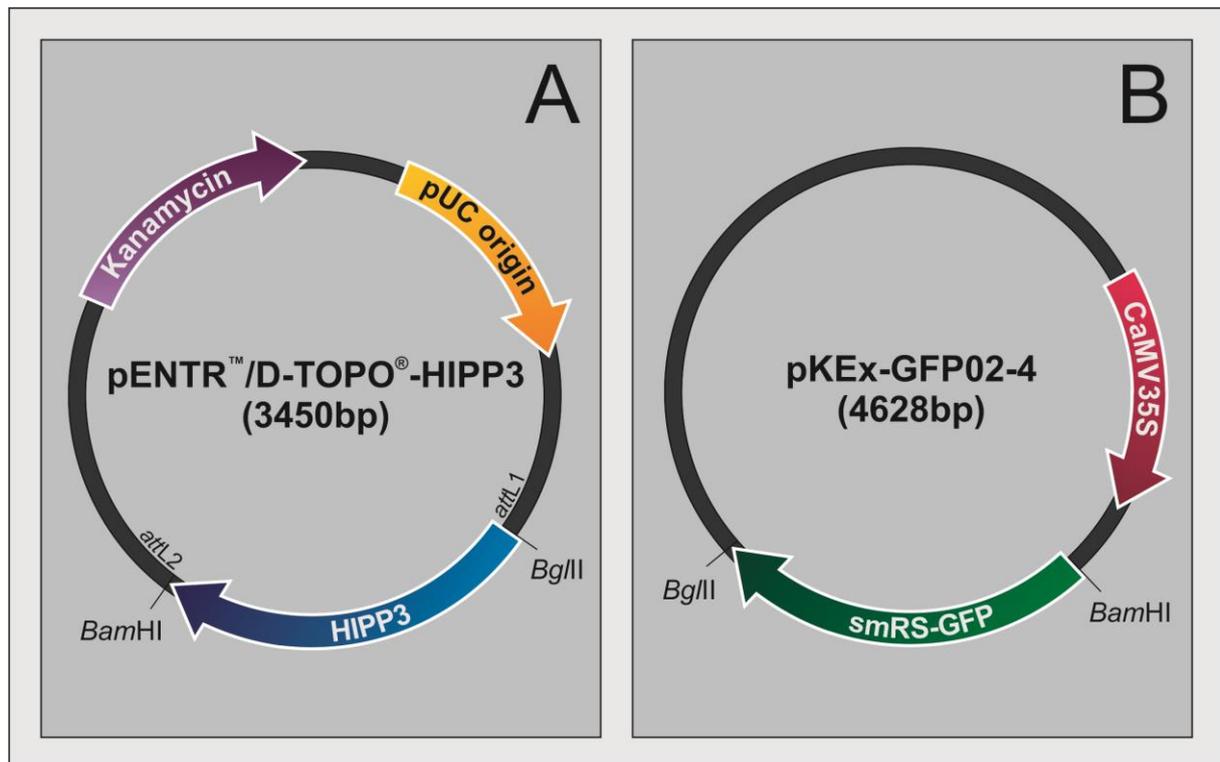


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Vektoren, die für die Vorbereitungen der biolistischen Transformation eingesetzt wurden. A: pENTR™/D-TOPO®-HIPP3 B: pKEx-GFP02-4.

Etwa 1cm² große innere Zwiebelepidermen (*Allium cepa*, Gartenzwiebeln, Bioland) wurden präpariert und steril auf MS-Onion-Platten (2% (w/v) Plant Agar mit ½ MS-Medium) eng aneinander gelegt. Die aus den transformierten *E. coli* Zellen isolierte DNA-Plasmid-Lösung wurde mit Wolframpartikel versetzt (3,3µl Wolframpartikel (60µg/µl), 300ng DNA-Plasmidlösung, 4,1µl CaCl₂ (2,5mM), 1,1µl Spermidin (0,1M)). Nach 10minütiger Präzipitation wurden die Wolframpartikel mit der angelagerten DNA kurz abzentrifugiert (10s, 5000xg) und 7,7µl des Überstands verworfen. Die restliche Suspension wurde kräftig vermischt und dann zur biolistischen Transformation mit einer nach dem Prinzip der 'PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System (Bio-Rad)' gebauten Partikelkanone eingesetzt. Der für den Beschuss eingesetzte Heliumdruck betrug 12 bar und die Distanz zu den Zwiebelzellen 9 cm. Die anschließende dunkle Lagerung der Zwiebelepidermen erfolgte im Brutschrank bei 28°C.

Die mikroskopische Analyse der Zwiebelepidermis-Zellen wurde in einem Zeitraum zwischen 4 und 24 Stunden nach Beschuss mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss Axiovert 100M Carl Zeiss, Jena, Deutschland) kombiniert mit dem konfokalem Laser Scanning System Zeiss LSM510 durchgeführt. Zur subzellulären Detektion von chimären

smRS-GFP-HIPP3 Proteinen wurde ein Argon-Krypton-Mischgaslaser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm und einem Emissionsfilter von 505-530nm verwendet.

2.4 Hefe-Zwei-Hybrid Experimente

Für die molekularbiologische Manipulation der Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind Standardtechniken angewendet worden (Guthrie und Fink 1991 und Yeast Handbook PT3024-1 Version PR13103, Clontech, Mountain View, USA.). Der auf dem GAL4-System (Wabrick 1997) basierende 'Hefe-Zwei-Hybrid-Screen' wurde entsprechend der Vorschriften des 'Matchmaker Two-Hybrid System 3' (Clontech, Mountain View, USA) durchgeführt. Die Hefestämme AH109 und Y187 wurden mit dem kompatiblen Expressionsvektor pGBKT7, der die HIPP3-Sequenz verbunden mit der Sequenz der GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD) enthält, transformiert.

Zum *Screening* wurden diese Hefezellen mit Hefezellen gepaart, die mit cDNA-Bibliotheken transformiert waren, bei denen die cDNA-Sequenzen von *Arabidopsis*-Genen mit der Gensequenz für die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) fusioniert vorliegen. Dies war zum einen die im Hefestamm Y187 vorliegende CD4-30 Bibliothek (ABRC stock center, Ohio, USA) und zum anderen eine cDNA-Bibliothek, die freundlicherweise von der AG Prof. Reuter (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurde, und im Hefestamm AH109 vorliegt. Beide cDNA-Bibliotheken beruhen auf mRNAs, die aus *Arabidopsis thaliana* Blütenständen isoliert wurden.

Das *Screening* nach putativen Interaktionspartnern erfolgte unter verschiedenen stringenten Bedingungen durch Verwendung von Mangelmedien (-Leu, -Trp, -His, -Ade) und in Ergänzung auch durch eine blaue Farbreaktion bei Aktivierung des *lacZ* Reportergens, die eine Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) zur Folge hat. Putativ positive Klone wurden noch einmal auf den Mangelmedien getestet. Die Interaktion der so identifizierten Proteine mit HIPP3 wurde anschließend in einem gezielten Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz überprüft. Dazu wurden die Expressionsvektoren mit den entsprechenden an die Gensequenz der GAL4-AD fusionierten cDNA-Sequenzen wiederum in Hefezellen transformiert.

Bei positiver Interaktion mit dem an die GAL4-BD fusionierten HIPP3 sollten die Hefezellen wiederum auf den Selektivmedien wachsen, bzw. eine in einer blauen Farbreaktion nachweisbare *lacZ*-Aktivität aufweisen. Zusätzlich wurde die Stringenz durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) noch erhöht, welches die Bildung von Histidin inhibiert und so den Selektionsdruck im Histidinmangelmedium steigert (Joshi et al. 2007).

2.5 Identifizierung des von HIPP3 gebundenen Metalls

Zur Analyse des gebundenen Metalls sollte HIPP3 in *E. coli* exprimiert, gereinigt und dann die gebundenen Metalle mittels ICP-MS (*i*nductively *c*oupled *p*lasma *m*ass *s*pectrometry) analysiert werden. Außerdem sollte zur Kontrolle ein modifiziertes HIPP3 (HIPP3-2 (C36G, C39G, C143G, C146G)), bei dem die für die Metallbindung essentiellen Cysteine der beiden Schwermetallbindedomänen durch Glycine ersetzt wurden, gleichermaßen analysiert werden.

Die entsprechenden cDNAs wurden von der Firma ShineGene (Molecular Biotech Inc., Shanghai, China) mit für *E. coli* optimierter Codon-Usage synthetisiert. Sie wurden in den Vektor pCold™II (Takara Bio Inc., Japan) ligiert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression der Zielgene über den Promotor des Kälteschockgens *cspA*. Er enthält einen *lac* Operator über den die Expression reguliert werden kann. Die entsprechend exprimierten HIPP3-Proteine weisen am N-terminalen Ende sechs zusätzliche Histidine auf (hexa-His-Tag), die zur biochemischen Identifizierung und Aufreinigung genutzt werden können. Die Überexpression wurde im *E. coli* Stamm BL21/pG-Tf2 (Takara Bio Inc., Japan) durch Zugabe von IPTG (Endkonz.: 1mM) induziert und für 3h bei 37°C inkubiert. Der *E. coli* Stamm BL21/pG-Tf2 besitzt das Chaperone-Team groES-groEL-tig. Diese molekularen Faltungshelfer begünstigen die Bildung und Stabilität der entsprechenden Zielproteine. Die Chaperone, deren genetische Information auf dem Plasmid pG-Tf2 gespeichert ist, werden durch die Applikation von Tetracyclin (Endkonzentration: 5ng ml⁻¹) in die 100ml *E. coli* Hauptkultur bei Erreichen einer optischen Dichte (OD600nm) von 0,5 bis 0,6 induziert. 30 Minuten danach erfolgte die bereits erwähnte Induktion der HIPP3 Expression durch Zugabe von IPTG.

Für die Analyse der HIPP3-Proteinproduktion wurden aus den *E. coli* Hauptkulturen je 1ml Probe vor IPTG-Zugabe und je 0,5ml Probe 3h nach IPTG-Zugabe entnommen und für 5min bei 13000xg und 4°C zentrifugiert. Aus den Bakterienpellets wurden dann die Proteine durch Mischen mit jeweils gleichem Volumen (ca. 40µl) 2x Lämmli-Probenpuffer (0,06 M Tris-HCL, pH 6,8; 0,0025% (w/v) Bromphenolblau; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 10% (v/v) β-Mercaptoethanol) und Aufkochen für 3min im Heizblock bei 95°C extrahiert. Anschließend erfolgte die Analyse der HIPP3-Proteinproduktion mittels SDS-PAGE, Coomassie-Proteinfärbung und immunologischer Detektion. Für die weitere Aufreinigung der rekombinant in *E. coli* produzierten HIPP3 Proteine mittels IMAC (*i*mmobilized *m*etal *i*on *a*ffinity *c*hromatography) und die Identifizierung der entsprechend gebundenen Schwermetalle mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) wurden die Bakterienzellen der Hauptkultur 3h nach IPTG-Zugabe durch Zentrifugieren bei 4000xg und 4°C für 20min geerntet.

SDS-PAGE, Western-Blot und immunologische Detektion

Die Auftrennung der zu untersuchenden Proteinlösungen erfolgte in 12-16%igen, SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen. Ein 16% Trenngel enthielt 375mM Tris-HCl pH 8,8; 53% Rotiphorese®Gel 30 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED. Ein Sammelgel enthielt 125mM Tris-HCl pH6,8; 15% Rotiphorese®Gel 30; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED. Zur Anfärbung der getrennten Proteine wurden die Gele über Nacht in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur geschüttelt (20% (v/v) Methanol reinst, 20% (v/v) 5x Roti®-Blue-Färbelösung (Carl Roth, Karlsruhe). Die anschließende Entfärbung in 25% (v/v) Methanol erfolgte zweimal für 30min unter Schütteln.

Für eine immunologische Detektion wurden die über SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese getrennten Proteine im Western-Blot Verfahren auf eine 0,45µm porige PVDF-Membran (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) übertragen. Dazu wurden die Gele in Kathodenpuffer (0,1% (w/v) SDS; 20mM Tris-Base; 0,15M Glycin) inkubiert. Der anschließende Transfer erfolgte mit einer Semidry-Blottingapparatur der Firma BioRad (München, Deutschland) bei 6°C für 90min bei 0,65mA cm⁻², wobei als Anodenpuffer 30% (v/v) Methanol, 20mM Tris-Base, 0,15M Glycin verwendet wurde. Die Membran wurde anschließend über Nacht mit 5% (w/v) Milchpulver-Lösung bei 6°C blockiert und mit TBST-Puffer (10mM Tris-Base, 0,15M NaCl, 0,1% (w/v) TWEEN 20, pH 8,0) gewaschen. Die Immunodetektion von mit His-Tag markiertem HIPP3 Protein erfolgte mit 0,1µg ml⁻¹ Maus-Anti-Penta-His (Kat.-Nr.: 34660, QIAGEN, Hilden) primärem Antikörper. Nach intensivem Waschen für je zweimal 30s, einmal 15min und dreimal 5min mit TBST-Puffer wurde die Membran mit dem 1:20000 in TBST verdünntem ECL Anti-Maus-IgG-HRP gekoppeltem sekundärem Antikörper (Kat.-Nr.: NA931-100UL, GE Healthcare Europe GmbH) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholt intensivem Waschen der Membran in TBST-Puffer erfolgte die Chemilumineszenz-Detektion nach Behandlung mit dem 'Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent' (GE Healthcare Europe GmbH) und einer entsprechenden Belichtung auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Europe GmbH).

IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography)

Die rekombinant in *E. coli* produzierten, mit hexa-His-Tag markierten HIPP3 Proteine wurden mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurde das 'QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kit' der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Proteinaufreinigung erfolgte nach dem im Handbuch des Herstellers beschriebenen Protokoll 'Reinigung unter nativen Bedingungen'. Entscheidende Reinigungsschritte wurden anschließend mittels SDS-PAGE, Coomassie-Proteinfärbung und immunologischer Detektion überprüft. Danach wurde mit den aufgereinigten Proteinextrakten (vereinigt je 2ml Elutionsvolumen) ein Pufferwechsel durchgeführt. Hierfür sind Amicon®Ultra-4

Zentrifugationsfilter (Merck Millipore, Billerica, USA) mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 10kDa und Proteinpuffer (20mM NaH₂PO₄; 50mM NaCl; 10% Glycerin; pH 8,0 mit NaOH) verwendet worden. Der Pufferwechsel erfolgte durch sukzessives Mischen und Ankonzentrieren. Die je 2ml Proteinextrakte wurden mit 2ml Proteinpuffer gemischt, auf 1ml ankonzentriert und dann in vierfacher Wiederholung mit 3ml Proteinpuffer gemischt und auf 1ml ankonzentriert. Im letzten Durchlauf wurden die Proteinextrakte auf 500µl ankonzentriert, die Proteinkonzentration bestimmt und entsprechende Mengen für die Identifizierung der gebundenen Schwermetalle mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) eingesetzt.

Quantitative Schwermetallanalyse (ICP-MS)

Um herauszufinden, welche Metalle an HIPP3 binden, wurden die Schwermetallgehalte im Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS, engl.: *inductively coupled plasma mass spectrometry*) analysiert.

Für die Mineralisierung der zu messenden Proben wurden diese zunächst auf gleiche Volumina von 100µl gebracht. Hierfür wurde der gleiche Proteinpuffer (20mM NaH₂PO₄; 50mM NaCl; 10% Glycerin; pH 8,0 mit NaOH) genutzt, der auch für den Pufferwechsel im Rahmen der Proteinaufreinigung Verwendung fand. Sowohl von der HIPP3- als auch von der HIPP3-2-Probe sind pro Messung 35µg Protein analysiert worden. Von den als Kontrollen auf Kontaminationen exakt parallel aufgereinigten Extrakten, welche aus nicht mit IPTG-Zugabe induzierten *E. coli* Kulturen isoliert wurden, sind jeweils die maximalen 100µl pro Probe gemessen worden. Als Blank-Lösung für die Leerwert-Bestimmung und die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ist der zum Verdünnen und den Pufferwechsel im Rahmen der Proteinaufreinigung verwendete Proteinpuffer analysiert worden.

Die unterschiedlichen Proben sind durch Zugabe von 100µl 69% HNO₃ Supra-Qualität (Kat.-Nr.: HN50, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Inkubation für 16h bei 70°C mineralisiert worden. Anschließend wurden die Proben mit je 1,8ml reinst H₂O auf 3,45% HNO₃ verdünnt und vom Autosampler zum Vermessen in ein X-Serie 2 ICP-MS Gerät der Firma Thermo Fisher Scientific (Niederlassung Dreieich, Deutschland) gebracht. Dabei sind die Proben mit feuchtem Argon angesaugt, in den Plasmazustand gebracht, durch Kollisionszellen geleitet und die Isotope ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn, ¹¹⁴Cd und ²⁰⁸Pb massenspektrometrisch analysiert worden. Für die Bestimmung sind kommerziell erworbene Multielement-Standards genutzt worden.

Die Messung der Blank-Lösung wurde achtmal durchgeführt. Die unterschiedlichen Proteinaufreinigungen sind dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und vermessen worden.

2.6 Expressionsstudien

RNA-Extraktion und DNase-Verdau

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörstert und die Extraktion der RNA erfolgte nach Barth et al. (2009) mit 60°C temperiertem Trizol (0,8 M Guanidiumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1M NaAcetat (pH5), 5% (v/v) Glycerol (99,8%), 38% (v/v) Phenol, TE gesättigt, pH 5). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (NanoDrop Spektrophotometer, ND-100, Wilmington, USA) nach folgender Formel bei 260nm bestimmt: $c \text{ RNA } [\text{ng}\mu\text{l}^{-1}] = E_{260} \times 40$.

Zur Entfernung kontaminierender DNA wurden die Proben mit DNaseI (Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) behandelt. Die Verdaulösung für 4µg RNA setzte sich aus 3,4µl Inkubationspuffer (400mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 60mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, pH7,9), 0,5µl RNase-freie DNaseI (10Uµl⁻¹) und sterilem, deionisiertem Wasser zusammen, dessen Volumen zusammen mit der jeweiligen RNA-Lösung 30,1µl ergab ($\Sigma=34\mu\text{l}$).

Nach 15minütiger Reaktion bei 37°C wurde die DNaseI durch die Zugabe von 1µl 280mM EDTA und einem 10minütigen Hitzeschock bei 75°C inaktiviert. Nachdem die RNA-Proben auf 4°C abgekühlt und abschließend noch mit 1,5µl 50mM MgCl₂ versetzt wurden, standen sie für weitere molekularbiologische Schritte bereit und konnten bis dahin bei -80°C gelagert werden.

cDNA-Synthese

Die RNA-Proben wurden nach dem DNaseI-Verdau durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte entsprechend dem Protokoll des verwendeten 'H Minus First Strand cDNA Synthesis' Kits der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) im Thermocycler von Biometra[®]. Pro Reaktion wurden 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Verwendung von Oligo(dT)18 Primern und Random-Hexamer-Nukleotiden ermöglichte die Übersetzung des gesamten RNA-Pools in cDNA Moleküle. Das Primergemisch aus 0,5µl Oligo(dT)18 Primer und 1µl Hexanucleotid-Mix wurde noch vor allen anderen Komponenten zur RNA gegeben. Während des ersten 10minütigen Vorsyntheseschrittes bei 25°C konnten die Oligonucleotide an die RNA binden. Erst dann wurden dem Reaktionsansatz die restlichen Komponenten hinzugegeben ($\Sigma=20\mu\text{l}$).

Um sicher zu gehen, dass es während der 60minütigen Syntheszeit bei 45°C nicht zum Abbau der RNA-Moleküle kommt, wurde neben der Reverse Transkriptase (0,6µl RevertAid

H Minus Reverse Transcriptase, 200U/μl) noch ein RNase Inhibitor (0,9μl RiboLock™ RNase Inhibitor, 20U/μl) eingesetzt. Beide Enzyme wurden im Anschluss an die cDNA-Synthese durch einen 5minütigen Hitzeschock bei 70°C inaktiviert.

Quantitative Analyse der Transkriptgehalte mittels *realtime-PCR*

Die quantitativen *realtime-PCR* Analysen wurden mit Hilfe Gen-spezifischer Primerpaare (siehe Tabelle 8) durchgeführt und erfolgte im iCycler MyiQ2 der Firma BioRad (München, Deutschland). Die Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten: 2μl Template (unterschiedliche Verdünnungsstufen der frisch synthetisierten cDNA [Verdünnungsfaktor: jeweils 0,25]), 7,5μl Platinum® SYBR® Green SuperMix der Firma Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), 0,9μl forward primer (5μM), 0,9μl reverse primer (5μM) und 0,15μl Fluorescein (1μM) als passives Referenzfluorophor. Das Gesamtvolumen von 15μl wurde durch die Zugabe von sterilem, deionisiertem Wasser erreicht. Die Abfolge des Reaktionsprogramms ist in Tabelle 9 dargestellt:

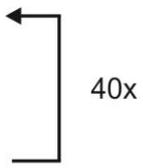
Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1) Initialbehandlung	2min	50°C	
2) Denaturierung	15s	95°C	
3) Primer-Annealing	15s	56°C	
4) Elongation	15s	60°C	
5) Abstoppen der Reaktion	1min	95°C	
6) Schmelzkurve	10s	56-95°C	
7) Abkühlung	∞	4°C	

Tabelle 9: Reaktionsschritte für die quantitative *realtime-PCR* Analysen

Als Referenzgen wurde At1g13320 gewählt, das für die Untereinheit A3 der Proteinphosphatase 2A kodiert (*PP2AA3*). Es wird unter verschiedensten Bedingungen stets in gleichem Maße exprimiert (Czechowski et al. 2005). Nur für die Expressionsanalysen der Proben aus den ABA-Experimenten, wurde das Gen At3g41768, welches für die 18S rRNA kodiert, als Referenzgen eingesetzt. Die Primersequenzen der beiden Referenzgene sind gleich zu Beginn der Tabelle 8 gelistet.

Die Berechnung der relativen Transkriptgehalte erfolgte mithilfe der 'Ct-Werte' (*crossing threshold*), die von der Cyclersoftware generiert wurden unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz, die durch vier Verdünnungsstufen des eingesetzten Templates (Verdünnungsfaktor: jeweils 0,25) für jedes Primerpaar ermittelt werden konnte, in Bezug auf das eingesetzte Referenzgen anhand der Formeln von Pfaffl 2001. Um die Signifikanz der

berechneten Werte zu ermitteln, wurde der statistische Test '*Pair wise fixed reallocation randomization test*' angewandt (REST-384[®], Pfaffl et al.2002). Der dabei ermittelte p-Wert, gibt die Überschreitungswahrscheinlichkeit wider und erlaubt Aussagen über die Signifikanz der errechneten Expressionsdaten, die in den graphischen Darstellungen der Expressionsergebnisse in Form von Sternchen angegeben wurde (je kleiner der p-Wert, desto größer die Signifikanz; $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Microarray-Analysen

Die vergleichende Analyse des Transkriptoms von Wildtyp (pCB-Leervektorlinie 187-2) und 35S::*HIPP3* Überexpressionslinie (*HIPP3-oe*, Linie 133-5) bzw. *hipp3-1 knockdown* Mutante (Linie 28-23-74) erfolgte mit dem Agilent 4x44K Arabidopsis (V4) Microarray (Source Bioscience, Imagenes, Berlin, Deutschland) nach dem 'Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis' Protokoll von Agilent (Böblingen, Deutschland). Pro Probe wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die mithilfe von Trizol isolierte Gesamt-RNA wurde einer zusätzlichen Reinigung unter Verwendung des RNeasy[®]-Mini-Kits (QIAGEN) in Anlehnung an die Herstellerangaben unterzogen. Der gereinigte Nucleotid-Pool konnte nach der cDNA-Synthese (1µg/Ansatz) und der Markierungsreaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 zur Microarray-Hybridisation eingesetzt werden. Die gewonnenen Rohdaten wurden nach der Methode der Quantilnormalisierung (Bolstad et al. 2003) normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test (Welch-Test). Alle weiteren Untersuchungen wurden nur mit solchen Genen durchgeführt, bei denen die gemessenen Expressionswerte in der statistischen Analyse, beruhend auf den drei unabhängigen biologischen Replikaten, im Vergleich zu den Kontroll-Werten signifikant unterschiedlich waren (p -Wert $<0,05$). Die Validierung der im Microarray beobachteten differentiellen Genexpression erfolgte für einige der am stärksten differentiell regulierten Gene der Listen mittels quantitativer *realtime*-PCR.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Hamid H, Chin K, Moeder W, Yoshioka K** (2011) High throughput chemical screening supports the involvement of Ca²⁺ in cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **11**, 1817-1819.
- Abreu ME, Munné-Bosch S** (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **60**, 1261-1271.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Aluru MR, Yu F, Fu A, Rodermel S** (2006) *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J Exp Bot* **57**, 1871-1881.
- Amasino R** (2010) Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* **61**, 1001-1013.
- Andrés F, Coupland G** (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* **13**, 627-639.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Barth O, Zschiesche W, Siersleben S, Humbeck K** (2004) Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. *Physiol Plant* **121**, 282-293.
- Barth O, Vogt S, Uhlemann R, Zschiesche W, Humbeck K** (2009) Stress induced and nuclear localized HIP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Mol Biol* **69**, 213-226.
- Berger S, Mitchell-Olds T, Stotz HU** (2002) Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **114**, 85-91.
- Besseau S, Li J, Palva ET** (2012) WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**, 2667-2679.
- Betancur L, Singh B, Rapp RA, Wendel JF, Marks MD, Roberts AW, Haigler CH** (2010) Phylogenetically distinct cellulose synthase genes support secondary wall thickening in *Arabidopsis* shoot trichomes and cotton fiber. *J Integr Plant Biol* **52**, 205-220.
- Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, Pöschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J** (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 8067-8072.

- Bethke G, Pecher P, Eschen-Lippold L, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J, Scheel D, Lee J** (2012) Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 471-480.
- Bhattacharjee S, Halane MK, Kim SH, Gassmann W** (2011) Pathogen effectors target *Arabidopsis* EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* **334**, 1405-1408.
- Boatwright JL, Pajerowska-Mukhtar K** (2013) Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. *Mol Plant Pathol* **14**, 623-634.
- Bolouri Moghaddam MR, den Ende WV** (2013) Sugars, the clock and transition to flowering. *Front Plant Sci* **4**, 22. doi: 10.3389/fpls.2013.00022.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP** (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193.
- Brady SM, McCourt P** (2003) Hormone cross-talk in seed dormancy. *J Plant Growth Regul* **22**, 25-31.
- Braybrook SA, Harada JJ** (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* **13**, 624-630.
- Capella AN, Menossi M, Arruda P, Benedetti CE** (2001) *COI1* affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta* **213**, 691-699.
- Chailakhyan MK** (1936) New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Dokl Akad Nauk SSSR (C.R. Acad. Sci. USSR)* **13**, 79-83.
- Chen Y, Wei J, Wang M, Shi Z, Gong W, Zhang M** (2012) The crystal structure of *Arabidopsis* VSP1 reveals the plant class C-like phosphatase structure of the DDDD superfamily of phosphohydrolases. *PLoS One* **7**, e49421.
- Chin K, Moeder W, Abdel-Hamid H, Shahinas D, Gupta D, Yoshioka K** (2010) Importance of the α C-helix in the cyclic nucleotide binding domain for the stable channel regulation and function of cyclic nucleotide gated ion channels in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **61**, 2383-2393.
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ** (2004) Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC-NBS-LRR* gene, *ADR1*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant J* **38**, 810-822.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803-814.
- Cho MH, Corea OR, Yang H, Bedgar DL, Laskar DD, Anterola AM, Moog-Anterola FA, Hood RL, Kohalmi SE, Bernardis MA, Kang C, Davin LB, Lewis NG** (2007) Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Identification and characterization of arogenate dehydratases. *J Biol Chem* **282**, 30827-30835.

- Christianson DW** (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev* **106**, 3412-3442.
- Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL** (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 425-436.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U** (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* **7**, 309-315.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M, Dameron CT** (1999) The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett* **445**, 27-30.
- Coen ES, Meyerowitz EM** (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **5**, 31-37.
- Cosgrove DJ** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Crowel DN** (2000) Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Prog Lipid Res* **39**, 393-408.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 5-17.
- Davis SJ, Vierstra RD** (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**, 521-528.
- de Abreu-Neto JB, Turchetto-Zolet AC, de Oliveira LF, Zanettini MH, Margis-Pinheiro M** (2013) Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS J* **280**, 1604-1616.
- Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL** (1991) Identification and molecular mapping of a single Arabidopsis thaliana locus determining resistance to a phytopathogenic Pseudomonas syringae isolate. *Plant J* **1**, 289-302.
- Degtyarenko KN** (2000) Bioinorganic motifs: towards functional classification of metallo-proteins. *Bioinformatics* **16**, 851-864.
- de Torres M, Sanchez P, Fernandez-Delmond I, Grant M** (2003) Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in *RPM1*-mediated resistance. *Plant J* **33**, 665-676.
- Develey-Rivière MP, Galiana E** (2007) Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytol* **175**, 405-416.

- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**, 539-548.
- Dong X** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 316-323.
- Duarte GT, Matioli CC, Pant BD, Schlereth A, Scheible WR, Stitt M, Vicentini R, Vincentz M** (2013) Involvement of microRNA-related regulatory pathways in the glucose-mediated control of *Arabidopsis* early seedling development. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/ert239
- Dupont CL, Butcher A, Valas RE, Bourne PE, Caetano-Anollés G** (2010) History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 10567-10572.
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.
- Dykema PE, Sipes PR, Marie A, Biermann BJ, Crowell DN, Randall SK** (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol Biol* **41**, 139-150.
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JD, Daniels MJ, Parker JE** (1999) *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3292-3297.
- Faulkner C, Robatzek S** (2012) Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 699-707.
- Feyissa DN, Løvdaal T, Olsen KM, Slimestad R, Lillo C** (2009) The endogenous *GL3*, but not *EGL3*, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves. *Planta* **230**, 747-754.
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, Parker JE** (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, *EDS1* and *PAD4*. *EMBO J* **20**, 5400-5411.
- Feys BJ, Wiermer M, Bhat RA, Moisan LJ, Medina-Escobar N, Neu C, Cabral A, Parker JE** (2005) *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell* **17**, 2601-2613.
- Fonseca JP, Menossi M, Thibaud-Nissen F, Town CD** (2010) Functional analysis of a TGA factor-binding site located in the promoter region controlling salicylic acid-induced *NIMIN-1* expression in *Arabidopsis*. *Genet Mol Res* **9**, 167-175.
- Förster S** (2009) Funktionelle Charakterisierung von HIPPs (*Heavy Metal associated Isoprenylated Plant Proteins*) mit zwei Schwermetallbindedomänen und HIPP25. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- Friedel S, Usadel B, von Wirén N, Sreenivasulu N** (2012) Reverse engineering: a key component of systems biology to unravel global abiotic stress cross-talk. *Front Plant Sci* **3**, 294. doi: 10.3389/fpls.2012.00294.

- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 839-863.
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M** (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**, 998-1001.
- Gao MJ, Lydiate DJ, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus DD, Rozwadowski K** (2009) Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **21**, 54-71.
- Gao MJ, Li X, Lui H, Gropp GM, Lydiate DD, Wei S, Hegedus DD** (2011) ASIL1 is required for proper timing of seed filling in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **6**, 1886-1888.
- Gerber E, Hemmerlin A, Hartmann M, Heintz D, Hartmann MA, Mutterer J, Rodríguez-Concepción M, Boronat A, Van Dorsselaer A, Rohmer M, Crowell DN, Bach TJ** (2009) The plastidial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway provides the isoprenyl moiety for protein geranylgeranylation in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **21**, 285-300.
- Gimenez-Ibanez S, Solano R** (2013) Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci* **4** (72), 1-11. doi:10.3389/fpls.2013.00072.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Métraux JP, Zhu T, Katagiri F** (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* **34**, 217-228.
- Grant JJ, Chini A, Basu D, Loake GJ** (2003) Targeted activation tagging of the *Arabidopsis* NBS-LRR gene, *ADR1*, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 669-680.
- Guthrie C, Fink GR** (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* **194**, 3-933.
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**, 1-11.
- Harbinson J, Genty B, Baker NR** (1989) Relationship between the Quantum Efficiencies of Photosystems I and II in Pea Leaves. *Plant Physiol* **90**, 1029-1034.
- Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM** (2012) Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol* **160**, 83-92.
- He S, Tan G, Liu Q, Huang K, Ren J, Zhang X, Yu X, Huang P, An C** (2011) The LSD1-interacting protein GILP is a LITAF domain protein that negatively regulates hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *PLoS One* **6**, e18750.
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**, 321-334.
- Hermann M, Maier F, Masroor A, Hirth S, Pfitzner AJ, Pfitzner UM** (2013) The *Arabidopsis* NIMIN proteins affect NPR1 differentially. *Front Plant Sci* **4**. doi: 10.3389/fpls.2013.00088. Print 2013.

- Hermes DA, Mattson WJ** (1994) Plant growth and defense. *Trends Ecol Evol* **9**, 488. doi: 10.1016/0169-5347(94)90319-0
- Herrera JBR, Bartel B, Wilson WK, Matsuda SPT** (1998) Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry* **49**, 1905-1911.
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Peñarrubia L, Amasino RM** (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**, 1227-1234.
- Huffman DL, O'Halloran TV** (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 677-701.
- Hung IH, Casareno RL, Labesse G, Mathews FS, Gitlin JD** (1998) HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J Biol Chem* **273**, 1749-1754.
- Ietswaart R, Wu Z, Dean C** (2012) Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends Genet* **28**, 445-452.
- Joshi PB, Hirst M, Malcolm T, Parent J, Mitchell D, Lund K, Sadowski I** (2007) Identification of protein interaction antagonists using the repressed transactivator two-hybrid system. *Biotechniques* **42**, 635-644.
- Jung JH, Park CM** (2011) Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signal Behav* **6**, 1198-1200.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ** (2003) *Arabidopsis* *MET1* cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* **163**, 1109-1122.
- Karpiński S, Szechyńska-Hebda M, Wituszyńska W, Burdiak P** (2013) Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant Cell Environ* **36**, 736-744.
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**, 22-31.
- Kendrick MD, Chang C** (2008) Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 479-485.
- Kienow L, Schneider K, Bartsch M, Stuible HP, Wenig H, Miersch O, Wasternack C, Kombrink E** (2008) Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **59**, 403-419.
- Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z** (2008) *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell* **20**, 2357-2371.

- Kim Y, Park S, Gilmour SJ, Thomashow MF** (2013) Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant J* **75**, 364-376.
- Kizis D, Pagès M** (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* **30**, 679-689.
- Kobe B, Kajava AV** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 725-732.
- Koncz C, Schell J** (1986) The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koo AJK, Chung HS, Kobayashi Y, Howe GA** (2006) Identification of a Peroxisomal Acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of Jasmonic Acid in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**, 33511-33520.
- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 325-331.
- Lee Y, Choi D, Kende H** (2001) Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 527-532.
- Li W, Ahn IP, Park CH, Zeng L, Whitehill JG, Lu H, Zhao Q, Ding B, Xie Q, Zhou JM, Dai L, Wang GL** (2012) The U-Box/ARM E3 Ligase PUB13 regulates cell death, defense, and flowering time in Arabidopsis. *Plant Physiol* **159**, 239-250.
- Li W, Dai L, Wang GL** (2012) PUB13, a U-box/ARM E3 ligase, regulates plant defense, cell death, and flowering time. *Plant Signal Behav* **7**, 898-900.
- Lian H, Li X, Liu Z, He Y** (2013) HYL1 is required for establishment of stamen architecture with four microsporangia in Arabidopsis. *J Exp Bot* **64**, 3397-3410.
- Liepman AH, Cavalier DM** (2012) The CELLULOSE SYNTHASE-LIKE A and CELLULOSE SYNTHASE-LIKE C families: recent advances and future perspectives. *Front Plant Sci* **3**, 109. doi: 10.3389/fpls.2012.00109. Epub 2012 May 24.
- Lin SJ, Culotta VC** (1995) The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3784-3788.
- Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, Culotta VC** (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* *ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* **272**, 9215-9220.
- Lin YA, Aarts MGM** (2012) The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3187-3206.
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H** (2009) Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev Cell* **16**, 711-722.

- Lu H, Salimian S, Gamelin E, Wang G, Fedorowski J, LaCourse W, Greenberg JT** (2009) Genetic analysis of *acd6-1* reveals complex defense networks and leads to identification of novel defense genes in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**, 401-412.
- Maier F, Zwicker S, Hückelhoven A, Meissner M, Funk J, Pfitzner AJ, Pfitzner UM** (2011) NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Mol Plant Pathol* **12**, 73-91.
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH** (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue):D348-52. doi: 10.1093/nar/gks1243.
- Mikkelsen MD, Pedas P, Schiller M, Vincze E, Mills RF, Borg S, Møller A, Schjoerring JK, Williams LE, Baekgaard L, Holm PB, Palmgren MG** (2012) Barley HvHMA1 is a heavy metal pump involved in mobilizing organellar Zn and Cu and plays a role in metal loading into grains. *PLoS One* **7**, e49027.
- Mir R, Hernández ML, Abou-Mansour E, Martínez-Rivas JM, Mauch F, Métraux JP, León J** (2013) Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) regulates polar lipid content, ABA-related responses, and pathogen defence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **64**, 3385-3395.
- Moroianu J** (1997) Molecular mechanisms of nuclear protein transport. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **7**, 61-72.
- Moyroud E, Kusters E, Monniaux M, Koes R, Parcy F** (2010) LEAFY blossoms. *Trends Plant Sci* **15**, 346-352.
- Mühlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mateo A, Mullineaux PM, Parker JE, Karpinska B, Karpinski S** (2008) Chloroplast signaling and *LESION SIMULATING DISEASE1* regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 2339-2356.
- Mülhardt C** (2008) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, sechste Auflage.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H und Prats E** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**, 501-520.
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE, Ecker JR, Reed JW** (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107-4118.
- Nakao M, Nakamura R, Kita K, Inukai R, Ishikawa A** (2011) Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. *Sci Rep* **1**, 171. doi: 10.1038/srep00171.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JD** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**, 650-655.

- Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T** (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 884-889.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and Raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* **147**, 1251-1263.
- Pajeroska-Mukhtar KM, Wang W, Tada Y, Oka N, Tucker CL, Fonseca JP, Dong X** (2012) The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Curr Biol* **22**, 103-112.
- Pajeroska-Mukhtar KM, Emerine DK, Mukhtar S** (2013) Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci* **18**, 402-411.
- Pandey N, Ranjan A, Pant P, Tripathi RK, Ateek F, Pandey HP, Patre UV, Sawant SV** (2013) CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **14**, doi: 10.1186/1471-2164-14-216.
- Parcy F** (2005) Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol* **49**, 585-593.
- Park HY, Lee SY, Seok HY, Kim SH, Sung ZR, Moon YH** (2011) EMF1 interacts with EIP1, EIP6 or EIP9 involved in the regulation of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **52**, 1376-1388.
- Patra B, Pattanaik S, Yuan L** (2013) Ubiquitin protein ligase 3 mediates the proteasomal degradation of GLABROUS 3 and ENHANCER OF GLABROUS 3, regulators of trichome development and flavonoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* **74**, 435-447.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, No.9 e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L** (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, No.9 e36.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, van der Ent S, van Wees SCM** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308-316.
- Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenón V, Andrés-Colás N, Garcia-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ, Ecker JR, Pilon M, Peñarrubia L** (2007) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 385-390.
- Qing G, Ma LC, Khorchid A, Swapna GVT, Mal TK, Takayama MM, Xia B, Phadtare S, Ke H, Acton T, Montelione GT, Ikura M, Inouye M** (2004) Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**, 877-882.
- Qiu JL, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez MC, Sandbech-Clausen S, Lichota J, Brodersen P, Grasser KD, Mattsson O, Glazebrook J, Mundy J, Petersen M** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* **27**, 2214-2221.

- Quegwer J** (2013) Funktionelle Charakterisierung von *Phosphate Deficiency Response 4* in *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**, 93-113.
- Rausche J** (2012). Untersuchung der Metallbindung und der Funktion von HIPP-Proteinen innerhalb der Metallhomöostase in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rehm H** (2009) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, sechste Auflage.
- Rippert P, Puyaubert J, Grisolle D, Derrier L, Matringe M** (2009) Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 1251-1260.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C** (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Robinson NJ, Winge DR** (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**, 537-562.
- Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S, Gruissem W** (1999) Protein prenylation in plants: old friends and new targets. *Plant Mol Biol* **39**, 865-870.
- Roine E, Wei W, Juan J, Nurmiäho-Lassila EL, Kalkkinen N, He SY** (1997) Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3459-3464.
- Rosenzweig AC** (2002) Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* **9**, 673-677.
- Rubino JT, Franz KJ** (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem* **107**, 129-143.
- Rustérucci C, Aviv DH, Holt BF, Dangl JL, Parker JE** (2001) The Disease Resistance Signaling Components *EDS1* and *PAD4* Are Essential Regulators of the Cell Death Pathway Controlled by *LSD1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2211-2224.
- Sahlman L, Skärfstad EG** (1993) Mercuric ion binding abilities of MerP variants containing only one cysteine. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 583-588.
- Sambrook J, Russel DW** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Verlag*, dritte Auflage.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M und Lepiniec L** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J* **54**, 608-620.

- Sato A, Yamamoto KT** (2008) Overexpression of the non-canonical *Aux/IAA* genes causes auxin-related aberrant phenotypes in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* **133**, 397-405.
- Sauerbrunn N, Schlaich N** (2004) *PCC1*: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in *Arabidopsis*. *Planta* **218**, 552-561.
- Segarra S, Mir R, Martínez C, León J** (2010) Genome-wide analyses of the transcriptomes of salicylic acid-deficient versus wild-type plants uncover Pathogen and Circadian Controlled 1 (*PCC1*) as a regulator of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **33**, 11-22.
- Shan X, Yan J, Xie D** (2012) Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 84-91.
- Shi ZB, Ge HH, Zhao P, Zhang M** (2010) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant VSP1 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**, 201-203.
- Sinclair SA, Krämer U** (2012) The zinc homeostasis network of land plants. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1553-1567.
- Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S** (2010) The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS One* **5**, e13935.
- Snider J, Thibault G, Houry WA** (2008) The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol* **9**, doi: 10.1186/gb-2008-9-4-216.
- Solioz M, Stoyanov JV** (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 183-195.
- Srikanth A, Schmid M** (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2013-2037.
- Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, Napoli C** (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**, 5789-5794.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11806-11811.
- Suzuki N, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H** (2002) Functional characterization of a heavy metal binding protein Cdl19 from *Arabidopsis*. *Plant J* **32**, 165-173.
- Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED** (1992) Protein metal-binding sites. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 378-387.
- Takada S, Goto K** (2003) *TERMINAL FLOWER2*, an *Arabidopsis* homolog of *HETEROCHROMATIN PROTEIN1*, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by *CONSTANS* in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**, 2856-2865.

- Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Kojima C, Shimamoto K** (2013) Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci* **18**, 287-294.
- Tehseen M, Cairns N, Sherson S, Cobbett CS** (2010) Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metalomics* **2**, 556–564.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**, 914-939.
- Timpte C, Lincoln C, Pickett FB, Turner J, Estelle M** (1995) The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J* **8**, 561-569.
- Torres Acosta JA, de Almeida Engler J, Raes J, Magyar Z, De Groot R, Inze D, De Veylder L** (2004) Molecular characterization of *Arabidopsis* PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1485-1497.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell* **16**, 2481-2498.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *Plant J* **49**, 46-63.
- Tsay MJ, Fatemi N, Narindrasorasak S, Forbes JR, Sarkar B.** (2004) Identification of the "missing domain" of the rat copper-transporting ATPase, *atp7b*: insight into the structural and metal binding characteristics of its N-terminal copper-binding domain. *Biochim Biophys Acta* **1688**, 78-85.
- Tsuchiya T, Eulgem T** (2010) Co-option of EDM2 to distinct regulatory modules in *Arabidopsis thaliana* development. *BMC Plant Biol* **10**, 203. doi: 10.1186/1471-2229-10-203.
- Turnbull C** (2011) Long-distance regulation of flowering time. *J Exp Bot* **62**, 4399-4413.
- Underwood W** (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci* **3**, 85. doi: 10.3389/fpls.2012.00085. Epub 2012 May 7.
- Urquhart W, Chin K, Ung H, Moeder W, Yoshioka K** (2011) The cyclic nucleotide-gated channels AtCNGC11 and 12 are involved in multiple Ca²⁺-dependent physiological responses and act in a synergistic manner. *J Exp Bot* **62**, 3671-3682.
- Usadel B, Nagel A, Steinhauser D, Gibon Y, Bläsing OE, Redestig H, Sreenivasulu N, Krall L, Hannah MA, Poree F, Fernie AR, Stitt M** (2006) PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* **7**, 535, doi:10.1186/1471-2105-7-535.

- van Verk MC, Bol JF, Linthorst HJM** (2011) WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. *BMC Plant Biol* **11**, 89. doi: 10.1186/1471-2229-11-89.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X** (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* **2**, e123.
- Wang Y, Liu K, Liao H, Zhuang C, Ma H, Yan X** (2008) The plant WNK gene family and regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Biol* **10**, 548-562.
- Warbrick E** (1997) Two's company, three's a crowd: the yeast two hybrid system for mapping molecular interactions. *Structure* **5**, 13-17.
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**, 681-697.
- Wasternack C und Hause B** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review. *Ann Bot* **111**, 1021-1058.
- Weigel RR, Bäuscher C, Pfitzner AJ, Pfitzner UM** (2001) NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol Biol* **46**, 143-160.
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C** (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1279-1291.
- Widjaja I, Lassowskat I, Bethke G, Eschen-Lippold L, Long HH, Naumann K, Dangl JL, Scheel D, Lee J** (2010) A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **61**, 249-258.
- Wieczorek K, Golecki B, Gerdes L, Heinen P, Szakasits D, Durachko DM, Cosgrove DJ, Kreil DP, Puzio PS, Bohlmann H, Grundler FMW** (2006) Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **48**, 98-112.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 383-389.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman MA, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono JJ, Cullimore JV, Jehle AK, Götz F, Kulik A, Molinaro A, Lipka V, Gust AA, Nürnberger T** (2011) *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 19824-19829.
- Winter CM, Austin RS, Blanvillain-Baufumé S, Reback MA, Monniaux M, Wu MF, Sang Y, Yamaguchi A, Yamaguchi N, Parker JE, Parcy F, Jensen ST, Li H, Wagner D** (2011) LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, *cis* motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev Cell* **20**, 430-443.

- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Wituszyńska W, Ślesak I, Vanderauwera S, Szechyńska-Hebda M, Kornaś A, van der Kelen K, Mühlenbock P, Karpińska B, Maćkowski S, van Breusegem F, Karpiński S** (2013) LESION SIMULATING DISEASE 1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 and PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency and seed yield in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**, 1795-1805.
- Wobus U, Weber H** (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol Chem* **380**, 937-944.
- Wong CK, Cobbett CS** (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **181**, 71-78.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep* **1**, 639-647.
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ** (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* **40**, 711-717.
- Xie C, Zhou X, Deng X, Guo Y** (2010) PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of *WRKY38* and *WRKY62*. *J Genet Genomics* **37**, 359-369.
- Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T** (2005) TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiol* **46**, 1175-1189.
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon M, Farmer EE** (2007) A Downstream Mediator in the Growth Repression Limb of the Jasmonate Pathway. *Plant Cell* **19**, 2470-2483.
- Yanagisawa S** (2004) Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol* **45**, 386-391.
- Yang DL, Yang Y, He Z** (2013) Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol Plant* **6**, 675-685.
- Yang H, Shi Y, Liu J, Guo L, Zhang X, Yang S** (2010) A mutant CHS3 protein with TIR-NB-LRR-LIM domains modulates growth, cell death and freezing tolerance in a temperature-dependent manner in *Arabidopsis*. *Plant J* **63**, 283-296.
- Yang W, Urano J, Tamanoi F** (2000) Protein farnesylation is critical for maintaining normal cell morphology and canavanine resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **275**, 429-438.
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**:6, doi: 10.1186/1746-4811-4-6.

- Ye J, Zheng Y, Yan A, Chen N, Wang Z, Huang S, Yang Z** (2009) *Arabidopsis* formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *Plant Cell* **21**, 3868-3884.
- Yoshida Y, Sano R, Wada T, Takabayashi J, Okada K** (2009) Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*. *Development* **136**, 1039-1048.
- Zhang B, Liu K, Zheng Y, Wang Y, Wang J, Liao H** (2013) Disruption of *AtWNK8* Enhances Tolerance of *Arabidopsis* to Salt and Osmotic Stresses via Modulating Proline Content and Activities of Catalase and Peroxidase. *Int J Mol Sci* **14**, 7032-7047.
- Zhang FL, Casey PJ** (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**, 241-269.
- Zhang H, Ogas J** (2009) An Epigenetic Perspective on Developmental Regulation of Seed Genes. *Mol Plant* **2**, 610-627.
- Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M** (2013) The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *J Genet Genomics* **20**, 23-35.
- Zheng Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE** (2009) Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-like15. *Plant Cell* **21**, 2563-2577.
- Zhou LL, Shi MZ, Xie DY** (2012) Regulation of anthocyanin biosynthesis by nitrogen in TTG1-GL3/TT8-PAP1-programmed red cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **236**, 825-837.
- Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM** (1993) Isoprenylation of the plant molecular chaperone ANJ1 facilitates membrane association and function at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8557-8561.
- Zhu S, Jeong RD, Venugopal SC, Lapchyk L, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P** (2011) SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathog* **7**, e1002318.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENE-VESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.

VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Der Buchstabencode verwendeter Protein- und Gen-Bezeichnungen wird jeweils im Text, soweit möglich, bei der ersten Nennung erklärt.

Englische Termini und Anglizismen wurden als solche beibehalten und kursiv markiert.

ABA	Abscisinsäure
AG	Arbeitsgruppe
AGI-Code	von ' <i>Arabidopsis Genome Initiative</i> ' vergebene Identifikationsnummer
APS	Ammonium Peroxodisulfat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
avr	<i>avirulence</i>
BAR	Bialaphos Resistenz (Resistenz gegenüber Herbizid BASTA [®])
BASTA [®]	Herbizid (Glufosinat-Ammonium, Bayer CropScience)
BIFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>base pairs</i> , Anzahl der DNA-Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Aminosäure Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	circa, ungefähr
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
cfu	<i>colony forming units</i>
Col	<i>Columbia</i>
Ct	<i>crossing threshold</i>
cy3	Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3
Da	Dalton
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	<i>Deoxyribonuclease</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DRE	<i>Drought Responsive Element</i>
E	Einstein
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Ethylen
et al.	lat. 'und andere'

- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -

ETI	<i>effector triggered immunity</i>
FLG22	22 Aminosäuren langes Peptid aus konserviertem Bereich des Flagellin
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)
FTase	Farnesyltransferase
GAs	Gibberelline
GAL4-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GAL4-BD	DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4
GGTase	Geranylgeranyltransferase
h	Stunde
HIPP	<i>'heavy metal associated isoprenylated plant protein'</i>
His	Aminosäure Histidin
HMA	<i>'heavy metal associated'</i> Proteinbindedomäne
hpi	<i>hours post infection</i>
HR	hypersensitive Reaktion
HRP	Horse Radish Peroxidase
I	Aminosäure Isoleucin
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ID	Identifikations-Nummer
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
<i>in planta</i>	lat. 'in der Pflanze'
<i>in silico</i>	lat. 'in Computer-Simulationen'
<i>in vivo</i>	lat. 'im Lebendigen'
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JAs	Jasmonate
k	Kilo
k.d.	<i>knockdown</i>
k.o.	<i>knockout</i>
L	Aminosäure Leucin
LB	<i>left border</i> , linke Begrenzungssequenz
lfc	<i>log2 fold change</i>
log	Logarithmus
M	Molar
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
μ g	Mikrogramm
min	Minute
miRNA	<i>micro-RNA</i>
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	<i>'nuclear localization signal'</i>

- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -

nm	Nanometer
NOS	Nopaline Synthase
NTA	Nitrilotriacetic Acid
OD	optische Dichte
oe	<i>over-expression</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PCD	programmierter Zelltod
PCM	Prenyl-Cystein-Methyl-Transferase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFAM	Protein-Familie
PR-Protein	<i>'pathogenesis related'</i> Protein
PSII	Photosystem II
Pst	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>
P. syringae	<i>Pseudomonas syringae</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
pv.	<i>pathovar</i>
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
RB	<i>right border</i> , rechte Begrenzungssequenz
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	<i>Ribonuclease</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SA	Salicylsäure
SAIL	<i>Syngenta Arabidopsis Insertion Library</i>
SAM	<i>shoot apical meristem</i>
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
smRS-GFP	<i>solubility modified red shifted Green Fluorescent Protein</i>
T-DNA	transferierte DNA aus Ti-Plasmiden der <i>Agrobacterien</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFs	Transkriptionsfaktoren
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TIR-NB-LRR	<i>Toll-interleukin-1 receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
xg	<i>gravitation force</i> , multipliziert mit der Erdbeschleunigung $g = 9,81\text{ms}^{-2}$
X-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Topologie der Signalwege pflanzlicher Pathogenabwehr	10
Abbildung 2:	Strukturelle Merkmale der HIPP-Proteine	11
Abbildung 3:	Phylogenetischer Stammbaum aller Arabidopsis-Proteine mit HMA-Domäne	12
Abbildung 4:	<i>HIPP3</i> Genstruktur	17
Abbildung 5:	HIPP3 Proteinstruktur	18
Abbildung 6:	Proteinstrukturmodelle	19
Abbildung 7:	Konstrukt pKEx-GFP02-4–HIPP3	21
Abbildung 8:	Vergleichende konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von transformierten Zwiebelepidermiszellen	22
Abbildung 9:	Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsstudien	26
Abbildung 10:	cDNA- und daraus abgeleitete Proteinsequenz der durch Überexpression generierten HIPP3-Proteine	28
Abbildung 11:	Elektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteinextrakte	29
Abbildung 12:	Elektrophoretische Auftrennung der mittels IMAC isolierten Proteine	30
Abbildung 13:	ICP-MS-Analyse der über IMAC gereinigten Proteine	31
Abbildung 14:	Unter Trockenstress wird der <i>HIPP3</i> Transkriptgehalt herunter reguliert	33
Abbildung 15:	Absinken der <i>HIPP3</i> -Transkriptlevel nach ABA-Behandlung	34
Abbildung 16:	Expression von <i>HIPP3</i> nach Inokulation mit <i>Pst</i> DC3000 und <i>Pst</i> DC3000 + <i>AvrRpm1</i>	36
Abbildung 17:	Expression von <i>MMP2</i> , <i>MLP</i> , <i>FRK1</i> und <i>PAD3</i> nach Inokulation mit <i>Pst</i> DC3000 und <i>Pst</i> DC3000 + <i>AvrRpm1</i>	37
Abbildung 18:	Expressionsmuster von <i>HIPP3</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien und pflanzlichen Organen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Abbildung 19:	Expressionsmuster von <i>HIPP3</i> nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen und Elicitoren	39
Abbildung 20:	Co-Expressionsnetzwerk um <i>HIPP3</i>	41

Abbildung 21:	Konservierte <i>cis</i> -Elemente im Promotor-Bereich von <i>HIPP3</i>	42
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der Genstruktur der <i>HIPP3 knockdown</i> Mutante (<i>hipp3-1</i>)	44
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der 'Transformationskassette' des pCB-Vektors	45
Abbildung 24:	Expression von <i>HIPP3</i> in der <i>knockdown</i> Mutante und den in der Arbeit untersuchten <i>HIPP3</i> Überexpressionslinien	46
Abbildung 25:	Differentiell regulierte Gene in <i>knockdown</i> Mutante (<i>hipp3-1</i>) und 35S:: <i>HIPP3</i> Überexpressionslinie (<i>HIPP3-oe</i>)	48
Abbildung 26:	Funktionelle Einordnung der durch Überexpression von <i>HIPP3</i> differentiell regulierten Gene	49
Abbildung 27:	Detaillierte funktionelle Zuordnung der 'TOP 100' differentiell regulierten Gene	51
Abbildung 28:	Validierung der Expressionsdaten	52
Abbildung 29:	Co-Expressionsanalyse der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie am stärksten hoch regulierten Gene	57
Abbildung 30:	Co-Expressionsanalyse der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie am stärksten herunter regulierten Gene	59
Abbildung 31:	Verzögerte Ausbildung der Infloreszenz in den untersuchten <i>HIPP3-oe</i> Linien	64
Abbildung 32:	Modell der Wirkung von <i>HIPP3</i> in pflanzlichen Signalwegen, insbesondere der Pathogenantwort	73
Abbildung 33:	Schematische Darstellung der Vektoren, die für die Vorbereitungen der biolistischen Transformation eingesetzt wurden	85

X TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Potentielle Interaktionspartner von HIPP3	24
Tabelle 2:	Auflistung der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene (Teil I)	53
Tabelle 2:	Auflistung der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene (Teil II)	54
Tabelle 2:	Auflistung der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene (Teil III)	55
Tabelle 2:	Auflistung der in der <i>HIPP3-oe</i> Linie im Vergleich zur Leervektorkontrolle am stärksten regulierten Gene (Teil IV)	56
Tabelle 3A:	Zusammenfassung der Co-Expressionsanalysen der Gene, die in der <i>HIPP3-oe</i> Linie hoch reguliert werden	58
Tabelle 3B:	Zusammenfassung der Co-Expressionsanalysen der Gene, die in der <i>HIPP3-oe</i> Linie herunter reguliert werden	60
Tabelle 4:	Genotypen der verwendeten <i>E.coli</i> Stämme	77
Tabelle 5:	Genotypen der verwendeten Hefe Stämme	77
Tabelle 6:	Primer für die Überprüfung der T-DNA Insertion in der <i>hipp3-1 knockdown</i> Mutante	79
Tabelle 7:	Primer für die Überprüfung der <i>HIPP3-ORF</i> Insertion in den <i>HIPP3-oe</i> Linien	79
Tabelle 8:	Primer für die quantitativen <i>realtime</i> -PCR Analysen	79
Tabelle 9:	Reaktionsschritte für die quantitative <i>realtime</i> -PCR Analysen	91
 <u>Appendix</u>		
Tabelle A1:	Differentiell regulierte Gene in <i>hipp3-1</i> vs. Leervektorkontrolle	114
Tabelle A2:	Differentiell regulierte Gene in <i>HIPP3-oe</i> vs. Leervektorkontrolle	116

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_001037004	0,133191459	-2,908426521	0,017835963
NM_113880	4,704223456	2,233956592	0,028955463
NM_102772	0,2911495	-1,780167953	0,035130789
NM_118859	0,295147927	-1,760489885	0,026507101
NR_022109	0,298503633	-1,744179605	0,019751943
NM_001084541	0,301661477	-1,728997622	0,047492409
NP221601	0,329622521	-1,601113281	0,017861755
NM_122845	0,330518912	-1,59719527	0,03943188
NM_128743	0,352291923	-1,505156695	0,017230589
NM_101924	0,354556879	-1,495911007	0,016765937
NM_129381	2,78976772	1,480145006	0,041592941
NM_123634	0,367306481	-1,444943742	0,006845132
NM_116075	0,368578921	-1,43995453	0,000704133
A_84_P844108	0,370138598	-1,433862506	0,012293124
NM_001124994	0,373861572	-1,419423907	0,006949629
NP174586	2,614311687	1,386431154	0,026247943
NM_125357	0,400036585	-1,32179615	0,022120722
NM_125343	2,469619479	1,304288767	0,047439451
NM_120298	0,407456255	-1,295282916	0,026956933
NR_022504	0,4137703	-1,273098	0,003437288
TA33368_3702	0,415312842	-1,267729611	0,014731175
NM_103599	2,407615581	1,267605058	0,030939039
BP651980	0,417560651	-1,259942331	0,016232343
A_84_P798373	2,341252745	1,227280686	0,013863545
NM_001123986	0,432019663	-1,210831117	0,008082383
NM_111779	2,30864239	1,207044716	0,018012689
NM_129744	2,285126085	1,19227377	0,034178425
DQ108748	2,280899553	1,189602914	0,020145959
NM_117652	2,277598937	1,187513725	0,045531903
NM_001125855	2,267856597	1,181329417	0,036300387
NM_103093	0,442448234	-1,176419423	0,019701015
NM_127760	0,442547953	-1,176094306	0,039403789
TA30477_3702	2,257935438	1,175004235	0,014060785
NM_101291	2,253518093	1,172179033	0,027629566
EG517227	2,249492857	1,169599786	0,011505082
NR_022184	0,446010845	-1,164849306	0,024034972
BE037594	2,20216016	1,138919398	0,045121233
NM_117804	0,455021582	-1,13599312	0,017989611
AK227999	0,455244371	-1,135286916	0,006205083
NM_118772	0,456209145	-1,132232729	0,017903038
NM_147867	0,460277092	-1,119425455	0,033280067
NM_202818	0,461617292	-1,115230826	0,012456514

Tabelle A1 (Teil I): Liste der differentiell exprimierten Gene der *hipp3-1* Mutante (Linie 28-23-74) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelerperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
EG449086	2,164373763	1,113949658	0,040455011
NM_116714	0,462191255	-1,113438133	0,024655056
EG425189	0,463175066	-1,110370502	0,024213991
NM_122440	0,463643908	-1,108910897	0,039727707
TC394900	2,156267073	1,10853588	0,043812704
NM_103812	0,464518684	-1,106191467	0,043023146
NM_114775	2,126900132	1,088752293	0,02687367
NM_118143	0,470539553	-1,087612095	0,033390683
NP226832	0,474028176	-1,076955282	0,009587981
A_84_P230039	2,092505155	1,065231177	0,011570576
AK117704	0,478729267	-1,062718086	0,021162408
TC368149	0,479924081	-1,05912189	0,008422392
NM_001084543	2,082755754	1,058493664	0,005431154
NM_148374	2,081886324	1,057891296	0,022379409
NM_120783	2,075998363	1,053805306	0,031562218
DR381041	0,481925056	-1,053119283	0,011087275
NM_112526	0,482296872	-1,052006643	0,018473224
NM_111802	2,064857609	1,046042298	0,039166731
TA33629_3702	0,484949626	-1,044093199	0,020040873
AK230419	2,051503345	1,036681507	0,0234462
NM_112079	2,048490053	1,034560887	0,029303426
NM_105300	0,489132961	-1,031701407	0,035058171
NM_111777	0,489406945	-1,030893522	0,01558047
NM_123751	2,033394312	1,023890007	0,0437792
A_84_P759443	0,493303747	-1,019451849	0,029417402
TA27808_3702	0,49569343	-1,012479957	0,003382486
NM_148331	0,495961067	-1,011701221	0,048201756

Tabelle A1 (Teil II): Liste der differentiell exprimierten Gene der *hipp3-1* Mutante (Linie 28-23-74) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log₂ ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log₂-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert ≤ 0,05' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_125473	116,0957619	6,859171498	0,022071203
NM_117760	10,42559162	3,382057349	0,000322962
BX829766	9,57005379	3,258527034	0,035725482
NR_022109	0,120172971	-3,056815653	0,01518041
NM_001125495	6,439653577	2,68698308	0,014556512
NM_105992	6,318520939	2,659586887	0,002134539
NM_123172	6,112737783	2,611818681	0,029954059
TA36021_3702	5,966842418	2,576967676	0,036972232
NM_117608	5,696911217	2,510179923	0,009397341
NM_100104	0,175772763	-2,508216562	0,031610686
NM_113771	0,187038173	-2,418595349	0,027313293
NM_113201	0,196567013	-2,346906863	0,031782942
NM_117415	5,021061231	2,327992318	0,029247814
NM_118895	4,986203294	2,317941705	0,004852693
NM_105367	0,201682863	-2,309839595	0,018297167
NM_129745	4,59235311	2,199233576	0,017586731
NM_148067	4,474190869	2,161626803	0,004648298
NM_116075	0,224360948	-2,15610651	0,003133623
NM_001037004	0,224701659	-2,153917318	0,0102444
NM_127555	4,257878688	2,090134846	0,018387541
NM_129623	0,237861118	-2,071808634	0,038816756
NM_130157	4,202118481	2,07111684	0,049979895
NM_121915	4,05258296	2,018841719	0,025922239
NM_117850	4,026168709	2,009407627	0,006308871
NM_130286	3,997205296	1,998991671	0,040161762
NM_104085	3,942118039	1,978970976	0,007641507
NR_022376	0,253798507	-1,978244515	0,022800799
R65132	0,254850823	-1,972275082	0,043524547
NM_130072	3,90952073	1,966991758	0,018043797
NM_117609	3,878899114	1,955647253	0,001000114
NM_121728	3,834194945	1,938923691	0,029324271
NM_120965	0,264497646	-1,918673213	0,040010068
NM_130281	0,265146365	-1,915139127	0,023888221
NM_128810	3,755662208	1,90906731	0,01209461
NM_202577	0,268933855	-1,894676715	0,001860211
NM_128629	0,270241623	-1,887678196	0,043056245
NM_127140	3,649561102	1,867722975	0,037287902
NM_001084589	3,614436325	1,853770675	0,011705044
NM_124652	0,283648126	-1,817825764	0,048910744
NM_113122	0,283814811	-1,816978214	0,027953457
NM_114710	3,51721741	1,814434515	0,00019522
NM_120607	0,285107194	-1,810423655	0,048362462

Tabelle A2 (Teil I): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_101851	0,286046011	-1,805680868	0,019538127
NM_122386	3,489472687	1,80300904	0,004282475
NM_113780	3,486586899	1,80181544	0,025302653
NM_121230	0,287048013	-1,800636027	0,017512826
NM_147879	3,466428123	1,793449846	0,000528421
NM_148657	0,288650396	-1,792604892	0,017650878
U74122	3,454966744	1,788671824	0,00824405
NM_121916	3,453745948	1,788161964	0,035308894
NP221601	0,290343673	-1,784166498	0,019674684
NM_111472	3,432344965	1,779194557	0,032252574
NM_119877	3,42360235	1,775515143	0,004982107
NM_001036860	3,417861627	1,77309399	0,004247183
NM_105681	3,378353659	1,756320363	0,019065417
NM_001125054	3,3720573	1,753629052	0,017359547
NM_118643	0,296656737	-1,753133548	0,03973421
NM_125071	3,362078756	1,74935352	0,019190089
NM_115028	3,358420033	1,747782677	0,000267292
NM_001161166	0,298901202	-1,742259394	0,030756563
NM_102701	0,299118753	-1,741209732	0,032550883
NM_113121	0,300050498	-1,736722772	0,028476411
NM_100126	0,302524577	-1,724875743	0,046914301
NM_117107	3,297937681	1,721564137	0,010258136
BP635769	3,282961905	1,714998009	0,013078845
NM_126327	3,276040262	1,711953088	0,00327124
NM_101291	3,25822367	1,704085645	0,009112367
NM_116161	3,232169571	1,692502889	0,008654906
NM_117851	3,197691506	1,677030763	0,022974209
H36258	3,193137768	1,674974799	0,014801243
NM_122287	3,183915435	1,670802018	0,000686662
NM_104541	3,182892482	1,670338424	0,001890445
NM_128070	3,182008726	1,669937792	0,001112909
NM_130208	0,314587135	-1,668468423	0,043878154
NM_114677	0,314653013	-1,668166338	0,018597664
CB254609	3,172921896	1,665812009	0,046260748
NR_022773	3,172496901	1,665618755	0,001268746
NM_103810	0,317121175	-1,65689388	0,023798955
NM_116338	3,128577263	1,645506733	0,00120862
NM_106060	3,121814933	1,642385014	0,000431701
NM_116143	0,320419697	-1,641965259	0,049542587
NM_126877	0,321146692	-1,638695657	0,001746191
NM_120813	3,111044929	1,63739923	0,026848265
NM_105277	0,321575266	-1,636771648	0,029859017

Tabelle A2 (Teil II): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_114775	3,106446248	1,635265091	0,00185597
NM_118859	0,324681527	-1,622902789	0,022406212
NM_128029	0,325179583	-1,620691418	0,005604563
NM_129460	3,059888461	1,613479065	0,008026443
AV564310	0,329588261	-1,601263235	0,045426675
TA29885_3702	3,029093248	1,598885991	0,010565704
NM_001125801	3,01736603	1,593289717	0,006681367
NM_118460	0,331715529	-1,591981543	0,040885218
NM_125225	0,333142628	-1,585788125	0,032025748
NM_119210	0,333812286	-1,58289104	0,0026484
NM_001084697	2,995159294	1,582632733	0,007330255
NM_179338	2,958945106	1,565082932	0,036049367
NM_112058	0,338433323	-1,563056467	0,033701549
NM_122440	0,339330573	-1,559236676	0,026202114
NM_128498	2,941072071	1,556342138	0,036481721
NM_123805	2,93421356	1,552973878	0,017215835
NM_106059	2,923472955	1,547683245	0,019925286
NM_119878	2,921696478	1,546806311	0,002309195
NM_105252	0,342273125	-1,546780078	0,017363477
NM_123772	2,908291828	1,540172041	0,004108788
NM_118543	2,905079488	1,538577639	0,002051516
NM_101819	0,346844009	-1,527641131	0,00823476
NM_116742	0,348881965	-1,519189075	0,003264211
NM_101978	0,34975189	-1,515596241	0,016444444
DQ108748	2,849962645	1,51094301	0,008416323
NM_122030	2,833922682	1,502800398	3,45073E-06
A_84_P750319	0,353968049	-1,498308954	0,000187354
NM_119174	2,82411862	1,497800686	0,016561684
NM_128213	0,357781543	-1,482849131	0,045450656
NM_103459	0,357905299	-1,482350189	0,02788648
NM_113528	0,358236151	-1,481017161	0,036744339
NM_179463	2,787043958	1,478735757	0,017989606
A_84_P759443	0,360807714	-1,470697911	0,000795837
NM_001036585	0,361609967	-1,467493652	0,01404964
NM_115875	2,764908443	1,467231708	0,031685833
NM_102578	0,361973448	-1,466044221	0,049115511
NM_100476	0,36231739	-1,464674043	0,011239672
NM_129674	0,362494582	-1,463968662	0,005222504
NM_113145	0,362693572	-1,463176916	0,002707423
NM_117224	0,364249452	-1,457001294	0,020034835
NM_112231	2,741796157	1,455121316	0,021626826
NM_126478	0,365507605	-1,452026671	0,00583451

Tabelle A2 (Teil III): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Accession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_001036883	0,365964747	-1,450223411	0,049711671
NM_102169	2,721135228	1,444208654	0,003080847
NM_120464	0,367576855	-1,443882168	0,001215368
NM_121271	2,716629387	1,441817761	0,042511985
TC379408	0,369157064	-1,437693331	0,024047984
NM_001123986	0,369465931	-1,436486758	0,010103834
NM_125890	0,370800528	-1,431284797	0,033285421
AK230242	2,695517168	1,430562099	0,034932808
NM_105858	0,372936822	-1,422996846	0,003838991
NM_120347	0,373375404	-1,421301201	0,000112014
EG517227	2,670141838	1,41691638	0,002617388
NM_130323	2,66623951	1,414806384	0,009598022
NM_115794	0,37538212	-1,413568159	0,021971943
NM_124927	0,375492188	-1,413145202	0,030240185
NM_101977	0,375940591	-1,411423402	0,008318749
NM_179853	0,376174185	-1,410527247	0,008202062
NM_126332	0,377111673	-1,406936285	0,020248609
NM_001036706	2,645775015	1,403690387	0,009850902
NM_111938	0,381239329	-1,391231138	0,048100216
NM_001036061	2,617372093	1,388119036	0,030166799
NM_129047	0,382427118	-1,386743266	0,041227291
NM_148667	0,3828821	-1,385027881	0,046238628
NM_129637	0,383051317	-1,384390413	0,023383541
NM_112473	0,383474075	-1,382799049	0,000440412
NM_130207	0,38414546	-1,380275391	0,018723635
NM_126121	2,601140316	1,379144226	0,026425594
NM_124928	0,384620325	-1,378493093	0,022846983
NM_126131	2,599730384	1,37836201	0,005522157
NM_120262	2,598478498	1,377667121	0,003052355
NM_118652	2,584277359	1,369760917	0,024920408
NM_113530	0,387242528	-1,368690692	0,00597771
NM_118673	0,38760697	-1,367333582	0,027804378
NM_125740	2,578117261	1,366317884	0,018770532
NM_105656	2,567041451	1,360106592	0,036905231
NM_103273	0,390728675	-1,355760958	0,031143094
NM_121240	2,556858054	1,35437207	0,034166661
NM_100684	2,554099788	1,352814892	0,006992665
NM_122319	2,551050196	1,351091287	0,026449136
NM_103881	0,392012695	-1,351027719	0,009389257
NM_001035609	0,392171508	-1,35044337	0,034522057
NM_118239	2,539191566	1,344369241	0,017488576
AV796960	0,394051255	-1,343544799	0,028028959

Tabelle A2 (Teil IV): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_129381	2,535193995	1,342096147	0,018375446
AI995133	2,530167457	1,339232871	0,023119931
AY099820	0,395419922	-1,338542535	0,033696941
NM_001125299	0,395638218	-1,337746298	0,014810003
NR_023276	0,3982164	-1,328375457	0,004350861
NM_128108	0,398254648	-1,328236894	0,011535553
NM_117519	0,398517882	-1,327283633	0,02690822
NM_112212	0,399634545	-1,323246798	0,037563015
NM_103811	0,400197774	-1,321214952	0,004556714
NM_121008	0,400757104	-1,319200001	0,032952055
NP231273	2,491903165	1,317248006	0,016183277
NM_120757	2,485235706	1,313382687	0,037555088
NM_103812	0,403397759	-1,309725026	0,046072346
NM_114704	2,477117743	1,308662445	0,039283377
TA29588_3702	0,403849638	-1,308109847	0,023491532
NM_119029	2,475234013	1,307564927	0,039360464
NM_129432	2,463123299	1,300488848	0,023420137
NM_121377	0,406099767	-1,300093896	0,040118626
NM_101926	2,46232726	1,300022518	0,036402512
NM_119491	0,407412659	-1,295437289	0,003451444
NM_129215	2,451073465	1,293413726	0,014957985
NM_202692	2,450998122	1,293369379	0,002536067
NM_130008	2,445642302	1,290213412	0,009572593
NM_111482	0,409125825	-1,289383487	0,026093826
NM_117849	0,409727603	-1,287263005	0,009463194
NM_102753	2,435391174	1,284153518	0,003116848
NM_115856	2,426886205	1,279106463	0,002727822
NM_105094	2,42587915	1,278507681	0,003787516
NM_124654	0,412508468	-1,277504361	0,021215384
NM_130068	2,423401494	1,277033441	0,029832673
NM_121063	0,412810049	-1,276450003	0,011775105
NM_121035	2,421705814	1,276023619	0,002628841
NM_106714	0,413004522	-1,275770517	0,040097914
NM_103546	2,420307198	1,275190174	5,20412E-05
AK228737	0,413522353	-1,273962778	0,008526922
NM_001124828	2,408548036	1,268163697	0,015567591
NM_001084013	2,407402025	1,267477085	0,003266325
NM_147989	2,405148167	1,266125773	0,010772179
NM_126444	2,401541762	1,263960897	0,031550603
NM_001123738	0,417266922	-1,260957538	0,002870299
NM_119567	0,417459256	-1,260292698	0,001356646
NM_122387	2,394144453	1,259510201	0,023021724

Tabelle A2 (Teil V): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Accession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NR_022904	0,418723038	-1,255931799	0,005734569
NM_111292	0,419857478	-1,252028413	0,004279025
NM_101224	0,42058318	-1,24953694	0,041769523
NM_001161047	0,420591058	-1,249509915	0,012744981
NM_102694	2,376675734	1,24894508	0,002448471
NM_101686	2,374468678	1,247604725	0,003015674
NM_179352	0,422801522	-1,241947526	0,027108776
NM_001036150	2,358326487	1,237763459	0,01632683
NM_123174	0,424441778	-1,236361426	0,034540576
NM_118232	2,35490602	1,235669486	0,018948296
NM_118258	0,425067364	-1,2342366	0,031562551
NM_106387	2,35187156	1,233809274	0,040046948
NM_115339	2,351494426	1,233577913	0,048546383
AK221636	0,426511604	-1,2293431	0,026133011
NM_001036586	0,42683455	-1,228251135	0,021571597
NM_114568	0,428217179	-1,223585422	0,002584815
AK118176	0,42843726	-1,222844141	0,030202361
NM_129157	2,33187693	1,221491649	0,018314157
NM_001161308	2,330547945	1,220669193	0,014861188
NM_104255	0,429632001	-1,218826638	0,002236371
AK318901	0,429935039	-1,217809401	0,004543772
NM_127650	2,325605776	1,21760656	0,038779578
NM_111961	2,325315556	1,21742651	0,040419171
AK229152	0,430475491	-1,215996996	0,004092143
NM_102811	2,321157385	1,214844347	0,031597459
NM_128426	2,317766867	1,21273546	0,003328963
NM_129274	2,315117991	1,211085723	0,001761203
NM_203046	2,312895612	1,209700154	0,007155639
NM_101447	0,432703465	-1,208549421	0,033519671
NM_114717	2,309968757	1,207873339	0,026236075
NM_125297	0,433543478	-1,205751415	0,002059354
TA29208_3702	2,297615154	1,200137169	0,043086404
NM_114723	0,435288281	-1,199956914	0,032739511
NM_105413	0,435466554	-1,199366177	0,009909412
NM_116469	2,293169065	1,197342722	0,002553
CO048667	0,436318349	-1,196546948	0,011035222
NM_001035619	2,29167164	1,196400343	0,001258161
NM_120238	2,289718382	1,195170169	0,049097651
TA36111_3702	0,436821758	-1,194883376	0,029859348
NM_127920	2,288806681	1,194595614	0,040606052
NM_121588	0,43757413	-1,192400648	0,047555439
NM_128374	2,281962671	1,190275192	0,014722086

Tabelle A2 (Teil VI): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_114572	0,439066524	-1,187488553	0,01351935
NM_100339	0,440816755	-1,181749034	0,006291187
NM_202669	0,442794462	-1,175290916	0,027953086
NM_125483	0,442828485	-1,175180068	0,030779329
NP281378	0,444130488	-1,170944484	0,030231516
NM_112504	2,251408708	1,170827979	0,031397496
NM_101464	0,444178391	-1,170788887	0,002938697
BP589120	2,250603124	1,170311671	0,020837264
NM_001123908	0,444579893	-1,169485395	0,038271103
NM_179929	2,248430849	1,168918514	0,046616985
NM_101503	2,247237423	1,168152555	0,015366256
BE523647	2,242944922	1,165394194	0,025850459
NM_124181	2,242114745	1,164860113	0,04364685
NM_119223	2,241667991	1,164572619	0,014064839
AY080642	0,446465839	-1,163378303	0,006761072
NM_124651	0,447911213	-1,158715312	0,020287969
NR_023150	0,448333364	-1,157356229	0,000443769
NM_125926	2,226521782	1,154791726	0,002033225
NM_120298	0,449149267	-1,154733117	0,033706409
NM_128177	0,449491156	-1,153635364	0,002467047
NM_001036167	0,449909227	-1,152294141	0,031933076
NM_001125931	0,450130993	-1,151583193	0,040652522
NM_122391	2,220185461	1,150680196	0,004967248
NM_115935	0,450416677	-1,15066785	0,006576335
NM_179797	0,451413533	-1,147478424	0,005236773
NM_115965	0,452446287	-1,144181565	0,004133086
NM_119637	2,205338241	1,140999945	0,000867041
NM_129433	2,205128092	1,140862462	0,00261151
NM_118242	0,453942595	-1,139418228	3,18686E-05
NM_103054	2,199335276	1,137067552	0,001112726
NM_105948	0,454715856	-1,136962784	0,004228272
NM_123237	2,187501347	1,129283905	0,012519623
NM_105405	0,45726059	-1,128911512	0,010991546
NM_148060	0,457465464	-1,128265264	0,016464087
NM_125067	2,185821276	1,128175444	0,023531217
TA36008_3702	0,457724812	-1,127447595	0,009157891
NM_123682	0,458501735	-1,125000902	0,002032727
NM_120628	0,459273125	-1,122575729	0,03194979
NM_118786	0,460132252	-1,119879513	0,001483039
NM_103829	0,460351128	-1,119193413	0,011706529
NM_125358	0,460883944	-1,117524587	0,040946129
NM_121082	0,461029223	-1,117069893	0,000293476

Tabelle A2 (Teil VII): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_201962	2,167597653	1,11609699	3,70055E-05
NM_100663	2,165633321	1,11478899	0,012077482
TA26531_3702	2,165261317	1,114541149	0,026050799
NM_130070	2,16400793	1,113705786	0,000745256
NM_124347	2,15873835	1,110188392	0,011199468
NM_001125377	0,464310647	-1,106837731	0,009655086
NM_130079	2,14809073	1,10305493	0,00526473
NM_122668	0,465619294	-1,102777254	0,036428738
NP226307	0,466673044	-1,099515957	0,003512211
NR_022067	2,142653288	1,09939842	0,042210544
NM_148331	0,46681985	-1,099062186	0,034277036
NM_113405	0,467368476	-1,097367667	0,021771571
NR_022080	0,4675722	-1,096738939	0,018305091
NM_114917	2,137999695	1,096261647	0,029712608
NM_112776	0,467853195	-1,095872189	0,041180302
NM_127428	2,134968457	1,094214755	0,011902535
NM_126351	2,132642437	1,092642101	0,025239557
NM_147244	0,470102947	-1,08895137	0,045632667
NM_123481	0,470663485	-1,087232164	0,017186683
NR_022955	0,471283718	-1,085332254	0,019315783
NM_122605	0,471926241	-1,083366703	0,028446307
NM_001160842	2,115867915	1,081249568	0,010083971
NM_115455	2,114834563	1,08054481	0,020265072
NM_117652	2,114702183	1,080454501	0,016364021
NM_179115	0,473312413	-1,079135336	0,019503396
NM_202818	0,473982116	-1,077095468	0,016669964
NM_105185	0,474307734	-1,076104703	0,002962341
NM_001036799	2,107520357	1,075546567	0,010625354
TA32187_3702	0,474660215	-1,075032964	0,02033576
NM_001084592	2,105600027	1,074231413	0,000197789
NM_124899	0,474941353	-1,074178719	0,009835463
NM_124900	2,10484652	1,07371504	0,037753165
NM_127551	0,47630944	-1,070028954	0,0011688
NM_001084209	2,098837217	1,069590278	0,026321354
NM_120142	2,09859904	1,069426551	0,002558162
A_84_P857309	0,477478357	-1,066492754	0,009375649
NM_114571	0,477754636	-1,065658221	0,007540043
BX842416	0,478025058	-1,064841848	0,00055745
NM_118492	0,479015846	-1,061854712	0,03791781
TA42683_3702	2,085667773	1,060509368	0,044503059
NM_103093	0,479726301	-1,059716558	0,023676349
NM_101967	0,480227401	-1,05821037	0,007845369

Tabelle A2 (Teil VIII): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelerperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_115833	2,082013323	1,0579793	0,002946627
NM_112260	2,081057835	1,05731706	0,025472294
BX815895	0,481440092	-1,054571807	0,001070066
NM_123708	2,076629376	1,054243756	0,03206517
NM_180384	2,076319296	1,054028318	0,004015907
NM_101638	2,076044894	1,053837642	0,028552818
NM_121622	0,481729764	-1,053704029	0,039783474
NM_111106	0,481774889	-1,053568895	0,001523131
NM_112345	0,482042025	-1,052769166	0,031976638
EG472756	2,07193364	1,050977797	0,01451567
BX817788	0,4836282	-1,048029726	0,034339744
NM_106329	2,066595595	1,0472561	0,009251227
NM_121095	0,484388871	-1,045762375	0,034612201
NM_116476	0,484563085	-1,045243594	0,0221694
NM_119796	0,484864097	-1,044347665	0,005426988
NM_179522	0,485221067	-1,043285905	0,017216722
NM_113631	2,060225207	1,042802049	0,034372612
NM_111439	0,485603529	-1,04214919	0,022182787
A_84_P767429	0,485679341	-1,041923973	0,004406184
NM_124532	0,485811664	-1,041530965	0,023294426
NM_202562	2,058036581	1,041268626	0,004646335
NM_179783	0,486063096	-1,040784492	0,012634369
NM_101823	2,056035791	1,039865379	0,037785784
NM_122047	0,486555841	-1,039322706	0,048351981
NM_121474	2,053168129	1,037851771	0,014576063
NM_100203	0,487413383	-1,03678223	0,019948294
NM_130113	0,487669853	-1,036023304	0,037263592
NM_126214	0,487999133	-1,035049509	0,004024439
NM_113529	0,488333631	-1,034060957	0,017575423
NM_106730	2,045238919	1,032269385	0,045738575
NM_105911	2,044997818	1,032099304	0,009188327
NM_118727	0,489066614	-1,031897111	0,023719302
NM_129170	0,489067403	-1,031894783	0,004588375
NM_129238	2,044693784	1,0318848	0,000108987
NM_113809	0,489889195	-1,029472624	0,035172514
NM_129913	2,03921559	1,028014308	0,045241966
NM_125288	0,490702622	-1,027079116	0,017395689
NM_106074	2,036983782	1,026434494	0,014345803
NM_130063	2,03536802	1,025289676	0,001417806
NM_101860	0,491313363	-1,025284617	0,000865356
NM_123278	2,033951553	1,024285316	0,004896058
NM_117633	2,032129469	1,02299232	0,02020469

Tabelle A2 (Teil IX): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log2 ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelexperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log2-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert $\leq 0,05$ ' erfüllt war.

Target ID	ratio	lfc-Wert	p-Wert
NM_122260	2,028458634	1,020383882	0,026320153
AK175505	0,493022439	-1,020274785	0,017846773
NM_104150	2,028245173	1,020232055	0,000574089
NM_118544	2,028157004	1,020169339	0,000386083
NM_104825	0,493195583	-1,019768215	0,002236928
NM_127926	2,025380011	1,018192618	0,000165371
TA36898_3702	0,493737896	-1,018182714	0,017737381
NM_180017	2,024475644	1,017548286	0,048064687
NM_125822	2,023893378	1,017133288	0,000174282
NM_001084041	2,022500675	1,016140184	0,041270271
TA53499_3702	2,022229471	1,015946715	0,0477
TA29218_3702	2,021122963	1,015157096	0,007919753
NM_120981	2,019359314	1,013897639	0,012495088
NM_001085088	0,495816544	-1,012121683	0,00131582
AA042562	0,496086211	-1,011337239	0,002569336
NM_113477	2,014557679	1,010463112	0,027940268
NM_121325	2,014141868	1,010165304	0,014055436
NM_104081	2,013770873	1,009899542	0,008960925
NM_102249	2,012351599	1,008882396	0,032251928
NM_203165	0,497603701	-1,006930878	0,020796343
NM_123618	0,497768198	-1,006454034	0,008511833
NM_112843	2,007912165	1,005696161	0,003542825
NM_114705	2,007476206	1,005382888	0,017763564
NM_148410	0,498282238	-1,004964946	0,014414768
NM_105220	2,005054413	1,003641389	0,02031407
NM_201974	0,499210839	-1,002278836	0,043600105

Tabelle A2 (Teil X): Liste der differentiell exprimierten Gene der *HIPP3-oe* Linie (Linie 133-5) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Linie 187-2). Dargestellt sind die im Array verwendeten Target IDs (GenBank Sequence Acession Code; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), das relative Expressionslevel (ratio), der lfc-Wert (log₂ ratio) und der p-Wert (Signifikanz auf der Basis von drei unabhängigen Einzelerperimenten; t-Test (Welch-Test)). Die Gene wurden nach den absoluten log₂-Werten in abfallender Reihenfolge geordnet. Es wurden nur die Gene gelistet, bei denen die Bedingung 'lfc-Absolutwert ≥ 1 und pWert ≤ 0,05' erfüllt war.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit '**Das Metallbindeprotein HIPP3 als regulatorische Komponente pflanzlicher Stressantworten und Entwicklung**' selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 07.Oktober 2013

Wiebke Zschiesche

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name:	Zschesche
Vorname:	Wiebke
Geburtsdatum:	16.04.1978
Geburtsort:	Hoyerswerda
Nationalität:	deutsch

Bildungsgang

1984 – 1989	Grundschule 'Paul Hornick', Hoyerswerda
1989 – 1994	Realschule 'Albert Schweitzer', Hoyerswerda Abschluss: Realschulabschluss
1994 – 1997	Gymnasium 'Leon Foucault', Hoyerswerda Abschluss: Abitur
1997 – 1999	Grundstudium Biologie Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Vordiplom
1999 – 2002	Hauptstudium Biologie Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg
2002 – 2003	Diplomarbeit, Institut für Pflanzenphysiologie Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom
2004 – 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Prof. Dr. Klaus Humbeck (Thema der Arbeit: Molekulare Antwort auf Kältestress bei Getreidepflanzen)
2006 – 2009	krankheitsbedingte Pause
2009 – 2013	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg