

**Funktionelle Charakterisierung von Hitzeschockfaktoren
aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh**

Dissertation

**der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

vorgelegt von

**Klaus Christian Lohmann
aus Bad Kreuznach**

2005

Tag der mündlichen Prüfung:	03.12.2004
Dekan:	Herr Prof. Dr. Friedrich Schöffl
1. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Friedrich Schöffl
2. Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. Vera Hemleben

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Die Hitzeschockreaktion	3
2.2	Die Hitzeschockproteine	5
2.3	Die Regulation der Hitzeschockantwort	9
2.3.1	Die Hitzeschockpromotoren	10
2.3.2	Die Hitzeschockfaktoren	12
2.3.2.1	Die HSF-Struktur	15
2.3.2.2	Regulation der HSF-Aktivität	18
2.4	HSF-Systeme: Redundante oder individuelle HSF-Funktionen?	27
2.5	Mutantenisolierung in <i>Arabidopsis</i> : Insertionsmutagenese	30
2.6	Zielsetzungen dieser Arbeit	33
3	MATERIAL UND METHODEN	35
3.1	Pflanzenlinien	35
3.2	Bakterienstämme	36
3.3	Plasmide	37
3.3.1	<i>E. coli</i> -Plasmide	37
3.3.2	Binäre Plasmide für <i>Arabidopsis</i> -Transformation	37
3.4	Konstrukte	38
3.4.1	<i>HSF</i> -cDNAs	38
3.4.2	HSF-Expressionskonstrukte für <i>E. coli</i>	39
3.4.3	Δ HSF-Expressionskonstrukte für <i>E. coli</i>	40
3.4.4	pBI121 Konstrukte für <i>HSF7</i> Expression in <i>Arabidopsis</i>	41
3.4.5	<i>HSF7</i> -Promotor-Konstrukte	41
3.4.6	Sonstige Konstrukte	43
3.5	Primer und synthetische Oligonukleotide	43
3.5.1	Primer für PCR	43
3.5.2	NLS-Oligonukleotide	49
3.5.3	Oligonukleotide für DNA-Bindungsstudien	49
3.6	Materialien	50
3.6.1	Antikörper	50
3.6.2	Enzyme	51
3.6.3	Kits	51
3.6.4	Längenstandards	51
3.6.5	Chemikalien und Radioisotope	52
3.6.6	Verbrauchsmaterialien	53
3.7	Computerprogramme und Datenbanken	53
3.8	Kultivierungsmethoden	54
3.8.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54
3.8.2	Kultivierung von <i>Arabidopsis in vitro</i>	54
3.8.2.1	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen	54
3.8.2.2	Pflanzenkultur auf Festmedium	55
3.8.3	Kultivierung von <i>Arabidopsis</i> auf Erde	55
3.8.4	Hitzeschockbehandlung von Pflanzengewebe	55
3.9	Transformationstechniken	56
3.9.1	Transformation von Bakterien	56
3.9.1.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	56

3.9.1.2	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	57
3.9.1.3	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> - und <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	57
3.9.1.4	Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation	57
3.9.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch <i>A. tumefaciens</i>	57
3.9.2.1	Vorbereitung der <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	57
3.9.2.2	Pflanzenransformation durch Blüten-Vakuuminfiltration	58
3.10	Kreuzungen an <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	58
3.11	Molekularbiologische Methoden	59
3.11.1	Isolierung von Nukleinsäuren	59
3.11.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus pflanzlichem Gewebe	59
3.11.1.2	Plasmidisolierung aus Bakterien	60
3.11.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe	60
3.11.1.4	Isolierung von mRNA aus Pflanzengewebe	60
3.11.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	61
3.11.2.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	61
3.11.2.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	61
3.11.2.3	Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA	61
3.11.2.4	Herstellung doppelsträngiger Oligodesoxynukleotide	62
3.11.2.5	Gelelektrophorese von RNA	62
3.11.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	63
3.11.3.1	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	63
3.11.3.2	Dephosphorylierung von DNA	63
3.11.3.3	Ligation von DNA	64
3.11.3.4	cDNA-Synthese aus poly(A) ⁺ -RNA	64
3.11.3.5	PCR-Amplifikation von DNA	64
3.11.3.6	Mutation von DNA durch gezielte Basensubstitution	65
3.11.3.7	Identifizierung des Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE	66
3.11.3.8	Sequenzierung von DNA	66
3.11.3.9	Radioaktive Endmarkierung von DNA mittels Klenow-Enzym	67
3.11.3.10	Radioaktive Markierung von DNA mittels <i>random priming</i>	67
3.11.3.11	Radioaktive Markierung von RNA mittels <i>in vitro</i> -Transkription	67
3.11.4	Hybridisierungstechniken zur Identifizierung von Nukleinsäuren	68
3.11.4.1	<i>Southern</i> -Analyse	68
3.11.4.2	<i>Northern</i> -Analyse	69
3.11.4.3	Entfernen radioaktiver Proben von Nylonmembranen	70
3.11.5	Identifizierung von <i>Arabidopsis</i> -T-DNA-Insertionsmutanten	70
3.11.6	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i>	74
3.12	Biochemische Methoden	76
3.12.1	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>Arabidopsis</i>	76
3.12.1.1	Denaturierende Herstellung von Gesamtproteinextrakten	76
3.12.1.2	Herstellung nativer Gesamtproteinextrakte	76
3.12.2	Expression und Isolierung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	76
3.12.2.1	Expression rekombinanter Proteine	76
3.12.2.2	Herstellung nativer Gesamtproteinextrakte	77
3.12.2.3	IMAC zur Reinigung rekombinanter Proteine	77
3.12.3	Fällung und Umpuffern von Proteinen	79
3.12.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	79
3.12.5	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	79
3.12.6	Immunpräzipitation zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von HSF	80
3.12.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	83
3.12.7.1	Native PAGE von Proteinen	83
3.12.7.2	SDS-PAGE von Proteinen	83
3.12.7.3	Coomassie-Färbung von Proteinen nach PAGE	84
3.12.8	<i>Immunoblotting</i> von Proteinen	84
3.12.8.1	<i>Western-Blot</i>	85

3.12.8.2 Immundetektion	85
3.12.9 Affinitätsreinigung von Antiseren	86
3.12.10 GUS-Aktivitätsbestimmung	87
3.12.11 Histochemische GUS-Analyse	88
4 ERGEBNISSE	89
4.1 Bindung rekombinanter HSF an Hitzeschockelemente	90
4.2 Herstellung HSF-spezifischer Antikörper	91
4.3 Expressionsstärken von HSF1-7 in <i>Arabidopsis</i>	92
4.4 Immunpräzipitation zur Bestimmung von HSF-Aktivität	94
4.5 HSE-Bindungsaktivitäten in <i>Arabidopsis</i> -Blättern nach Hitzeschock	95
4.6 Charakterisierung der HSF3-Aktivität in <i>HSF3</i> -transgenen <i>Arabidopsis</i>	97
4.6.1 DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in <i>HSF3</i> -transgenen <i>Arabidopsis</i> bei 22°C	97
4.6.2 HSF-DNA-Bindung in <i>HSF3</i> -transgenen Pflanzen unter HS-Bedingungen	98
4.7 Charakterisierung von <i>HSF7</i>	100
4.7.1 Regulation der <i>HSF7</i> -Expression	100
4.7.1.1 <i>HSF7</i> -Promotor: Transkriptionsstart und Identifizierung von HSE	100
4.7.1.2 Bindung rekombinanter HSF an <i>HSF7</i> -Promotorfragment <i>in vitro</i>	102
4.7.1.3 Hitzeinduzierbarkeit des <i>HSF7</i> -Promotors	103
4.7.2 Charakterisierung <i>HSF7</i> -transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	106
4.7.2.1 Nomenklatur <i>HSF7</i> -transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	106
4.7.2.2 Phänotypische Charakterisierung <i>HSF7</i> -transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	106
4.7.2.3 HSF7-Expression und DNA-bindende Komplexe in <i>HSF7</i> -transgenen Pflanzen	111
4.7.2.4 HS-Genexpression in <i>HSF7</i> -GUS-transgenen Pflanzen und Thermotoleranz	113
4.8 Isolierung und Charakterisierung von <i>HSF</i> -Mutanten	115
4.8.1 Integrationsorte der T-DNA in <i>HSF</i> -Insertionsmutanten	115
4.8.2 Einfluss der T-DNA-Insertion auf die DNA-Bindungsaktivität der HSF	117
4.8.3 HSF- und HSP-Expression in <i>HSF</i> -Mutanten und Thermotoleranz	118
4.9 Charakterisierung der <i>HSF1</i> - und <i>HSF3</i> -Doppelmutante <i>hsf1⁻/hsf3⁻</i>	120
4.9.1 HSE-bindende Komplexe in <i>hsf1/3</i> -Pflanzen	120
4.9.2 <i>Northern</i> - und <i>Western</i> -Analyse der Genexpression in <i>hsf1/3</i> -Pflanzen	122
4.9.3 <i>Real-Time-PCR</i> zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene	123
4.9.4 Thermotoleranz von <i>hsf1/3</i> -Pflanzen	127
4.9.5 Einfluss von <i>HSF-loss-of-function</i> und <i>HSF-gain-of-function</i> auf sHSP-Expression	128
5 DISKUSSION	129
5.1 Beteiligung einzelner HSF an der HS-Reaktion	129
5.2 Funktion der Klasse-A-HSF, HSF1 und HSF3 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
5.3 Funktion der Klasse-B-HSF, HSF4 und HSF7 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	139
6 LITERATURVERZEICHNIS	145
7 ANHANG	165
7.1 Konstruktarten	165
7.2 Feldmann-Linien	167
7.3 Übersichtstabelle: 21 HSF-Homologe aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	168
7.4 AS- <i>Alignment</i> von HSF1-4 und HSF6-7	169
7.5 AS- <i>Alignment</i> der 21 HSF-Homologen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	171
7.6 Übergänge von <i>HSF</i> -Genen und T-DNA in T-DNA-Insertionslinien	172
7.7 Abkürzungen	174

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hitzeschockfaktoren (HSF) eukaryotischer Organismen sind konservierte Transkriptionsfaktoren mit starken Homologien innerhalb der DNA-Bindungsdomäne. Unter physiologischen Stressbedingungen binden HSF in oligomerer Form an Hitzeschockelemente (HSE) innerhalb der Promotoren von HS-Genen und induzieren deren transiente Transkription. Erhöhte Titer an HS-Genprodukten schützen vor akuten Zellschäden und führen zum Erwerb höherer Stresstoleranz. Neben dieser Rolle als zentrale Regulatoren der HS-Reaktion wurden für einzelne Vertreter der HSF-Familie zellstadium- und entwicklungspezifische Funktionen nachgewiesen. Auf die Expression ihrer Zielgene, bei denen es sich nicht ausschließlich um klassische HS-Gene wie Hitzeschockproteine handelt, üben HSF in einigen Fällen auch negativ-regulatorische Eigenschaften aus.

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält die für Pflanzen typische, große Anzahl von 21 HSF-Homologen. Sechs von ihnen waren Gegenstand dieser Arbeit. Aufgrund struktureller Besonderheiten innerhalb ihrer Aminosäuresequenz gehören jeweils drei der Klasse-A und drei der Klasse-B an. Im Einzelnen handelte es sich um HSF1 (AtHsfA1a), HSF2 (AtHsfA1e), HSF3 (AtHsfA1b) und HSF4 (AtHsfB1), HSF6 (AtHsfB2a), HSF7 (AtHsfB2b); wobei die Angaben in Klammern der von Nover *et al.* (2001) vorgeschlagenen Nomenklatur entsprechen. Die funktionelle Charakterisierung dieser HSF umfasste deren Expressionsanalyse, den Nachweis ihrer HSE-Bindungsaktivität, *loss-of-function*- und im Einzelfall *gain-of-function*-Ansätze und wurde im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung an der HS-Reaktion durchgeführt.

Aufgrund der nachgewiesenen Expression in vegetativem *Arabidopsis*-Gewebe können alle 6 HSF an der HS-Reaktion beteiligt sein. Die in *E. coli* rekombinant exprimierten HSF haben in homooligomerer Form an synthetische HSE gebunden, womit sie ein wesentliches HSF-Merkmal erfüllt haben. Mit Hilfe eines neu entwickelten Immunpräzipitationsassays konnte eine Hitzeinduktion der HSE-Bindungsaktivitäten von HSF1 und -3 in *Arabidopsis*-Blättern nachgewiesen werden. Außerdem wurde mit dieser Methode der vollständige Verlust der HSE-Bindungsaktivität von HSF1 und HSF3 in den im Rahmen dieser Arbeit isolierten T-DNA-Insertionslinien *hsf1-tt1* und *hsf3-tt1* gezeigt. Die HSE-Bindungsaktivitäten von HSF2, HSF4, HSF6 und HSF7 konnten in *Arabidopsis*-Blättern vor und während eines 2-stündigen HS nicht nachgewiesen werden. In wie weit das ein Hinweis dafür ist, dass diese HSF nicht an der HS-Reaktion beteiligt sind, wird diskutiert.

Mittels Durchmustern von T-DNA-Insertionslinien wurden *knockout*-Mutanten für HSF1, HSF3 und HSF7 isoliert. Die phänotypisch unauffälligen Mutanten zeigten auch auf molekularer Ebene keine Unterschiede zum WT bezüglich der HS-Genexpression, weshalb für diese HSF entweder redundante oder für das normale Wachstum und die HS-Reaktion entbehrliche Funktionen angenommen werden müssen.

Die Doppelmutante *hsf1/hsf3*, welche durch Kreuzen der beiden Einzelmutanten generiert worden war, zeigte keine veränderte Thermotoleranz. Analysen zur HS-Genexpression ergaben aber, dass HSF1 und HSF3 synergistisch zusammenwirken und für die Akkumulation großer Mengen von hitzeinduzierten Transkripten in der Frühphase der HS-Reaktion verantwortlich sind. Anhand der *hsf1/hsf3*-Doppelmutante konnte außerdem gezeigt werden, dass die hitzeinduzierte Expression von *HSF4* und *HSF7* abhängig von HSF1 und HSF3 ist. Darüberhinaus ergab die strukturelle und funktionelle Analyse des *HSF7*-Promotors, dass *HSF7* ein direktes Zielgen von HSF darstellt. Somit wurde erstmals die direkte Regulation der Expression eines HSF durch andere HSF gezeigt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu HSF4, HSF6 und HSF7 lassen keine eindeutige Aussage über ihre Funktion im Speziellen oder die Funktion von Klasse-B-HSF im Allgemeinen zu. Während der *HSF7-knockout* ohne nachweisbare Auswirkungen blieb, hatte die ektopische Expression von HSF7-Konstrukten schwerwiegende, pleiotrope Effekte auf die transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen.

[Teile dieser Arbeit wurden zwischenzeitlich in Zhang *et al.* (2003) und Lohmann *et al.* (2004) veröffentlicht.]

2 EINLEITUNG

2.1 Die Hitzeschockreaktion

Die Evolution basiert auf der natürlichen Selektion von Organismen, welche die vorhandenen Ressourcen effizienter nutzen als andere Organismen. Sie führt somit zu einer bestmöglichen Anpassung an die bestehenden Umweltbedingungen. Evolutiver Stillstand ist dabei ausgeschlossen, da kaum ein Ökosystem über einen längeren Zeitraum absolut konstante Umweltbedingungen bietet (Darwin, 1859). Die Spezialisierung auf bestimmte Umweltbedingungen führt unweigerlich zur Definition suboptimaler Lebensbedingungen. Bei der

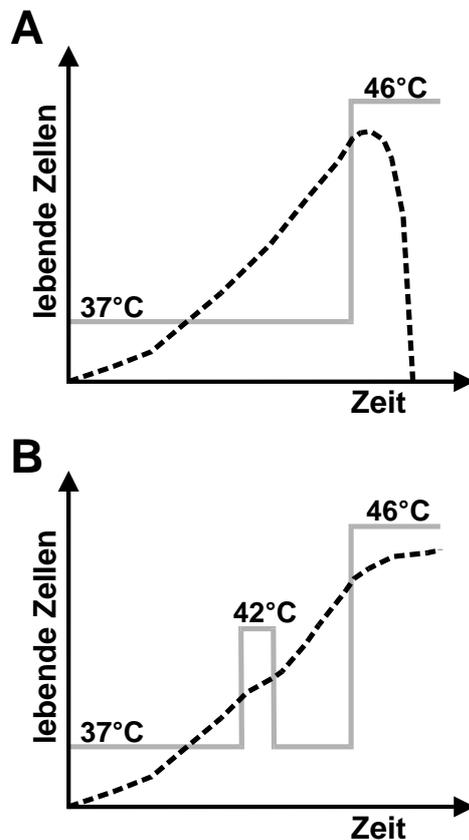


Abbildung 2.1: Wachstumskurve von *Escherichia coli* bei unterschiedlichen Hitzeschockbedingungen. **A)** Die basale Thermotoleranz liegt unter 46°C, weshalb die Zellen bei dieser Temperatur sterben. **B)** Eine Vorinkubation der Zellen bei subletaler Temperatur bewirkt eine Adaption. Die erworbene Thermotoleranz reicht nun über 46°C.

evolutiven Adaption des Erbguts bzw. der Art und Weise seiner Expression muß daher immer ein Kompromiss eingegangen werden: Trotz Anpassung an optimale Bedingungen muß die Fähigkeit erhalten bleiben, flexibel auf suboptimale Bedingungen (Stresssituationen) zu reagieren. Auf zellulärer Ebene geht es bei dieser Reaktion um den Schutz essentieller Zellstrukturen und -funktionen, die Gewährleistung einer raschen Erholung und um eine Adaption an die jeweilige Stresssituation, die mittelfristig zu einer erhöhten, erworbenen Stresstoleranz führt (Abb. 2.1).

Die Hitzeschockreaktion als spezielle Form dieser zellulären Stressreaktion ist hochkonserviert. Die Zellen aller bisher untersuchten Organismengruppen reagieren auf subletalen Hitzestress (Hitzeschock, HS) mit einer schnellen, grundlegenden Umstellung ihrer Genexpression, die zur massiven Synthese von HS-Proteinen (HSP) führt. Die Expression vieler Nicht-HS-Gene ist dabei deutlich verringert, weshalb die HS-Reaktion von transienter Natur ist (Tissieres *et al.*, 1974; zur Übersicht: Nover, 1991).

HSP existieren in allen Organismen von Bakterien bis zum Menschen und gehören zu den evolutiv konserviertesten Proteinen (Schlesinger, 1990). HSP werden aufgrund ihrer Molmasse in kDa, Struktur und Funktion in die 5 verschiedenen Klassen HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und die kleinen HSP (*small HSP*: sHSP) mit einer Molmasse von 16 bis 42 kDa eingeteilt (zur Übersicht: Morimoto *et al.*, 1994a). Hitzeinduziert-exprimiert werden auch Ubiquitin und Ubiquitin-konjugierende Enzyme, welche Substrate für die zellinterne Proteolyse markieren (Neves *et al.*, 1988; Hershko & Ciechanover, 1998). Weitere wichtige Vertreter der ständig wachsenden „HSP-Gemeinde“ sind Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen, die in Eukaryoten auch Immunophiline genannt werden (zur Übersicht in Pflanzen: Harrar *et al.*, 2001; Pratt *et al.*, 2001).

Neben der HS-Reaktion führen auch die zellulären Schutzreaktionen auf Kälte, Trockenheit, osmotischen Stress, Oxidantien, Schwermetalle, Aminosäureanaloge oder Pathogenbefall zu einer verstärkten HSP-Synthese (zur Übersicht: Nover, 1991; Schöffl *et al.*, 1999). Dabei wird offensichtlich ein generelles Schutzprinzip verfolgt, da die Reaktion auf einen Stress auch zum Schutz vor anderen Stressfaktoren führt. Beispielsweise sind die Früchte von Tomaten kälteunempfindlicher, wenn eine Adaption an Hitze vorausging. Ein solches Phänomen wird „erworbene Kreuztoleranz“ genannt (Sabehat *et al.*, 1998).

Den genannten Stressfaktoren gemeinsam ist ihre direkte oder indirekte proteindenaturierende Wirkung. Unter diesen Bedingungen besteht die Aufgabe vieler HSP darin, die Funktionalität essentieller Proteine aufrechtzuhalten und die Bildung zytotoxischer Proteinaggregate zu verhindern bzw. diese rechtzeitig aufzulösen. Als molekulare Chaparone begleiten und unterstützen sie die Synthese, Faltung, Interaktionen, den Transport und wenn nötig auch die Degradation anderer Proteine. Dabei werden i.d.R. hydrophobe Bereiche partiell entfalteter Proteine als Substrat erkannt, wie sie bei naszierenden Polypeptiden am Ribosom, der Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen und bei der Translokation von Proteinen durch Membranen auch unter Normalbedingungen und im allgemeinen unter zellulären Stressbedingungen verstärkt auftreten (zur Übersicht: Lindquist & Craig, 1988; Hightower, 1991; Craig *et al.*, 1993; Parsell & Lindquist, 1993; Hartl, 1996; McClellan & Frydman, 2001). Viele HSP werden deshalb in geringem Umfang auch in Abwesenheit von Stress exprimiert. Zudem finden sich für einige HSP eng verwandte, konstitutiv exprimierte Gene, die *heat shock cognates* (HSC) genannt werden. Außerdem ist die Synthese einiger HSP entwicklungspezifisch reguliert (zur Übersicht für Pflanzen: Schöffl *et al.*, 1998 und 1999). Die Rolle der HSP bei der Bewältigung zellulärer Ausnahmesituationen stellt daher eine Erweiterung ihrer auch unter Normalbedingungen essentiellen biologischen Funktionen dar.

2.2 Die Hitzeschockproteine

In zahlreichen biochemischen Analysen an Vertretern aller HSP-Familien wurde deren Fähigkeit nachgewiesen, Proteine vor irreversibler Denaturierung zu schützen. Im Folgenden wird daher vor allem auf die Bedeutung der Chaperonfunktionen *in vivo* unter Normalbedingungen sowie der kausale Zusammenhang zwischen stressinduzierter HSP-Expression und der Ausbildung von Stresstoleranz eingegangen.

Die kleinen HSP (sHSP) kommen ubiquitär vor, sind aber vor allem in Pflanzen zahlreich vertreten (Scharf *et al.*, 2001). Ihre Expression ist stark hitzeinduziert und vor HS kaum nachweisbar. Nach HS machen sHSP in Pflanzen jedoch bis zu 1% des zellulären Gesamtproteins aus (DeRocher *et al.*, 1991). Lediglich in vegetativem Gewebe der austrocknungstoleranten Pflanze *Craterostigma plantagineum* (Alamillo *et al.*, 1995) und während Entwicklungsprozessen wie Gametogenese, Samenreifung und Keimung (zur Übersicht: Waters *et al.*, 1996) werden größere sHSP-Mengen auch bei Abwesenheit von Stress exprimiert. sHSP der Klasse I und II sind zytoplasmatische Proteine, weitere Klassen kommen in den Mitochondrien, im Endoplasmatischen Reticulum und in den Chloroplasten vor (zur Übersicht: Waters *et al.*, 1996). Die ATP-unabhängige Funktion der sHSP unter akuten HS-Bedingungen besteht darin, die Aggregation partiell entfalteter Proteine zu verhindern, diese zu stabilisieren und somit ein Reservoir an faltungskompetenten Proteinen zu schaffen (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997). Die eigentliche Rückfaltung erfolgt dann durch ATP-abhängige Chaperone, vor allem durch HSP70 (Lee & Vierling, 2000; Smýkal *et al.*, 2000). Die Stresstoleranz von *E. coli* und Säugerzellen kann durch heterologe Expression von sHSP erhöht werden (Yeh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1999; Rollet *et al.*, 1992; Mehlen *et al.*, 1993). Die Reduktion endogener sHSP-Mengen führt aber weder in *E. coli*, Hefe noch *Drosophila* zu einer verringerten Stresstoleranz (Kitagawa *et al.*, 2000; Petko & Lindquist, 1986; McGarry & Lindquist, 1986). Wie bedeutend kleine HSP für die Ausbildung von Thermotoleranz in Pflanzen sind, ist unklar. *Antisense*- und Überexpressionsstudien in transgenen Pflanzen führen zu keinen oder nur geringen Veränderungen der Thermotoleranz (Schöffl *et al.*, 1987; Malik *et al.*, 1999). Die Überexpression des zytoplasmatischen Klasse-II *HSP17.6A* erhöht die Osmotoleranz nicht aber die Thermotoleranz der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (Sun *et al.*, 2001). Für einzelne sHSP konnte eine Funktion beim Schutz des Photosystems oder der Kohlenstofffixierung vor oxidativem Stress nachgewiesen werden, der unter natürlichen Bedingungen mit Hitzestress einhergeht (Heckathorn *et al.*, 1998; Härndahl *et al.*, 1999).

Die Vertreter der HSP60-Familie werden als Chaparonine (Cpn) bezeichnet. Das HSP60-Homolog aus *E. coli* GroEL wurde erstmals 1981 von Tilly *et al.* als essentielles Protein für das *Assembly* des Bakteriophagen Lambda beschrieben. Aufgrund anschließender intensiver Studien gehört GroEL und dessen Co-Chaparonin GroES (HSP10 bzw. Cpn10) zu den best-analysierten Chaparonen. HSP60 werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse I enthält das prokaryotische GroEL und das eukaryotische Cpn60, welches in Mitochondrien und Plastiden lokalisiert ist. Die zweite Klasse beinhaltet das Thermosom der Archeabakterien und den eukaryotischen, zytoplasmatischen Chaparoninkomplex C-Cpn auch TCP-1 (*T-complex-protein-1*), CCT (*chaperonin containing TCP-1*) oder TRIC (*TCP-1 ring complex*) genannt. Beide Klassen sind an der Faltung von Proteinen beteiligt, beide arbeiten ATP-abhängig, aber nur Klasse I Chaparonine benötigen das Co-Chaparonin Cpn10 bzw. GroES. Das GroEL/GroES-System ist essentiell für *E. coli* und erfüllt zusammen mit dem DnaK/DnaJ-System (HSP70/HSP40) den Großteil der Chaparonfunktion in prokaryotischen Zellen (zur Übersicht: Hartl, 1996; Ranson *et al.*, 1998). Das zytoplasmatische Chaparonin TRIC unterstützt in Säugerzellen hauptsächlich die Ausbildung von Aktin- und Tubulinfilamenten (Eggers *et al.*, 1997). Im pflanzlichen Zytoplasma konnten nur geringe Mengen TRIC nachgewiesen werden, detaillierte funktionelle Studien fehlen bislang. Die beiden chloroplastidären Cpn60-Formen Cpn60 α und Cpn60 β sind hauptsächlich am Zusammenbau von Rubisco beteiligt (Hemmingsen *et al.*, 1988). Ihre Expression ist eng an die von Rubisco gekoppelt, eine Stressinduktion scheint nur in jungen Keimlingen möglich (Holland *et al.*, 1998). Eine Mutation in Cpn60 α führt in *Arabidopsis* zu einem drastischen Embryodefekt, wahrscheinlich weil keine funktionellen Chloroplasten gebildet werden (Apuya *et al.*, 2001). [Zur Chaparoninfunktion in Pflanzen siehe außerdem: Boston *et al.*, 1996; Miernyk, 1999; Hill & Hemmingsen, 2001]

Vertreter der HSP70-Familie kommen sowohl in Prokaryoten (DnaK in *E. coli*) als auch in allen subzellulären Kompartimenten eukaryotischer Zellen vor. Ebenso wie GroEL (s.o.) wurde DnaK ursprünglich als Protein identifiziert, welches essentiell für die Replikation des Bakteriophagen Lambda in *E. coli* ist (Georgopoulos, 1977). HSP70 sind hochkonserviert, speziell die mitochondrialen und plastidären HSP70 zeigen hohe Homologien zu prokaryotischen HSP70. Konstitutiv exprimierte Familienmitglieder werden HSC70 genannt, wesentliche Unterschiede in Struktur und Funktion zu den stressinduzierten HSP70 sind nicht bekannt. In der Hefe kommen zwei zytoplasmatische HSP70-Klassen vor (SSA und SSB) und jeweils ein Vertreter im ER und in den Mitochondrien (KAR2 bzw. SSC-I). Das HSP70 im ER von Säugerzellen wird BiP (*binding protein*) genannt. HSP70 sind an allen chaparonab-

hängigen Prozessen beteiligt. Neben der Rückfaltung denaturierter Proteine unterstützen sie die Faltung naszierender Polypeptide, stabilisieren Proteine, die zum Transport durch Membranen partiell entfaltet werden und ermöglichen als Co-Faktoren proteolytischer Systeme die Degradation von Proteinen. Außerdem gibt es Hinweise zur autoregulatorischen Funktion der HS-Reaktion durch HSP70 (Kap. 2.3.2.2). Die HSP70-Maschinerie interagiert häufig synergistisch mit anderen Chaparonen wie HSP100, HSP90, HSP60 oder sHSP und ist wichtige Komponente von Multichaparonkomplexen (Glover & Lindquist, 1998; Chen & Smith, 1998; Lee & Vierling, 2000; zur Übersicht: Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001). Zur Ausbildung einer funktionellen HSP70-Maschinerie wird das Co-Chaparon HSP40 (DnaJ in *E. coli*; HDJ-1 in Säugerzellen) und - speziell in *E. coli* - der *nucleotide exchange factor* GrpE benötigt. DnaJ vermittelt die Bindung einiger HSP70-Substrate und aktiviert die ATP-Hydrolyse durch HSP70. GrpE katalysiert den Austausch von ADP durch ATP und ermöglicht so die Freisetzung gebundener Bereiche eines Substrats und die erneute Bindung anderer Bereiche (zur Übersicht: Hartl, 1996; Bukau & Horwich, 1998). Neben dem DnaJ-Homolog HDJ sind in Säugerzellen weitere Co-Faktoren von HSP70 bekannt. So gelten BAG-1 und CHIP als negative Regulatoren der HSP70-Aktivität wogegen HIP (*HSP70 interacting protein*) den HSP70/Substrat/ADP-Komplex stabilisiert und über HOP (*HSP70/HSP90 organizing protein*) ein Zusammenwirken mit HSP90 ermöglicht (Bimston *et al.*, 1998; Ballinger *et al.*, 1999; Höhfeld *et al.*, 1995; Chen & Smith, 1998). Dass HSP70 ein wichtiger Thermotoleranzfaktor in *Drosophila* ist, und durch die Manipulation einzelner HSP die Stressresistenz eines komplexen Organismus verändert werden kann, zeigten Welte *et al.* erstmals 1993. Transgene Larven, die mit 12 zusätzlichen *HSP70*-Kopien ausgestattet waren und als Folge davon erhöhte HSP70-Mengen exprimierten, waren deutlich hitzeresistenter als die Kontrolllinie. Auch die Stresstoleranz tierischer Zelllinien korreliert mit der Menge an funktionellem HSP70 (Riabowol *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1991). Dabei besteht die Funktion von HSP70 nicht hauptsächlich darin, der Proteinaggregation entgegenzuwirken, sondern die Aktivierung der Stresskinase JNK und somit eine stressinduzierte, Caspase-unabhängige Apoptose zu verhindern (Volloch *et al.*, 2000).

Angehörige der HSP90-Familie kommen sowohl in Prokaryoten (HtpG in *E. coli*) als auch in Eukaryoten vor, wo sie sowohl im Zytosol, im ER (Grp94, *glucose related protein 94*) als auch in den Plastiden gefunden wurden (Schmitz *et al.*, 1996; zur Übersicht: Buchner, 1996). Für HSP außergewöhnlich ist die hohe Abundanz einzelner HSP90 bereits unter Normalbedingungen, die unter Stressbedingungen noch deutlich zunimmt. Ungewöhnlich ist auch die Substratspezifität von HSP90. Im Gegensatz zu anderen Chaparonen, die mehr oder weniger

allgemein entfaltete Proteine binden, sind die meisten HSP90-Substrate an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Klassische HSP90-Substrate sind Steroidhormon-Rezeptoren und Kinasen (zur Übersicht: Young *et al.*, 2001). Generell scheint HSP90 nicht wie beispielsweise HSP70 in den frühen Phasen der Proteinfaltung beteiligt zu sein, sondern stabilisiert vorzugsweise die Konformation annähernd nativer Proteine und trägt zu deren „Reifung“ bei (Nathan *et al.*, 1997). Funktionelles HSP90 ist dimär und benötigt ATP. Die ATP-Bindungstasche wurde von Prodromou *et al.* (1997) identifiziert, sie kann selektiv durch die chemische Substanz Geldanamycin blockiert werden. Obwohl HSP90 in Bakterien und im ER autonom agieren, benötigen zytosolische HSP90 beim engen Zusammenwirken mit HSP70 (s.o.) in Multichaparonkomplexen zusätzliche Co-Faktoren (Bose *et al.*, 1996). Neben den bereits bei HSP70 erwähnten HOP und HIP sind dies p23, Immunophiline (Prolyl-Isomerasen) und in speziellen Fällen p50 bzw. Cdc37 (zur Übersicht: Young *et al.*, 2001). Neben der Bedeutung für die zellulären Signaltransduktion scheint HSP90 gemeinsam mit HSP70 auch an der Regulation der HS-Reaktion beteiligt zu sein (Zou *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2001; siehe auch: Kap. 2.3.2.2). In der *Arabidopsis*-Mutante TU2 korreliert das Fehlen von hitzeinduziert-exprimiertem HSP90 mit der verringerten Thermotoleranz der Pflanze. Da die transiente Transformation mit intaktem HSP90 zur Restauration des Phänotyps führt, liegt der direkte Zusammenhang zwischen HSP90-Expression und Erwerb von Thermotoleranz in *Arabidopsis* nahe (Ludwig-Müller *et al.*, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* führen reduzierte HSP90-Konzentrationen zu erhöhter Thermosensitivität, das komplette Fehlen der HSP90-Funktion ist letal (Borkovich *et al.*, 1989). Auch in *Drosophila melanogaster* ist eine HSP90-Nullmutation letal (Cutforth & Rubin, 1994). Bei der Arbeit mit *Drosophila*-Mutanten, die reduzierte HSP90-Funktion besaßen, fiel Rutherford & Lindquist (1998) das ungewöhnlich häufige Auftreten morphologischer Veränderungen an einzelnen Individuen auf. Diese Veränderungen waren genetisch bedingt, jedoch nicht allelisch zur HSP90-Mutation. Weitere Untersuchungen legten vielmehr nahe, dass HSP90 unter normalen Umständen die morphologische Ausprägung von Mutationen abpuffert, indem es mutierte Proteine maskiert. Auf diese Weise könnten sich stille Mutationen im Genom anreichern. Sie führten erst dann zu tiefgreifenden Veränderungen der Eigenschaften eines Organismus, wenn bei suboptimalen Umweltbedingungen (z.B. Hitzestress) die maskierende Funktion von HSP90 austitriert wurde. Indem HSP90 unter normalen Umweltbedingungen zur zellulären Homöostase beiträgt, fördert es die morphologische Variabilität bei einer plötzlichen Veränderung des Selektionsdrucks, es könnte somit zur Evolution beitragen (Rutherford & Lindquist, 1998).

Vertreter der eukaryotischen HSP100-Familie sind Homologe der prokaryotischen ClpB-Proteine (*caseinolytic protease*). Die Expression der HSP100/Clp-Proteine ist stark stress-induziert, unter normalen Wachstumsbedingungen außerdem entwicklungs- organspezifisch reguliert (Schirmer *et al.*, 1994; zur Übersicht: Parsell & Lindquist, 1994). Als ATP-abhängige Proteasen verhindern sie nicht wie andere Chaparone die Aggregation von Proteinen, sondern sind aktiv am proteolytischen Abbau irreversibel denaturierter Polypeptide beteiligt (zur Übersicht: Horwich, 1995). Darüberhinaus sind HSP100 an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt (Vogel *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2000). Für die Thermotoleranz von *Saccharomyces cerevisiae* ist HSP104 sowohl essentiell als auch ausreichend (Sanchez & Lindquist, 1990; Lindquist & Kim, 1996). Die Komplementation des thermosensitiven Phänotyps von *HSP104*-Mutanten mit *HSP101* aus *Arabidopsis* unterstreicht die konservierte Funktion der HSP100-Chaparone in Eukaryoten (Schirmer *et al.*, 1994). Auch in *Arabidopsis thaliana* führt die Mutation von *HSP101* zum Verlust induzierbarer Thermotoleranz (Hong & Vierling, 2000 und 2001). Transgene Pflanzen, die *HSP101* konstitutiv exprimieren, sind hitzeresistenter als WT-Pflanzen (Queitsch *et al.*, 2000). Deutlicher als für alle anderen HSP ist somit die Bedeutung von HSP100 für die Thermotoleranz von Organismen gezeigt.

2.3 Die Regulation der Hitzeschockantwort

Die Expression von Hitzeschockproteinen wird in eukaryotischen Zellen neben posttranskriptionellen Mechanismen vor allem auf transkriptioneller Ebene kontrolliert (zur Übersicht: Craig, 1985; Lindquist, 1986). Dazu bindet ein durch entsprechende Signale aktivierter, trimerer Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF) an Promotorelemente der HS-Gene und induziert so deren Transkription (Abb.2.2).

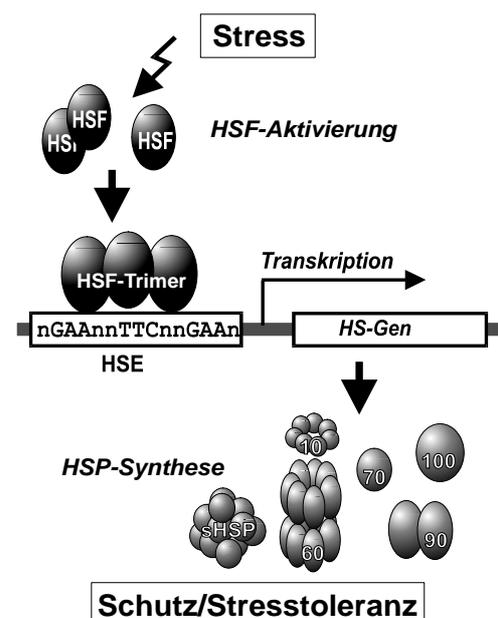


Abbildung 2.2: Zentrale Schritte der Hitzeschockreaktion sind HSF-Aktivierung, Bindung eines oligomeren HSF an Hitzeschockelemente [HSE] in HS-Promotoren und Induktion der HS-Genexpression.

2.3.1 Die Hitzeschockpromotoren

Als *cis*-regulatorische Erkennungssequenz für die spezifische Bindung des HSF dienen Hitzeschockelemente (HSE), die in den Promotoren aller HS-Gene zu finden sind und deren Sequenz hoch konserviert ist (Mirault *et al.* 1982; Pelham, 1982; Pelham & Bienz, 1982). Die HSE-Konsensussequenz besteht aus Nukleotidpentameren der Sequenz nGAAn, die fortlaufend in alternierender Orientierung angeordnet sind (Amin *et al.*, 1988; Xiao & Lis, 1988). Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung jeder einzelnen der 5 Basen zeigten, dass Adenin an Position 1 bevorzugt wird und Guanin an Position 2 essentiell ist, wogegen die Substitution des Adenins auf Position 3 oder 4 zu geringeren Beeinträchtigungen der HSF-Bindung führt. Für die entsprechenden Systeme (Mensch, Hefe, *Drosophila*, Sonnenblume) ergibt sich somit eine Erweiterung der Konsensussequenz auf aGAAn (Barros *et al.*, 1992; Cunniff & Morgan, 1993; Fernandes *et al.*, 1994a). Eine 5 Bp-Einheit ist Bindungsstelle für die DNA-Bindungsdomäne (DBD) eines HSF-Polypeptids (Kim *et al.*, 1994; Perisic *et al.*, 1989). Für die vollständige Bindung eines HSF-Trimer besteht ein HSE daher aus drei 5 Bp-Einheiten. Die minimale Bindungsstelle für den HSF aus *Drosophila melanogaster* (DmHSF) besteht aus zwei 5 Bp-Einheiten, wodurch sich ein HSE der Sequenz nGAAnnTTCn bzw. nTTCnnGAAn ergibt. Zwei HSF-Trimere binden, wenn das HSE aus vier 5 Bp-Einheiten besteht (Perisic *et al.*, 1989).

Sowohl HSE-Länge, -Konservierungsgrad, -Anzahl und relative Lage können innerhalb der Promotoren verschiedener HS-Gene variieren und beeinflussen die Stärke eines HS-Promotors (zur Übersicht: Fernandes *et al.*, 1994b; Nagao & Gurley, 1999). Die HSF-Affinität eines Promotors wird speziell durch ausgedehnte HSE oder Anordnung mehrerer HSE erhöht, die eine kooperative Bindung mehrerer HSF-Trimere ermöglichen (Topol *et al.*, 1985; Xiao *et al.*, 1991, Amin *et al.*, 1994, Bonner *et al.*, 1994; Kroeger & Morimoto, 1994). So ist ein HSE bestehend aus drei nGAAn-Motiven zwar für die stabile Bindung aktiver *Drosophila*- und Hefe-HSF *in vitro* ausreichend, seine biologische Aktivität *in vivo* ist aber zu gering, um eine Transkriptionsaktivierung zu erzielen (Amin *et al.*, 1985; Wei *et al.*, 1986).

Neben den HSE existieren in HS-Promotoren weitere *cis*-regulatorische Elemente, welche die Stärke der Transkription beeinflussen. Dabei werden Elemente unterschieden, die eine HSE-Funktion verstärken und solche die HSE-unabhängig regulieren. In der Hefe tragen die STREs [*stress responsive elements*: CCCCT] zur HSF-unabhängigen, MSN-vermittelten allgemeinen Stressantwort bei (zur Übersicht: Morano *et al.*, 1998). Die Promotoren des humanen *HSP27* und der *HSP23* und *HSP27*-Gene aus *Drosophila* beinhalten funktionelle *estrogen response elements* (EREs) bzw. *ecdysone response elements* (EcdREs) (Martinez *et*

al., 1991; Mestril *et al.*, 1986; Riddihough & Pelham, 1986; Porter *et al.*, 1996). Ebenfalls Steroidhormon-reguliert ist das humane *HSP70.1*-Gen, welches neben einem Zellzyklus-abhängigen G1-Enhancer, Bindungstellen für SP1 (G/C-reich) und den *CCAAT-Box binding factor* (CBF) in der Promotorregion aufweist (Greene *et al.*, 1987; Morgan, 1989; Bevilacqua *et al.*, 1997 & 2000; Taira *et al.*, 1997). Aufgrund des Vorhandenseins solcher und anderer „autonomer“ Elemente bieten HS-Promotoren zahlreiche Möglichkeiten zur HS-unabhängigen Regulation der Genexpression. Inwieweit HSF bei solch differentieller Regulation beteiligt ist, muß im Einzelfall getestet werden, wobei der Nachweis der Funktionalität der HSE als Beweis angesehen wird. Alleine die Anwesenheit von HSE in komplexen Promotoren läßt keine Aussage über eine HSF-abhängige Induzierbarkeit zu. So zeigten Sorger & Pelham (1987a), dass der HSC73-Promotor in Rattenzellen nicht hitzeinduziert werden kann, obwohl er zwei perfekte HSE beinhaltet.

Zu den nicht-autonomen HS-Promotorelementen gehören AT-reiche Elemente in Pflanzen, die alleine kaum Aktivität besitzen, zusammen mit HSE aber zu einer Verstärkung der hitzeinduzierten Genexpression führen (Czarnecka *et al.*, 1992; Rieping & Schöffl, 1992). Die konstitutive Bindung des GAGA-Faktors an entsprechende Bindungsstellen im Promotor des *HSP70*-Gens in *Drosophila* wird für die Auflösung von Nukleosomen und somit für die Ausbildung einer für den HSF zugänglichen Promotorstruktur verantwortlich gemacht (Tsukiyama *et al.*, 1994; zur Übersicht: Wilkins & Lis, 1997). Darüberhinaus wurden das TATA-bindende Protein (TBP) samt pausierender RNA-Polymerase II bereits unter nicht-induzierten Bedingungen am Promotor gefunden (Gilmour & Lis, 1986; Lee *et al.*, 1992; Giardina *et al.*, 1992). Die hitzeinduzierte Elongation des Transkripts erfolgt sobald aktiver HSF hinzukommt, wahrscheinlich über HSF-Interaktion mit TBP (Mason & Lis, 1997; Reindl & Schöffl, 1998; Yuan & Gurley; 2000). Ein solches *priming* des Promotors erklärt die rasche Induktion der Genexpression bereits 30-60 s nach HS (O'Brien & Lis, 1993; zur Übersicht: Fernandes *et al.*, 1994b). Im weiteren Verlauf der HS-Reaktion erhöht der Promotorgebundene HSF die Reinitiation der RNA-Polymerase, wodurch hohe Transkriptionsraten erzielt werden (Sandaltzopoulos & Becker, 1998). Obwohl in natürlichen HS-Promotoren also eine ganze Reihe zusätzliche, funktionelle *cis*-regulatorischer Elemente vorhanden sind, konnten Prändl & Schöffl (1996) zeigen, dass synthetische HSE, die vor die TATA-Box eines minimalen 35S-Promotors gesetzt wurden, ausreichen, um sowohl hitzeinduzierte als auch entwicklungspezifische Expression eines GUS-Reportergens in transgenen Tabakpflanzen zu vermitteln.

Da höhere Eukaryoten mehrere *HSF*-Gene besitzen (s.u.) könnten Unterschiede innerhalb der *HSF*-Bindungstellen einzelner *HS*-Gene dafür verantwortlich sein, welches Gen von welchem *HSF* differentiell reguliert wird. Beispielsweise bindet der humane *HSF1* (h*HSF1*) kooperativ an ausgedehnte aber weniger stark konservierte *HSE*, wogegen minimale, hoch konservierte *HSE* von humanem *HSF2* (h*HSF2*) bevorzugt werden (Morimoto *et al.*, 1994b). Nagao & Gurley (1999) unterscheiden und definieren verschiedene Promotortypen pflanzlicher *HS*-Gene, die je nach Lokalisation und Beschaffenheit der *HSE* und dem Vorhandensein anderer *cis*-aktiver Elemente Möglichkeiten zur differentiellen Regulation u.a. auch durch „spezialisierte *HSF*“ bieten. Zu letzterem fehlen allerdings bis heute stichhaltige experimentelle Hinweise. Da beispielsweise der *Drosophila HSP70*-Promotor in Pflanzen korrekt reguliert bleibt und umgekehrt transient exprimierter *HSF1* aus *Arabidopsis* in der Lage ist, *HS*-Gen-Promotoren in *Drosophila*-Zellen zu aktivieren, spielt die *HSF*-Promotorspezifität wohl eher eine untergeordnete Rolle (Spena *et al.*, 1985; Hübel *et al.*, 1995). Auch der hohe Konservierungsgrad der DNA-Bindungsdomänen verschiedener *HSF* und der *HSE*-Konsensussequenz deuten darauf hin, dass die individuelle Regulation von *HS*-Genen vom zeitlichen und räumlichen Muster der Expression und/oder der Aktivierung einzelner *HSF* und akzessorischer *trans*-aktiver Faktoren abhängig ist. Möglichkeiten dazu werden unter 2.3.2.2 beschrieben.

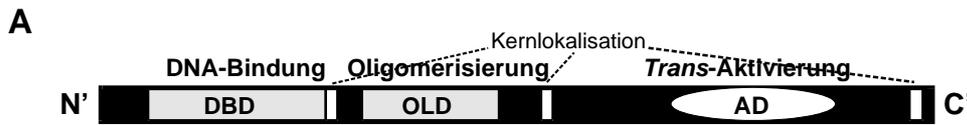
2.3.2 Die Hitzeschockfaktoren

Hitzeschockfaktoren werden definiert als strukturell verwandte, eukaryotische Transkriptionsfaktoren, welche spezifisch an *HSE* binden und die Expression von *HS*-Genen regulieren. Zwei Jahre nach der erstmaligen Charakterisierung der *HS*-Gen-Promotoren durch Pelham (1982) wurde in hitzegeschockten Kernextrakten aus *Drosophila* eine Proteinkomponente gefunden, die spezifisch an den *HSP70*-Promotor bindet (Wu, 1984) und die Transkription des Gens *in vitro* induzieren kann (Parker & Topol, 1984). Ein Protein mit fast identischen Eigenschaften wurde 1987 für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben und isoliert (Sorger & Pelham 1987b; Wiederrecht *et al.*, 1987). Damit waren die beiden ersten *HSF* identifiziert, die sowohl in der Hefe als auch in *Drosophila* von je einem Gen codiert werden (Wiederrecht *et al.*, 1988; Sorger & Pelham 1988; Clos *et al.*, 1990).

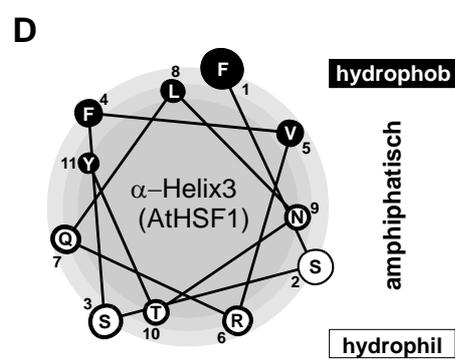
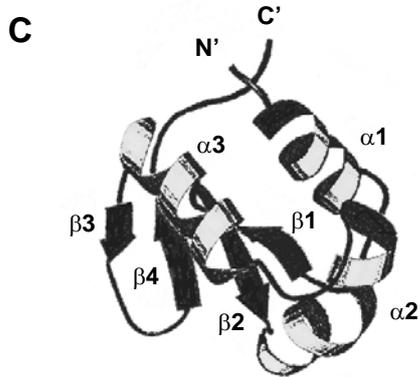
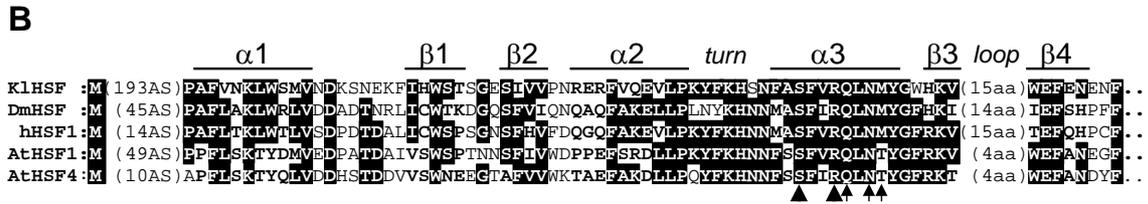
Bis heute konnten *HSF*-Gene aus einer Reihe von Organismen isoliert werden. Dabei zeigte sich, dass niedere Eukaryoten wie die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe* ebenso wie *Drosophila melanogaster* nur ein einziges *HSF*-Gen besitzen, wogegen in höheren Eukaryoten *HSF*-Genfamilien vorkommen (zur Übersicht: Morimoto *et al.*, 1994b; Wu, 1995). Das *HSF*-System in Vertebraten beinhaltet mindestens

vier Mitglieder. Im Menschen konnten cDNAs für hHSF1, hHSF2 und für zwei Isoformen von hHSF4, die durch alternatives Spleißen entstehen, isoliert und die entsprechenden Genprodukte funktionell charakterisiert werden (Rabindran *et al.*, 1991; Schuetz *et al.*, 1991; Nakai *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1999). Im Huhn wurden bislang drei *HSF*-Gene beschrieben, neben dem hHSF1- und hHSF2-Homologen cHSF1 und cHSF2 (*chicken HSF*) ist dies cHSF3 (Nakai & Morimoto, 1993; Nakai *et al.*, 1995). Gene für HSF1- und HSF2-Homologe existieren auch in der Maus, aus ihnen gehen durch alternatives Spleißen weitere Isoformen hervor (Sarge *et al.*, 1991; Fiorenza *et al.*, 1995; Goodson *et al.*, 1995). Unübertroffen aber scheint die Zahl der *HSF*-Gene in Pflanzen zu sein. Beispielweise wurden bisher 6 HSF aus der Sojabohne (*Glycine max*, GmHSF) und 4 HSF aus der Tomate (*Lycopersicon peruvianum*, LpHSF) beschrieben (Czarnecka-Verner *et al.*, 1995; Scharf *et al.*, 1990; Bharti *et al.*, 2000), obwohl die entsprechenden Modellorganismen bezüglich der *HSF*-Genfamilie noch nicht erschöpfend analysiert wurden. Anders bei der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: Im Anschluss an die Isolierung und Charakterisierung von HSF1 durch Hübel & Schöffl (1994) wurden *Arabidopsis*-cDNAs für 7 weitere HSF isoliert (Prändl *et al.*, 1998; Schöffl & Prändl, 1999). Die umfangreichen *Arabidopsis* cDNA- und EST-Datenbanken und schließlich die Sequenzierung des kompletten *Arabidopsis*-Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) ermöglichten die Identifizierung weiterer *HSF*-Gene aufgrund von Sequenzhomologien (Schöffl & Prändl, 1999; Nover *et al.*, 2001). Insgesamt ergibt sich somit eine Zahl von 21 HSF in *Arabidopsis*. Eine Übersichtstabelle der 21 HSF-Homologen und ein AS-Alignment der DNA-Bindungsdomänen findet sich im Anhang unter 7.3 bzw. 7.5. Aufgrund deutlicher struktureller Unterschiede (siehe hierzu: Kap. 2.3.2.1), werden pflanzliche HSF unterteilt in die Klassen A, B und C (Schöffl *et al.*, 1998; Nover *et al.*, 1996 & 2001).

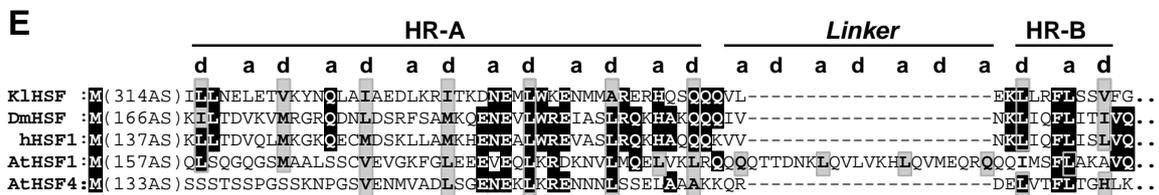
Schematische Darstellung der HSF-Struktur



DNA-Bindungsdomäne (DBD)



Oligomerisierungsdomäne (OLD)



zentraler Bereich AtHSF1-OLD

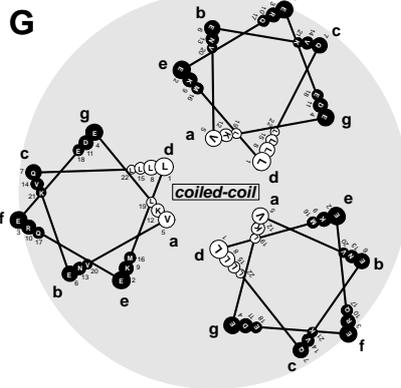
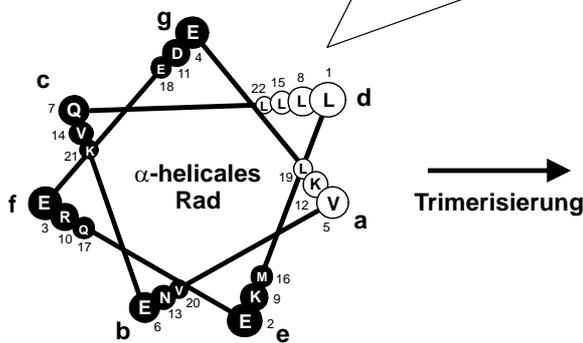


Abbildung 2.3: HSF-Proteinstruktur und konservierte funktionelle Domänen. **A)** Schemazeichnung der allgemeinen HSF-Struktur. **B)** und **E)** AS-Alignment wesentlicher Bereiche der DBD bzw. OLD des HSF aus *Kluyveromyces lactis*, *Drosophila*, Mensch und des Klasse-A-HSF1 und Klasse-B-HSF4 aus *Arabidopsis* – Hervorhebung konservierter und funktioneller AS und Sekundärstrukturen. **C)** Tertiärstruktur der DBD von LpHSF24, verändert aus Schultheiss *et al.* (1996). **D)** α-Helix 3 der DBD von AtHSF1 als α-helicales Rad – amphiphatischer Charakter. **F)** Zentraler Bereich der HR-A von AtHSF1 als α-helicales Rad – Leucin-Zipper-artige Struktur. **G)** Trimerisierung der OLD von AtHSF1 – Ausbildung eines dreisträngigen coiled-coil. Siehe auch Text: Kap. 2.3.2.1.

2.3.2.1 Die HSF-Struktur

Die Molmassen und Aminosäuresequenzen der verschiedenen HSF variieren beträchtlich. Für die beiden HSF aus den Hefen *S. cerevisiae* und *K. lactis* ergibt sich beispielsweise nur eine AS-Übereinstimmung von 18%. Es lassen sich lediglich zwei Bereiche hoher Homologie ausmachen, die im N-terminalen Bereich lokalisierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die weiter C-terminal gelegene Oligomerisierungsdomäne (OLD) (Abb. 2.3.A). Diese allen HSF gemeinsamen, hoch konservierten Regionen bewirken die charakteristische HSF-Eigenschaft, in oligomeren Formen an Hitzeschockelemente zu binden.

Die DBD der HSF zeigen nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu den bekannten Bindungsmotiven anderer DNA-bindender Proteine. Kurze Übereinstimmungen ergeben sich mit der DNA-Erkennungshelix des bakteriellen σ^{32} -Faktors (Clos *et al.*, 1990) und mit der HNF3/*forkhead*-DNA-Bindungsregion (Scharf *et al.*, 1994). Röntgenstruktur- und NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Analysen der DBD von HSF aus *Drosophila*, Hefe und Tomate ergeben eine Tertiärstruktur, die aus 4 antiparallelen β -Faltblattstrukturen und 3 α -Helices besteht und damit den Bindungsmotiven der Helix-turn-Helix-Familie DNA-bindender Proteine ähnelt (Abb. 2.3.B & C). Dabei bilden α -Helix 2 und 3 die Helix-turn-Helix-Struktur, die eng mit der DNA wechselwirkt (Harrison *et al.*, 1994; Vuister *et al.*, 1994a & 1994b, Schultheiss *et al.*, 1996). In direkten DNA-Kontakt treten einzelne AS der amphiphatischen α -Helix 3 (Abb. 2.3.D), indem sich diese in die große Rinne der DNA lagert. Für α -Helix 3 der DBD des Hefe-HSF sind dies die exponierten Reste der Aminosäuren Serin (S), Arginin (R), Glutamin (Q), Asparagin (N) und Methionin (M). Dabei bildet speziell das Arginin zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Guanin₂ des HSE-Motivs $n_1G_2A_3A_4n_5$ aus und tritt zusammen mit dem Serin über Van-der-Waals-Kräfte in zusätzlichen Kontakt mit dem zu A_3 komplementären Thymin. Die restlichen der genannten AS sind an Wasserstoffbrückenbindungen zu den Phosphatgruppen der DNA beteiligt (Hubl *et al.*, 1994; Fernando *et al.*, 1995). Die essentielle Bedeutung der angesprochenen AS-Positionen spiegelt sich in ihrer hohen funktionellen Konserviertheit wider, vor allem Serin und Arginin sind an den entsprechenden Positionen aller bekannten HSF zu finden (siehe Pfeile in Abb. 2.3.B).

Ein *Linker* von variierender AS-Sequenz und Länge verbindet die DBD mit der N-terminal folgenden OLD. Untersuchungen am HSF aus Hefe und Mammaliern ergaben, dass dieser *Linker*, oder zumindest Teile davon, das Oligomerisierungsverhalten des HSF und seine DNA-Bindungsaffinität beeinflussen (Flick *et al.*, 1994; Liu & Thiele, 1999). Die OLD besteht aus zwei hydrophoben Regionen HR-A und HR-B. Sie zeichnen sich durch mehrfache, aneinandergereihte Wiederholungen eines 7 AS-langen Sequenzmotivs (abcdefg) aus, in dem

vor allem die Positionen a und d von hydrophoben AS besetzt werden (*hydrophobic heptad repeat*, Abb. 2.3.E). In der α -helicalen Sekundärstruktur der OLD (Peteranderl & Nelson, 1992) kommen diese hydrophoben AS-Reste auf einer Seite der Helix zum Liegen (Abb. 2.3.F). Diese Leucin-*Zipper*-artige Struktur ermöglicht die HSF-Trimerisierung, indem drei OLD über hydrophobe Wechselwirkung eine dreisträngige, parallele Superhelix (*coiled-coil*) bilden (Sorger & Nelson, 1989; Peteranderl & Nelson, 1992; Zuo *et al.*, 1994 & 1995; siehe auch: Abb. 2.3.G). Obwohl sich die regelmässige Wiederholung hydrophober AS kontinuierlich über die gesamte OLD fast aller HSF erstreckt, werden HR-A und HR-B unterschieden. Wahrscheinlich bilden beide jeweils eine α -Helix. Da beide essentiell für die HSF-Oligomerisierung sind, wird angenommen, dass Helix2 (HR-2) zur Stabilisierung des *coiled-coil* beiträgt, welches in erster Linie von der längeren Helix1 gebildet wird (Sorger & Nelson, 1989). Im Gegensatz zu allen anderen HSF weist die OLD der pflanzlichen Klasse-A-HSF einen Einschub von 21 AS zwischen HR-A und HR-B auf, in dem es außerdem zu einem *frame shift* der Leucin-*Zipper*-Motive kommt (Nover *et al.*, 1996; siehe: Abb. 2.3.E).

In den HSF tierischer Organismen findet sich im C-terminalen Bereich ein zusätzlicher Leucin-*Zipper* (Clos *et al.*, 1990; Rabindran *et al.*, 1991). Deletion- und Mutagenese-Studien zeigten, dass diese Struktur für die negative Regulation der Oligomerisierung des HSFs verantwortlich ist, wobei eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem C-terminalen Leucin-*Zipper* und den Leucin-*Zippern* der OLD angenommen wird (Rabindran *et al.*, 1993; Sarge *et al.*, 1993; Zuo *et al.*, 1994). Dementsprechend zeigt der Hefe-HSF, dem dieser C-terminale Leucin-*Zipper* fehlt, konstitutive DNA-Bindung (Jakobsen & Pelham, 1991). Auch im C-terminalen Bereich einiger pflanzlicher HSF können gehäuft hydrophobe AS gefunden werden (zur Übersicht: Nover *et al.*, 2001). Zur funktionellen Bedeutung dieser HR-C fehlen experimentelle Hinweise, das regelmäßige Auftreten von Prolinresten macht eine α -helicale, Leucin-*Zipper*-artige Sekundärstruktur aber unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zur DBD und OLD ist die Position und AS-Sequenz der Aktivierungsdomäne (AD), die für die *trans*-aktivierenden HSF-Eigenschaften verantwortlich ist, wenig konserviert (zur Übersicht: Wu, 1995). Lediglich die auffällige Häufung aromatischer, hydrophober und saurer AS-Reste (*aromatic, hydrophobic, acidic*: AHA-Motiv) ist typisch für die durch *deletion-mapping* definierten AD der HSF aus Hefe, Mensch und Tomate (Sorger, 1990; Newton *et al.*, 1996; Treuter *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1993). Während sich die beiden AD des hHSF1 im C-terminalen Bereich des Polypeptids befinden, besitzt der Hefe-HSF zwei räumlich separierte AD, eine N-terminale und eine C-terminale. Jeweils eine der Beiden aktiviert die Transkription der HS-Gene, je nach dem, ob es sich um einen akuten HS oder um eine

länger anhaltende, erhöhte Umgebungstemperatur handelt (Sorger, 1990, Chen *et al.*, 1993). Detaillierte Mutationsstudien an den beiden AHA-Motiven im C-terminalen Bereich von HSF aus Tomate belegen deren Bedeutung für eine funktionelle AD (Döring *et al.*, 2000). Dabei könnte ein AHA-Motiv eine amphipatische α -Helix bilden, die den HSF zur Wechselwirkung mit Mitgliedern des basalen Transkriptionskomplexes befähigt. In allen pflanzlichen Klasse-A-HSF sind bis zu 4 AHA-Motive vorhanden. In Klasse-B-HSF fehlen solche AHA-Motive, in ihren C-terminalen Bereichen überwiegen neutrale bis basische AS-Reste (Czarnecka-Verner *et al.*, 2000; zur Übersicht: Nover *et al.*, 2001).

Innerhalb der Zelle bestehen weitere zahlreiche Mechanismen zur positiven und negativen Regulation der transkriptionaktivierenden HSF-Eigenschaften. Diese setzen außer der AD die Funktion zusätzlicher HSF-Domänen und Phosphorylierungsereignisse voraus. (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Bonner *et al.*, 1992; Nakai & Morimoto, 1993; Green *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1995; Wisniewski *et al.*, 1996).

Praktisch alle HSF beinhalten zwei *Cluster* der basischen AS Lysin und Arginin (K/R-Motiv), welche Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*: NLS) darstellen könnten. K/R-1 befindet sich am C-terminalen Ende der DBD, wogegen die Position von K/R-2 variiert. In HSF aus Vertebraten und pflanzlichen Klasse-A-HSF liegt sie zentral, C-terminal der OLD, in pflanzlichen Klasse-B-HSF weiter C-terminal. Für den Kernimport von hHSF1 und -2 sind beide K/R-Motive von Bedeutung (Sheldon & Kingston, 1993), essentiell scheint aber vor allem K/R-1 (Zuo *et al.*, 1995). Dagegen ist für den Kernimport von HSFA1 und HSFA2 aus Tomate in erster Linie K/R-2 verantwortlich (Lyck *et al.*, 1997). Die Beobachtung, dass HSFA2 - obwohl im Besitz eines funktionellen K/R-2-Motivs - nicht in den Kern importiert wird, wenn er in heterologen Systemen separat exprimiert wird (Scharf *et al.*, 1998), führte zur Identifizierung eines leucinreichen nukleären Exportsignals (NES) im äußersten C-terminalen Bereich des HSF-Polypeptids (Heerklotz *et al.*, 2001). Durch die Bindung eines nukleären Exportrezeptors an dieses NES und gleichzeitige Maskierung des NLS durch intramolekulare Wechselwirkungen, überwiegt der Kernexport von HSFA2. Beide Mechanismen werden unterdrückt, wenn HSFA2 mit HSFA1 Heterooligomere bildet, denn nur in dieser Form kommt es zum effizienten Kernimport von HSFA2 (Scharf *et al.*, 1998). Durch AS-Sequenzvergleich können auch in den C-terminalen Bereichen anderer pflanzlicher HSF leucinreiche, putative NES gefunden werden (Nover *et al.*, 2001, siehe auch: Kap. 7.4).

2.3.2.2 Regulation der HSF-Aktivität

Das allgemeine Modell der HS-Reaktion geht von einem präexistierenden, inaktiven HSF aus, der durch stressausgelöste Signale aktiviert wird und die transiente Transkription von HS-Genen bewirkt (Abb. 2.2). Diesem Modell zu Folge bestehen Mechanismen zur Inaktivierung des HSF unter Normalbedingungen, zur Induktion der HSF-Oligomerisierung, zur Regulation der Kernlokalisation, zur Modulation seiner DNA-Bindungsaffinität, zur Erlangung *trans*-aktivierender Eigenschaften und zur HSF-Inaktivierung bei Ende der HS-Reaktion. Experimentell ist die Existenz solcher Mechanismen nachgewiesen, es hängt jedoch vom jeweiligen Organismus ab, in welchem Umfang die einzelnen Regulationsschritte verwirklicht werden. Beispielsweise gilt für die Aktivierung des *Drosophila*-HSF die Oligomerisierung als entscheidend (Westwood & Wu, 1993), wogegen für den Hefe-HSF die stressinduzierte Erlangung *trans*-aktivierender Eigenschaften als dominanter Regulationsmechanismus angesehen wird, da dieser bereits unter Normalbedingungen in trimerer, DNA-bindender Form vorliegt (Sorger & Nelson, 1989; Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Sorger, 1990; Gross *et al.*, 1990; Jakobsen & Pelham, 1991; Chen *et al.*, 1993). Aber auch die HSF aus Vertebraten können unter bestimmten Umständen DNA-Bindungsaktivität erlangen und an die Promotoren von HS-Genen binden, ohne die Transkription zu induzieren (Hensold *et al.*, 1990; Jurivich *et al.*, 1992; Bharadwaj *et al.*, 1998). Die generelle HSF-Aktivierung erfolgt demnach in zwei separaten Schritten, der Induktion der DNA-Bindungsaktivität und der Induktion der *Trans*-Aktivierungskompetenz.

Eine wachsende Zahl von Untersuchungen belegt außerdem die Beteiligung von HSF an der gewebe- und entwicklungsspezifischen HS-Genexpression, sowie bei einer Vielzahl zusätzlicher zellulärer Schutzreaktionen (zur Übersicht: Schöffl *et al.*, 1999). Da sich dabei die Expressionsmuster einzelner HS-Genen unterscheiden können, müssen neben den allgemeinen Aktivierungsmechanismen auch Möglichkeiten zur individuellen Modulation der HSF-Funktion bestehen. Zusätzlichen Raum dazu bietet die Anwesenheit von *HSF*-Genfamilien in höheren Eukaryoten (Kap. 2.3.2).

Regulation der HSF-Expression und Stabilität

In allen bisher untersuchten Organismen wird mindestens ein Vertreter der HSF-Familie konstitutiv exprimiert. Dies korreliert mit der essentiellen HSF-Funktion, auch unter Normalbedingungen. So sind Nullmutationen des HSF in Hefe letal (Sorger & Pelham, 1988) und führen in *Drosophila* zu einem unüberwindbaren Defekt während der Oogenese und frühen Larvenentwicklung (Jedlicka *et al.*, 1997). Auch die extrem rasche Umstellung der

Genexpression innerhalb von Sekunden nach HS (O'Brien & Lis, 1993) ist nur mit der Präexistenz von HSF zu erklären. Zwar berichten Aranda *et al.* (1999) von der hitzeinduzierten Expression des scheinbar einzigen HSF in der Erbse, bemerken aber, dass dies die Funktion eines konstitutiv-exprimierten HSF-ähnlichen Transkriptionsfaktors voraussetzt, zumal sie auf die Existenz eines HSE im *HSF*-Promotor hinweisen. Auch in anderen pflanzlichen Modellorganismen sind hitzeinduzierte HSF bekannt, immer jedoch kommen auch konstitutive HSF vor (Prändl *et al.*, 1998; zur Übersicht bis 1996: Nover *et al.*, 1996). In Säugerzellen ist der konstitutive HSF1 für die schnelle Umstellung der Genexpression im Rahmen der Stressantwort verantwortlich (Baler *et al.*, 1993; Sarge *et al.*, 1993). Die Expression von hHSF4 erfolgt gewebespezifisch (Nakai *et al.*, 1997), die ubiquitäre Expression von HSF2 aus Säugerzellen kann zusätzlich durch entwicklungspezifische Signale induziert werden (Fiorenza *et al.*, 1995; Sarge *et al.*, 1994; Sistonen *et al.*, 1992). Beide HSF sind nicht primär an der hitzeinduzierten Expression von HSP beteiligt (zur Übersicht: Morimoto, 1998). Die Aktivität des hHSF2 scheint über seiner Proteinstabilität reguliert zu werden. Anders als hHSF1 ist hHSF2 ein thermolabiles Protein. Zu einer Akkumulation von aktivem hHSF2 im Zellkern kommt es erst im längeren Verlauf der HS-Reaktion und während bestimmter Entwicklungs- und Differenzierungsstadien, wenn ausreichende HSP-Mengen zu seiner Stabilisierung zur Verfügung stehen und/oder die Ubiquitin-Proteasome-Maschinerie inhibiert bzw. überlastet ist (Mathew *et al.*, 1998 und 2001).

Auch die Aktivität des *E. coli*-HSF RpoH (σ^{32}) wird über Proteinstabilität reguliert. Unter Normalbedingungen ist σ^{32} ein kurzlebiges Protein, dessen Degradation durch die FtsH-Protease erst bei HS inhibiert wird (Tomoyasu *et al.*, 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das DnaK-System (HSP70) aktiv an der Degradation von σ^{32} durch FtsH beteiligt ist (Tatsuta *et al.*, 2000). Dies erklärt die Ergebnisse zahlreicher Studien, die eine negativ Regulation von σ^{32} durch DnaK belegen (zur Übersicht: Yura & Nakahigashi, 1999). Neben diesem posttranslationalen besteht in *E. coli* ein zusätzlicher posttranskriptioneller Mechanismus zur Regulation der zellulären σ^{32} -Menge. Unter Normalbedingungen bildet die 5'-Region der *RpoH*-mRNA eine stabile Sekundärstruktur, wodurch die Bindung des Ribosoms verhindert wird. Erhöhte Temperatur führt zu einem Aufschmelzen dieser Sekundärstruktur und ermöglicht die Translation der mRNA (Morita *et al.*, 1999).

Intrinsische HSF-Eigenschaften

HSF-Aktivität setzt den Übergang des latenten HSF-Monomers in ein Homotrimer voraus (zur Übersicht: Wu, 1995). Die Trimerisierung erhöht die Bindungsaffinität des HSF an HSE

um mehr als das 1000-fache (Kim *et al.*, 1994) und wird daher als entscheidender Schritt bei der Aktivierung der HSF höherer Eukaryoten angesehen.

Die Trimerisierung von rekombinantem oder gereinigtem DmHSF und HSF1 aus Säugerzellen kann *in vitro* sowohl durch Hitze als auch durch die Zugabe von Agenzien, die Proteinkonformationen beeinflussen, ausgelöst werden (Larson *et al.*, 1988; Zimarino *et al.*, 1990; Mosser *et al.*, 1990; Goodson & Sarge, 1995; Larson *et al.* 1995; Zhong *et al.*, 1998). HSF müssen demnach eine in ihrer AS-Sequenz begründete, interne Struktur besitzen, die eine Oligomerisierung unter Normalbedingungen verhindert, proteotoxischen Stress direkt wahrnehmen kann und daraufhin die OLD-vermittelte Trimerisierung veranlasst. Eine Funktion hierbei erfüllt die C-terminal gelegene HR-C, deren Deletion zur konstitutiven Trimerisierung des DmHSF und der Vertebraten-HSF1 und -3 führt (Nakai & Morimoto, 1993; Rabindran *et al.*, 1993; Westwood & Wu, 1993; Zuo *et al.*, 1994). Angenommen wird eine thermolabile intramolekulare *coiled-coil*-Interaktion der HR-C mit HR-A und -B der OLD, die intermolekulare Interaktionen zwischen einzelnen OLD verhindert. Unterstützt wird dieses Modell durch die Tatsache, dass die HSF aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* und der hHSF4, denen die HR-C fehlt, konstitutiv in trimerer, DNA-bindender Form vorliegen (Sorger & Nelson, 1989; Gross *et al.*, 1990; Jakobsen & Pelham, 1991; Nakai *et al.*, 1997). In welcher Weise die Oligomerisierung und DNA-Bindungsaktivität pflanzlicher HSF durch interne Strukturen reguliert ist, bleibt unklar, zumal hier die HR-C nur wenig konserviert, wenn überhaupt vorhanden ist. Zumindest im DmHSF scheinen jedoch auch zusätzliche, bisher wenig charakterisierte Bereiche für die negative Regulation der Trimerisierung nötig zu sein (Orosz *et al.*, 1996).

Klar ist, dass intrinsische HSF-Strukturen zur direkten Wahrnehmung physikalisch/chemischer Veränderungen integriert sind im biochemischen System der Zelle. So wird die DNA-Bindungsaktivität des hHSF1 nach heterologer Expression in *Drosophila*-, Tabak- oder Frosch-Zellen bei der Hitzeschocktemperatur der Wirtszellen induziert, die jeweils etwa 10°C unter der humaner Zellen liegt (Baler *et al.*, 1993; Clos *et al.*, 1993, Treuter *et al.*, 1993). Andererseits liegt der *Drosophila*-HSF nach Expression in *E. coli* unter Nichthitzeschockbedingungen konstitutiv in trimerer, DNA-bindender Form vor (Clos *et al.*, 1990) und die Aktivität von heterolog-exprimierter HSF1 aus *Arabidopsis* ist in *Drosophila*- und menschlichen Zellen dereguliert (Hübel *et al.*, 1995). Die Aktivität von HSF *in vivo* muss also durch zusätzliche positiv- und negativ-regulatorische Faktoren beeinflusst werden.

Autoregulation der HS-Reaktion

1982 berichteten DiDomenico *et al.* erstmals von der Autoregulation der HS-Genexpression in *Drosophila*, wo eine Erhöhung der zellulären HSP70-Konzentration zur Reprimierung der HSP70-Expression und eine Verringerung der HSP70-Konzentration zur Induktion der HSP-Expression führt (Solomon *et al.*, 1991). Genetische Studien an der Hefe belegten ebenfalls, dass die HSP70-Expression autoreguliert ist (Stone & Craig, 1990). Die Vermutung, dass diese Autoregulation ein genereller Mechanismus zur Regulation der HSF-vermittelten HS-Genexpression ist, wurde durch Untersuchungen an der HSP70-Doppelmutante (*ssa1/ssa2*) unterstützt. In diesem Hefestamm werden u.a. die ansonsten ausschließlich hitzeinduzierten *SSA3*- und *SSA4*-Gene dereguliert exprimiert. Boorstein & Craig (1990a & b) wiesen nach, dass für die konstitutive Expression beider Gene in der HSP70-Mutante die gleichen *cis*-regulatorischen Promotorelemente verantwortlich sind wie für deren Expression nach HS, nämlich HSE. Der Zusammenhang zwischen der Autoregulation der HSP-Expression und HSF-Aktivität war somit hergestellt.

Die Beobachtung, dass die Injektion denaturierter Proteine in Frosch-Oozyten die Synthese von HSP induzieren kann (Anathan *et al.*, 1986), das Wissen um die Chaperonfunktion von HSP70 und HSP90 und der Nachweis der Bindung beider Chaperone an inaktiven HSF (Abravaya *et al.*, 1992; Baler *et al.*, 1992; Rabindran *et al.*, 1994; Baler *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998; Bharadwaj *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001) führen zum „Chaperontitrationsmodell“ der HSF-Regulation: Monomeres, inaktiver HSF ist unter Normalbedingungen assoziiert mit HSP70 bzw. HSP90, wodurch seine Oligomerisierung/Aktivierung verhindert wird. Hitzeschock oder andere proteotoxische Einflüsse führen zur Akkumulation denaturierter Proteine, die daraufhin mit HSF um die Bindung an HSP70 bzw. HSP90 kompetieren. Freigesetzter HSF kann nun oligomerisieren bzw. aktiviert werden und die HSP-Expression induzieren, bis die HSP-Konzentration hoch genug ist, um sowohl die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten als auch die HSF-Inaktivierung wiederaufzunehmen (zur Übersicht: Morimoto *et al.*, 1994b).

Welche Rolle im einzelnen HSP90 oder HSP70 spielen, ist weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen, überlappende bzw. synergistische Funktionen deuten sich an, die zudem in einzelnen Organismen in ihrem Umfang variieren könnten. Klar ist, dass beide Chaperone nicht nur die HSF-Oligomerisierung regulieren, sondern auch die *Trans*-Aktivierungseigenschaften von trimerem HSF beeinflussen.

In Säugerzellen führt die Überexpression von HSP70 zu einem beschleunigten *Disassembly* aktiver HSF-Trimere und fördert die Attenuation der HS-Reaktion (Mosser *et al.*, 1993; Ra-

bindran *et al.*, 1994). Dementsprechend korrelieren reduzierte HSP70-Mengen in *HSP70-antisense*-Pflanzen mit einer verzögerten Rückführung aktiver HSF-Trimere in inerte Monomere nach HS (Lee und Schöffl, 1996). Einzelne Beobachtungen, dass HSP70 die Trimerbildung zu Beginn der HS-Reaktion inhibiert, blieben experimentell vage (Mosser *et al.*, 1993; Baler *et al.*, 1996) und Rabindran *et al.* (1994) zeigten, dass die Interaktion von HSF mit HSP70 nicht ausreicht, um *in vivo* die hitzeinduzierte Oligomerisierung zu verhindern. HSP70 wird daher in erster Linie für das Trimer-*Disassembly* und für die negative Regulation der *Trans*-Aktivierungseigenschaften des trimeren HSF verantwortlich gemacht (zur Übersicht: Morimoto, 1998). Hierfür spricht auch, dass humanes HSP70 und sein Cochaperon HdJ1 (HSP40-Homolog) an die Aktivierungsdomäne des hHSF1 bindet und die Aktivität eines GAL4-Fusionsproteins, welches die AD des hHSF1 trägt, negativ reguliert. Dabei sind weder hitzeinduzierte Oligomerisierung noch Phosphorylierung von hHSF1 Gegenstand der negativen Regulation (Shi *et al.*, 1998). Allerdings zeigten Marchler & Wu (2001), dass das HSP40/HDJ1-Homolog DROJ1 (Cochaperon von HSP70) in *Drosophila*-Zellen zu den dominierenden Interaktionspartnern von HSF gehört und seine Überexpression den Beginn der HS-Reaktion verzögert. Die Verringerung zellulärer DROJ1-Mengen führten zu einer konstitutiven HS-Genexpression, die quantitativ zunahm, wenn zusätzlich die zellulären HSP70/HSC70- oder HSP90-Mengen reduziert wurden. In gleicher Weise synergistisch bewirkte die Reduktion der Chaperonmengen eine Aktivierung der HSF-DNA-Bindungsaktivität. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass bei der Regulation von HSF die HSP70- und HSP90-Chaperonsysteme synergistisch interagieren, wie etwa auch bei der Regulation der Steroidhormonrezeptor-Aktivität (Johnson & Craig, 2000; Murphy *et al.*, 2001). In Vertebraten scheint dabei HSP90 die entscheidende, nicht-redundante Rolle zu spielen. In Extrakten aus nicht-hitzegechockten HeLa-Zellen führt die spezifische Inaktivierung von HSP90 durch Antikörper oder Geldanamycin nicht aber die Reduktion von HSP/HSC70, Hop, Hip, p23 oder HSP40 zur Oligomerisierung und DNA-Bindung von HSF (Zou *et al.*, 1998). Der gleiche Effekt wird *in vitro* durch die Zugabe denaturierter Proteine erzielt und HSF/HSP90-Komplexe können nur vor aber nicht nach HS nachgewiesen werden. *In vivo* scheint die HSF-Trimerisierung daher in erster Linie durch HSP90-Bindung inhibiert zu werden und erst nach HS im Rahmen der Austitration von HSP90 durch denaturierte Proteine induziert zu werden. Eine Erweiterung der HSP90-Funktion bei der Regulation von HSF erfordern die Ergebnisse von Ali *et al.* (1998). In *Xenopus*-Oozyten weisen sie die Interaktion von HSP90 mit monomerem HSF vor HS und trimerem HSF nach HS nach. Die spezifische Inaktivierung von HSP90 durch Antikörper oder Geldanamycin führt *in vivo* zur Induktion

bzw. Verlängerung der HSF-DNA-Bindungsaktivität vor bzw. nach HS, blockiert aber die hitzeinduzierte Expression eines Reportergens. Die Autoren schlagen daher ein Modell vor, in dem HSP90 die HSF-Aktivität an mehreren Stellen des Aktivierungs/Deaktivierungs-Prozesses sowohl negativ als auch positiv moduliert. Untersuchungen zur Zusammensetzung der HSF/HSP90-Komplexe ergeben eine Assoziation von HSF-Trimeren mit HSP90, dem Immunophilin FKBP52 und dem Cochaperon p23, funktionell scheinen außerdem HSP/HSC70 und HSP40 zu interagieren, womit deutliche Ähnlichkeiten zu Steroidhormonrezeptor/HSP90-Komplexen bestehen (Bharadwaj *et al.*, 1999). Guo *et al.* (2001) zeigen, dass die Bindung von HSP90/FKBP52/p23 an HSF-Trimere die *Trans*-Aktivierungskompetenz von HSF blockiert und abhängig ist von einer zuvor identifizierten negativ-regulatorischen HSF-Domäne (Green *et al.*, 1995). Gegenwärtig besteht zur Beteiligung von HSP90 an der HSF-Regulation folgendes Modell: HSP90 erfüllt eine dominante, nicht-redundante Funktion zur Repression der HSF-Oligomerisierung unter Normalbedingungen. Im Anschluss an die HSF-Trimerisierung ist ein Multichaperonkomplex bestehend aus HSP90, Immunophilinen, p23, HSP70 und HSP40 je nach zellulärer Situation an der Stabilisierung oder dem Disassembly von HSF-Trimeren beteiligt, verhindert aber in jedem Fall die transkriptionelle Aktivität von HSF. Entsprechend dem Chaperontitrationsmodell (s.o.) ergeben sich somit multiple Ansatzpunkte zur Autoregulation der HS-Reaktion. Die Beteiligung der HSP90- und HSP70-Chaperonsysteme eröffnen darüberhinaus die Integration der HSF-Aktivität in andere Signaltransduktionskaskaden der Zelle.

Regulation der zytoplasmatisch/nukleären HSF-Verteilung

Anfängliche Untersuchungen zum Zeitpunkt des Kernimports von Vertebraten-HSF spalteten die beteiligten Wissenschaftler in zwei Lager. Die Ergebnisse von Baler *et al.* (1993) und Sarge *et al.* (1993) ließen vermuten, dass hHSF1 unter Normalbedingungen im Zytoplasma vorliegt und der Kernimport mit seiner stressinduzierten Aktivierung einhergeht. Andere Untersuchungen ergaben eine konstitutive nukleäre Lokalisation von sowohl *Drosophila*-HSF, *Xenopus*-HSF und humanem HSF (Orosz *et al.*, 1996; Wisniewski *et al.*, 1996; Mercier *et al.*, 1997 & 1999; zur Übersicht bis 1994: Wu *et al.*, 1994). Der scheinbare Widerspruch wurde durch FISH-Analysen und GFP-HSF-Fusion zur intrazellulären Lokalisation von hHSF1 relativiert. Dieser ist vor HS diffus im Zytoplasma und im Zellkern verteilt und konzentriert sich nach HS in „Stressgranula“ im Zellkern (Sarge *et al.*, 1993). Diese Relokalisation von HSF innerhalb des Zellkerns erfolgt innerhalb von weniger Sekunden nach HS, ist transient und korreliert mit der hitzeinduzierten HSP-Expression (Cotto *et al.*, 1997;

Jolly *et al.*, 1997, Jolly *et al.*, 1999). Die Zahl der Stressgranula ist abhängig vom Ploidiegrad der Zelle, weshalb davon ausgegangen wird, dass sie sich an definierten chromosomalen Bereichen bilden (Jolly *et al.*, 1997). Da diese Orte nicht deckungsgleich sind mit den Loci starker hitzeinduzierter Transkription, scheinen die Stressgranula HSF-Reservoirs darzustellen, von denen HSF zu ihren Zielsequenzen geleitet werden (zur Übersicht: Morimoto, 1998). Zeitpunkt, Kinetik und Dauer der Ausbildung von HSF-Stressgranula und das Pendeln von aktivem HSF zwischen Stressgranula und Orten der Transkription könnten daher regulatorische Ansatzpunkte sein, die die nukleäre Lokalisation von HSF betreffen. Für die Regulation der HSF-Aktivität über einen Mechanismus, der den generellen Kernimport betrifft, gibt es zur Zeit einen Beleg: In der Embryonalentwicklung von *Drosophila* bleibt der HSF bis zur 13. Zellteilung vom Kernimport ausgeschlossen, was erklärt, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine HS-Reaktion ausgelöst werden kann (Wang & Lindquist, 1998). Fang *et al.* (2001) zeigten, dass der Kernimport des HSF von der Bindung des nukleären Transportfaktors Karyopherin- $\alpha 3$ an das zuvor von Zandi *et al.* (1997) identifizierte NLS des DmHSF abhängig ist und dass die Expression dieses Importins bis zur 13. Zellteilung unterbleibt. Zumindest in *Drosophila* wird daher die entwicklungspezifische HS-Genexpression über den Kernimport von HSF reguliert.

Phosphorylierung

Die HSF aus Hefe und menschlichen Zellen sind konstitutiv an Serin- und Threoninresten phosphoryliert und werden nach HS hyperphosphoryliert (zur Übersicht: Wu, 1995). Auch der *Drosophila*-HSF ist Gegenstand von hitzeinduzierter Phosphorylierung einiger AS-Reste, da gleichzeitig aber andere zuvor phosphorylierte Reste dephosphoryliert werden, ändert sich der Phosphorylierungszustand insgesamt nicht (Fritsch & Wu, 1999).

Die konstitutive Phosphorylierung ist offensichtlich an der negativen Regulation von HSF beteiligt, da die Mutation entsprechender AS-Positionen zur Deregulation der HSF-Aktivität führt (Knauf *et al.*, 1996). Auch Chu *et al.* (1996) zeigen, dass durch die aufeinanderfolgende Phosphorylierung von zunächst Ser303 und dann Ser307 innerhalb der Aktivierungsdomäne von hHSF1 die transkriptionelle Aktivierung des HSP70-Promotors unterdrückt wird. Sowohl Knauf *et al.* als auch Chu *et al.* haben Hinweise für eine Beteiligung von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) an dieser Phosphorylierung und weisen auf die sich dadurch ergebenden Möglichkeiten zur Integration von Wachstumssignalen in die HSF-Regulation hin. Eine ähnliche Möglichkeit besteht für die Regulation von HSF1 aus *Arabidopsis*. Reindl *et al.* (1997) zeigen, dass rekombinanter HSF1 durch CDC2a (*cyclin dependent kinase*)

phosphoryliert wird und daraufhin eine verminderte DNA-Bindungsaktivität besitzt.

Obwohl die hitzeinduzierte Phosphorylierung von Hefe-HSF und hHSF1 mit ihrem Erwerb transkriptionsaktivierender Eigenschaften korreliert, blieb der kausale Zusammenhang lange unklar. Es ergaben sich hauptsächlich Hinweise für eine negativ-regulatorische Funktion der induzierten Phosphorylierung bei der Inaktivierung von HSF nach HS (Høj & Jacobsen, 1994, Xavier *et al.*, 2000). Schließlich aber gelang die Identifizierung eines Aminosäurerestes, dessen Phosphorylierung zur Induktion der Transkriptionsaktivität von hHSF1 führt. Es handelt sich dabei um Ser230, welches innerhalb der durch Green *et al.* (1995) identifizierten Regulatorischen Domäne von hHSF1 liegt (Holmberg *et al.*, 2001). Unter Verwendung eines pS230-HSF1-Antikörpers in *Western*-Analysen wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung nach 1-stündigem HS ein Maximum erreicht, dann graduell abnimmt und nach 6 h HS nicht mehr nachzuweisen ist. FISH-Analysen ergaben deutliche Signale für die Stressgranula, die als nukleäres Reservoir für aktiven HSF angesehen werden (s.o.). Ser230 stellt eine Erkennungsstelle für die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), welche in der Lage ist Ser230 *in vitro* zu phosphorylieren. Die Überexpression von CaMKII in menschlichen Zellen führt zur konstitutiven Ser230-Phosphorylierung, die alleine keine Aktivierung von HSF1 bewirkt, nach Hitzeschock aber die Aktivität eines HS-Promotors verstärkt. Das Verhindern der Ser230-Phosphorylierung durch AS-Substitution oder spezifische Inhibition von CaMKII blockiert die hitzeinduzierte HSF1-Transkriptionsaktivität, hat aber keinen Einfluss auf hitzeinduzierte DNA-Bindungsaktivität von HSF1 und Ausbildung der Stressgranula.

Modulation der HSF-Aktivität durch *trans*-aktive Faktoren

Neben den autoregulatorisch wirkenden HSP (s.o.) kann die HSF-Aktivität auch durch andere *trans*-aktive Faktoren reguliert bzw. moduliert werden. Einige Beispiele dazu sollen im Folgenden gegeben werden.

In tierischen Zellen stellt das Hitzeschockfaktor-Bindungs-Protein-1 (HSBP1) einen *trans*-aktiven Faktor dar, der durch direkte Interaktion mit HSF-Trimeren deren Transkriptionsaktivität negativ beeinflusst (Satyal *et al.*, 1998). Die Interaktion erfolgt über die HSF-Oligomerisierungsdomäne und verhindert die HSF-Bindung an HSE. Die Überexpression des HSBP1-Homologen (CeHSB-1) in *Caenorhabditis elegans* verringert die Thermotoleranz der Tiere, wogegen der Verlust von CeHSB-1 eine Erhöhung der Thermotoleranz von transgenen Tieren über die von Wildtyp-Tieren hinaus bewirkt (Satyal *et al.*, 1998; zur Übersicht: Morimoto, 1998). Auch in *Arabidopsis* konnte ein HSBP1-Homolog identifiziert werden, das aber

sehr wahrscheinlich eine andere Funktion als das tierische HSBP1 ausübt. Denn die Erhöhung oder Reduktion der AtHSBP1-Mengen in transgenen Pflanzen, hatte keine sichtbaren Auswirkungen auf HSF-DNA-Bindungsaktivität, HSP-Expression und Thermotoleranz (Kim, 2001).

An der Induktion von HS-Genen durch oxidativen Stress in Hefe ist sowohl HSF als auch der Transkriptionsfaktor Skn7 beteiligt, welcher auffällige Homologien zur DBD und OLD des HSF besitzt. Raitt *et al.* (2000) zeigen eine direkte physikalische Interaktion beider Faktoren *in vitro* und *in vivo* und weisen die Fähigkeit von Skn7 nach, an HSE innerhalb des SSA-Promotors zu binden, weshalb sie von einem kooperativen Zusammenwirken von HSF mit Skn7 ausgehen.

In Vertebraten sind sowohl HSF1 als auch HSF3 essentiell für die hitzeinduzierte HSP-Expression und Ausbildung von Thermotoleranz (McMillan *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 1998). Speziell für HSF3 aber konnte eine Interaktion mit der DBD des Protooncogenproduktes c-MYB nachgewiesen werden, die zu seiner Aktivierung auch unter Normalbedingungen führt (Kanei-Ishii *et al.*, 1997). Durch diesen Mechanismus könnte HSF3 über die zu HSF1 redundante Funktion hinaus zur differentiellen, HSE-abhängigen HSP-Expression während der Zellproliferation beitragen (zur Übersicht: Nakai, 1999).

Auch an der entwicklungspezifischen HSP-Expression in Pflanzen sind höchst wahrscheinlich HSF beteiligt, da die Funktionalität von HSE hierbei gezeigt wurde (Prändl & Schöffl, 1996; Almoguera *et al.*, 1998; Carranco *et al.*, 1999, Rojas *et al.*, 1999). Interessant ist, dass sich das Expressionsmuster von HSP-Genen während entsprechender Entwicklungsstadien und nach HS in vegetativem Gewebe unterscheidet. Beispielsweise werden die Gene für *HSP18.6* in der Sonnenblume und *HSP18.2* in *Arabidopsis* im Blatt stark hitzeinduziert exprimiert, nicht aber während der Embryonalentwicklung (Coca *et al.*, 1994 & 1996; Takahashi *et al.*, 1992; Wehmeyer *et al.*, 1996; Hinderhofer, 1998). Umgekehrt wird *HSP17.6* zwar im Samen der Sonnenblume nicht aber nach HS im Blatt exprimiert (Carranco *et al.*, 1997). Es müssen daher Mechanismen zur differentiellen Regulation der entwicklungspezifischen HSP-Expression existieren, z.B. HSF-modulierende Faktoren. Bei der HSP-Expression während der Samenreifung könnte dies ABI3 sein, ein potentieller Transkriptionsfaktor und eine wichtige Komponente der Abscisinsäure-Signaltransduktion während der Samenreifung. In *abi3*-Nullmutanten ist die HSP-Expression während der Samenreifung inhibiert (Wehmeyer *et al.*, 1996). Mittels EMSA zeigt Hinderhofer (1998), dass sich die HSE-bindenden Komplexe in Samenextrakten von *abi3*-Mutanten qualitativ vom WT unterscheiden und gibt somit den ersten Hinweis für eine direkte Modulation der HSF-Aktivität durch ABI3. Unter-

suchungen von Rojas *et al.* (1999) belegen, dass die transiente Expression von sowohl ABI3 aus *Arabidopsis* als auch HSFA1 aus der Tomate zur Aktivierung des *HaHSP17.7G4*-Promotors in Sonnenblumenembryos führt und eine Co-Expression beider Gene diese Aktivierung verstärkt. In allen Fällen ist die Promotoraktivierung abhängig von HSE, an die HSFA1 *in vitro* stärker bindet, wenn ABI3 im Bindungsansatz co-existiert.

2.4 HSF-Systeme: Redundante oder individuelle HSF-Funktionen?

Das zur Zeit bestuntersuchte HSF-System ist das der Vertebraten (zur Übersicht: Morimoto, 1998, Nakai, 1999, Pirkkala *et al.*, 2001). Hier werden 4 *HSF*-Gene unterschieden, nämlich *HSF1*, *HSF2*, und *HSF4* in Säugerzellen, und zusätzlich *HSF3*, welcher nur in Vogelzellen existiert. *In vivo* scheint jeder dieser HSF eine individuelle Funktion auszuüben. *HSF1* gilt als funktionelles Homolog zu den alleinigen HSF von Hefe und *Drosophila*. Er ist für die Expression von HS-Genen während einer Reihe physiologischer Stressbedingungen und für den Erwerb von Stresstoleranz verantwortlich und essentiell (McMillan *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999). In *HSF1-knockout* Mäusen bleibt die konstitutive HSP-Expression unverändert, die Tiere zeigen jedoch schwere morphologische Defekte während der Entwicklung, retardiertes Wachstum und weibliche Infertilität (Xiao *et al.*, 1999; Christians *et al.*, 2000). *HSF1* übt daher auch unter Normalbedingungen bei Entwicklungs- und Wachstumsprozessen eine nicht-redundante Funktion aus, die offensichtlich nicht mit HSP-Expression zusammenhängt (Xiao *et al.*, 1999). Für *HSF1* ergeben sich somit weitere funktionelle Parallelen zu dem HSF in *Drosophila*, dessen essentielle Funktion bei der Oogenese und während der frühen Larvenentwicklung ebenfalls nicht darin besteht, HS-Gene zu induzieren (Jedlicka *et al.*, 1997).

HSF2 wird nicht durch klassische Stress-Stimuli aktiviert, sondern unter entwicklungsregulierten Bedingungen, vor allem während der Embryogenese und Spermatogenese (Sistonen *et al.*, 1992; Sistonen *et al.*, 1994). HS beispielsweise führt nicht zur Aktivierung, sondern zur Inaktivierung des thermolabilen *HSF2* (Mathew *et al.*, 2001). Auch die Regulation seiner Expression und Stabilität ist an Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse gekoppelt (Kap. 2.3.2.2). Gut belegt ist die Beteiligung von *HSF2* an der HSP-Expression während der heminduzierten Erythrozyten-Differenzierung (zur Übersicht: Morimoto, 1998). Weitere *HSF2*-Funktionen *in vivo* können seit kurzem an *HSF2-knockout*-Mäusen untersucht werden (Kallio *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2002). Die von Kallio *et al.* (2002) beschriebenen *HSF2-knockout*-Mäuse zeigen Schädigungen des Gehirns und Defekte während der Gametogenese, wobei vor allem die Synapsis der Chromosomen während der Meiose beeinträchtigt ist und eine erhöhte Apoptoserate im Testis auffällt. Diese Beobachtungen können McMillan *et al.*

(2002) an ihren Tieren nicht nachvollziehen. Wenigstens in einem Punkt stimmen beide Gruppen überein: Anders als der HSF1- führt der HSF2-*knockout* nicht zu Embryoletalität, HSF2 ist kein essentieller maternaler Faktor.

Die Expression von HSF4 findet nur in wenigen Gewebetypen statt. HSF4 fehlt die C-terminal gelegene HR-C und unterscheidet sich somit strukturell von allen anderen Vertebraten-HSF (Nakai *et al.*, 1997). Er liegt konstitutiv in trimerer Form vor, eine konstitutive Bindung von HSF4 an HS-Promotoren wird dennoch nicht beobachtet (Abravaya *et al.*, 1991; Sistonen *et al.*, 1992). HSF4 existiert wie HSF1 und HSF2 in zwei Isoformen HSF4a und HSF4b (Tanabe *et al.*, 1999). HSF4a ist transkriptionell inaktiv und kann als Repressor die HS-Genexpression blockieren (Nakai *et al.*, 1997; Frejtag *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), während Isoform b *trans*-aktivierende Eigenschaften besitzt, HS-Genexpression induzieren kann und eine *HSF*-Mutante in Hefe komplementiert (Tanabe *et al.*, 1999). Die Funktion von HSF4 *in vivo* ist ungeklärt, da noch keine *HSF4-knockout*-Mäuse generiert wurden.

Eine Sonderstellung nimmt HSF3 in Vogelzellen ein. Er wird wie HSF1 unter zellulären Stressbedingungen aktiv und induziert die Expression von HS-Genen, weshalb beiden Faktoren zunächst redundante Funktionen zugesprochen wurden. Es zeigte sich aber, dass die Temperaturschwelle zur Aktivierung von HSF3 höher ist als die von HSF1, weshalb er für die zelluläre Schutzreaktion unter extremen und anhaltenden Stressbedingungen verantwortlich gemacht wird (Tanabe *et al.*, 1997). Die Analyse von HSF3-defizienten Zellen schliesslich zeigte, dass HSF3 epistatisch zu HSF1 ist (Tanabe *et al.*, 1998). In solchen Zellen findet trotz Anwesenheit von HSF1 keine HS-Reaktion statt. Es zeigte sich, dass für die stressinduzierte HSF1-Oligomerisierung *in vivo* HSF3 benötigt wird und zwar auch unter milden HS-Bedingungen, die normalerweise nur zur Aktivierung von HSF1 führen. In Vogelzellen ist somit HSF3 der dominante, nicht-redundante HSF, der für die stressinduzierte HS-Genexpression und Thermotoleranz verantwortlich ist. HSF3 konnte bisher nur in Vogelzellen nachgewiesen werden. Er könnte eine co-evolutive Anpassung an die für homoiotherme Tiere außergewöhnlich hohe Körpertemperatur von Vögeln darstellen.

Die zahlreichen HSF-Homologen, die bisher in einzelnen Pflanzengattungen gefunden wurden (*Arabidopsis*, *Lycopersicon*, *Glycine*, Kap. 2.3.2), sprechen für eine hohe Komplexität des pflanzlichen HSF-Systems und erschweren dessen Erforschung. Aufgrund struktureller Unterschiede werden pflanzliche HSF in die Klassen A und B eingeteilt (Nover *et al.*, 1996). Klasse-A-HSF weisen im Gegensatz zu Klasse-B-HSF und den HSF aller anderen Organismen eine Insertion von 21 AS (hydrophober *Linker*) zwischen HR-A und HR-B der OLD auf (Abb. 2.3.E). Charakteristisch für pflanzliche Klasse-B-HSF ist das Fehlen einer typischen C-

terminalen Aktivierungsdomäne (CTAD). Die CTAD von Klasse-A-HSF ist insgesamt sauer, also negativ geladen und enthält sogenannte AHA-Motive, die für die *Trans*-Aktivierung der Genexpression durch HSF essentiell sind (Treuter *et al.*, 1993, Döring *et al.*, 2000). Solche AHA-Motive fehlen in Klasse-B-HSF, ihre CTAD ist neutral bis positiv geladen. Durch Sequenzvergleich sämtlicher HSF-Homologe im Anschluss an die Sequenzierung des kompletten *Arabidopsis*-Genoms wurde eine dritte HSF-Klasse C identifiziert (Nover *et al.*, 2001). Klasse-C-HSF beinhalten wie Klasse-A-HSF einen hydrophoben *Linker* zwischen HR-A und HR-B, dieser ist allerdings nur 7 AS lang. Gegenwärtig beschränken sich die Untersuchungen pflanzlicher HSF auf Angehörige der Klasse A und B.

Die Ergebnisse von Experimenten, bei denen einzelne Klasse-A- und -B-HSF transient in Tabak-Protoplasten exprimiert wurden, welche HS-Promotor::Reportergen-Konstrukte enthielten, lassen vermuten, dass Klasse-B-HSF keine transkriptionsaktivierenden Eigenschaften besitzen (Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000). Klasse-A-HSF hingegen sind in solchen Experimenten in der Lage HS-Promotoren zu induzieren, wobei die AHA-Motive in der CTAD von entscheidender Bedeutung sind, welche den Klasse-B-HSF fehlen (Treuter *et al.*, 1993; Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000, Bharti *et al.*, 2000; Döring *et al.*, 2000). Auch die Komplementation einer Hefe-*HSF*-Mutante gelingt nur mit den Tomaten *HSFA1* und *-A2* nicht aber mit *HSFB1* (Boscheinen *et al.*, 1997) und die ektopische Expression der beiden *Arabidopsis* Klasse-A-HSF *HSF1* und *HSF3* nicht aber des Klasse-B-HSF *HSF4* führt zur HSP-Expression unter Nicht-HS-Bedingungen und erhöhter Thermotoleranz der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (Lee *et al.*, 1995; Prändl *et al.*, 1998).

Aufgrund der fehlenden Transkriptionsaktivität werden Klasse-B-HSF auch als „inerte“ HSF bezeichnet, die negativ-regulatorisch auf die HS-Expression wirken könnten, ähnlich wie der hHSF4a in menschlichen Zellen (Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000). Da zumindest für *HSFB1* aus Tomate eine konstitutive Kernlokalisierung nachgewiesen wurde (Scharf *et al.*, 1998) und die Expression einiger Klasse-B-HSF nach HS zunimmt, schlagen Czarnecka-Verner *et al.* (1997 & 2000) folgendes Modell zur negativen Regulation der HS-Antwort durch Klasse-B-HSF vor: Inerte Klasse-B-HSF binden konstitutiv an HS-Promotoren und verhindern die HS-Expression unter Normalbedingungen. Nach HS werden sie durch aktivierte Klasse-A-HSF von den HS-Promotoren verdrängt und HSP werden exprimiert. Auch Klasse-B-HSF werden nun hitzeinduziert exprimiert bis ihre Menge ausreicht, um die Klasse-A-HSF-Promotorbindung zu kompetieren und die Attenuation der HS-Reaktion einzuleiten.

Zur Zeit muss dieses Modell als hypothetisch angesehen werden. Alle bisherigen Ergebnisse zur möglichen Funktion einzelner pflanzlicher HSF während der HS-Reaktion beruhen auf

Experimenten, in denen HSF transient in heterologen oder ektopisch in homologen Systemen exprimiert wurden. Wie beim tierischen HSF-System (s.o.) kann eine individuelle HSF-Funktion in Pflanzen letztlich eindeutig nur durch die Analyse von *HSF*-Mutanten bestimmt werden.

2.5 Mutantenisolierung in *Arabidopsis*: Insertionsmutagenese

Antisense- oder Cosuppressions-Strategien (Kooter & Mol, 1993; Baulcombe, 1996) führen nicht immer zur vollständigen Eliminierung der Genfunktion, außerdem ist ihre Spezifität unklar, weshalb die damit erzielten Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden müssen (van der Krol *et al.*, 1990; Höfgen *et al.*, 1994). Die folgenden Ausführungen sollen sich daher auf die Herstellung, Identifizierung und Analyse von Gen-*knockouts* durch Mutagenese beschränken.

Das sich speziell die Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten bis vor wenigen Jahren auf *forward genetics*-Strategien beschränkten, hatte folgende Gründe: Während die gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination in Mäusen mittlerweile zur Routine gehört (Koller *et al.*, 1989) und auch in *E. coli* und Hefe zu diesem Zweck verwendet wird, findet sie in *Arabidopsis* zu selten statt, um in größerem Umfang eingesetzt zu werden (Kempin *et al.*, 1997). Wirklich effizient wird die homologe Rekombination für das gezielte Ausschalten von Genen zur Zeit nur in einem pflanzlichen Modellorganismus eingesetzt, dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Strepp *et al.*, 1998). Die stattdessen verwendeten, chemischen oder physikalischen Methoden (zur Übersicht: Feldmann *et al.*, 1994) zur zufälligen, ungerichteten Mutagenese, führen zwar zu Populationsgrößen, in denen statistisch gesehen jedes Gen mindestens einmal betroffen ist, aufgrund der geringen und unvorhersagbaren „Spuren“ ist es aber aufwendig, ausgehend von der Gensequenz die entsprechende Mutante aus einer solchen Population zu isolieren. Deutlichere und vorhersagbare Spuren hinterläßt die Insertionsmutagenese, bei der das Ausschalten von Genen durch Integration von T-DNAs oder Transposons in codierende oder regulatorische Bereiche des Genoms geschieht (zur Übersicht: Feldmann *et al.*, 1994).

Da für *Arabidopsis* nur wenige endogene Transposons ausreichend beschrieben sind, müssen sowohl heterologe Transposonsysteme als auch T-DNAs zunächst durch Transformation in das *Arabidopsis*-Genom eingebracht werden (van Sluys *et al.*, 1987; Feldmann, 1991; Bancroft *et al.*, 1993). Die resultierende Insertionsmutante zeichnet sich weniger durch den Erwerb und die Expression fremdartiger DNA aus - die in diesem Zusammenhang verwendeten T-DNAs bzw. Transposons besitzen lediglich Markergene, zur Selektion der

Transformanden - wichtiger ist die Unterbrechung des am Integrationsort gelegenen Gens. Die Voraussetzungen dafür sind in *Arabidopsis* gut. Die im Vergleich zu anderen Organismen hohe Gendichte des Genoms von 4480 Bp pro Gen (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), die in der geringen Menge intergenetischer Sequenzen begründet liegt, macht es wahrscheinlich, dass ein Gen getroffen wird. Aufgrund der Länge der verwendeten T-DNA bzw. Transposons (5-25 Kb) bleibt die Insertion außerdem nur selten ohne Wirkung.

Individuen, die eine Insertion in einem bestimmten Gen tragen, können mittels PCR identifiziert werden, indem genspezifische Primer mit Primern kombiniert werden, die spezifisch für die Randbereiche des entsprechenden Insertionsmutagens sind. Nur genomische DNA einer Linie, die eine Insertion innerhalb oder nahe des entsprechenden Gens trägt, führt zu PCR-Produkten (siehe auch: Kap. 3.11.5). Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR können dabei zunächst Gemische (*Pools*) genomischer DNAs von mehr als tausend unabhängiger Transformanden pro PCR eingesetzt werden, um schnell eine Aussage über die Anwesenheit einer gewünschten Insertion in der entsprechenden Population treffen zu können. In den folgenden Durchmusterungsrunden wird die gefundene „Spur“ zurückverfolgt auf eine immer kleiner werdende Zahl von Individuen, bis schließlich das einzelne Individuum identifiziert ist. Solche reverse-Genetik-Ansätze zur Identifizierung von Insertionsmutanten mittels PCR waren bereits erfolgreich in *Drosophila* mit *P*-Elementen (Ballinger & Benzer 1989; Kaiser & Goodwin, 1990; Hamilton *et al.*, 1991) und in *Caenorhabditis elegans* mit *Tc1*-Elementen (Plasterck, 1993; Rushforth *et al.*, 1993) durchgeführt und von Feldmann *et al.* (1994) auch für *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinien beschrieben worden.

Die systematische Suche nach T-DNA-Insertionslinien wurde durch die Entwicklung effizienter und unaufwendiger *in planta*-Transformationstechniken unterstützt, mit deren Hilfe große Populationen unabhängiger T-DNA-Transformanden etabliert werden konnten (Feldmann & Marks, 1987; Bechtold & Pelletier, 1998; Clough & Bent, 1998). Erstmals berichteten McKinney *et al.* (1995) von der Identifizierung von T-DNA-Insertionslinien für *Aktin2*- und *-4*, aus einer Population von 5.300 unabhängigen Transformanden, indem sie degenerierte *Aktin*-Primer mit T-DNA-Primern kombinierten. Ein Jahr später durchmusterten Krysan *et al.* (1996) eine Population von 9.100 Individuen mit spezifischen Primern für 63 verschiedene Gene und fanden für 17 dieser Gene Insertionslinien. Mittlerweile stehen T-DNA-Insertionslinien mit Populationsgrößen von mehr als 60.000 Individuen zur Verfügung (Krysan *et al.*, 1999). Werden mehrere Populationen von T-DNA- und Transposon-Insertionslinien gleichzeitig untersucht, ist es bereits heute möglich, für annähernd jedes der 25.498 *Arabidopsis*-Gene Nullmutationen zu identifizieren (Meissner *et al.*, 1999; zur Übersicht: Parinov

& Sundaresan, 2000).

Beim Vergleich von T-DNA und Transposon als Insertionsmutagen ergeben sich für beide Systeme Vorteile und Nachteile. Transposon-Insertionen können remobilisiert werden, d. h. aus dem ursprünglichen Integrationsort desintegrieren. Führt dies zur Reversion des Phänotyps ist der Beweis für den kausalen Zusammenhang von Insertion und Phänotyp erbracht. Die Remobilisierung autonomer Elemente ist aber auch nachteilig, da die entsprechende Mutation nicht stabil ist. Kommt es zu somatischen Sprüngen, weisen die betroffenen Pflanzen sektorielle Unterschiede bezüglich der Insertion auf, die sich nicht in den Nachkommen wiederfinden. Diesem Problem wurde begegnet, indem Zwei-Element-Systeme verwendet wurden (Aarts *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1995). Nach mehreren Generationen, in denen sich die Transposons auf bis zu 20 Kopien pro Genom anreichern, kann durch Segregation der Transposasequelle ein weiteres Springen des zurückbleibenden, nicht-autonomen Transposons verhindert werden. Die vergleichsweise hohe Kopienzahl an Transposons in einer Linie führt dazu, dass Transposon-Populationen ein vielfaches an unabhängigen Insertionsereignissen repräsentieren, wie gleichgroße T-DNA-Populationen. Die Wahrscheinlichkeit eine Insertionsmutante für ein bestimmtes Gen in Transposonlinien zu finden, ist somit höher als beim Durchmustern der gleichen Anzahl von T-DNA-Insertionslinien. Die hohe Zahl an *second-site*-Insertionen macht andererseits umfangreiche Rückkreuzungen nötig, um den direkten Zusammenhang zwischen einer bestimmten Insertion und dem gefundenen Phänotyp zu zeigen. Letzteres stellt einen nicht unwesentlichen Vorteil bei der Verwendung von T-DNA-Insertionslinien dar, die durchschnittlich nur 1,5 Insertionen pro Genom aufweisen (Feldmann, 1991; Feldmann *et al.*, 1994). Interessanterweise gehen die meisten bis heute erfolgreich mittels reverser Genetik isolierten und beschriebenen Insertionsmutanten auf T-DNA-Insertion zurück (Bouché & Bouchez, 2001).

2.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält 21 HSF-Homologe (Nover *et al.*, 2001; Kap. 7.3 & 7.5). Von diesen waren bisher vier Vertreter (HSF1, HSF3, HSF4 und HSF21) bezüglich ihrer Expression und allgemeiner biochemischer Eigenschaften als Transkriptionsfaktoren charakterisiert worden (Hübel & Schöffl, 1994; Hübel *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Prändl *et al.*, 1998; Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000). Eine Aussage über ihre Funktion *in planta* ließen die entsprechenden Ergebnisse nur begrenzt zu, da sie in heterologen Systemen oder durch *gain-of-function*-Ansätze erzielt wurden. Insbesondere die Frage, welche Aufgabe Klasse-B-HSF im pflanzlichen HSF-System erfüllen, blieb dabei unbeantwortet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden 1) wann und 2) in welcher Weise einzelne HSF an der HS-Reaktion in *Arabidopsis* beteiligt sind. Dabei fiel die Wahl auf jeweils drei Vertreter der HSF-Klassen A und B. Zusätzlich zu den erwähnten HSF1, -3 und -4 waren dies HSF2, -6 und -7, deren cDNAs durch Dr. R. Prändl isoliert worden waren (Schöffl & Prändl, 1999).

Zur Beantwortung der Fragestellung 1) sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die Aktivität individueller HSF in *Arabidopsis*-Gesamtproteinextrakten nachzuweisen und zu quantifizieren. Das so ermittelte Aktivitätsprofil einzelner HSF würde Anhaltspunkte liefern, wann ein HSF funktionell an der HS-Reaktion beteiligt ist.

Um Fragestellung 2) zu beantworten, sollten *HSF-knockout*-Pflanzen isoliert werden. Dabei würde es sinnvoll sein, sich auf jene HSF zu konzentrieren, deren Aktivitätsprofile eine Beteiligung an der HS-Reaktion wahrscheinlich machen. Neben dem physiologischen Parameter der Thermotoleranz sollten vor allem detaillierte Untersuchungen zu Expressionsstärke und –kinetik verschiedener HS-Gene in *HSF*-Mutanten während der HS-Reaktion Aufschluss über die Funktion der entsprechenden HSF geben. Im Einzelfall sollte außerdem die Möglichkeit genutzt werden, *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Ansätze zu kombinieren, um ein möglichst vollständiges Bild von der *in vivo*-Funktion einzelner HSF zu erhalten.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzenlinien

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia (C24)**

Dieser Ökotyp wurde im allgemeinen für Untersuchungen an "Wildtyp" *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Er stellt außerdem den Hintergrund für *HSF3*- und *HSF7*-transgene Pflanzen dar.

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia (Col-0)**

Dieser Ökotyp stellt den Hintergrund für die *pHSF7:GUS*-Promotorlinien dar.

***HSF3*-transgene *Arabidopsis* (Prändl *et al.*, 1998)**

Hintergrund: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia (C24)

Für Analysen an *HSF3*-transgenen *Arabidopsis* Pflanzen wurde die homozygote T3 Generation der Linie 197 (Prändl *et al.*, 1998) verwendet. Diese Linie zeichnet sich durch die ektopische Expression von *HSF3* unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors aus. Das zur Transformation verwendete Plasmid pBI121.1.(Jefferson, 1987) verleiht Kanamycinresistenz.

T-DNA-Insertionslinien:

Samen einzelner Linien wurden von DuPont (DuPont, Wilmington, USA), dem *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio State Universität, Columbus, USA) und dem *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC, Nottingham, GB) bezogen.

a) Feldmann-Linien:

Hintergrund: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Wassilewskija.

Es handelt sich um eine Population von 12.600 unabhängigen T-DNA Transformanden, gegründet im Labor von Dr. K. Feldmann an der Universität von Arizona (zur Übersicht: Feldmann, 1992). Zur Transformation wurde pGV3850 (Zambryski *et al.* 1983) verwendet, welches die zirka 16 Kb lange 3850:1003 T-DNA trägt (Velten & Schell, 1985) und Kanamycinresistenz verleiht. Eine genaue Auflistung und Beschreibung der Linienorganisation findet sich im Anhang unter 7.2. Samen der Populationen wurden vom NASC, dem ABRC und von DuPont durch Dr. J. Ward (seinerzeit ZMBP/Pflanzenphysiologie, Universität Tübingen) bezogen.

b) Wisconsin-Alpha-Linien:

Hintergrund: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Wassilewskija.

Es handelt sich um eine Population von 60.480 unabhängigen T-DNA Transformanden, hergestellt von Dr. R. Amasino und Kollegen an der Universität von Wisconsin. Zur Transformation wurde pD991 ein Derivat von pCGN1547 (McBride and Summerfelt, 1990) verwendet, welches Kanamycinresistenz vermittelt. Eine genaue Beschreibung der Linienorganisation findet sich in Krysan *et al.* (1999), Sussman *et al.* (2000) und unter <http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis>. Nach dem primären Durchmustern auf DNA-Ebene durch die *Arabidopsis Knockout Facility* im Labor von M. Sussman (Universität Wisconsin) wurden einzelne Samen-Pools dieser Linien über das ABRC bezogen.

3.2 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1985) *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Diente zur Klonierung von DNA.

***E. coli* TG1** (Gibson, 1984) *supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB)
F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]*

Diente zur Expression rekombinanter Proteine in Verbindung mit dem pQE-Expressionssystem von Qiagen.

***E. coli* TOP10F'** (Invitrogen) *F'[proAB lacI^q lacZ Δ M15 Tn10(Tet^r)]
McrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15
 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697
galU galK rpsL(Str^r) endA1 nupG λ ⁻*

Diente zur Klonierung von DNA in Verbindung mit dem TA Cloning® Kit und dem GeneRacer™ Kit von Invitrogen.

***E. coli* XL1 Blue MRF'** (Stratagene) *Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1
supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proAB, lacI^q
Z Δ M15] Tn10(tet^r)*

Diente zur Klonierung von DNA in Verbindung mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101**C58C1 Rif^r(Van Larebeke *et al.* 1974)

Diente zur Pflanzentransformation.

3.3 Plasmide**3.3.1 *E. coli* -Plasmide****pBlueskriptSK** (Stratagene)pUC19 Derivat, amp^r

Wird im Folgenden mit pBSK bezeichnet. Diente zur Klonierung von DNA. Ermöglicht blau/weiß-Selektion über α -Komplementation.

pCR®2.1 (Invitrogen)amp^r, kan^r

Diente zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in Verbindung mit dem TA Cloning® Kit von Invitrogen. Ermöglicht blau/weiß-Selektion über α -Komplementation.

pQE30, pQE40 (Qiagen)Expressionsvektor, amp^r

Von diesen Plasmiden exprimierte rekombinante Proteine besitzen einen N-terminalen 6xHis-Tag, welcher deren Reinigung über Nickelaffinitätschromatographie ermöglicht. In pQE40 können rekombinante Proteine zusätzlich als Dihydrofolatreduktase (DHFR) -Fusionsprotein exprimiert werden.

3.3.2 Binäre Plasmide für *Arabidopsis*-Transformation**pBI121.1** (Jefferson, 1987)kan^r

Diente zur ektopischen Expression von *HSF7*-Konstrukten unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in *Arabidopsis*. Auf der T-DNA befindet sich zwischen Promotor und dem Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens (*nos-ter*) das β -Glucuronidase-Gen (*uidA*, *GUS*). Bei Verwendung entsprechender Restriktionsschnittstellen ist daher die Expression von GUS-Fusionsproteinen möglich.

pGPTV-BAR (Becker *et al.*, 1992)Basta^r

Diente zur Herstellung von pHSF7::*GUS* Linien. Die T-DNA *Left border* trägt ein Phosphino-

thricinacetyltransferase-Gen unter der Kontrolle des Nopalinsynthese-Promotors (*Pnos*) und verleiht transformierten Pflanzen daher eine Basta-Resistenz. Innerhalb der T-DNA *Right border* befindet sich stromabwärts der *multiple cloning site* (MCS) ein promotorloses *GUS*-Gen (*uidA*), welches als Reporter für Promotorstudien verwendet werden kann.

3.4 Konstrukte

Expressionskonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, wurden durch Sequenzierung bestätigt. Konstruktarten finden sich im Anhang unter 7.1.

3.4.1 HSF-cDNAs

Sämtliche *HSF*-cDNAs (in Klammer: GenBank-Akzessionsnummer) stammen aus *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia und wurden in pBSK kloniert. Sie dienen als PCR-*templates* für die Klonierung entsprechender Folgekonstrukte. Zur Sondenherstellung über *in vitro*-Transkription wurden sie mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen linearisiert und mit der entsprechenden RNA-Polymerase transkribiert.

pBSK-*HSF1* (diese Arbeit)

Die einschließlich Stoppcodon 1488 Bp lange codierende Sequenz von *HSF1* (X76167) wurde mit den Primern rekHSF1/5' und rekHSF1/3' mittels PCR aus cDNA amplifiziert. Das entstandene Produkt wurde mit *Bgl*II und *Sal*I geschnitten und in die *Bam*HI/*Sal*I Schnittstellen von pBSK kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde es mit *Mun*I linearisiert.

pBSK-514 (Dr. R. Prändl):

Enthält 1840 Bp lange *HSF2*-cDNA (Y14069) über *Eco*RI/*Eco*RI kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde es mit *Bam*HI linearisiert.

pBSK-113 (Dr. R. Prändl):

Enthält 1791 Bp lange *HSF3*-cDNA (Y14068) über *Eco*RI/*Eco*RI kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T3 RNA-Polymerase wurde es mit *Eco*RV linearisiert.

pBSK-432 (Dr. R. Prändl):

Enthält 1155 Bp lange *HSF4*-cDNA (Y14069) über *Eco*RI/*Eco*RI kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T3 RNA-Polymerase wurde es mit *Hind*III linearisiert.

pBSK-412 (Dr. R. Prändl):

Enthält 1142 Bp lange *HSF6*-cDNA (AJ251867) über *EcoRI/EcoRI* kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T3 RNA-Polymerase wurde es mit *EcoRV* linearisiert.

pBSK-201 (Dr. R. Prändl):

Enthält partielle 1452 Bp lange *HSF7*-cDNA (AJ251868) über *EcoRI/EcoRI* kloniert. Für die *in vitro*-Transkription mit der T3 RNA-Polymerase wurde es mit *PvuII* linearisiert.

3.4.2 HSF-Expressionskonstrukte für *E. coli***pQE32-HSF1** (Hübel & Schöffl, 1994)

6xHis-Tag + Aminosäuren 31-491

HSF1-cDNA in *Sall/PstI* Schnittstelle des pQE32.

pQE30-HSF2 (Dr. R. Prändl)

6xHis-Tag + Aminosäuren 1-468

Die codierende Sequenz der *HSF2*-cDNA wurde mittels PCR aus pBSK-514 amplifiziert, mit *BglII* geschnitten und in die *BamHI*-Schnittstelle des pQE30 kloniert.

pQE30-HSF3 (Dr. R. Prändl)

6xHis-Tag + Aminosäuren 1-481

Die codierende Sequenz der *HSF3*-cDNA wurde mittels PCR aus pBSK-113 amplifiziert und über *BamHI* in pQE30 kloniert.

pQE30-HSF4 (Dr. R. Prändl)

6xHis-Tag + Aminosäuren 1-284

Die codierende Sequenz der *HSF4*-cDNA wurde mittels PCR aus pBSK-432 amplifiziert und über *BamHI* in pQE30 kloniert.

pQE30-HSF6 (Dr. R. Prändl)

6xHis-Tag + Aminosäuren 1-299

Die codierende Sequenz der *HSF6*-cDNA wurde mittels PCR aus pBSK-412 amplifiziert und über *BamHI/SmaI* in pQE30 kloniert.

pQE30-HSF7 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Aminosäuren 1-377

Die einschließlich Stoppcodon 1134 Bp lange codierende Sequenz von *HSF7* wurde mittels PCR mit den Primern rekHSF7/5' und rekHSF7/3' aus pBI121-HSF7 amplifiziert und über *Bam*HI/*Sal*I in pQE30 kloniert.

3.4.3 Δ HSF-Expressionskonstrukte für *E. coli***pQE30- Δ HSF1** (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + Aminosäuren 331-486

Das cDNA-Fragment von *HSF1* wurde mittels PCR mit den Primern Δ HSF1/331Q und Δ HSF1/482L aus pQE32-*HSF1* amplifiziert und über *Bam*HI/*Sal*I in pQE30 kloniert.

pQE30- Δ HSF2 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + Aminosäuren 311-455

Das cDNA-Fragment von *HSF2* wurde mittels PCR mit den Primern Δ HSF2/311A und Δ HSF2/455T aus pBSK-514 amplifiziert, mit *Bgl*III/*Sal*I geschnitten und in die *Bam*HI/*Sal*I-Schnittstelle des pQE30 kloniert.

pQE40- Δ HSF3 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + DHFR + Aminosäuren 317-367

Das cDNA-Fragment von *HSF3* wurde mittels PCR mit den Primern Δ HSF3/317A und Δ HSF3/367F aus pBSK-113 amplifiziert und über *Bgl*III/*Sal*I in pQE40 kloniert.

pQE30- Δ HSF4 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + Aminosäuren 189-281

Das cDNA-Fragment von *HSF4* wurde mittels PCR mit den Primern Δ HSF4/189T und Δ HSF4/281K aus pBSK-432 amplifiziert und über *Bam*HI/*Sal*I in pQE30 kloniert.

pQE30- Δ HSF6 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + Aminosäuren 208-296

Das cDNA-Fragment von *HSF6* wurde mittels PCR mit den Primern Δ HSF6/208S und Δ HSF6/296R aus pBSK-412 amplifiziert und über *Bam*HI/*Sal*I in pQE30 kloniert.

pQE30-ΔHSF7 (diese Arbeit)

6xHis-Tag + Enterokinase-Schnittstelle + Aminosäuren 262-377

Das cDNA-Fragment von *HSF7* wurde mittels PCR mit den Primern ΔHSF7/213A und ΔHSF7/328K aus pBSK-201 amplifiziert und über *Bam*HI/*Sa*II in pQE30 kloniert.

3.4.4 pBI121 Konstrukte für *HSF7* Expression in *Arabidopsis***pBI121-HSF7** (diese Arbeit)

CaMV35S-Promotor + Aminosäuren 1 - 377 + Nos-Terminator

Aus *Arabidopsis*(Ökotyp Columbia, C24)-cDNA wurde die codierende Sequenz von *HSF7* mittels PCR mit den Primern HSF7/5' *Xba*I und HSF7/3' *Bam*HI-Stopp-*Sst*I amplifiziert und über *Xba*I/*Sst*I in pBI121 kloniert. (= Konstrukt I)

pBI121-HSF7-GUS (diese Arbeit)

CaMV35S-Promotor + Aminosäuren 1 bis 377 + GUS + Nos-Terminator

Aus *Arabidopsis*(Ökotyp Columbia, C24)-cDNA wurde die codierende Sequenz von *HSF7* mittels PCR mit den Primern HSF7/5' *Xba*I und HSF7/3' *Bam*HI-Stopp-*Sst*I amplifiziert und über *Xba*I/*Bam*HI in pBI121 kloniert. (= Konstrukt II)

pBI121-HSF7-NLS (diese Arbeit)

CaMV35S-Promotor + Aminosäuren 1 bis 377 + NLS + Nos-Terminator

pBI121-HSF7-GUS (s.o.) wurde mit *Bam*HI und *Sst*I geschnitten. Der Vektor (enthält *HSF7*) wurde vom *GUS*-Gen elektrophoretisch getrennt und über Gelelektion isoliert. Das verwendete nukleäre Lokalisationssignal (NLS) ist das *Annealing*-Produkt der beiden synthetischen Oligodesoxyribonukleotide NLSOligo1 und NLSOligo2. Die Sequenz (s.u.) entspricht weitgehend dem NLS des großen T-Antigens aus *Simian* Virus 40 (SV40) wie sie von van der Krol & Chua (1991) verwendet wurde. Das NLS wurde mit *Bgl*II und *Sst*I geschnitten und in den mit *Bam*HI und *Sst*I geschnittenen pBI121-HSF7 ligiert. (= Konstrukt III)

3.4.5 *HSF7*-Promotor-Konstrukte**pBSK-pHSF7** (diese Arbeit)

Aus genomischer *Arabidopsis*-DNA wurde mittels PCR mit den Primern HSF7prom/5' und HSF7prom/3' das 1730 Bp lange *HSF7*-Promotorfragment von +210 bis -1520 relativ zum Transkriptionsstart amplifiziert und über *Hind*III/*Sma*I in pBSK kloniert.

pBSK-pHSF7mut (diese Arbeit)

Derivat von pBSK-pHSF7. Hier wurden die 3 Hitzeschockelemente durch *site-directed mutagenesis* wie folgt mutiert: -338 G/T, -331 C/A, -328 G/T und -174 G/T, -177 C/T, -167 C/A und -118 G/T, -111 C/A-108 G/T.

pBSK-7HSE (diese Arbeit)

Aus pBSK-pHSF7 wurde mittels PCR mit den Primern 7HSE/5' und 7HSE/3' ein 305 Bp langes *HSF7*-Promotorfragment (von -379 bis -75 relativ zum Transkriptionsstart), welches die identifizierten Hitzeschockelemente beinhaltet, amplifiziert und über *Bam*HI/*Hind*III in pBSK kloniert. Das Insert (7HSE) wurde durch Restriktionsverdau und Gelelution vom restlichen Plasmid abgetrennt und für den EMSA verwendet.

pBSK-mut7HSE (diese Arbeit)

Aus pBSK-pHSF7mut wurde mittels PCR mit den Primern 7HSE/5' und 7HSE/3' ein 305 Bp langes *HSF7*-Promotorfragment (von -379 bis -75 relativ zum Transkriptionsstart), welches die mutierten Hitzeschockelemente beinhaltet, amplifiziert und über *Bam*HI/*Hind*III in pBSK kloniert. Das Insert (mut7HSE) wurde durch Restriktionsverdau und Gelelution vom restlichen Plasmid abgetrennt und für den EMSA verwendet.

pGPTV-pHSF7::GUS (diese Arbeit)

Aus pBSK-pHSF7 wurde das Insert durch Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Sma*I ausgeschnitten, vom restlichen Vektor durch Gelelution abgetrennt und über *Hind*III/*Sma*I in pGPTV-BAR kloniert. Das Konstrukt führt zur Expression des *GUS*-Reportergens unter der Kontrolle des *HSF7*-Promotors in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen.

pGPTV-pHSF7mut::GUS (diese Arbeit)

Aus pBSK-pHSF7mut wurde das Insert durch Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Sma*I ausgeschnitten, vom restlichen Vektor durch Gelelution abgetrennt und über *Hind*III/*Sma*I in pGPTV-BAR kloniert. Das Konstrukt führt zur Expression des *GUS*-Reportergens unter der Kontrolle des mutierten *HSF7*-Promotors in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen.

3.4.6 Sonstige Konstrukte

pBSK83.1 (C. Leisgen, Tübingen)

Dieses pBSK-Derivat enthält ein 862 Bp langes Fragment der cDNA von *HSP83.1* aus *A. thaliana* (Ökotyp Columbia) und entspricht der von Conner *et al.* (1990) veröffentlichten Sequenz von Bp-Position 1554 bis 2390. Zur Herstellung einer *HSP83.1*-Sonde wurde das Insert mittels PCR mit den M13-*universal* und *-reverse* Primern amplifiziert und anschließend über *random priming* markiert.

pHSP17.6 (Dr. E. Vierling, Tucson)

Dieses pBSK-Derivat enthält die 652 Bp lange cDNA des Klasse-I-sHSP *HSP17.6* (Helm & Vierling, 1989) aus *A. thaliana* (Ökotyp Columbia), über *EcoRI/EcoRI* kloniert. Zur Herstellung einer *HSP17.6*-Sonde wurde das Insert mittels PCR mit den M13-*universal* und *-reverse* Primern amplifiziert und anschließend über *random priming* markiert.

pAAc2 (Dr. R. Meagher, Athens)

Dieses pcDNAII-Derivat enthält die 1552 Bp lange cDNA des *Aktin2*-Gens (An *et al.*, 1996) aus *A. thaliana* (Ökotyp Columbia) und diente zur Herstellung einer *Aktin2*-Sonde durch *random priming*-Markierung.

3.5 Primer und synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligodesoxyribonukletide wurden i.d.R. HPLC gereinigt im Synthesemaßstab von 10 nmol von Sigma/ARK bezogen. Nukleinsäuresequenzen sind in 5' → 3'-Orientierung dargestellt, soweit nicht anders angegeben. Überhänge und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv, letztere zusätzlich fett hervorgehoben. Von einem Primerpaar wird der Vorwärts-Primer zuerst genannt.

3.5.1 Primer für PCR

Primer für Klonierung der codierenden Region der *HSF1*-cDNA in pBSK

rekHSF1/5'

GACTG**AGATCT**ATGTTTGTAAATTTCAAATACTTCTCT

Enthält *BglII*-Schnittstelle und Startcodon.

rekHSF1/3'

GACTG**GTCGAC**CTAGTGTTCTGTTTCTGATGTGAGA

Enthält *SalI*-Schnittstelle und Stoppcodon.

Primer für Klonierung von HSF7 in pQE30**rekHSF7/5'**

GACTGGGATCCATGCCGGGGGAACAAACCGGA

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle und Startcodon.

rekHSF7/3'

GACTGGTCGACTCATTTCCTCGAGTTCAAGCCACGACC

Enthält *Sal*I-Schnittstelle und Stoppcodon.

Primer für Klonierung von ΔHSF in pQE30 oder -40**ΔHSF1/331Q**

GACTGGGATCCGATGACGATGACAAACAAGAGGTACTACCCACAACCTTC

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF1/482L

GACTGGTCGACTTACAATTCTTCTATAAGCTTATCCATATG

Enthält *Sal*I-Schnittstelle und Stoppcodon.

ΔHSF2/311A

GACTGAGATCTGATGACGATGACAAAGCAGATGTTTCATCCATTCCTGC

Enthält *Bgl*II-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF2/455T

GACTGGTCGACTTAAGTAAGATGGTTCATTTGTTGATTC

Enthält *Sal*I-Schnittstelle und Stoppcodon.

ΔHSF3/317A

GACTGAGATCTGATGACGATGACAAAGCCGAGTTTTACCCAACACAG

Enthält *Bgl*II-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF3/367F

GACTGGTCGACTTAAAATTCAGGGCTCCAAGAGTCTG

Enthält *Sal*I-Schnittstelle und Stoppcodon.

ΔHSF4/189T

GACTGGGATCCGATGACGATGACAAAACGGGTCATCTGAAAGTAAGACC

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF4/281K

GACTGGT**CGACTT**ATTTGCTGCTTTTCCACAACGGC

Enthält *SalI*-Schnittstelle und Stoppcodon.

ΔHSF6/208S

GACTGG**GATCC**GATGACGATGACAAATCGAATTACGTCCGGATCTCAGCC

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF6/296R

GACTGGT**CGACTT**ATCTCTGATTGGTTCGATTATAATGTC

Enthält *SalI*-Schnittstelle und Stoppcodon.

ΔHSF7/213A

GACTGG**GATCC**GATGACGATGACAAAGCGAATTTACACCCGGGTCAAG

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle und Enterokinase-Erkennungssequenz.

ΔHSF7/328K

GACTGGT**CGACTC**ATTTTCCGAGTTCAAGCCACG

Enthält *SalI*-Schnittstelle und Stoppcodon.

Primer für pBI121-HSF7-Konstrukte**HSF7/5' *Xba*I**

GACTGT**CTAGA**AATGCCGGGGGAACAAACCGG

Enthält *Xba*I-Schnittstelle und Startcodon.

HSF7/3' *Bam*HI-Stopp-*Sst*I

GACTGG**GAGCTCTCAGGATCC**TTTTCCGAGTTCAAGCCACGACC

Enthält *Bam*HI-Schnittstelle, Stoppcodon und *Sst*I-Schnittstelle.

Primer für HSF7-5'-RACE**GeneRacerTM 5'-Primer (Stratagene)**

CGACTGGAGCACGAGGACACTGA

HSF7RACE/3'

TTCGTTCCACGAGATCAATTCGTCGT

Pos.+428

GeneRacer™5'Nested (Stratagene)

GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA

HSF7prom/3'GACTG**CCCGGG**GAGTTATAGATCAAAAATCTAAACTTTCCT**Primer für HSF7-Promotor-Klonierung****HSF7prom/5'**: GACTG**AAAGCTT**CATAAATCATTAAGTACACCGACTTCTCTEnthält *Hind*III-Schnittstelle.**HSF7prom/3'**: GACTG**CCCGGG**GAGTTATAGATCAAAAATCTAAACTTTCCTEnthält *Sma*I-Schnittstelle.**Primer für site-directed mutagenesis des HSF7-Promotors**

Diese 3 Primerpaare wurden in Verbindung mit dem Site-Directed™ Mutagenesis Kit von Stratagene zur gezielten Mutation der 3 Hitzeschockelemente im *HSF7*-Promotor verwendet. Die Mutagenese erfolgte sukzessiv, d.h. ausgehend von pBSK-pHSF7 wurde zunächst das erste HSE mit Primerpaar 1 mutiert. Ausgehend von dem entstandenen Plasmid wurde dann das zweite HSE mit Primerpaar 2 mutiert, usw. Die betroffenen HSE-Boxen und die substituierten Basen sind in der Primersequenz fett, letztere zusätzlich unterstrichen dargestellt.

Primerpaar 1:**mutHSE1/5'**: CAAAAGAAGAAAAAGAT**TAACTTATGTAAAAAGAAAGGAAG****mutHSE1/3'**: CTCCTTTTCTTT**TTACATAAAGTTTAT**CTTTTTTCTTCTTTTGTG**Primerpaar 2:****mutHSE2/5'**: GTTTTTGTTGTTGTCT**TTATGTAACTTCAGATCTGTCTCTCCTC****mutHSE2/3'**: GAGGAGAGACAGATCT**TGAAGTTACATAAGACAACAACAAAAAC****Primerpaar 3:****mutHSE3/5'**: CAATACGTTCTCTCATA**TAACATTAATGTAACTTCACAACATAATC****mutHSE3/3'**: GATTATGTTGTGAAG**TTACATAATGTTAT**GTGAGAGGAACGTATTG**Primer für 7HSE- und mut7HSE-Klonierung in pBSK****7HSE/5'**: GACTG**GGATCCC**CACAGGGTCAAAAAGGAAATAACAAAAAGEnthält *Bam*HI-Schnittstelle.

7HSE/3': GACTGA**AAGCTT**GATAGAGAGAGAGAGAGATTATGTTGTGA

Enthält *Hind*III-Schnittstelle.

Primer für das Durchmustern von T-DNA Insertionslinien

Für Feldmann-Linien:

HSF3/5'B: GAAGAACAGAAGAACTTCCAGGATCAATC

HSF3/3'B: ATAAACAACACAAAAACCGATCTCTACTAAC

HSF7/5'B: CGTATCAGCTTGTGGAAGATCCGGTTTAC

HSF7/3'B: GAAAT-GATTCTGTATCAACATTGCCATAACTC

LB' (T-DNA *left border* Primer, Krysan *et al.*, 1996)

GATGCACTCGAAATCAGCCAATTTTAGAC

RB' (T-DNA *right border* Primer, Krysan *et al.*, 1996)

TCCTTCAATCGTTGCGGTTCTGTCAGTTC

Für Wisconsin-Linien:

HSF1/5': GTCCAGGTGATGAAAATGTGTTCAAGCAA

HSF1/3': ATGAAGAGCTCGCAAGGACCTCCATTGAA

HSF2/5'B: GAGTAGTGAATCTCGGAATTGTTGAAGAAG

HSF2/3'B: GAACAGAAGAATATCTCTCACTTTGAAGC

HSF7/5': GGATTTGGTTCTAATGGGTCTGTGATAGA

HSF7/3': AAACACACACACGACCACTAGAGAACTTG

J1 202 (T-DNA *left border* Primer)

CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC

J1 270 (T-DNA *left border* Primer, Nested)

TTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTG

Primer für Real-Time-PCR***Aktin2 (U41998)***

Act2-3F': AAGCTGGGGTTTTATGAATGG

Act2-3R': TTGTCACACACAAGTGCATCAT

HSF1 (X76167)

hsf1-F': CGAAAATGGACGGTGTACC

hsf1-R': GCGGTAAAGAGTTCGCATTAAG

HSF3 (Y14068)

hsf3-5F': CAAGAACCAAACGAGTGGACCCGTAA

hsf3-5R': TCCTTTTGCAACCTCCCCTGAAAATC

HSF4 (Y14069)

hsf4-F': GGACCGGGATGAAAAGAATTA

hsf4-R': CACGCTGGTTTGAACAGTCTT

HSF7 (AJ251868)

hsf7-F': TGGAGGAGAATAACTCCGGTAA

hsf7-R': ATGCAATGGGGATTTCAGTAACA

HSP17.6A (Y14070)

hsp17.6-2F': TGAGCCAAAGAAACCAAAGACT

hsp17.6-2R': CGAACACCAAGAGGTAGTTGC

HSP18.2 (X17295)

hsp18.2-F': TTACCGGAGAATGCAAAGATG

hsp18.2-R': CGGAGATATCGATGGACTTGA

HSP70 (AJ002551)

hsp70-F': AGGAGCTCGAGTCTCTTTGC

hsp70-R': AGGTGTGTCGTCATCCATTC

HSP83.1 (M62984)

hsp83.1-F': GCTGCTAGGATTCACAGGATG

hsp83.1-R': TCCTCCATCTTGCTCTCTTCA

HSP101 (AF218796)

hsp101-3R': TAACGGGCCAAAGAGAAGTG

hsp101-3F': CACACGTTGGAGGTCAAGACT

3.5.2 NLS-Oligonukleotide

Durch *Annealing* beider Oligonukleotide ergibt sich das doppelsträngige NLS, wie es für die Klonierung von pBI121-HSF7-NLS verwendet wurde. Neben der für das NLS codierenden Sequenz befindet sich eine *Bgl*III-Schnittstelle am 5'-Ende und ein Stoppcodon direkt gefolgt von der *Sst*I-Schnittstelle am 3'-Ende. (Konstruktkarte: Kap. 7.1)

NLSOligo1

CTAGAG**AGATCT**TACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTG
AGAGCTCCAGTC

NLSOligo2

GACTG**GAGCTC**TCAGGATCCTACCCGGGGATCTACCTTTCTCTTCTTCTTGGGAGCCATTGT
AGATCTCTCTAG

3.5.3 Oligonukleotide für DNA-Bindungsstudien

Durch *Annealing* entsprechender 23 Nukleotide langer komplementärer Oligonukleotide ergaben sich die doppelsträngigen synthetischen Hitzeschockelemente HSE bzw HSEm, wie sie für DNA-Bindungsstudien (EMSA und Immunpräzipitationsassay) mit HSF verwendet wurden. HSEm bedeutet „mutiertes HSE“, da hier die für HSF-Bindung essentiellen Basen mutiert sind. HSE-Boxen sind hervorgehoben.

HSE

5´ -TCGGCCA**GAAGCTTCCAGAAGCC**
 :::::::::::::::::::::
 GGT**CTTCGAAGGTCTTC**GGGGCT-5´

HSEm

5´ -TCGGCCATA**AAGCTTACATAAGCC**
 :::::::::::::::::::::
 GGT**ATTTCGAATGTATT**CGGGCT-5´

3.6 Materialien

3.6.1 Antikörper

Anti-HSF-Antiseren:

Immunisierungen von Kaninchen zur Gewinnung folgender antiHSF-Antiseren wurden von der Firma BioGenes (Berlin) durchgeführt. Für die Immundetektion pflanzlicher Proteine in der *Western*-Analyse wurden aus diesen Antiseren monospezifische Antikörper gewonnen (Kap. 3.12.9) und in einer Konzentration von zirka 50-100 ng pro ml eingesetzt.

Anti Δ HSF1 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
Anti Δ HSF2 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
Anti Δ HSF3 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
Anti Δ HSF4 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
Anti Δ HSF6 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit
Anti Δ HSF7 (polyklonal aus Kaninchen)	diese Arbeit

Anti-HSP-Antiseren:

Für die Immundetektion pflanzlicher Proteine in der *Western*-Analyse wurden 1:2000 Verdünnungen dieser Antiseren verwendet.

AntiHSP17.6 (polyklonal aus Kaninchen)	Lee <i>et al.</i> (1995)
AntiHSP90 (polyklonal aus Kaninchen)	Krishna <i>et al.</i> (1997)

Anti-His-Tag-Antikörper:

Entsprechend den Herstellerangaben wurde eine 1:2000 Verdünnung dieses Antikörpers bei *Western*-Analysen eingesetzt.

^{MRGS} -His Antikörper, (monoklonal, Maus IgG)	Qiagen
---	--------

Sekundäre Antikörper:

Entsprechend den Herstellerangaben wurden 1:10.000 Verdünnungen dieser Antikörper bei *Western*-Analysen eingesetzt.

antiRabbit IgG HRP-conjugated (affinitätsgereinigt, polyklonal aus Ziege)	Sigma
--	-------

antiMouse IgG HRP-conjugated
(monoklonal, Fc-spez, Ziegen IgG) Sigma

3.6.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Pharmacia
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Peqlab
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim, AGS, NEB, Pharmacia
TaKaRa ExTaq™ DNA-Polymerase	TaKaRa (BioWhittaker)
ThermoZyme™ DNA Polymerase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	New England BioLabs

3.6.3 Kits

Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer
ECL™ Western Blotting detection system	Amersham/Pharmacia
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
GeneRacer™ Kit	Invitrogen
QIAexpressionist Protein Expression Kit	Qiagen
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit	Amersham/Pharmacia
Rediprime™ DNA labelling System	Amersham/Pharmacia
Renaissance Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	NEN
RNA Transkription Kit	Stratagene
RNeasy® Plant RNA Mini Kit	Qiagen
TA Cloning® Kit	Invitrogen

3.6.4 Längenstandards

RNA:

0.24-9.5 Kb RNA ladder Gibco BRL
(9,50 Kb, 7,46 Kb, 4,40 Kb, 2,37 Kb, 1,35 Kb, 0,24 Kb)

DNA:

Gene Ruler™ DNA ladder MBI Fermentas
(10000 Bp, 8000 Bp, 6000 Bp, 5000 Bp, 4000 Bp, 3500 Bp, 3000 Bp, 2500 Bp, 2000 Bp, 1500 Bp, 1200 Bp, 1031 Bp, 900 Bp, 800 Bp, 700 Bp, 600 Bp, 500 Bp, 400 Bp, 300 Bp, 200 Bp, 100 Bp)

1 Kb DNA ladder Gibco BRL
(12216 Bp, 11198 Bp, 10180 Bp, 9162 Bp, 8144 Bp, 7126 Bp, 6108 Bp, 5090 Bp, 4072 Bp, 3054 Bp, 2036 Bp, 1636 Bp, 1018 Bp, 506 Bp, 517 Bp, 396 Bp, 344 Bp, 298 Bp, 220 Bp, 201 Bp, 154 Bp, 134 Bp, 75 Bp)

Lambda-DNA/*Hind*III+*Eco*RI MBI Fermentas
(21226 Bp, 5148 Bp, 4973 Bp, 4268 Bp, 3530 Bp, 2027 Bp, 1904 Bp, 1584 Bp, 1375 Bp, 947 Bp, 831 Bp, 564 Bp, 125 Bp)

Protein (nativ):

High Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit Pharmacia
 (Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Katalase 232 kDa, Laktat-Dehydrogenase 140 kDa, Albumin 67 kDa)

Protein (denaturierend):

Mark12™ wide range protein standard Invitrogen/Novex
 (Myosin 200 kDa, β-Galaktosidase 116,3 kDa, Phosphorylase b 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Glutamindehydrogenase 55,4 kDa, Laktatdehydrogenase 36,5 kDa, Carbo-anhydrase 31,0 kDa, Trypsin-Inhibitor 21,5 kDa, Lysozym 14,4 kDa, Aprotinin 6,0 kDa, Insulin β-Kette 3,5 kDa, Insulin α-Kette 2,5 kDa)

SeeBlue™ Plus2, pre-stained protein standard Invitrogen/Novex
 (Myosin 250 kDa, Phosphorylase B 148 kDa, BSA 98 kDa, Glutamindehydrogenase 64 kDa, Alkohol-Dehydrogenase 50 kDa, Carbo-anhydrase 36 kDa, Myoglobin Rot 22 kDa, Lysozym 16 kDa, Aprotinin 6 kDa, Insulin β-Kette 4 kDa)

3.6.5 Chemikalien und Radioisotope**Chemikalien:**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Merck und im Reinheitsgrad "zur Analyse" oder "reinst" bezogen.

Acrylamid/Bis-acrylamid-Lsg. (30%)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Pharmacia
Ampicillin	Roth
Bacto-Trypton	Difco
Blue G	Serva
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Serva
BSA	Serva
Calciumhypochlorid	Fluka
DNA, niedermolekular	Roth
DMSO	Roth
DTT	Sigma
EDTA	Serva
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll 400	Serva
Gentamycin	Sigma
Glycerin	Serva
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
IPTG	Peqlab
Magnesiumchlorid	Roth
β-Mercaptoethanol	Serva
MOPS	Roth
MS-Salze (mit Vitaminen)	Duchefa
Natriumacetat	Roth

Desoxyribonukleotidtriphosphate	Sigma
Phenol	Roth
Poly(dI-dC)	Pharmacia
Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten, Complete, EDTA-frei,	Roche
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
Saccharose	Roth
SDS	Roth
TEMED	Pharmacia
Tris	Roth
Trinatriumacetat	Roth
Triton X100	Serva
Tween 20	Serva
X-Gal	Serva

Radioisotope:

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	Amersham
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$	Amersham

3.6.6 Verbrauchsmaterialien

3MM Filterpapier	Whatman
DE81 Ionenaustauscher Chromatographiepapier	Biometra/Whatman
Dynabeads® Oligo (dT) ₂₅	Dynal
Ni-NTA Superflow-Agarose	Qiagen
Nylonmembran Hybond™-N und -N ⁺	Amersham
Parafilm	American National Can
Polyacrylamid-Fertiggele (Tris-Glycin, 4-20% oder 8-16%)	LTF Labortechnik
Protein A-Sepharose 4B Fastflow	Sigma
Protran® BA Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Sarstedt
Röntgenfilm X-Omat	Kodak
Rundfilter 3MM (8,5 cm)	Whatman
Sterilfilter (2 µm)	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen (10 ml)	Greiner
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Costar

3.7 Computerprogramme und Datenbanken

Microsoft Office 2000 Professional
Für Textverarbeitung und Tabellenkalkulation (Word, Excel).

CorelDRAW® 10 Graphics Suite
Für Graphiken und Photobearbeitung (Corel Draw, Corel Photo Paint)

DNA STAR (Lasergene)
Für Darstellung, Bearbeitung und Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen (EditSeq, MegAlign, SeqMan, MapDraw, Protean).

PubMed von NCBI, Current Contents, Medline, Winspurs, Web of Science Datenbanken und Programme zur Literatursuche.

BLAST (Altschul *et al.*, 1990)

„BLAST“ = *basic local alignment search tool*. Zum Suchen von homologen Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen in den entsprechenden Sequenz-Datenbanken. Dies sind im Einzelnen die GenBank des *National Center for Biotechnological Information* der USA (Benson *et al.*, 1998), die EMBL Datenbank und die DNA DataBank aus Japan.

Primer3-Software (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>)

Zur Erstellung von Primerpaaren für die *Real-Time-PCR*.

3.8 Kultivierungsmethoden

3.8.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium unter Schütteln (200 Upm) oder auf LB-Festmedium. Bei der Kultivierung von *A. tumefaciens* (GV3101) wurde dem Flüssigmedium außerdem 100 mg/l Rifampicin und 25 mg/l Gentamycin zugesetzt, um dem Wachstum schnellwüchsiger, kontaminierender Bakterien vorzubeugen.

E. coli wurde bei 37°C, Agrobakterien bei 28-30°C angezogen. Zur Selektion wurde dem Medium 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin nach dem Autoklavieren zugesetzt. Für blau/weiß-Selektion über α -Komplementation wurden 40 μ l 2 % (w/v) X-Gal in DMF und 12 μ l 100 mM IPTG pro Platte ausplattiert.

LB-Medium (Luria Broth):	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	NaCl
	1 g/l	Glucose
		pH 7,5 mit NaOH
Für Festmedium:	16 g/l	Agar

3.8.2 Kultivierung von *Arabidopsis in vitro*

3.8.2.1 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Samen wurden 7 min unter Schütteln in gesättigter Calciumhypochlorid-Lsg./0,1 % (v/v) Triton X100 inkubiert und anschließend viermal mit sterilem H₂O gewaschen.

3.8.2.2 Pflanzenkultur auf Festmedium

Sterilisierte Samen wurden mit sterilen Zahnstochern auf GM-Festmedium oder auf mit GM-Flüssigmedium getränktem Filterpapier ausgelegt. Die Stratifizierung erfolgte für 3 Tage bei 4-8°C im Dunkeln. Keimung und Wachstum erfolgte bei 24°C, 60% Luftfeuchte, 16 h Photoperiode und einer Lichtintensität von zirka 5000 Lux.

Zur Selektion von Primärtransformanten, wurde GM-Medium ohne Saccharose verwendet, dem 50 mg/l Kanamycin und 200 mg/l Cefotaxim zugesetzt wurde.

GM-Medium (Valvekens <i>et al.</i> , 1988):	1x	MS-Salze mit Vitaminen
	30% (w/v)	Saccharose
	0,5 g/l	MES
		pH 5,8 mit KOH
	8 g/l	Agar

3.8.3 Kultivierung von *Arabidopsis* auf Erde

Unsterile Samen wurden auf feuchter Erde ausgesät und 3 Tage bei 4-8°C im Dunkeln stratifiziert. Keimlinge aus Sterilkultur wurden zirka 10 DAG (*days after germination*) auf Erde umgesetzt. Wachstum erfolgte bei 22°C, 60% Luftfeuchte, 16 h Photoperiode und einer Lichtintensität von zirka 5000 Lux.

Zur Selektion Basta-resistenter Pflanzen wurden zirka 7 Tage alte Keimlinge zweimal im Abstand von einer Woche mit einer 0,1% Lösung des Herbizids BASTA® besprüht.

3.8.4 Hitzeschockbehandlung von Pflanzengewebe

Zur Isolierung von RNA oder zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten wurde Blattmaterial bei angegebenen Temperaturen und Zeitspannen in SIB-Puffer schüttelnd inkubiert. Blieb die Angabe HS undefiniert, bedeutete dies einen 2-stündigen Hitzeschock bei 37°C.

Bei den Analysen von *HSF3*-transgenen Pflanzen wurden die Pflanzen 3-4 Wochen auf Erde bei 22°C angezogen und dann für 3 Tage bei 25°C kultiviert.

Für Thermotoleranztests sowie Analyse der Expression kleiner Hitzeschockproteine wurden *Arabidopsis*-Keimlinge im Alter von 7 DAG (*days after germination*) in einer Petrischale bei angegebenen Temperaturen und Zeitspannen inkubiert. Die Dokumentation der Thermotoleranz erfolgte nach 7-10 Tagen weiterer Kultivierung unter Kontrollbedingungen.

SIB-Puffer:	1 mM	Kaliumphosphat, pH 6,0
	1% (w/v)	Saccharose

3.9 Transformationstechniken

3.9.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte durch Chemotransformation oder Elektroporation. Beide Techniken erfordern zunächst die Präparation von Bakterienzellen, die in erhöhtem Maße zur Aufnahme von DNA befähigt sind, d.h. in diesem Sinne „kompetent“ sind.

3.9.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

(Hanahan, 1983)

100 ml SOB-Medium wurden mit 100 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur (in LB-Medium) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde dann in einer Heraeus-Christ-Minifuge bei 2500 Upm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml TFB1 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Wiederholung der vorangegangenen Zentrifugation. Das Zellpellet wurde in 2 ml TFB2 vorsichtig und unter Kühlung resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und schließlich aliquotiert bei -80°C aufbewahrt.

SOB-Medium:	20 g/l	Bacto-Trypton
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	5 g/l	Hefe-Extrakt
	0,5 g/l	NaCl
		pH 7,5 mit NaOH
nach Autoklavieren zugeben:	20 ml/l	1 M MgSO ₄

TFB1:	30 mM	KOAc
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl ₂
		pH 5,8 mit Essigsäure
	15% (v/v)	Glycerin

Dieser Puffer wurde nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

TFB2:	10 mM	MOPS
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
		pH 7,0 mit NaOH
	15% (v/v)	Glycerin

Dieser Puffer wurde nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

3.9.1.2 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

(Hanahan, 1983)

Von den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden 50 µl zu 10 µl Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, für 90 s bei 37°C „hitzegechockt“ und 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz 50 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Transformationsrate für *E. coli* DH5α lag bei $3,5 \times 10^6$ Kolonien pro 1 µg pBluescript-DNA.

3.9.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Zellen

0,5 l LB-Medium wurden mit 1/100 VT einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4000g wurde das Zellpellet in 500 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. In weiteren Zentrifugationsrunden wurde das Pellet schrittweise in 250 ml, 120 ml und schließlich in 2 ml 10% Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

3.9.1.4 Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 2-5 µl der zu transformierenden, möglichst salzfreien DNA zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine einminütige Inkubation auf Eis, bevor der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mM) pipettiert wurde. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV im *E. coli* pulser (Bio-Rad). Anschließend wurden 500µl LB-Medium zugegeben und *E. coli*-Zellen für 45 min bei 37°C, *A. tumefaciens*-Zellen für 4 h bei 28°C inkubiert. Nach dem Ausplattieren der Zellen auf Selektionsmedium und Inkubation bei entsprechenden Kultivierungsbedingungen erschienen die ersten transformierten *E. coli*-Kolonien nach zirka 16 h, während *A. tumefaciens*-Kolonien erst nach zirka 2 Tagen sichtbar wurden.

3.9.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana* durch *A. tumefaciens*

3.9.2.1 Vorbereitung der *A. tumefaciens*-Zellen

Ein Liter LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurde mit 10 ml einer 3-Tage-Kultur des gewünschten *A. tumefaciens*-Klons angeimpft und für 20 h kultiviert. Die Bakterien wurden bei 4000 g abzentrifugiert und in 1 l Infiltrationsmedium resuspendiert.

Infiltrationsmedium:	$\frac{1}{2} \times$	MS-Salze mit Vitaminen
	5% (w/v)	Saccharose
	0,03% (v/v)	Silwet L-77
		pH 5,8 mit KOH

3.9.2.2 Pflanzentransformation durch Blüten-Vakuuminfiltration

(Bechtold & Pelletier, 1998)

Bei dieser *Agrobacterium*-vermittelten Transformationsmethode erfolgt die Transformation in der Keimbahn und zwar an der Blüte *in vivo*, d.h. an der intakten Pflanze. Dadurch wird ein aufwendiges Regenerieren von transformiertem Gewebe wie es bei der somatischen Transformation nötig ist vermieden. Für die hier beschriebene, sowie für die vergleichbare „*floral-dip*“-Methode (Clough & Bent, 1998) konnte gezeigt werden, dass vornehmlich die weiblichen Gametophyten transformiert werden (Bechtold *et al.*, 2000; Desfeux *et al.*, 2000). Die daraus hervorgehenden Samen stellen heterozygote Primärtransformanden der Generation T1 dar.

Arabidopsis Pflanzen wurden auf Erde zur Blüte gebracht (zirka 6 Wochen). Nach dem Entfernen bereits vorhandener Schoten wurden die Pflanzen kopfüber mit den Blütriebren in die sich in einem Excikator befindliche Bakteriensuspension getaucht. Ein Eintauchen der Blätter wurde dabei vermieden. Nun wurde ein Vakuum angelegt. Sobald sich in der Flüssigkeit Luftblasen bildeten, wurde die Vakuumpumpe abgestellt. Nach 10 min wurde das Vakuum schnell abgelassen. Die so behandelten Pflanzenteile erscheinen glasig, weshalb die Pflanzen zur Regeneration zunächst für mehrere Stunden seitlich liegend kultiviert wurden.

3.10 Kreuzungen an *Arabidopsis*-Pflanzen

(Müller 1961)

Zur Gewinnung einer Linie, die sowohl in *HSF1* als auch in *HSF3* eine T-DNA-Insertion trägt (*hsf1/hsf3*, „Doppel-*knockout*“), wurde *hsf1-tt1* mit *hsf3-tt1* gekreuzt. Die für beide Gene bezüglich der T-DNA-Insertion heterozygote T1-Generation wurde geselbstet und aus der T2-Generation mittels PCR homozygote Individuen ermittelt (Kap. 3.11.5). Auf diese Weise wurden je 3 Individuen identifiziert, die bezüglich T-DNA-Insertion in *HSF1* und *HSF3* homozygot waren oder aber die entsprechenden Wildtypallele (keine Insertion) besaßen. Die Nachkommen dieser homozygoten Pflanzen (Doppel-*knockout* und Wildtyp) wurden für entsprechende Experimente verwendet.

Die weiblichen Kreuzungspartner wurden emaskuliert, indem die noch unreifen Staubblätter

mit einer Dumont-Pinzette entfernt wurden. Die so behandelten Blüten wurden mit einem Bindfaden markiert. Sobald sich nach zwei bis drei Tagen auf dem Stempel deutlich sichtbar Papillen entwickelt hatten, wurden die Blüten bestäubt. Dazu wurden reife Staubblätter des männlichen Kreuzungspartners über den Stempel gestrichen. Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Binokular vorgenommen.

3.11 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken, wie Phenolextraktion sowie Fällung und photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

3.11.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.11.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus pflanzlichem Gewebe

(Li & Chory, 1998)

Die folgende Methode zur Isolierung hochmolekularer Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe führt zu DNA-Ausbeuten und -Reinheit, die ausreichend für die Verwendung als PCR-*template* sind. Sie ist einfach und schnell und daher bestens für die parallele Aufarbeitung vieler Proben geeignet. Im Folgenden wird die DNA-Präparation aus einem jungen Blatt (zirka 10 mg) beschrieben. Bei größeren Gewebemengen kann die Methode in entsprechend größerem Maßstab angewandt werden, wobei in erster Linie die Volumina der Puffer und Lösungen proportional erhöht werden müssen.

Ein junges Blatt wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem passenden Pistill für 10 s homogenisiert. Dann wurden 700 µl Extraktionspuffer zugegeben und für weitere 10 s gemörtsert. Nach heftigem Vortexen für 5 s wurden Zelltrümmer durch 2-minütige Zentrifugation bei 18.000 g pelletiert. Vom Überstand wurden 600 µl abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol und kurzem Vortexen wurde der Ansatz bei 18.000 g für 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen, wobei eine mehrstündige Inkubation bei 4°C für das Inlösungsgehen der DNA von Vorteil war.

Extraktionspuffer:	200 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	250 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS

TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

3.11.1.2 Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und *A. tumefaciens* wurden die E.Z.N.A.®-Plasmid Miniprep Kits I und II der Firma Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben verwendet. Zur vollständigen Lyse von Agrobakterien wurden diese nach Zugabe des Lysepuffers (Lösung 2) für 5 min bei 70°C inkubiert.

Das E.Z.N.A.-Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Alkalisch-denaturierte, chromosomale DNA wird nach einem Neutralisationsschritt gemeinsam mit denaturierten Proteinen und Zelltrümmern abzentrifugiert. Der so gewonnene Extrakt wird über Silica-Gel-Säulen gereinigt. Dabei bindet die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze, welche die Hydrathülle der DNA zerstören, über ihre negativ-geladenen Phosphatgruppen und eine Kationenbrücke an die Si-OH-Gruppen (Silanolgruppen) des Silikats. Polysaccharide und Proteine binden nicht und können durch Waschen unter Hochsalzbedingungen entfernt werden. Die Elution mit Wasser oder Niedrigsalz-Puffern bewirkt die Rehydratation der DNA, die Bindung an das Silikat wird aufgehoben.

Die so präparierte Plasmid-DNA kann für Restriktionen, PCR, Sequenzierung und zur Transformation von Bakterien eingesetzt werden. Aus 5 ml einer Übernachtskultur mit *High Copy-Number* Plasmiden können zirka 15 - 20 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

3.11.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe wurde das RNeasy® Plant RNA Mini Kit von Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dabei wird das Gewebe zunächst durch Mörsern in flüssigem Stickstoff pulverisiert, dann in einen Puffer, der Guanidinium-Isothiocyanat enthält, gegeben und nochmals durch Zentrifugation durch ein „Shredder-Säulchen“ homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol wird das Lysat auf ein Silica-Gel-Säulchen geladen, an welches die RNA selektiv bindet. Nach Waschsritten kann die RNA mit TE-Puffer oder H₂O eluiert werden.

3.11.1.4 Isolierung von mRNA aus Pflanzengewebe

(nach Herstellerangaben Dynal)

Die Isolierung von polyadenylierter RNA aus Pflanzengewebe erfolgte mittels *Oligo(dT)₂₅* *Dynabeads* entsprechend den Herstellerangaben.

3.11.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

3.11.2.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Agarosegele wurden zur Längen- und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Außerdem fanden sie bei der präparativen Darstellung von DNA-Fragmenten Anwendung (Kap. 3.11.2.2).

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 bis 2% (w/v) Agarosegelen mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,5 µg/ml. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,2 VT Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte die DNA durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromidkomplexes im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden und mit einer Videokamera aufgenommen werden.

Durch den Vergleich der Intensität und Laufstrecke einer DNA-Bande mit der eines Standards bekannter Konzentration und Fragmentlänge konnten die Konzentration und Länge eines DNA-Fragmentes bestimmt werden. Als Standard diente hierbei die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnittene DNA des Bakteriophagen Lambda.

5 x TBE:	445 mM	Tris
	445 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
Ladepuffer:	30%	Glycerin
	0,025%	Bromphenolblau

3.11.2.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um bestimmte Restriktionsfragmente von der übrigen DNA zu trennen und zu isolieren, wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem präparativen Agarosegel die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel extraction Kit von Qiagen erfolgte dann die Reinigung der DNA aus der Agarose, entsprechend den Herstellerangaben.

3.11.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Elektrophorese von DNA-Fragmenten, die kürzer als 100 Bp waren, wurden 10% Polyacrylamidgele verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE. Zur Herstellung der

Gellösung wurde eine 30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (AA/Bis), $c = 0,8\%$, der Firma Roth benutzt. Zum Auslösen der Polymerisierungsreaktion wurden 30 ml Gellösung mit 140 μl 10% Ammoniumpersulfat und 20 μl TEMED versetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 VT Ladepuffer (3.11.2.1) versehen. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2 h. Anschließend wurden die Gele in 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid für 5 min unter leichtem Schwenken inkubiert, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen.

3.11.2.4 Herstellung doppelsträngiger Oligodesoxynukleotide

Zum *Annealen* von komplementären Oligodesoxynukleotiden wurden äquimolare Mengen der in H_2O gelösten Einzelstränge gemischt, auf 95°C erhitzt und über Nacht bei RT abgekühlt. Anschließend wurde die doppelsträngige Form von den Einzelsträngen durch Elektrophorese in einem 10% Polyacrylamidgel (3.11.2.3) abgetrennt und die Doppelstrangbande unter UV-Licht ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer Pipettenspitze zerkleinert. Nach Zugabe von 500 μl TE, pH 8,0, wurde die Probe über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Polyacrylamid bei 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge für 20 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das pelletierte Polyacrylamid wurde dann in 500 μl TE resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Der gesammelte Überstand wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt und in 50 μl TE aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch UV-Absorptionmessung bestimmt. Eine erneute Polyacrylamidgelelektrophorese mit 1 bis 2 μg DNA ergab Aufschluß über die Reinheit der Präparation.

3.11.2.5 Gelelektrophorese von RNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

10-30 μg Gesamt-RNA oder 2-3 μg poly(A)⁺-RNA in 4,5 μl RNasefreiem H_2O wurden mit 2 μl 10 x MOPS, 3,5 μl Formaldehyd [37%] und 10 μl Formamid vermischt und 15 min bei 65°C inkubiert. Auf gleiche Weise wurden 3 μl der RNA-ladder [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$], die als Längensstandard verwendetet wurde, vorbereitet. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze mit je 2 μl Formaldehyd-Gel-Ladepuffer versetzt, auf ein 1% (w/v) Formaldehyd-Agarosegel geladen und in 1 x MOPS-Puffer bei 40 mA für zirka 3 h elektrophoretisch aufgetrennt.

10 x MOPS-Puffer:	200 mM	MOPS
	80 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
		pH 7,0 mit 10 N NaOH
Formaldehyd-Gel-Ladepuffer:	50% (v/v)	Glycerin
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
	0,25%	Bromphenolblau
1% (w/v) Formaldehyd-Agarosegel:	1% (w/v)	Agarose
	1 x	MOPS-Puffer
	0,18 VT	37% Formaldehyd

Für das Herstellen von 300 ml einer 1% Formaldehyd-Agarosegel-Lsg. ergibt sich folgender Ablauf: 3 g Agarose in 216 ml H₂O aufkochen, kurz abkühlen lassen, unter dem Abzug 30 ml 10 x MOPS-Puffer und 54 ml Formaldehyd (37%) zugeben, mischen und gießen.

3.11.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.11.3.1 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Typs II spielen bei der Technik der *in-vitro*-Rekombination von DNA eine wesentliche Rolle. Sie ermöglichen die Hydrolyse von DNA-Molekülen an definierten Stellen und eröffnen damit Möglichkeiten zur gezielten Manipulation von DNA.

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt 2 µg DNA und 2 U Restriktionsenzym in 20 µl Enzympuffer (nach Herstellerangaben). Es wurde beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (meist 37°C) für mehrere Stunden inkubiert. Sollten größere DNA-Mengen verdaut werden, wurde das Reaktionsvolumen so gewählt, dass das zugegebene Volumen des oder der Restriktionsenzyme 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschritt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen nach Herstellerangaben beendet und die DNA, wenn nötig, mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt.

3.11.3.2 Dephosphorylierung von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Um die Rückligation linearisierter Plasmide zu verhindern, wurde dem Ansatz nach abgeschlossener Restriktion 3-4 U Alkalischer Phosphatase zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C für 20 min abgestoppt.

3.11.3.3 Ligation von DNA

(verändert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Synthese von Phosphordiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen. Sie ermöglicht daher die *in-vitro*-Verknüpfung von DNA-Fragmenten.

Für die Ligationen wurde der vom Enzymhersteller mitgelieferte Ligasepuffer verwendet. Ein Ligationsansatz enthielt 50 ng Vektor-DNA, einen 2- bis 3-fachen molaren Überschuß an Insert-DNA und 0,5 U T4-DNA-Ligase in 10 µl 1 x Ligasepuffer. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C.

3.11.3.4 cDNA-Synthese aus poly(A)⁺-RNA

Zur Herstellung von cDNA wurde das Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit von Amersham/Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde poly(A)⁺-RNA mittels Oligo(dT)₂₅ Dynabeads isoliert (Kap. 3.11.1.4). Für die nachfolgende Erststrangsynthese wurde 1 µg der poly(A)⁺-RNA in 33 µl H₂O zunächst für 5 min bei 65°C, dann für 5 min bei 37°C inkubiert. Zeitgleich wurde der Reaktionsmix, der u.a. Reverse Transkriptase und Oligo(dT)₁₈ Primer enthält, ebenfalls bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Nach Zugabe der RNA-Lösung zum Reaktionsmix erfolgte eine Inkubation für weitere 5 min bei 37°C, bevor der Ansatz vorsichtig gemischt wurde und zum vollständigen Ablauf der Reaktion für 60 min bei 37°C inkubiert wurde.

3.11.3.5 PCR-Amplifikation von DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1985) und Mullis & Falcoona (1987) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Die Amplifikation der DNA erfolgt durch zyklische Wiederholung dreier Schritte: Zunächst wird die DNA, die die zu amplifizierende Sequenz enthält (*template*), durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Im zweiten Schritt werden zwei Oligodesoxynukleotide (Primer), die zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereichs komplementär sind, bei niedrigerer Temperatur angelagert (*annealt*). Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert dann im dritten Schritt beide Primer zu zwei komplementären Strängen (*extension*). Bei jedem Zyklus vermehrt sich auf diese Weise die zu amplifizierende Sequenz exponentiell.

Bei einer entsprechenden Modifikation der Primer können außerdem die Randbereiche des DNA-Fragments mutiert werden.

Zur Amplifikation von geringen *template*-Mengen und DNA-Fragmenten von mehr als 2 Kb, wie es beim Durchmustern der T-DNA Insertionslinien der Fall war, wurde die ExTaq Poly-

merase (TaKaRa) verwendet.

Zur Amplifikation von DNA zu Klonierungszwecken wurde die *Pwo*-Polymerase (Peqlab) verwendet, da diese eine zusätzliche 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt.

Ein typischer PCR-Ansatz (50 µl) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Pflanzen-DNA hatte folgende Zusammensetzung:

1 µl	5'Primer [12 pmol/µl]
1 µl	3'Primer [12 pmol/µl]
4 µl	dNTP-Mix [10 mM]
5 µl	10 x Polymerasepuffer
1 µl	Polymerase [1-2 U/µl]
1 µl	DNA- <i>template</i> [40 ng/µl]
37 µl	H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde i.d.R. 30 mal folgendem Temperaturzyklus ausgesetzt: 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primer-*Annealing* bei entsprechender Temperatur (s.u.) und 1 min pro Kb zu amplifizierender DNA-Länge Extension bei 72°C. Die *Annealing*-Temperatur wurde so gewählt, dass sie zirka 10°C unter der mit folgender Formel errechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer lag. T_m [°C] = 4 x (G+C-Gehalt) + 2 x (A+T-Gehalt). Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt.

3.11.3.6 Mutation von DNA durch gezielte Basensubstitution

(nach Herstellerangaben Stratagene)

Um Hitzeschockelemente (HSE) innerhalb der klonierten Bereichs des *HSF7*-Promotors durch gezielte Basensubstitution zu mutieren, wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Herstellerangaben verwendet. Dabei muß die zu mutierende Sequenz zunächst in einem Plasmid kloniert vorliegen. Dieses Plasmid dient dann als *template* für eine PCR, bei der Primer verwendet werden, die die gewünschten Basensubstitutionen aufweisen. Die Sequenzen beider Primer sind komplementär zueinander, so dass das PCR-Produkt das gesamte Plasmid umfaßt und sich von diesem nur durch die einzelnen ausgetauschten Basen unterscheidet. Im Gegensatz zum *template*-Plasmid, welches aus Bakterien isoliert wurde, weist das PCR-Produkt keinerlei Modifikationen auf. Im folgenden Schritt kann daher gezielt das *template*-Plasmid durch endonukleolytischen Abbau mit *DpnI*, welches nur modifizierte (methylierte) Schnittstellen erkennt, eliminiert werden. Die mutierte DNA bleibt intakt und kann in *E. coli* eingeschleust und kloniert werden.

10 ng des zirkulären pBSK-pHSF7 (Kap. 3.4.5) dienten als *template* für eine erste PCR, bei

der das erste Hitzeschockelement durch Verwendung des Primerpaar 1 (mutHSE1/5' und mutHSE1/3') mutiert wurde. Nach wiederholter Klonierung in *E. coli* wurde zunächst das zweite HSE unter Verwendung des Primerpaar 2 (mutHSE2/5' und mutHSE2/3') und schließlich das 3. HSE mit dem Primerpaar 3 (mutHSE3/5' und mutHSE3/3') mutiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 3.5.1 angegeben.

3.11.3.7 Identifizierung des Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE

Die 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) diente zur Isolierung des vollständigen 5'-Bereichs der *HSF7*-cDNA und damit verbunden zur Identifizierung des Transkriptionsstarts. Es wurde das GeneRacer™ Kit (Version B) von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde aus hitzegeschockten *Arabidopsis*-Blättern poly(A)⁺-RNA mittels Oligo(dT)₂₅ Dynabeads (Kap. 3.11.1.4) isoliert. 200 ng dieser cDNA wurden mit Alkalischer Phosphatase behandelt, um 5'-Phosphatgruppen sämtlicher Nukleinsäuren (unvollständige oder vollständige mRNA und nicht-mRNA) zu entfernen. Anschließend wurde dem Ansatz Pyrophosphatase zugegeben, um die 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende vollständiger mRNA-Moleküle zu entfernen. Nur diese besitzen dann, im Gegensatz zu allen anderen Nukleinsäuremolekülen des Ansatzes, eine 5'-Phosphatgruppe, die für die Ligation eines RNA-Adaptors definierter Sequenz (GeneRacer™ RNA Oligo) benötigt wird. Im folgenden Schritt wurde die mRNA mittels Oligo (dT)₃₆ Primern revers transkribiert. Ein Zehntel der entstandenen cDNA wurde als *template* für eine PCR mit dem GeneRacer™ 5'-Primer (Stratagene) und dem HSF7RACE/3' eingesetzt, wobei sich der GeneRacer™ 5'-Primer innerhalb der Adaptorsequenz und der HSF7RACE/3'-Primer in der codierenden Sequenz von *HSF7* anlagert. Da nach dieser PCR kein eindeutiges Amplifikat identifiziert werden konnte, wurde 1 µl einer 1:100-Verdünnung des PCR-Produktes für eine *Nested* PCR mit dem GeneRacer™ 5'Nested Primer (Stratagene) und dem HSF7prom/3'-Primer eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert und nach Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) sequenziert.

3.11.3.8 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA im *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* (Kapillarsequenziergerät von PerkinElmer Biosystems) wurde das Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PerkinElmer Biosystems) verwendet. Die Sequenzierung mit diesem Kit beruht auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977).

3.11.3.9 Radioaktive Endmarkierung von DNA mittels Klenow-Enzym

Das Klenow-Enzym ist das „große Fragment“ (M_r : 7,5 kDa) der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Es besitzt die 5'→3'-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, während die 5'→3'-Exonuklease des Holoenzym nicht mehr vorhanden ist.

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, die im EMSA Verwendung fanden, wurde folgender Ansatz für 20 min bei 30°C inkubiert.

1,0 µl	DNA [100 ng/µl]
2,0 µl	10 x Klenow-Puffer
2,0 µl	dNTP-Mix ohne dCTP [je 2 mM]
2,5 µl	[α - ³² P]dCTP [10 µCi/µl]
1,0 µl	Klenow-Enzym [2 U/µl]
11,5 µl	H ₂ O

Es folgte eine Ethanol-fällung und Waschen des DNA-Pellets mit 80% Ethanol, wodurch nicht eingebaute Nukleotide entfernt wurden. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. Mit 2 µl, aufgenommen in 7,5 ml Ultima-Gold-Szintillationscocktail, erfolgte eine Ausbeutemessung im Szintillationsmeßgerät Wallac 1219 (PerkinElmer-Wallac). Die Ausbeuten lagen durchschnittlich zwischen 70 und 90%.

3.11.3.10 Radioaktive Markierung von DNA mittels random priming

(Amersham/Pharmacia)

Wesentlicher Bestandteil der *random priming*-Technik ist ein statistisches Gemisch aus Hexanukleotiden, die zufällig an verschiedenen Orten der zu markierenden DNA hybridisieren und dem Klenow-Enzym als Primer für die folgende Synthese des komplementären Stranges unter Einbau radioaktiv-markierter Nukleotide dienen.

Zur Herstellung radioaktiver DNA-Sonden für *Southern*- oder *Northern*-Analysen wurden 25 ng DNA in 45 µl H₂O 5 min bei 94°C denaturiert und nach Herstellerangaben mit dem Rediprime DNA labelling System (Amersham/Pharmacia) mit [α -³²P]dCTP markiert. Die markierte DNA wurde nach Denaturierung direkt zur Hybridisierung verwendet.

3.11.3.11 Radioaktive Markierung von RNA mittels *in vitro*-Transkription

(nach Herstellerangaben Stratagene)

Die MCS von pBSK ist eingerahmt von einem T7- und einem T3-Promotor. Unter Verwendung der T3- bzw. der T7-RNA-Polymerase ist daher die *in vitro*-Transkription eines entsprechenden *Inserts* möglich. Werden dabei radioaktiv-markierte Nukleotide angeboten,

kann das resultierende Transkript als Sonde für Hybridisierungen mit anschließender Autoradiographie eingesetzt werden. Für die Detektion von mRNAs muß die RNA-Polymerase gewählt werden, die zur *in vitro*-Transkription der entsprechenden Antisense-RNA führt. Dies ist abhängig von der Orientierung des *Inserts*. Durch gezielte Restriktion des *Inserts* kann außerdem die Transkriptlänge begrenzt werden, was häufig für die Herstellung von genspezifischen Sonden nötig ist. RNA-Polymerasen und Restriktionsenzyme, die in diesem Zusammenhang im Einzelnen verwendet wurden, sind bei der Beschreibung der *template*-Plasmide angegeben (Kap. 3.4.1).

3.11.4 Hybridisierungstechniken zur Identifizierung von Nukleinsäuren

3.11.4.1 Southern-Analyse

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zum Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen nach abgeschlossener Agarosegelelektrophorese wurde der *Alkali-Blot*, eine spezielle Form der *Kapillar-Blot*-Technik, verwendet.

Im Anschluß an die Agarosegelelektrophorese wurde die DNA durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und dokumentiert (Kap. 3.11.2.1). Es folgte eine 15-minütige Inkubation des Gels in Transferpuffer (0,4 N NaOH) zur Denaturierung der DNA. Danach wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine doppellagige, in Transferpuffer getränkte 3MM-Papierbrücke gelegt. Die beiden Enden dieser Papierbrücke stehen mit einem Transferpufferreservoir in Verbindung. Auf das Gel wurde nun eine mit Transferpuffer angefeuchtete Hybond N⁺-Nylonmembran und zwei Lagen ebenfalls angefeuchteter 3MM-Papiere gelegt. Zum Aufsaugen der Flüssigkeit wurde das Ganze mit einem dicken Stapel Papierservietten abgedeckt und mit einem Gewicht von zirka 0,5 Kg beschwert. Nach mindestens 4 h wurde der *Blot* vorsichtig abgebaut. Nach dem Markieren der Geltaschen auf dem Nylonfilter wurde dieser kurz in 2 x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. (Bei der Verwendung von geladener Nylonmembran in der *Alkali-Blot*-Technik ist kein *crosslinking* der DNA nötig.)

Die Bedingungen für die folgende Hybridisierung werden unter (3.11.4.2 *Northern-Analyse*) beschrieben. Zu beachten ist lediglich, dass Hybridisierungslösungen für geladene Membranen kein Formamid enthalten dürfen.

20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
		pH 7,0 mit NaOH

3.11.4.2 Northern-Analyse

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zum Transfer von RNA-Molekülen auf Nylonmembranen nach abgeschlossener Formaldehydrogelelektrophorese (Kap. 3.11.2.5) wurde die KapillarBlot-Technik, wie unter 3.11.4.1 für den *Southern-Blot* beschrieben, verwendet. Als Transferpuffer und zum Befeuchten der 3MM-Papiere und der verwendeten (ungeladenen!) Hybond N-Nylonmembran wurde 20 x SSC bzw. 2 x SSC verwendet.

Nach Abbau des *Blots* wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, an der Luft getrocknet und die RNA durch UV-crosslinking (Fluo-Link-UV-Lampe, Dosis: 0,125 J/cm²) auf der Nylonmembran fixiert. Die Spur, in der der RNA-Längenstandard gelaufen war, wurde abgeschnitten, zunächst 15 min in 5% (v/v) Essigsäure inkubiert und anschließend in Methylenblaufärbelösung (0,5 M Natriumacetat pH 5,2 und 0,04% w/v Methylenblau) für zirka 5 min gefärbt. Das Entfärben erfolgte in H₂O.

Die Hybridisierung von *Northern-* oder *Southern-Blot*-Membranen mit radioaktiv-markierten RNA- oder DNA-Sonden (Kap. 3.11.3.9 und 3.11.3.10) erfolgte in Hybridisierungslösung ohne Formamid bei 65°C oder in Hybridisierungslösung mit 50% Formamid bei 55°C, wenn RNA-Sonden verwendet wurden oder eine höhere Stringenz erforderlich war.

Die Membranen wurden in 30 ml Hybridisierungslösung und bei entsprechender Temperatur für 1 h vorhybridisiert. Nach Zugabe der Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Membranen einmal mit 2 x SSPE/0,1% (w/v) SDS bei RT für 5 min und zweimal in 0,2 x SSPE/0,1% (w/v) SDS bei 65°C für 20 min gewaschen. Gewaschene Membranen wurden feucht in Folie eingeschweißt und in eine Expositionskassette mit Verstärkerfolie überführt. Die Exposition eines Röntgenfilmes erfolgte bei -70°C.

20 x SSPE: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	3,6 M 0,2 M 20 mM	NaCl Natriumphosphat, pH 7,4 EDTA
50 x Denhardt's-Lsg.: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g/l 10 g/l 10 g/l	Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon BSA (Fraktion V)
Hybridisierungs-Lsg. mit Formamid: (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	5 x 5 x 10 mM 0,1% (w/v) 1% (w/v) 50% (v/v)	SSPE Denhardt's-Lsg. EDTA SDS DNA, niedermolekular Formamid

Hybridisierungs-Lsg. ohne Formamid: (Westneat <i>et al.</i> , 1988)	0,25 M	Natriumphosphat, pH 7,2
	1 mM	EDTA
	1% (w/v)	BSA (Fraktion V)
	7% (w/v)	SDS

3.11.4.3 Entfernen radioaktiver Proben von Nylonmembranen

Um Sonden nach Hybridisierungen von Nylonmembranen zu entfernen, wurden diese zweimal für 5 min in 2 x SSPE/1% (w/v) SDS gekocht und anschließend in 2 x SSPE/0,1% (w/v) SDS für 5 min bei RT gewaschen.

3.11.5 Identifizierung von *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionsmutanten

Zur Identifizierung und Isolierung von *Arabidopsis*-Linien, die Mutationen in *HSF*-Genen tragen, wurden 2 Populationen von T-DNA-Insertionslinien (Feldmann-Linien und Wisconsin-Linien, Kap. 3.1) mittels einer auf PCR basierenden Methode (Krysan *et al.*, 1996) durchmustert.

Grundlage dieses Ansatzes reverser Genetik ist das Vorhandensein großer Populationen unabhängiger T-DNA-Transformanden. Solche Populationen werden je nach *Pooling*-Strategie in Subpopulationen eingeteilt. Von diesen Subpopulationen, die beispielsweise 100 unabhängige Primärtransformanden beinhalten, werden nach Selbstung Samen geerntet und als „100er-Pools“ archiviert und gegebenenfalls den *Arabidopsis*-Samen-Stock-Centern zugeführt. Diese Samen-Pools repräsentieren die Nachkommen (T2) der i.d.R. für die T-DNA-Insertion heterozygoten T1-Generation. In der T2 treten daher bezüglich der T-DNA-Insertion heterozygote und homozygote Individuen im Verhältnis 3:1 auf. Da es sich um 100er-Pools handelt, ist statistisch gesehen jede unabhängige T-DNA-Insertion mit der Häufigkeit von 1% vertreten.

Aus einem Teil der Samen der Subpopulationen wurden Pflanzen herangezogen und genomische DNA präpariert (Kap. 3.11.1.1). Um die Zahl der folgenden PCR-Reaktionen zu reduzieren, wurden DNAs von 10 Subpopulationen zu einem *Superpool* vereinigt. Die DNA eines *Superpools* diente als *template* in 5 PCR-Reaktionen (Abb. 3.1, Angaben zur PCR: Kap. 3.11.3.5). Für die erste PCR wurden genspezifische 5'- und 3'-Primer verwendet, die zur Amplifikation eines möglichst großen Bereichs des „Gens von Interesse“ führten. Für die Reaktionen 2-5 wurden beide genspezifische Primer mit jeweils beiden T-DNA-spezifischen Primern (*left border*: LB', *right border*: RB') kombiniert (Primersequenzen: Kap. 3.5.1). Falls in einem *Superpool* die DNA einer Transformande vertreten ist, bei der die T-DNA im „Gen

von Interesse“ inseriert ist, sollte mindestens eine der PCR-Reaktionen 2-5 ein Produkt liefern. In diesem Stadium des Durchmusterens war die Produktabundanz aufgrund der geringen *template*-Menge sehr niedrig, außerdem traten unspezifische PCR-Produkte auf. Zusätzlich zur Agarosegelelektrophorese mussten die PCR-Produkte daher durch *Southern-Analyse* (Kap. 3.11.4.1) verifiziert werden. Obwohl bereits aufgrund der Länge des PCR-Produkts eine Aussage über die relative Lage der T-DNA innerhalb des „Gens von Interesse“ getroffen werden konnte, wurde diese durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt.

War auf diese Weise ein positiver *Superpool* identifiziert worden, wurde in einer zweiten Durchmusterungsrunde die entsprechende Subpopulation (100er-*Pool*) ausfindig gemacht. Dies geschah im Wesentlichen wie für den *Superpool* beschrieben. Um schließlich die gewünschte Einzelpflanze aus der Subpopulation zu isolieren, wurden ihre Samen auf Erde zum Keimen gebracht. Bei einer Subpopulation von 100 Individuen wurden 343 Samen auf 7 Pflanzschalen verteilt ausgelegt, wobei jede Schale 49 Pflanzen in 7 Reihen und 7 Spalten beherbergte. Von etwa 10 Tage alten Keimlingen wurde je ein Primärblatt abgeschnitten und in 7 Schalen-*Pools* vereinigt. Nach DNA-Extraktion wurde mittels PCR die Schale ermittelt, die die gewünschte Einzelpflanze enthält. Im Abstand weniger Tage wurden auf ähnliche Weise zunächst die einzelnen Spalten, dann die einzelnen Reihen durchmustert, um die Einzelpflanze durch Schnittpunktbildung zu ermitteln. Ergaben sich mehrere positive Spalten oder Reihen, wurden alle in Frage kommenden Einzelpflanzen separat mittels PCR getestet.

Durch PCR mit DNA aus Einzelpflanzen kann außerdem ermittelt werden, ob es sich um eine homo- oder eine heterozygote Pflanze bezüglich der T-DNA-Insertion handelt. Da die T-DNA zirka 15 Kb lang ist, kann das „Gen von Interesse“, in welches die T-DNA inseriert ist, nicht mehr mit den genspezifischen 5'- und 3'-Primern amplifiziert werden. Nur bei einer heterozygoten Pflanze, die ein Allel ohne Insertion besitzt, ist dies noch möglich. Auf diese Weise wurden homozygote T-DNA-Insertionsmutanten identifiziert.

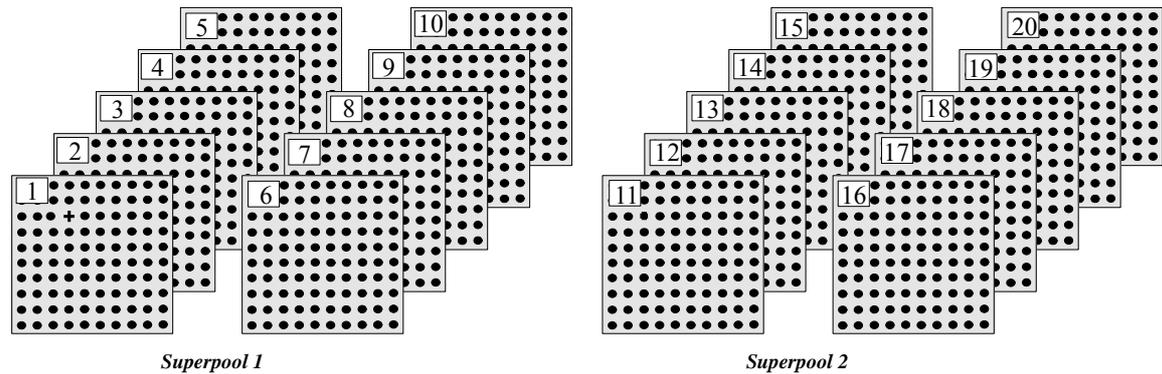
Während der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation kommt es zur Integration von T-DNAs in 1-4 (durchschnittlich 1,5) Loci pro Transformandengenom (Feldmann, 1991; Feldmann *et al.*, 1994). Dabei können zusätzliche Gene mutiert werden, außerdem kann es beim Integrationsvorgang zu größeren chromosomalen *Rearrangements* kommen (Nacry *et al.*, 1998; Laufs *et al.*, 1999). T-DNA-Insertionsmutanten sollten daher mit dem Wildtyp rückgekreuzt werden, um die Segregation der gewünschten Insertion von den zusätzlichen, unerwünschten Insertionen zu erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit geschah dies je einmal für die T-DNA-Insertionsmutanten *hsf1-tt1* und *hsf3-tt1*. Von je 10 bezüglich der gewünschten T-DNA-Insertion heterozygoten Nachkommen dieser Rückkreuzungen wurden Samen geerntet.

Jeweils 100 dieser Samen wurden einer Segregationsanalyse bezüglich Kanamycinresistenz unterzogen. Für alle untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten konnten auf diese Weise heterozygote Pflanzen (aus Rückkreuzung hervorgegangen) identifiziert werden, deren Nachkommen in 3 Teile kanamycinresistente und 1 Teil kanamycinsensitive Pflanzen spalteten. Mittels PCR wurde außerdem für je 20 der kanamycinresistenten Nachkommen die Anwesenheit der gewünschten T-DNA-Insertion bestätigt, wobei heterozygote und homozygote Pflanzen annähernd im Verhältnis 2:1 auftraten. Von homozygoten Individuen wurden Samen geerntet und für die entsprechenden Experimente verwendet. Aufgrund der Segregationsanalysen kann davon ausgegangen werden, dass diese Pflanzen nur die gewünschte T-DNA-Insertion tragen.

a) Feldmann-Linien: Es handelt sich um eine Population von 12.600 unabhängigen T-DNA Transformanden, die im Labor von Dr. K. Feldmann an der Universität von Arizona hergestellt wurde. Zur Transformation wurde pGV3850 (Zambryski *et al.* 1983) verwendet, welches die 3850:1003 T-DNA trägt (Velten & Schell, 1985) und daher Kanamycinresistenz verleiht. Für diese Linien wurde gezeigt, dass einzelne Transformanden im Durchschnitt 1,5 T-DNA Insertionen tragen (Feldmann, 1991; Feldmann *et al.*, 1994). Die 12.600 unabhängigen T-DNA Transformanden repräsentieren daher 18.900 T-DNA Insertionen. Eine genaue Auflistung und Beschreibung der Linienorganisation findet sich im Anhang unter 7.2. Samen der 126 Subpopulationen (100er-Pools) wurden vom NASC, dem ABRC und von DuPont durch Dr. J. Ward (seinerzeit ZMBP/Pflanzenphysiologie, Universität Tübingen) bezogen. In seinem Labor erfolgte die DNA-Extraktion und das Zusammenfassen der 126 DNA-Pools zu 13 Superpools. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Superpool-DNAs nach T-DNA-Insertionen in *HSF1*, -2, -3, -4, -6 und -7 wie oben beschrieben durchmustert.

b) Wisconsin-Alpha-Linien: Es handelt sich um eine Population von 60.480 unabhängigen T-DNA Transformanden, die von Dr. R. Amasino und Kollegen an der Universität von Wisconsin hergestellt wurde. Zur Transformation wurde pD991 verwendet, ein Derivat von pCGN1547 (McBride and Summerfelt, 1990), welches Kanamycinresistenz vermittelt. Eine genaue Beschreibung der Linienorganisation und der experimentellen Vorgehensweise findet sich in Krysan *et al.* (1999) und unter <http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis>.

A) Eine Pflanze (Kreuz) von 2000 Transformanten enthält eine T-DNA-Insertion im Gen von Interesse. Die Transformanten werden in 20 Subpopulationen à 100 Individuen (100er-Pool) aufgeteilt. Von jeder Subpopulation wird Samen geerntet. Ein Teil des Samens wird zu Keimlingen herangezogen, aus denen DNA präpariert wird. DNAs von je 10 Subpopulationen werden zu einem *Superpool* vereinigt.



B) PCRs mit *Superpool1*- und *Superpool2*-DNA als *template*, wobei genspezifische Primer und T-DNA-Primer kombiniert werden. Die genspezifischen 5'- und 3'-Primer führen zur Amplifikation des Gens, welches markiert und als Sonde in der *Southern*-Analyse verwendet wird, um spezifische von unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden.

Ergebnis: Die Insertionsmutante findet sich in *Superpool1*. Aufgrund der Größe der PCR-Produkte, sollte die Insertion der T-DNA im 5'-Bereich des Gens stattgefunden haben.

Ethidiumbromid-Färbung

Ergebnis: Die Insertionsmutante findet sich in *Superpool1*. Aufgrund der Größe der PCR-Produkte, sollte die Insertion der T-DNA im 5'-Bereich des Gens stattgefunden haben.

□ Gen von Interesse ■ T-DNA

C) Mittels PCR wird untersucht, welche Subpopulation des positiven *Superpools* die Insertionsmutante enthält.

Ergebnis: Die Insertionsmutante befindet sich in Subpopulation 1.

Subpopulation...

D) 343 Samen des positiven 100er-Pools werden auf 7 Schalen zu je 49 Individuen in 7 Reihen und 7 Spalten ausgelegt und zu Keimlingen angezogen. Je ein Blatt einer Pflanze wird abgeschnitten. Die Blätter einer Schale werden vereinigt und DNA extrahiert. Ergibt die DNA einer Schale die bekannten PCR-Produkte, erfolgen DNA-Präparationen der 7 Spalten und 7 Reihen dieser Schale (hier Schale I). Ergibt die DNA von jeweils einer Spalte und einer Reihe (hier Spalte C und Reihe 4) ein PCR-Produkt, steht die Insertionsmutante auf dem Schnittpunkt von Spalte und Reihe. Unter Verwendung von genomischer DNA von Einzelpflanzen, kann überprüft werden, ob es sich um eine hetero- oder homozygote Pflanze bezüglich der T-DNA-Insertion handelt.

Schale I Spalte C Reihe 4

Das Ergebnis:
Aus einer Population von 2000 Individuen ist durch 41 DNA-Präparationen und ca. 60 PCRs eine Einzelpflanze identifiziert worden, die eine T-DNA-Insertion im Gen von Interesse aufweist.

Einzelpflanzen	Schale I		
	Spalte 1	Spalte C	Reihe 4
Wildtyp	+	-	-
heterozygot	+	+	-
homozygot	+	+	+

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zum Durchmustern von T-DNA-Insertionslinien, bei einer angenommenen Populationsgröße von 2000 Individuen.

3.11.6 Quantitative *Real-Time-PCR*

Mittels quantitativer *Real-Time-PCR* wurden die Transkriptmengen von verschiedenen *HSF*- und *HSP-Genen* in Relation zu *Aktin2* in Blättern von WT- und *hsf1/hsf3-knockout*-Pflanzen bestimmt.

Das Prinzip der quantitativen *Real-Time-PCR* beruht darauf, dass der Zeitpunkt, an dem die während der PCR amplifizierte DNA-Menge einen bestimmten Schwellenwert erreicht, abhängig ist von der *template*-Menge zu Beginn der PCR. „*Real-Time*“ bedeutet, dass durch ein Detektionssystem im PCR-Gerät während der gesamten PCR-Reaktion regelmäßig die DNA-Menge bestimmt wird. Im vorliegenden Fall wurde *Sybr Green* zur fluorimetrischen DNA-Konzentrationsbestimmung während der PCR verwendet, welches selektiv in doppelsträngige DNA interkaliert. Als *template* wird komplexe cDNA aus dem zu untersuchenden Gewebe eingesetzt. Zunächst wird der Zeitpunkt d.h. die Anzahl der PCR-Zyklen bestimmt, die nötig sind, damit die DNA-Menge eines Standards (hier *Aktin2*) einen Schwellenwert erreicht. Dieser Schwellenwert liegt knapp über der Nachweisgrenze des Detektionssystems und somit innerhalb der PCR-Phase, in der es zur exponentiellen Produktamplifikation kommt. Die ermittelten Messwerte für andere Gene der gleichen cDNA können dann zu dem Standard in Relation gesetzt werden. Erreicht die Menge des *Aktin2*-PCR-Produkts beispielsweise den Schwellenwert bei Zyklus 10, die eines PCR-Produkts von Gen X bei Zyklus 11, so war im *template* doppelt-soviel *Aktin2*- wie Gen X-cDNA vorhanden, da während eines Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird. Vorausgesetzt, die relative Transkriptmenge des internen Standard bleibt in den entsprechenden unterschiedlichen Geweben unverändert, können die einzelnen relativen Transkriptmengen des Gen X direkt miteinander verglichen werden. Enthält z.B. komplexe cDNA aus nicht-hitzegechockten Blättern halb soviel Gen X- wie *Aktin2*-cDNA, komplexe cDNA aus hitzegechockten Blättern aber doppelt soviel, dann ist Gen X nach HS 4-fach stärker exprimiert als vor HS.

Experimentelle Vorgehensweise:

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus je 100 mg homogenisierten Blattmaterials mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Ausbeute betrug dabei i.d.R. 20-30 µg RNA. Hieraus wurde poly(A)⁺-RNA unter Verwendung von OligotexTM (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die poly(A)⁺-RNA-Konzentration im Eluat wurde mit *Ribo-Green*TM (MoBiTec) nach Herstellerangaben fluorimetrisch bestimmt und betrug zwischen 5-20 ng/µl. Je 9 µl der poly(A)⁺-RNA (≅ 45-180 ng) wurden für die cDNA-Synthese mit dem ThermoScript RT-PCR SystemTM (Invitrogen) eingesetzt. Das Gesamtvolumen der RT-

Reaktion betrug 20 μl . Zu Testzwecken erfolgte im Anschluss eine fluorimetrische cDNA-Konzentrationsbestimmung mit *Pico-Green*[™] (MoBiTec). Dabei ergaben sich cDNA-Konzentrationen von zirka 10-20 ng/ μl . Als *template* in der *Real-Time-PCR* dienten 1:8, 1:16 und 1:512-Verdünnungen der cDNAs in 5 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 5 $\mu\text{g/ml}$ poly(dIdC). Eine *Real-Time-PCR*-Reaktion setzte sich bei einem Endvolumen von 50 μl wie folgt zusammen:

5,0 μl	10 x PCR-Puffer ohne MgCl ₂ (Invitrogen)
5,0 μl	0,4 x SYBR [™] Green1 (Molecular Probes)
4,0 μl	50 mM MgCl ₂ (Invitrogen)
2,0 μl	40 mM dNTP-Mix (Peqlab)
0,5 μl	Primer1 [50 μM]
0,5 μl	Primer2 [50 μM]
0,2 μl	Platinum Taq DNA Polymerase [5u/ μl] (Invitrogen)
30,8 μl	H ₂ O (Merck)
2,0 μl	der jeweiligen cDNA-Verdünnung

Die PCR erfolgte in Mikrotiterplatten (Thermo-Fast 96 PCR Plates, Standard, Peqlab) im *iCycler iQ*[™] *Multi-Color Real-Time-PCR Detection System* (Bio-Rad) nach Eichung des Gerätes mit einer *well factor plate* nach Herstellerangaben (Bio-Rad). Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

10 min	95°C
20 s	95°C
40 s	<i>Annealing</i> -Temperatur
15 s	72°C
	40 mal zurück zum 2. Schritt
unendlich	4°C

PCR-Primer waren mit Hilfe der *Primer3-Software* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) so entworfen worden, dass sie zur Amplifikation von 100-150 Bp-Fragmenten aus dem 3'-distalen Bereich der entsprechenden cDNAs führten (Primersequenzen: Kap. 3.5.1). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurvenbestimmung im *iCycler* nach Herstellerangaben (Bio-Rad) und durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

Datenermittlung:

Mit jedem Primerpaar wurden jeweils Duplikate mit drei verschiedenen *template*-Verdünnungen angesetzt (s.o.). Pro Gen und komplexer cDNA ergeben sich somit 6 PCR-Reaktionen. Aus den Ergebnissen von mindestens 4 dieser Reaktionen wurde mit der *iCycler-Software* (Bio-Rad) ein Mittelwert gebildet, wobei ein *slope* von 3,1 bis 3,5 und ein Korrelationskoeffizient $\geq 0,98$ zugelassen wurde.

Um Schwankungen einschätzen zu können, wurde die relative Transkriptmenge eines Gens auf diese Weise zweimal unabhängig voneinander bestimmt und zwar ausgehend von 2 unabhängigen RNA-Präparationen.

3.12 Biochemische Methoden

3.12.1 Isolierung von Gesamtprotein aus *Arabidopsis*

3.12.1.1 Denaturierende Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Gewinnung von Gesamtprotein-Extrakten wurde *Arabidopsis*-Gewebe in 2 VT Harnstoff-Extraktionspuffer homogenisiert und 10 min in einer Tischzentrifuge bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode (Kap. 3.12.4).

Harnstoff-Extraktionspuffer:	8 M	Harnstoff
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	20 mM	β-Mercaptoethanol

3.12.1.2 Herstellung nativer Gesamtproteinextrakte

Für EMSA Analysen (Kap. 3.12.5) wurde *Arabidopsis*-Gewebe bei 4°C in 4 VT 0,5 x TBE/10 mM β-Mercaptoethanol/Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete, EDTA-frei, Roche) durch Mörsern homogenisiert und 10 min in einer Tischzentrifuge bei 10.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß aufgenommen und bis zur möglichst umgehenden Verwendung bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Bradford-Methode (Kap. 3.12.4).

Für die Immunpräzipitation zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität einzelner HSF (Kap. 3.12.6) wurde auf gleiche Weise natives Gesamtprotein aus *Arabidopsis*-Gewebe gewonnen. Allerdings wurde hier 1 x TBE/0,2% Triton X100/Protease-Inhibitor-Cocktail als Extraktionspuffer verwendet.

3.12.2 Expression und Isolierung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

3.12.2.1 Expression rekombinanter Proteine

Zur Expression von HSF1, HSF2, HSF3, HSF4, HSF6 und HSF7 sowie deren C-terminale Bereiche (ΔHSF) in *E. coli* waren die entsprechenden cDNAs oder Teile davon in die pQE-Expressionsvektoren der Firma Qiagen kloniert und in den *E. coli*-Stamm TG1 trans-

formiert worden (Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Die Expression der rekombinanten Proteine steht dabei unter der Kontrolle des Promotors des Bakteriophagen T5 und zweier lac-Operator-Sequenzen. Der lac-Repressor ist in TG1 chromosomal codiert, so dass die Expression der rekombinanten Proteine erst nach einer Induktion mit IPTG erfolgt. Die resultierenden, rekombinanten Proteine enthalten einen N-terminalen 6xHis-Tag, wodurch ihre Reinigung über Ni-Affinitätschromatographie und ihr immunologischer Nachweis mit anti-His-Tag-Antikörpern möglich ist.

500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 1/50 VT der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Nach der Induktion durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM wurden die Kulturen für 4 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation für 20 min bei 4000 g und 4°C geerntet. Das Zellpellet konnte in diesem Stadium bei -70°C aufbewahrt werden oder aber in 20 ml 0,5 x TBE resuspendiert werden und als 2 ml Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt werden. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen konnten die aliquotierten Zellpellets ebenfalls bei -70°C gelagert werden.

3.12.2.2 Herstellung nativer Gesamtproteinextrakte

Zur Herstellung von nativen Gesamtproteinextrakten für den EMSA oder die Immunpräzipitation wurde ein aliquotiertes Bakterienpellet (Kap. 3.12.2.1) in 1 ml 0,5 x TBE/10 mM β-Mercaptoethanol bzw. 1 x TBE/0,2% Triton X100 resuspendiert (bei 4°C). Die Lyse der Zellen erfolgte durch dreimalige Ultraschallbehandlung (50 W) zu je 10 s. Eine Erwärmung der Proben wurde dabei durch zwischenzeitliche Inkubationen auf Eis vermieden. Es folgte eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 12.000 Upm und 4°C für 20 min. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und bei 4°C gelagert.

3.12.2.3 IMAC zur Reinigung rekombinanter Proteine

(nach Herstellerangaben Qiagen)

Zur Darstellung möglichst reiner ΔHSF-Polypeptide für die immunologische Herstellung HSF-spezifischer Antikörper wurden die HSF-Polypeptide mit einem 6xHis-Tag über IMAC (*Immobilized Metall Affinity Chromatography*) mittels Ni²⁺-NTA-Agarose aus *E. coli*-Gesamtprotein gereinigt. Die Reinigung erfolgte zunächst unter denaturierenden Bedingungen. Im Anschluß wurden die an Ni-NTA-Agarosematrix gebundenen Proteine durch FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) unter Verwendung eines 6 M bis 0 M Harnstoff-

gradienten renaturiert. Die Elution erfolgte unter nativen Bedingungen durch Imidazol, welches mit den Imidazolgruppen des 6xHis-Tag der rekombinanten Proteine um die Bindung an die Ni-Ionen des Säulenmaterials kompetiert. Auf diese Weise lagen die gereinigten Proteine in einem Puffer vor, der Kaninchen injiziert werden konnte.

Für die denaturierende Reinigung der rekombinanten Proteine wurden das Zellpellet (zirka 4 g) einer induzierten 1,5 l-Kultur in Puffer A resuspendiert und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Das Volumen von Puffer A betrug dabei 5 ml pro g Nassgewicht des Pellets. Anschließend wurde das Lysat durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 g von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Dem Lysat wurden 16 ml einer 50% Ni-NTA Superflow-Agarose (von Qiagen, äquilibriert mit Puffer A) zugegeben und der Ansatz 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert, bevor er vorsichtig auf eine Säule geladen wurde. Es erfolgten drei Waschriffe mit 10 Säulenvolumen Puffer A, 10 Säulenvolumen Puffer B und schließlich solange mit Puffer C, bis die A_{280} des Durchflusses weniger als 0,01 betrug. Die Säulen wurden anschließend in der *Pump P500* von Pharmacia LKB einer FPLC unterzogen. Dabei wurde durch entsprechendes Mischen der Renaturierungspuffer 1 und 2 ein linearer Gradient von 6 M Harnstoff bis 0 M Harnstoff erzielt. Insgesamt wurde mit dem 45-fachen Säulenvolumen (\cong 360 ml) bei 4°C renaturiert. Die Flußrate betrug dabei 1 ml pro min. Anschließend wurde mit 5 Säulenvolumen 40 mM Imidazol in Renaturierungspuffer 2 gewaschen, bevor die gereinigten rekombinanten Proteine mit 5 Säulenvolumen 200 mM Imidazol in Renaturierungspuffer 2 eluiert wurden. Der Durchfluß wurde in 1 ml-Fractionen aufgefangen. Ein Teil der einzelnen Fractionen wurde mittels Bradford-Methode (Kap. 3.12.4) und SDS-PAGE (Kap. 3.12.7.2) auf Konzentration und Reinheit der rekombinanten Proteine hin untersucht. Fractionen hoher Proteinkonzentration und -reinheit wurden vereinigt. Auf diese Weise konnten zirka 1,5 mg zur Homogenität gereinigtes Protein isoliert werden.

Puffer A:	6,0 M	Guanidiniumhydrochlorid
	0,1 M	NaPO ₄
	0,01 M	Tris-HCl, pH 8,0
Puffer B:	8,0 M	Harnstoff
	0,1 M	NaPO ₄
	0,01 M	Tris-HCl, pH 8,0
Puffer C:		wie Puffer B, aber pH 6,3

Renaturierungspuffer 1:	500 mM	NaCl
	20% (v/v)	Glycerin
	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,4
	6,0 M	Harnstoff
Renaturierungspuffer 2:		wie Renaturierungspuffer 1, aber ohne Harnstoff

3.12.3 Fällung und Umpuffern von Proteinen

Proteine wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) zu einer Endkonzentration von 15% oder durch Zugabe von Ethanol zu einer Endkonzentration von 70% gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 2 min bei 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet TCA-gefällter Proteine wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, bevor es an der Luft getrocknet und in SDS-PAGE-Probenpuffer (Kap. 3.12.7.2) aufgenommen wurde. Das Umpuffern von nativen Proteinen erfolgte durch eine Dialyse gegen den gewünschten Puffer über Nacht bei 4°C. Dazu wurden die umzupuffernden Proteine in einen sauberen Dialyseschlauch überführt und dieser verschlossen in ein 1 l Becherglas gegeben, in dem sich mindestens 0,5 l des gewünschten Puffers befand. Ein Rührfisch sorgte für die nötige Umwälzung des Puffers. Nach Dialyse über Nacht wurde der Puffer im Becherglas erneuert und für weitere 2 h dialysiert.

3.12.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurden Probenvolumina von 20 µl und 1 ml Bradford-Reagenz eingesetzt. Als Standard diente BSA (1-10 µg).

Bradford-Reagenz:	100 mg	Serva Blue G
	in 50 ml	Ethanol lösen
	100 ml	85% H ₃ PO ₄

Mit H₂O auf 1 l auffüllen, gut mischen, durch 3 MM-Faltenfilter filtrieren und 2 Tage „ruhen“ lassen.

3.12.5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die spezifische Interaktion zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen kann mit Hilfe des EMSA untersucht werden. Durch die Bindung eines Proteins an eine radioaktiv-markierte DNA-Sonde wandert diese langsamer während einer nativen Gelelektrophorese als die ungebundene DNA. Es kommt zum *Band Shift*. Um die Identität des DNA-bindenden Proteins zu

bestätigen, können dem Bindungsansatz außerdem Antikörper zugegeben werden, die gegen das entsprechende Protein gerichtet sind. Durch die Bindung der Antikörper an den Protein-DNA-Komplex wird dessen Mobilität während der Gelelektrophorese zusätzlich verringert. Es ergibt sich ein *Supershift*. Sowohl *Band Shift* als auch *Supershift* können mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Für EMSA-Studien wurden die entsprechenden DNA-Sonden mit dem Klenow-Enzym radioaktiv markiert (Kap. 3.11.3.9). Je 5-15 µg natives Gesamtprotein aus *E. coli* (Kap. 3.12.2.2) oder 30 µg natives Gesamtprotein aus *Arabidopsis* (Kap. 3.12.1.2) in 0,5 x TBE/10 mM β-Mercaptoethanol wurden mit 1 µg poly(dI-dC) als unspezifischem Kompetitor und 1 ng radioaktiv-markierter DNA für 20 min bei RT inkubiert. Zur spezifischen Kompetition war manchen Ansätzen außerdem ein 100-facher Überschuß (100 ng) unmarkierter Sonde zugesetzt worden. Nach Zugabe von 1/5 VT Ladepuffer (Kap. 3.11.2.1) wurden die Ansätze elektrophoretisch bei 4°C in 0,5 x TBE aufgetrennt. Dabei wurden 5% Polyacrylamidgele mit 3% (v/v) Glycerol verwendet, wenn die 23 Bp langen HSE- oder HSEm-Oligonukleotide (Kap. 3.5.3) eingesetzt wurden. Für EMSA-Studien an dem zirka 300 Bp langem *HSF7*-Promotorfragment (Kap. 3.4.5) wurden 1% Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen erfolgte bei 4°C für 9 h bei 90 V, die Elektrophorese in Agarosegelen erfolgte bei RT für 3 h bei 60 V. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele in einem Gelrockner auf DE81-Chromatographiepapier getrocknet und zur Exposition eines Röntgenfilms in Expositionskassetten mit Verstärkerfolie überführt. Die Exposition erfolgte bei -80°C.

Für *Supershift*-Experimente wurde den Bindungsreaktionen jeweils zirka 200 ng monospezifische Antikörper (Kap. 3.12.9) zugesetzt und bis zur Zugabe und Inkubation mit der radioaktiven DNA-Sonde für 1 h bei 4°C vorinkubiert.

3.12.6 Immunpräzipitation zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von HSF

Um die DNA-Bindungsaktivität einzelner HSF in *Arabidopsis* während der Hitzeschockreaktion zu bestimmen, wurde ein Assay entwickelt, bei dem die HSF zunächst mittels Immunpräzipitation aus Gesamtproteinextrakten entsprechender *Arabidopsis*-Gewebe selektiv angereichert wurden. Dabei wurden Antiseren verwendet, die gegen die divergenten C-terminalen Bereiche einzelner HSF gerichtet sind (Kap. 7.4). Diese Antiseren sollten daher HSF-spezifisch sein und nicht mit der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne interferieren. Dem nativen Immunpräzipitat wurden anschließend radioaktiv-markierte Hitzeschockelemen-

te (HSE) zugesetzt. Nach Entfernen überschüssiger HSE wurde die Menge spezifisch gebundener HSE mittels LSC (*Liquid Scintillation Counting*) bestimmt. Die Idee dabei war, dass je nach Menge und Aktivität einzelner HSF in einem Gewebe und somit in dem entsprechenden Immunpräzipitat unterschiedliche Mengen an HSE gebunden werden. Zur Etablierung wurde die Methode zunächst an Extrakten HSF-exprimierender *E. coli* und an Extrakten *HSF3*-überexprimierender, transgener *Arabidopsis*-Pflanzen getestet. Eine graphische Übersicht der Methode ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die gesamte Pozedur erfolgte - sofern nicht anders angegeben - bei 4°C.

a) *E. coli*-Gesamtproteinextrakte: 20 µl 50% (v/v) Protein A-Sepharose 4B *Fast Flow* (Sigma) wurden äquilibriert mit 1% (w/v) BSA in Immunpräzipitationspuffer. Nach Zugabe von 5 µl Antiserum und Auffüllen des Ansatzes auf 200 µl mit Immunpräzipitationspuffer wurde 1 h bei RT schüttelnd inkubiert, um eine Präadsorbition der Antikörper an die Protein A-Sepharose zu erzielen. Die Sepharose-Kügelchen wurden anschließend durch Zentrifugation (1 min in Tischzentrifuge bei 2000 Upm) pelletiert und ungebundene Serumbestandteile durch zweimaliges Waschen des Sepharosepellets mit 1 ml Immunpräzipitationspuffer entfernt. Nach Zugabe von nativem *E. coli*-Gesamtproteinextrakt (Kap. 3.12.2.2), der 100 µg Protein enthielt, wurde der Ansatz auf 500 µl mit Immunpräzipitationspuffer aufgefüllt und 4 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose pelletiert und dreimal mit 1 ml Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Nachdem überschüssiger Puffer bis auf zirka 30 µl abgenommen worden war, wurde dem Pellet 2 µg poly(dI-dC) und 2 ng radioaktiv-markierter HSE bzw. HSEm (Sequenz: Kap. 3.5.3, Herstellung und radioaktive Markierung: Kap. 3.11.2.4 und 3.11.3.9) zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Waschen des Pellets, wie oben beschrieben, wurde anschließend die ungebundene DNA entfernt. Das Immunpräzipitat samt spezifisch gebundener, radioaktiv-markierter DNA wurde in 1 ml Immunpräzipitationspuffer resuspendiert, in ein Szintillationsgefäß überführt und in 15 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold) über LSC im Flüssig-Szintillationsmessgerät Wallac 1219 vermessen. Durch Division des erhaltenen Wertes mit der pro Reaktion eingesetzten Aktivität, die 2 ng DNA entspricht, wurde die Menge der gebundenen DNA ermittelt und in fmol umgerechnet (2 ng HSE oder HSEm entsprechen 141,75 fmol). Dieser Wert wurde in Relation mit der für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtproteinmenge gestellt und normalisiert auf fmol pro 1 g Protein.

Auf gleiche Weise wurden Kontrollwerte ermittelt, indem Präimmenserum statt Antiserum bei der Immunpräzipitation oder mutierte HSE (HSEm) statt HSE für die DNA-Bindungsreaktion verwendet wurden. Als weitere Kontrollen wurden Immunpräzipitationen

in der Gegenwart von 1 mg Gesamtprotein aus Δ HSF-exprimierenden (spezifische Antikörper-Kompetition) oder aus DHFR-exprimierenden *E. coli*-Zellen (unspezifische Kompetition) durchgeführt.

b) *Arabidopsis*-Gesamtproteinextrakte: Die Präadsorption der Antikörper an 20 μ l 50% (v/v) Protein A-Sepharose erfolgte wie oben beschrieben, allerdings wurden je 20 μ l Antiserum bzw. Präimmenserum eingesetzt. Native Gesamtproteinextrakte (Kap. 3.12.1.2), die i.d.R. 3 mg Protein enthielten, wurden pro Immunpräzipitation verwendet, die ansonsten wie oben beschrieben ablief. DNA-Bindung und Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität in fmol pro 1 g Gesamtprotein erfolgten ebenfalls wie unter a) beschrieben.

Immunpräzipitationspuffer:	1 x	TBE
	150 mM	NaCl
	0,2% (v/v)	Triton X100

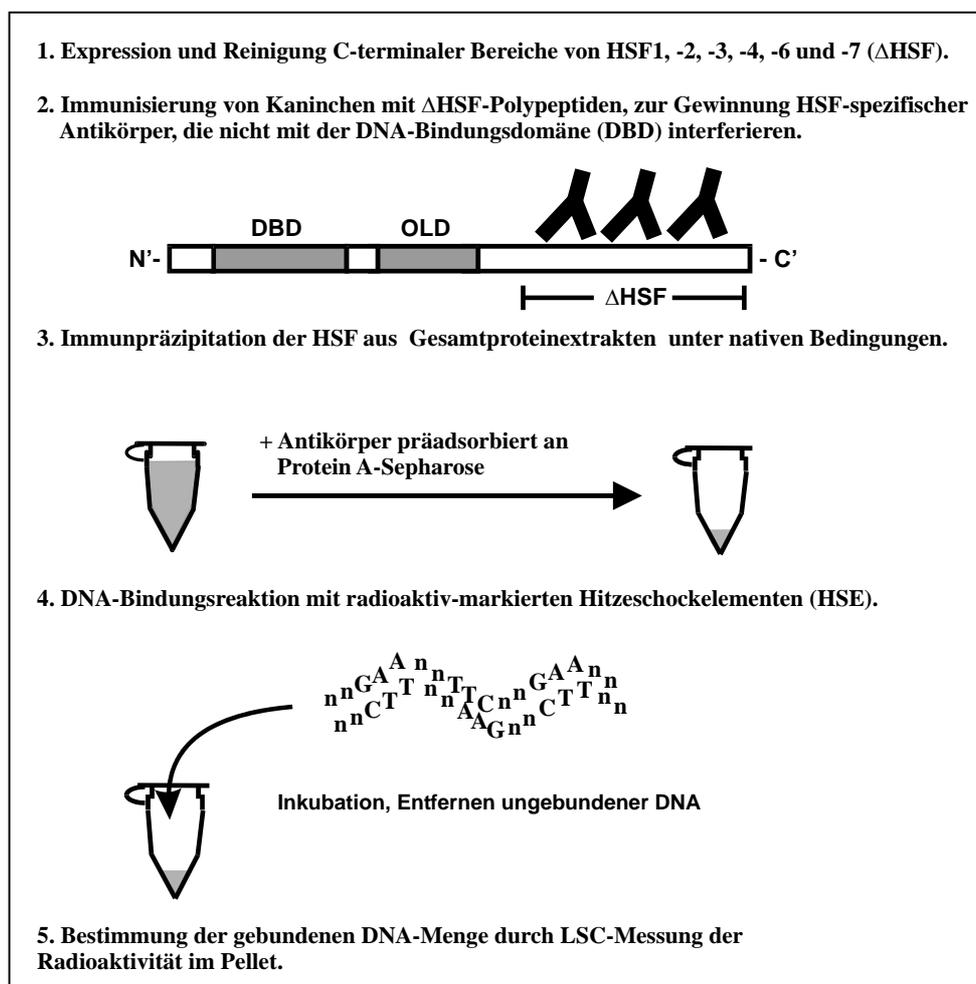


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität individueller HSF in nativen Gesamtproteinextrakten.

3.12.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

3.12.7.1 Native PAGE von Proteinen

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen fand in erster Linie beim EMSA Anwendung (Kap. 3.12.5). Maximal 40 µg Gesamtprotein in 0,5 x TBE/10 mM β-Mercaptoethanol wurden mit 1/5 VT Ladepuffer (Kap. 3.11.2.1) versetzt und auf ein 5% (w/v) Polyacrylamidgel mit 3% (v/v) Glycerin aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5 x TBE für 10 h bei 80 V und 4°C. Zur Bestimmung der Molekularmasse nativer Proteine wurde das High Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit von Pharmacia (Kap. 3.6.4) verwendet. Die Markerspür wurde nach der Elektrophorese abgeschnitten und, während das restliche Gel für die Autoradiographie getrocknet wurde, in Coomassie-Färbelösung inkubiert, um die Markerbanden sichtbar zu machen (Kap. 3.12.7.3). 50 ml Gellösung setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 ml	5 x TBE
8,3 ml	AA/Bis [30%, c = 0,8%]
1,85 ml	Glycerin [80%]
ad 50 ml mit	H ₂ O
30 µl	TEMED
200 µl	APS [10%]

3.12.7.2 SDS-PAGE von Proteinen

(Laemmli, 1970)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet. Durch SDS denaturierte und proportional zu ihrer Länge mit negativen Ladungen versehene Proteine wandern je nach Molekularmasse unterschiedlich schnell durch die Poren der Polyacrylamid-Gelmatrix. Abhängig von dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurden Gele verschiedener Prozentigkeit nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt.

Die Gellösung für ein 10% SDS-Gel ist unten beispielhaft angegeben. Die Gele besaßen die Maße 9 x 10 cm und eine Dicke von 1 mm. Dabei wurde zunächst die Trenngellösung bis zirka 2 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol entfernt worden war, wurde der Rest des Gels mit einem 5% Sammelgel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 1 VT SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Als Molekularmassenstandard dienten Mark12™ oder SeeBlue™ Plus2 von Invitrogen/Novex. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA in SDS-PAGE-Puffer, bis die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte.

	10% Trenngel	5% Sammelgel
30% AA/Bis, c = 0,8%	10,5 ml	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	3,7 ml
20% (w/v) SDS	150 µl	75 µl
H ₂ O	12,5 ml	8,5 ml
TEMED	20 µl	10 µl
10% APS	140 µl	200 µl
SDS-PAGE-Puffer:	1,5% (w/v) 0,6% (w/v) 0,15% (w/v)	Glycin Tris SDS
2 x SDS-Probenpuffer:	0,1 M 4% (w/v) 20% (v/v) 10% (v/v) 0,02% (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau

3.12.7.3 Coomassie-Färbung von Proteinen nach PAGE

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden Proteine in Polyacrylamidgelen durch eine Coomassieblau-Färbung fixiert und sichtbar gemacht. Dabei wurden die Gele zunächst für 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit Coomassie-Entfärbelösung unter mehrmaligen Erneuern der Lösung entfärbt. Nach einer 20-minütigen Rehydratisierung in H₂O konnten die Gele auf einem Rahmen zwischen Cellophan eingespannt, bei RT getrocknet werden.

Coomassie-Färbelösung:	0,07 % (w/v) 40% (v/v) 10% (v/v)	Servablau R-250 Ethanol Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung:		Coomassie-Färbelösung ohne Servablau

3.12.8 Immunoblotting von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Technik des *Immunoblottings* nach Gershoni und Palade (1983) angewendet. Dabei werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Gel auf eine dünne Matrix (meist Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen) transferiert, was als „*Western-Blot*“ bezeichnet wird. Die schnellste und effizienteste Methode

des Protein-Transfers stellt der Elektrottransfer dar. Anschließend können die gebundenen, immobilisierten Proteine über allgemeine Proteinnachweismethoden (Ponceau-Rot-, Amido-Schwarz-Färbung) oder durch spezifische Antikörperreaktionen visualisiert werden.

3.12.8.1 Western-Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine zur weiteren Untersuchung elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert. Dazu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese luftblasenfrei auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt, die vorher in *Blotting*-Puffer eingeweicht worden war. Beide Seiten dieser Einheit wurden anschließend mit zwei ebenfalls in *Blotting*-Puffer eingeweichten 3MM-Papieren abgedeckt und *sandwich*-artig zwischen zwei poröse Trägerschichten in die Gerätehalterung eingeklemmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Nitrocellulose auf der Anodenseite der *Blotting*-Kammer befand. Nach Füllen der *Blotting*-Kammer mit *Blotting*-Puffer wurde über Nacht eine Spannung von 20 V angelegt. Der Erfolg des Proteintransfers konnte anhand eines bei der vorangegangenen Gelelektrophorese verwendeten, vorgefärbten Molekularmassenstandards (SeeBlue™ Plus2) oder durch Ponceau-Färbung der Membran festgestellt werden. Dazu wurde die Membran für 5 min in Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war. Erfolgte die Antikörperfärbung nicht direkt im Anschluß, konnte die *Western-Blot*-Membran auf der Laborbank getrocknet und bei RT bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

<i>Blotting</i> -Puffer: (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	192 mM 25 mM 20% (w/v)	Glycin Tris-HCl, pH 7,4 Methanol
Ponceau-Färbelösung:	0,2% (w/v) 10% (v/v)	Ponceau S (Roth) Essigsäure

3.12.8.2 Immundetektion

(nach Herstellerangaben Amersham)

Zur Immundetektion der transferierten Proteine wurde das ECL-System der Firma Amersham/Pharmacia verwendet. Das Prinzip der ECL-Detektion (ECL = *enhanced chemiluminescence*) beruht darauf, dass die am sekundären Antikörper gebundene Merrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol oxidiert, welches dabei in einen angeregten Zustand übergeht und Chemilumineszenzlicht emittiert. Da die Reaktion in diesem Fall durch die Gegenwart von Phenolen

verstärkt wird, spricht der Hersteller von „verstärkter Chemilumineszenz“. Die maximale Lichtemission liegt bei einer Wellenlänge von 428 nm, wodurch die Detektion über Schwärzung eines Röntgenfilms erfolgen kann. Für die gesamte Prozedur wurde mit Handschuhen gearbeitet, sämtliche Inkubationen und Waschschrte wurden unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt.

Die ponceaufärbte *Western-Blot*-Membran wurde nach Abschneiden der Spur mit dem Molmassenstandard zweimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen und für 1 h in *Blocking*-Puffer inkubiert. Danach wurde sie für 10 min in TBST-Puffer gewaschen bevor die 1-stündige Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte. Hierfür wurden die einzelnen Antikörper bzw. Antiseren entsprechend der Angaben unter 3.6.1 in 0,5 x *Blocking*-Puffer verdünnt. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern. Auch sie wurden hierfür nach den Angaben unter 3.6.1 in 0,5 x *Blocking*-Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran viermal für jeweils 10 min in TBST-Puffer gewaschen und auf Frischhaltefolie in eine Filmkassette überführt. Hier wurden zirka 15 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ eines 1:1-Gemisches aus Detektionslösung 1 und 2 gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach Entfernen überschüssiger Detektionslösung wurde die benetzte Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt, 1 min bei RT inkubiert und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Kodak-X-omat R) aufgelegt. Die Exposition erfolgte zunächst für 1 min. Nach Entwickeln des Films konnte dann die geeignete Expositionsdauer gewählt werden.

5 x TBST-Puffer:	685 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	0,5%(v/v)	Tween 20
<i>Blocking</i> -Puffer:	5% (w/v)	Magermilchpulver in TBST-Puffer

3.12.9 Affinitätsreinigung von Antiseren

(verändert nach Olmstedt, 1981; Smith & Fischer, 1984)

Zur Gewinnung monospezifischer Antikörper aus polyklonalen Antiseren wurden diese über Affinitätsreinigung mittels eines modifizierten *Western Blot*-Verfahrens aufgereinigt. Dazu wurden 100 μg des gereinigten Antigens in einem präparativen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kap. 3.12.8.1). Nach Ponceaurot-Färbung (3.12.8.1) wurde die dem Antigen entsprechenden Bande ausge-

schnitten und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 1 h in *Blocking*-Puffer (Kap. 3.12.8.2) rotierend inkubiert. Im Anschluß wurde das Membranstück auf gleiche Weise für 1 h in 200 µl Antiserum/1,8 ml TBST inkubiert und zweimal für 10 min mit je 2 ml TBST (Kap. 3.12.8.2) gewaschen. Die an das immobilisierte Antigen gebundenen monospezifischen Antikörper wurden durch eine 10 minütige Inkubation des Membranstückes in 100 µl einer 100 mM Glycin-Lösung (pH 2,5) eluiert. Das Eluat wurde abgenommen und durch sofortige Zugabe von 1/10 VT 1 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Mittels der Bradford-Methode (Kap. 3.12.4) wurde die Antikörperkonzentration im Eluat bestimmt.

3.12.10 GUS-Aktivitätsbestimmung

(Jefferson, 1987)

Bei dieser Bestimmung der β -Glucuronidase(GUS)-Aktivität wird Methylumbelliferylglucuronid (MUG) als Substrat eingesetzt, welches in die Produkte Methylumbelliferon (MU) und Glucuronsäure gespalten wird. Unter alkalischen Bedingungen und bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm emittiert MU Fluoreszenzstrahlung der Wellenlänge 455 nm, deren Intensität in einem Fluorometer bestimmt werden kann.

10-20 mg Blattmaterial wurden in 100 µl GUS-Extraktionspuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemörsert und für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 2 µl davon wurden zur Proteinkonzentrationsbestimmung herangezogen (Kap. 3.12.4). 20 µl des Überstandes wurden zu 180 µl eines auf 37°C vorgewärmten GUS-Reaktionspuffers gegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Dann wurden 100 µl (enthalten 10 µl des ursprünglichen Proteinextraktes!) entnommen, in 900 µl GUS-Stopplösung gegeben und die Produktmenge [pmol] im Messansatz fluorimetrisch in einer Quarzglasküvette mit einem Hitachi Spectrofluorometer F-2000 (Einstrahlung bei 365 nm, Messung bei 455 nm) ermittelt. Die restlichen 100 µl des Reaktionsansatzes verblieben bei 37°C und konnten zu einem späteren Zeitpunkt vermessen werden, falls der 1 h-Wert zu niedrig war. Als Nullwert dienen 100 µl eines Reaktionsansatzes der 0 min bei 37°C inkubiert wurde, in 900 µl GUS-Stopplösung. Die MU-Konzentration wurde über eine Eichgerade definierter MU-Konzentrationen ermittelt. Folgende Formel wurde zur Ermittlung der GUS-Aktivität (A) verwendet:

$$A [\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}] = \frac{M_{\text{mu}} [\text{nmol}]}{T [\text{min}] * M_{\text{prot}} [\text{mg}]}$$

Dabei ist M_{mu} die vom Gerät angegebene Produktmenge, T die Reaktionsdauer (hier 60 min) und M_{prot} die eingesetzte Proteinmenge im Messansatz (hier die Proteinmenge in 10 μ l Proteinextrakt).

GUS-Extraktionspuffer:	50 mM	Natriumphosphat, pH 7,0
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	10 mM	β -Mercaptoethanol
	0,1% (v/v)	Triton X100
	0,1% (v/v)	Na-Lauroylsarkosinat
GUS-Reaktionspuffer:	2 mM	MUG in GUS-Extraktionspuffer
GUS-Stopplösung:	200 mM	Na_2CO_3

3.12.11 Histochemische GUS-Analyse

(verändert nach Jefferson *et al.*, 1986)

Arabidopsis-Gewebe wurde zur Entfärbung und Fixierung in 90% (v/v) Aceton für 1 h bei $-20^\circ C$ inkubiert, zweimal mit 100 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) gewaschen und für 16 h in GUS-Färbelösung bei $37^\circ C$ im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 70% (v/v) Ethanol bei mehrmaligem Erneuern der Lösung, bis das restliche Blattgrün vollständig ausgebleicht war. In diesem Stadium konnte das Gewebe für mehrere Monate in 70% Ethanol bei $4^\circ C$ aufbewahrt werden.

GUS-Färbelösung:	0,5 mM	K-Ferricyanid
	0,5 mM	K-Ferrocyanid
	100 mM	Na-Phosphat, pH 7,4
	0,5 mg/ml	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure (Duchefa)

4 ERGEBNISSE

Von den 21 HSF-Homologen, die im Genom von *Arabidopsis thaliana* aufgrund hoher HSF-typischer AS-Sequenzhomologien innerhalb der DNA-Bindungsdomäne und der Oligomerisierungsdomäne identifiziert wurden (Nover *et al.*, 2001; Kap. 7.3 & 7.5), sollten im Rahmen dieser Arbeit drei Klasse-A-HSF (HSF1, HSF2, HSF3) und drei Klasse-B-HSF (HSF4, HSF6, HSF7) funktionell charakterisiert werden. cDNAs dieser *HSF* waren bereits isoliert worden (zur Übersicht: Schöffl & Prändl, 1999), bisherige Studien zur Funktion der Genprodukte beschränken sich auf HSF1, HSF3 und HSF4 (Hübel & Schöffl, 1994; Hübel *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Prändl *et al.*, 1998). Wesentliche strukturelle Unterschiede, die zur Einteilung in die HSF-Klassen A oder B führen, ergeben sich durch AS-Alignment (Kap. 7.4) und sind in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

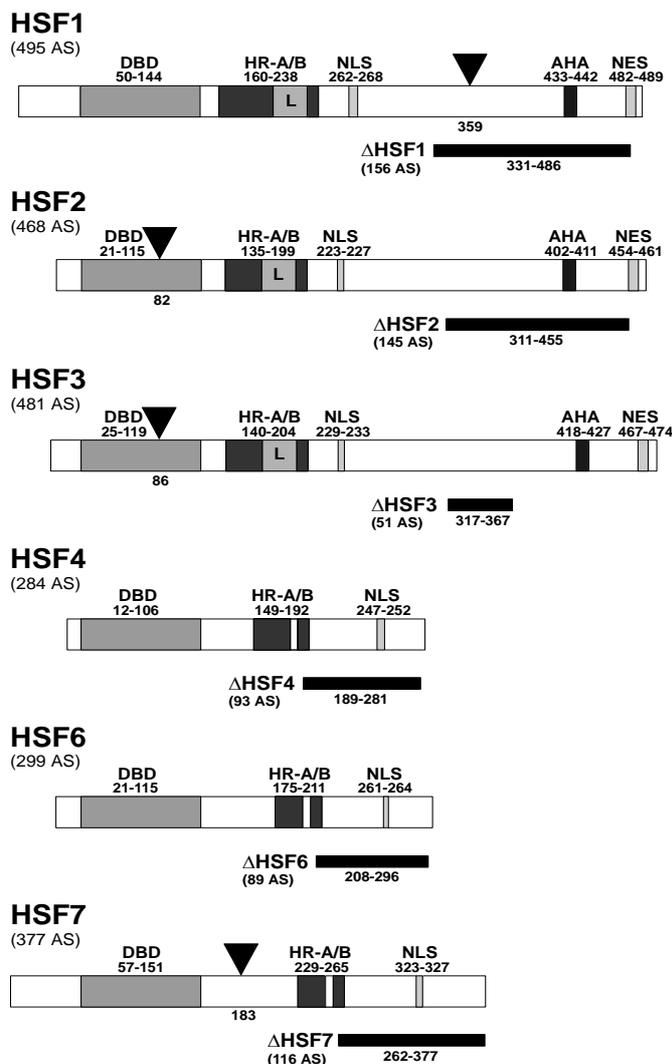


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der grundlegenden Proteinstruktur von HSF1, -2, -3, -4, -6 und -7. Essentielle, funktionelle Domänen wurden aufgrund von Sequenzhomologien in weitgehender Übereinstimmung zu Nover *et al.* (2001) identifiziert. DBD: DNA-Bindungsdomäne, HR A/B: hydrophobe Regionen A und B, L: hydrophober *Linker*, NLS: Nukleäres Lokalisationssignal, AHA: Aktivierungsdomäne, NES: Nukleäres Exportsignal. Die Zahlen markieren die Positionen der ersten und letzten Aminosäure einer Domäne innerhalb des gesamten Polypeptids. Schwarze Dreiecke markieren die Position von T-DNA-Integraten in den entsprechenden genomischen HSF-Sequenzen. C-terminale HSF-Bereiche (Δ HSF), die zur Produktion HSF-spezifischer Antikörper verwendet wurden, sind durch schwarze Balken unterhalb der jeweiligen kompletten Polypeptide gekennzeichnet.

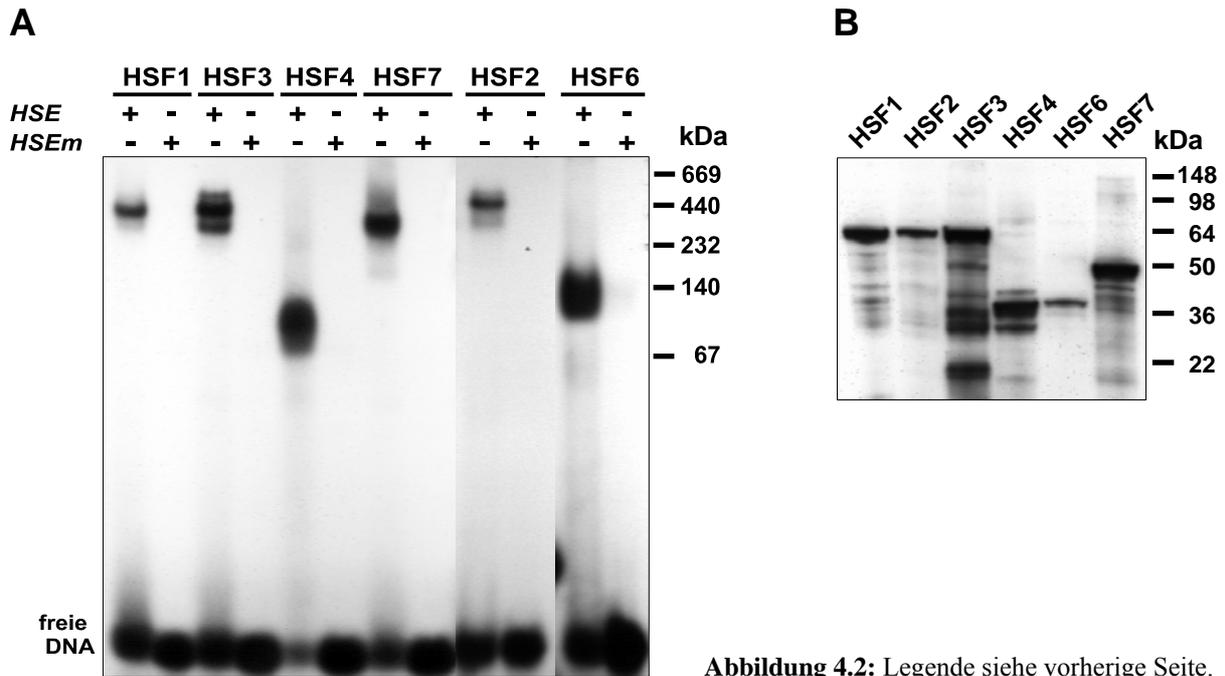
4.1 Bindung rekombinanter HSF an Hitzeschockelemente

Ein wesentliches Merkmal, welches HSF auszeichnet, ist die Fähigkeit spezifisch an Hitzeschockelemente (HSE) zu binden. Um zu klären, ob es sich bei den untersuchten Proteinen tatsächlich um HSF handelt, wurden diese als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) auf diese Fähigkeit hin überprüft. Dazu wurden native Gesamtextrakte der entsprechenden *E. coli*-Klone mit radioaktiv-markierten, synthetischen HSE inkubiert und in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurden jeweils in einem zweiten Ansatz mutierte Hitzeschockelemente (HSEm) verwendet.

Es zeigte sich, dass alle getesteten HSF-Homologe spezifisch an HSE, nicht aber an HSEm binden (Abb. 4.2.A). Dabei liegen sie offensichtlich in der DNA-bindenden Form als Oligomere vor, da die apparenten Molekularmassen der Protein-DNA-Komplexe wesentlich größer sind als die theoretischen Molmassen einzelner HSF-Proteine (Werte unter 7.3).

Ob und in welchem Maß die rekombinanten, mit 6xHis-Tag versehenen HSF in den jeweiligen nativen Gesamtproteinextrakten repräsentiert sind, wurde durch *Western-Blot* und anschließender Immundetektion mit anti-His-Tag-Antikörpern ermittelt (Abb. 4.2.B). Alle HSF werden in den entsprechenden *E. coli*-Stämmen exprimiert und sind in vergleichbaren Mengen in nativen Gesamtproteinextrakten vorhanden. Lediglich für HSF2 und HSF6 ergeben sich etwas schwächere Signale, entweder aufgrund einer geringeren Expressionsstärke oder einer schlechteren Löslichkeit unter den angewandten Aufschlußbedingungen. Diesem Umstand wurde im EMSA Rechnung getragen, indem hier die 4-fache Proteinmenge pro Bindungsreaktion eingesetzt wurde. Wie HSF1 (Hübel & Schöffl, 1994) so zeigen auch die übrigen rekombinanten HSF eine erhöhte apparente Molmasse in der SDS-PAGE (Abb. 4.2.B).

Abbildung 4.2 (auf nächster Seite): Analyse der rekombinanten, in *E. coli* exprimierten HSF1-4 und HSF6-7. **A)** EMSA mit rekombinanten HSF. Es wurden je 5 µg (für HSF1, -3, -4 und -7) bzw. 20 µg Gesamtprotein (für HSF2 und -6) der entsprechenden *E. coli*-Kulturen mit je 1 ng radioaktiv-markierten HSE bzw. HSEm pro Bindungsreaktion eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch native PAGE. Als Molekularmassenstandard diente das High Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit von Pharmacia. **B)** Immundetektion der rekombinanten HSF in *E. coli*-Gesamtproteinextrakten. Je 10 µg Gesamtprotein (auf gleiche Weise wie für die EMSA-Studie präpariert) wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte die Immundetektion mit dem MRGS-His Antikörper von Qiagen. Als Molekularmassenstandard diente SeeBlue™ Plus2 von Invitrogen/Novex.



4.2 Herstellung HSF-spezifischer Antikörper

Für biochemische Untersuchungen und den Nachweis individueller HSF sollten HSF-spezifische Antikörper erzeugt werden. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades innerhalb der N-terminalen DBD und der benachbarten OLD (Kap. 7.4) sind diese Regionen für die Herstellung HSF-spezifischer Antikörper ungeeignet. Daher wurden die divergenten C-terminale Bereiche einzelner HSF (Kap. 7.4), die im Folgenden als Δ HSF bezeichnet werden, in *E. coli* exprimiert. Diese dienten nach ihrer Reinigung mittels IMAC als Antigen bei der Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von Antiseren durch die Firma BioGenes (Berlin). Da aus früheren Versuchen bekannt war, dass die Aufreinigung rekombinanter HSF aus *E. coli* unter nativen Bedingungen stark unterschiedliche Ausbeuten und Reinheitsgrade ergibt, wurden die Δ HSF zunächst unter denaturierenden Bedingungen isoliert und gereinigt, bevor sie auf der Nickel-Agarose-Säule mittels FPLC renaturiert wurden (Kap. 3.12.2.3). Die anschließende Elution erfolgte dann unter nativen Bedingungen. Die gewonnenen Antiseren konnten in einer Verdünnung von 1:2000 in der *Western-Analyse* zur Immundetektion rekombinanter HSF verwendet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Kreuzreaktivität trat bei fast allen untersuchten Kombinationen auf, sie kann zu einem Teil durch den in sämtlichen Antigenen vorhandenen 6xHis-Tag erklärt werden (siehe auch: Kap. 4.3). Davon abgesehen bestehen lediglich zwischen Δ HSF2 und HSF3 erkennbare Homologien (Kap. 7.4), die zu einer stärkeren Kreuzreaktion des anti Δ HSF2-Antiserums mit HSF3 führten.

Die Reinheit der als Antigene verwendeten Δ HSF Proteine wurde durch SDS-PAGE-Analyse überprüft (Abb. 4.3). Im Vergleich zur theoretischen Molmasse fällt auch hier wieder eine erhöhte apparente Molmasse vor allem der C-terminalen Bereiche der Klasse-A-HSF (1, 2, 3) und HSF7 auf. Die theoretischen Molmassen in kDa betragen für Δ HSF1: 18,8; Δ HSF3: 7,6 + 19,0 DHFR; Δ HSF2: 17,7; Δ HSF4: 12,3; Δ HSF6: 12,0; Δ HSF7: 14,7.

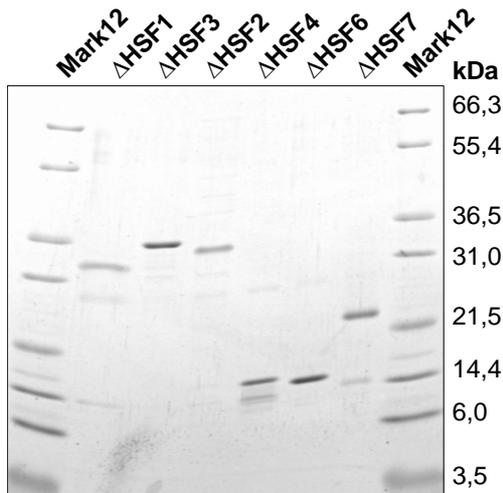


Abbildung 4.3: SDS-PAGE-Analyse der affinitätsgereinigten Δ HSF-Polypeptide. Je 200 ng Protein wurde auf einem 4-20% Polyacrylamid-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Molekularmassenstandard diente Mark12™ Wide Range Protein Standard von Invitrogen/Novex.

4.3 Expressionsstärken von HSF1-7 in *Arabidopsis*

Die Expression einzelner HSF in *Arabidopsis*-Blättern vor (Kontrolle) und nach Hitzeschock (2h bei 37°C) wurde durch *Northern*-Analyse unter Verwendung genspezifischer RNA-Sonden (Kap. 3.4.1) und durch *Western*-Analyse unter Verwendung der affinitätsgereinigten, unter 4.2 beschriebenen anti Δ HSF-Antisera untersucht.

Die *Northern*-Analyse (Abb. 4.4.A) zeigt, dass die Klasse-A-HSF (*HSF1*, -2, -3) konstitutiv und nicht hitzeinduziert exprimiert werden. Unter Berücksichtigung der Expositionszeiten ergeben sich für diese drei HSF vergleichbare Signalstärken. Von den drei analysierten Klasse-B-HSF sind *HSF4* und *HSF7* deutlich hitzeinduziert exprimiert, während *HSF6* schwach und nicht hitzeinduziert exprimiert wird.

Für die Immundetektion der HSF-Proteine in Gesamtproteinextrakten (Abb. 4.4.B) waren aufgrund der offensichtlich geringen Abundanz der HSF lange Expositionszeiten nötig, nach denen in fast allen Fällen multiple, kreuzreaktive Banden sichtbar wurden. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Molekularmassen konnten für manche Antisera Signale identifiziert werden, die den entsprechenden HSF (1, 3, 4, 7) repräsentieren könnten. Diese

Banden sind durch Pfeile in der jeweiligen HS-Spur gekennzeichnet.

Für HSF1 und -3 ergeben sich Signale bei zirka 66 kDa. Die Signalstärken der Proteine bleiben nach HS unverändert und korrelieren mit der konstitutiven Expression dieser HSF auf RNA-Ebene. Für HSF4 und -7 können nur nach HS Banden bei zirka 40 bzw. 55 kDa detektiert werden. Somit werden auch hier die Ergebnisse der *Northern*-Analyse bestätigt.

HSF2 und -6 konnten durch Immundetektion in Gesamtproteinextrakten aus *Arabidopsis*-Blättern weder vor noch nach HS nachgewiesen werden. Im Fall von HSF2 kann dies an der geringen Qualität des anti Δ HSF2-Antiserums liegen (siehe auch: Kap. 4.4). Da sich mit anti Δ HSF6-Antiserum rekombinanter HSF6 gut präzipitieren lässt (Abb. 4.5) und auch im *Northern-Blot* nur wenig HSF6-RNA nachgewiesen werden konnte, kann geschlossen werden, dass *HSF6* in *Arabidopsis*-Blättern nur schwach exprimiert wird.

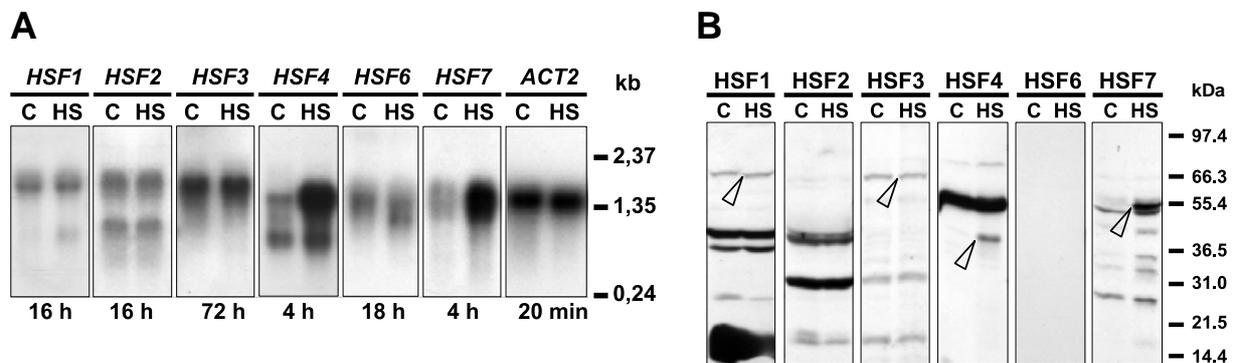


Abbildung 4.4: Expressionsstärken von HSF1-4 und HSF6-7 in *Arabidopsis*-Blättern ohne (C) und nach 2-stündigem Hitzeschock bei 37°C (HS). **A)** *Northern*-Analyse. Je 3 μg poly(A)⁺-RNA wurden elektrophoretisch separiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung mit *in vitro* transkribierten *HSF*-Sonden (Kap. 3.4.1) erfolgte in Hybridisierungslösung mit 50% Formamid bei 55°C. Die Kontrollhybridisierung mit einer über *random priming* markierten *Aktin2*-Sonde erfolgte ohne Formamid bei 65°C. Unter den Suren sind die jeweiligen Expositionszeiten während der Autoradiographie angegeben. **B)** *Western*-Analyse. Je 40 μg Gesamtprotein wurden nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit den jeweiligen, monospezifischen anti Δ HSF-Antikörpern.

4.4 Immunpräzipitation zur Bestimmung von HSF-Aktivität

Zum Nachweis der DNA-Bindungsaktivität individueller HSF in Proteinextrakten wurde ein Assay entwickelt, dessen Prinzip unter 3.12.6 detailliert beschrieben ist und der zunächst an Gesamtproteinextrakten HSF-exprimierender *E. coli*-Kulturen getestet (Abb. 4.5) wurde.

Mit Ausnahme von HSF2 ist die DNA-Bindungsaktivität aller HSF in den Immunpräzipitaten entsprechender *E. coli*-Gesamtproteinextrakte nachzuweisen. Wie erwartet binden die präzipitierten Proteine HSE, nicht aber mutierte HSEm (vergleiche Reaktionen 1 bzw. 2 mit Reaktion 4). Eine deutliche Reduktion der HSE-Bindungsaktivität ergibt sich, wenn den Immunpräzipitationreaktionen ein Überschuß an Gesamtprotein aus Δ HSF-exprimierenden *E. coli* (spezifischer Proteinkompetitor) zugesetzt worden war (Reaktion 3). Bei diesen Immunpräzipitationen kompetieren die überschüssigen Δ HSF-Polypeptide die Antikörperbindung an vollständige HSF-Moleküle und werden statt diesen präzipitiert. Da Δ HSF keine DNA-Bindungsdomäne besitzen, verringert sich die HSE-Bindungsaktivität im Immunpräzipitat. Die Zugabe von Gesamtprotein aus DHFR-exprimierenden *E. coli* (unspezifischer Proteinkompetitor) verringert die Menge der gebundenen HSE hingegen nur in geringem Umfang (Reaktion 2).

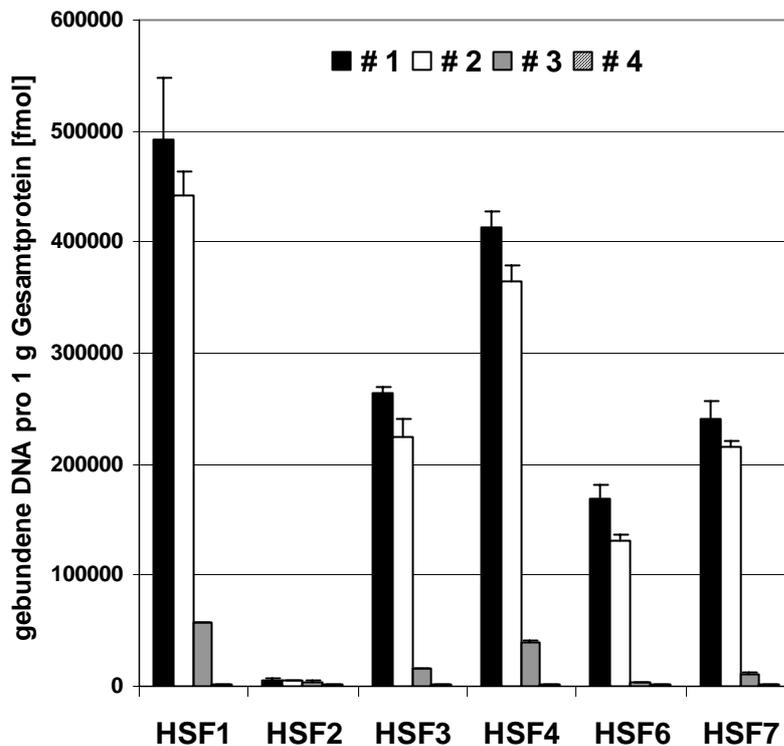


Abbildung 4.5: DNA-Bindungsaktivitäten in Immunpräzipitaten aus Gesamtproteinextrakten von HSF-exprimierenden *E. coli*-Kulturen. Mit HSF-Antisera wurden Immunpräzipitate aus je 100 μ g Gesamtprotein erzeugt und entweder mit 2 ng (141,75 fmol) radioaktiv-markierten HSE (Reaktionen 1-3) oder HSEm (Reaktion 4) inkubiert. Nach Entfernen ungebundener DNA wurde die gebundene DNA-Menge durch LSC bestimmt. Einzelne Immunpräzipitationen erfolgten in Gegenwart eines 10-fachen Überschusses an unspezifischem (DHFR, Reaktionen 2 und 4) oder spezifischem (Δ HSF, Reaktion 3) Proteinkompetitor. Säulen repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.5 HSE-Bindungsaktivitäten in *Arabidopsis*-Blättern nach Hitzeschock

Den Aktivitätsanteil, den verschiedene HSF an der Hitzeschockreaktion in *Arabidopsis* haben, sollte durch Quantifizierung ihrer individuellen DNA-Bindungsaktivität ermittelt werden. Dazu wurden zunächst HSE-bindende Komplexe, die nach 0 min, 10 min, 30 min, 1 h oder 2 h HS bei 37°C in *Arabidopsis*-Gesamtproteinextrakten auftreten, mittels EMSA sichtbar gemacht (Abb. 4.6.A). Der Immunpräzipitationsassay sollte dann Aufschluß darüber geben, welche HSF tatsächlich an der Ausbildung der im EMSA beobachteten HSE-bindenden Komplexe beteiligt sind (Abb. 4.6.B). Hierfür wäre auch die Methode des *Supershifts* geeignet, sie konnte aber in diesem Zusammenhang nicht erfolgreich etabliert werden. Da das anti Δ HSF2-Antiserum nicht in der Lage war, rekombinanten, DNA-bindenden HSF2 zu präzipitieren (Kap. 4.4), wurde auf dieses Antiserum verzichtet. Die selben Proteinextrakte wurden außerdem mittels *Western*-Analyse auf Expression von HSF-Zielgenen untersucht, exemplarisch anhand zytoplasmatischer Klasse-I-sHSP (Abb. 4.6.C).

Im EMSA treten nach einem 10-minütigen HS hitzeinduzierte Protein-DNA-Komplexe auf. Diese sind HSE-spezifisch, da sie nicht erscheinen, wenn mutierte HSE verwendet wurden. Nach 30-minütigem HS werden diese „frühen“ Signale schwächer, nach 60-minütigem HS ist vor allem die Signalstärke des Komplexes geringster Mobilität deutlich verringert, gleichzeitig treten Komplexe mit höherer Mobilität auf. Vor allem die Signalstärke des Komplexes größter Mobilität nimmt im weiteren Verlauf der HS-Reaktion zu und dominiert nach einem 2-stündigem HS.

Im Immunpräzipitationsassay ergeben sich sowohl für HSF1 als auch für HSF3 schon bei Kontrollbedingungen DNA-Bindungsaktivitäten, die mehr als 20-fach über dem Hintergrund liegen, der bei Verwendung mutierter HSE in der DNA-Bindungsreaktion bzw. von Präimmunserum während der Immunpräzipitation zu messen ist. Nach einem 10-minütigen HS steigt diese konstitutive DNA-Bindungsaktivität beider Klasse-A-HSF signifikant an, im Mittel auf das 1,9-fache. Im weiteren Verlauf der HS-Reaktion bleiben die Werte in etwa auf diesem Niveau.

Bei Verwendung des anti Δ HSF7-Antiserums ist nach 30-minütigem HS erstmals eine HSE-Bindungsaktivität im Immunpräzipitat nachzuweisen, die signifikant über dem Hintergrund liegt. Mit zunehmender Dauer des HS steigt dieser Wert fast linear an und erreicht nach 2-stündigem HS das ungefähr Doppelte der Werte, die für HSF1 oder HSF3 erzielt werden. Diese deutliche hitzeinduzierte Zunahme der DNA-Bindungsaktivität korreliert mit der hitzeinduzierten Expression von *HSF7* (Kap. 4.3). Die Kinetik, mit der dieser Anstieg erfolgt, ähnelt der Kinetik mit der die hitzeinduzierte Zunahme von Klasse-I-sHSP in der *Western*-

Analyse nachzuweisen ist (Abb. 4.6.C). Auch hier sind die Translationsprodukte nach 30-minütigem HS zu detektieren, ihre Menge steigt mit zunehmender Dauer des HS an.

Immunpräzipitationen mit anti Δ HSF4- und anti Δ HSF6-Antiserum führen zu keinem Zeitpunkt der HS-Reaktion zu DNA-Bindungsaktivitäten im Präzipitat, die über den jeweiligen Hintergrundwerten liegen.

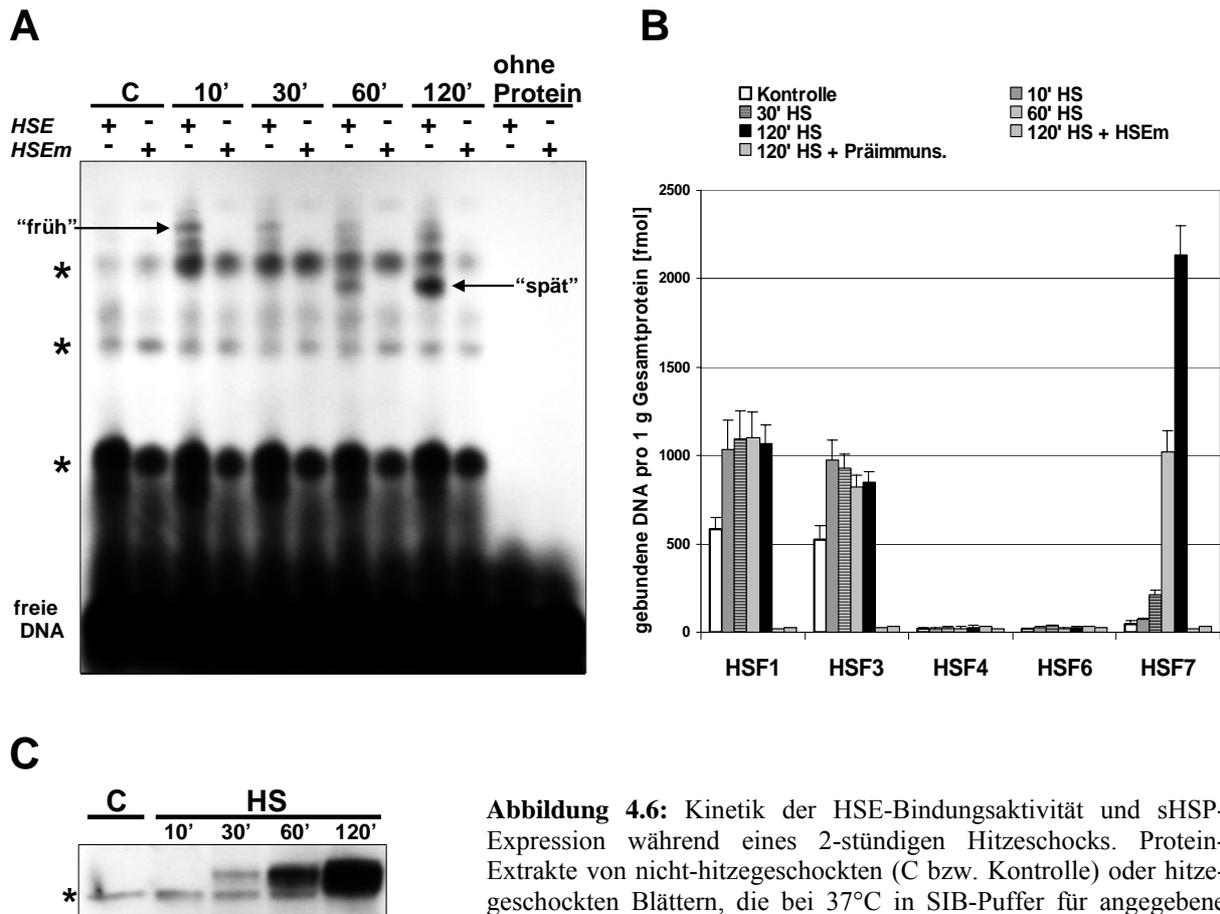


Abbildung 4.6: Kinetik der HSE-Bindungsaktivität und sHSP-Expression während eines 2-stündigen Hitzeschocks. Protein-Extrakte von nicht-hitzegechockten (C bzw. Kontrolle) oder hitzegechockten Blättern, die bei 37°C in SIB-Puffer für angegebene Zeitspannen (in Minuten) inkubiert worden waren, wurden mittels EMSA (A), Immunpräzipitationsassay (B) oder durch *Western-*

Analyse (C) untersucht. **A**) Für den EMSA wurden native Gesamtproteinextrakte, die je 30 μ g Protein enthielten, mit je 1 ng radioaktiv-markierten HSE bzw. mutierten HSE (HSEm) inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch native PAGE. Die Positionen dominanter Banden, die auch bei Verwendung mutierter HSE auftauchen und daher als nicht-HSF-spezifisch beurteilt wurden, sind durch Sterne markiert. **B**) Unter Verwendung von anti Δ HSF-Antiseren oder den entsprechenden Präimmunsereen wurden Immunpräzipitate aus je 3 mg Gesamtprotein erzeugt. Diese wurden mit 2 ng (141,75 fmol) radioaktiv-markierten HSE bzw. HSEm inkubiert. Nach Entfernen ungebundener DNA wurde die gebundene DNA-Menge durch LSC bestimmt. Säulen repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. **C**) *Western-*Analyse der Kinetik der hitzeinduzierten sHSP-Expression in *Arabidopsis*-Blättern während eines HS von 2 h. Je 15 μ g Gesamtprotein wurde durch SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Immundetektion zytoplasmatischer Klasse-I-sHSP wurde antiHSP17.6-Antiserum verwendet. Die Position einer nicht-hitzeinduzierten Bande, die daher als unspezifisches Signal bewertet wurde, ist durch einen Stern markiert.

4.6 Charakterisierung der HSF3-Aktivität in *HSF3*-transgenen *Arabidopsis*

Um die bisherigen Daten und Ergebnisse zur DNA-Bindungsaktivität verschiedener HSF in *Arabidopsis* während der HS-Reaktion schlüssig interpretieren zu können, wurde das DNA-Bindungsverhalten von HSF3 in *HSF3*-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (*HSF3*-TP) untersucht. Es war gezeigt worden, dass die Überexpression von HSF3 in *Arabidopsis* zur Expression aller untersuchten HSP auch unter nicht-HS-Bedingungen führt. Diese Deregulation der HS-Reaktion korrelierte mit einer erhöhten basalen Thermotoleranz der *HSF3*-TP und wurde auf die durch EMSA nachgewiesene konstitutive DNA-Bindungsaktivität des ekto- pisch exprimierten HSF3 zurückgeführt (Prändl *et al.*, 1998). Später stellte sich heraus, dass für eine gut nachweisbare Expression von sHSP eine mindestens dreitägige Kultivierung der Pflanzen bei einer Temperatur $\geq 25^{\circ}\text{C}$ nötig ist.

4.6.1 DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-transgenen *Arabidopsis* bei 22°C

Zunächst wurde die konstitutive DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-TP mittels Immunpräzipitationsassay quantifiziert (Abb. 4.7). Dazu wurden *HSF3*-TP der Linie 197 und der nichttransformierte Wildtyp (C24) bei 22°C kultiviert. In Parallelansätzen wurden Immunpräzipitationen mit steigenden Mengen von Antiserum durchgeführt und jeweils mit HSE inkubiert. In separaten Kontrollen wurden Präimmenserum oder mutierte HSE getestet.

Für *HSF3*-TP führt die schrittweise Erhöhung der Antiserummenge auf $5\ \mu\text{l}$ zu einer Erhöhung der HSE-Bindungsaktivität im Präzipitat. Dann tritt eine Sättigung ein, da eine weitere Erhöhung auf $20\ \mu\text{l}$ zu keinem weiteren Anstieg der gebundenen DNA-Menge führt. Die maximale DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-TP liegt mit $4790\ \text{fmol/g}$ 9-fach über dem Wert, der in Wildtyp-Extrakten gemessen wurde ($529\ \text{fmol/g}$), wobei letzterer Wert bereits bei Verwendung von $1\ \mu\text{l}$ Antiserum erreicht wird. Die Kontrollreaktionen mit Präimmenserum oder mutierten HSE führen bei *HSF3*-TP und beim WT zu Werten von zirka $30\ \text{fmol}$ gebundener DNA pro $1\ \text{g}$ Gesamtprotein und erreichen somit nur $1/160$ bzw. $1/18$ der Werte, die bei Verwendung von Antiserum und HSE erzielt wurden.

Der Immunpräzipitationsassay ist also in der Lage, die bereits gezeigte, konstitutive DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-TP zu quantifizieren. Sie ist gegenüber nichttransgenen Pflanzen um den Faktor 9 erhöht.

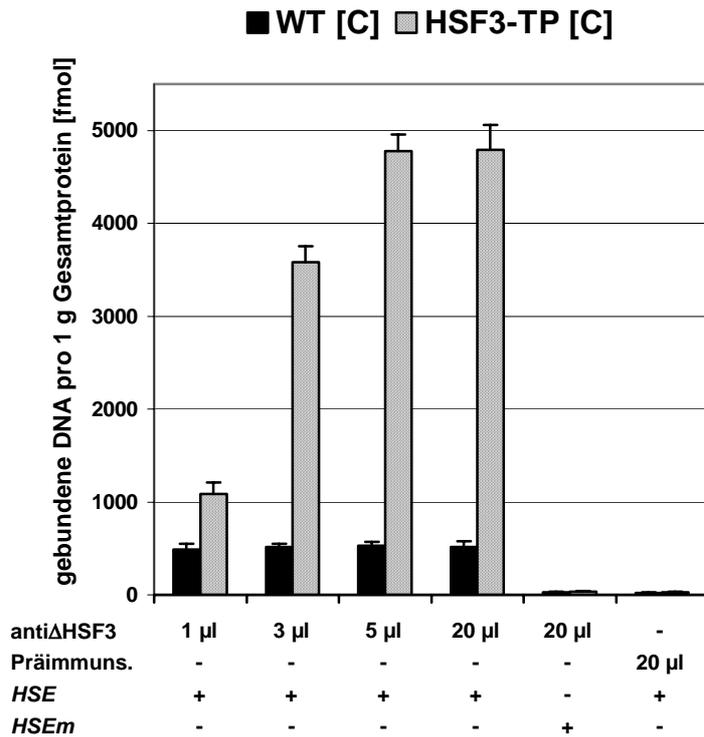


Abbildung 4.7: Immunpräzipitationssassay zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in Wildtyp (WT) und in HSF3-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (*HSF3*-TP), die unter Kontrollbedingungen (C), d.h. bei 22°C kultiviert wurden. Unter Verwendung angegebener Mengen des antiΔHSF3-Antiserums oder Präimmunsersums, wurden Immunpräzipitate aus je 3 mg Gesamtprotein erzeugt und mit 2 ng (141,75 fmol) radioaktiv-markierten HSE oder HSEm inkubiert. Nach Entfernen ungebundener DNA wurde die gebundene DNA-Menge durch LSC bestimmt. Säulen repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

4.6.2 HSF-DNA-Bindung in *HSF3*-transgenen Pflanzen unter HS-Bedingungen

Nach einer dreitägigen Kultivierung bei 25°C können in *HSF3*-TP nicht aber im WT deutliche Mengen von sHSP dedektiert werden (Abb. 4.8.A). Im Folgenden wurde untersucht, ob die Kultivierung von *HSF3*-TP bei 25°C zu einer Veränderung von HSF-DNA-Komplexen führt. Durch EMSA konnte gezeigt werden, dass bei 22°C im WT kaum spezifische HSE-bindende Komplexe vorhanden sind, wohl aber in Extrakten aus *HSF3*-TP (Abb. 4.8.B). Diese Komplexe entsprechen den publizierten Daten und repräsentieren die konstitutive DNA-Bindungsaktivität des ektopisch exprimierten HSF3. Die dreitägige Kultivierung der *Arabidopsis*-Pflanzen bei 25°C führt weder im WT noch in *HSF3*-TP zu einer deutlichen Veränderung des Bandenmusters bzw. der Signalstärken. Nach einem 2-stündigen HS bei 37°C zeigen WT und *HSF3*-TP ein übereinstimmendes Bandenmuster HSE-bindender Komplexe. Die hochmolekularen Komplexe, typisches Charakteristikum nicht-hitzgeschockter *HSF3*-TP, sind verschwunden (siehe auch: Abb. 4.8.D), die Komplexe mit höherer Mobilität - charakteristisch für die „späte“ HS-Reaktion - treten wie beim WT auf.

Die *Western*-Analyse der für den EMSA verwendeten Proteinextrakte (Abb. 4.8.C) zeigt, dass in *HSF3*-TP vor und nach HS gleiche Mengen an HSF3 zu detektieren sind. Das Verschwinden der hochmolekularen Komplexe im EMSA nach HS kann also nicht mit einer Abnahme der HSF3-Menge nach HS erklärt werden.

Im Immunpräzipitationsassay (Abb. 4.8.E) ergeben sich in *HSF3-TP*, ungeachtet der unterschiedlichen Kultivierungs- bzw. HS-Bedingungen, vergleichbare HSF3-DNA-Bindungsaktivitäten. Im WT werden bei 22°C und 3 d 25°C nahezu identische Werte gemessen, die nach einem 2-stündigen HS auf in etwa das Doppelte ansteigen.

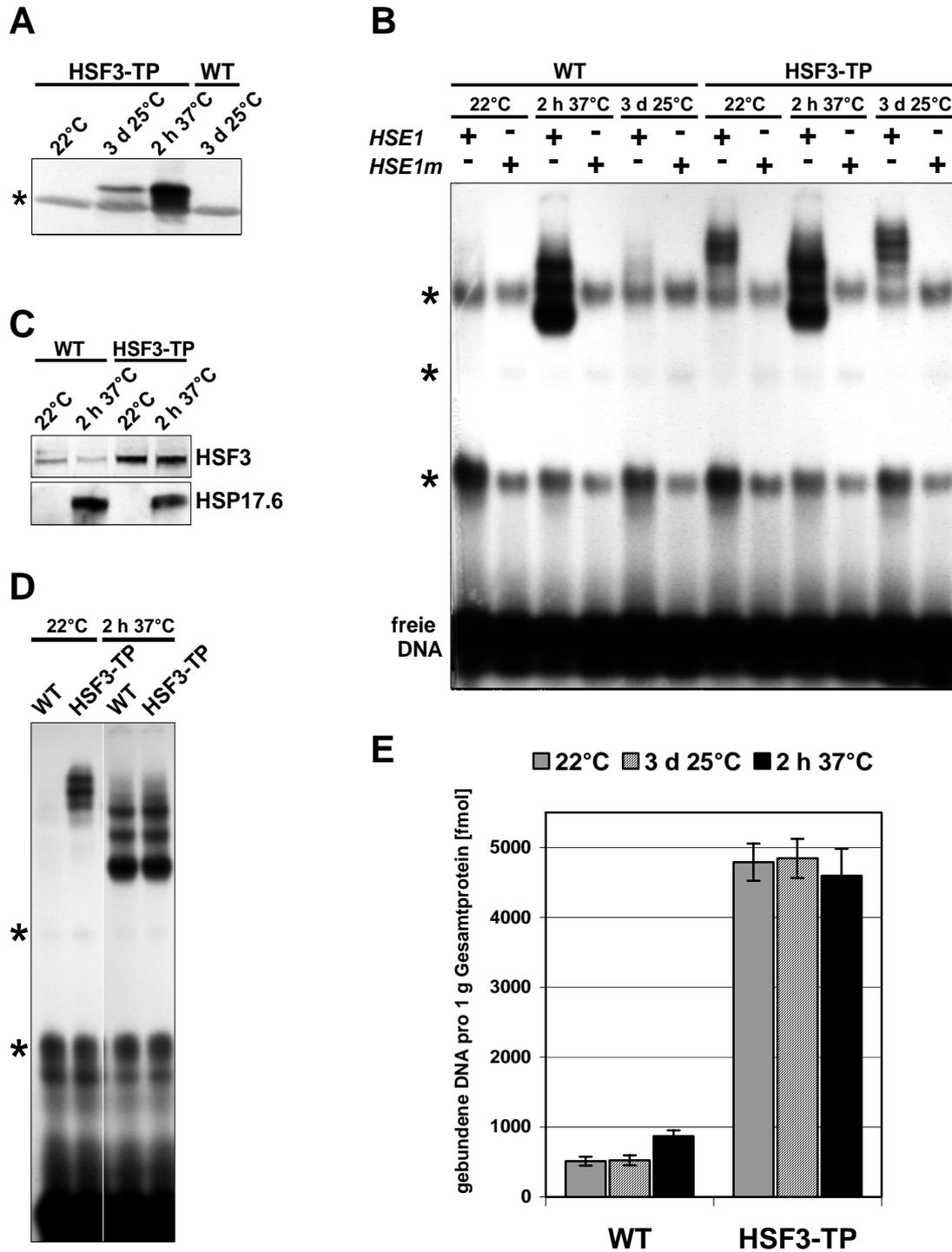


Abbildung 4.8: Legende siehe nächste Seite.

Abbildung 4.8 (vorherige Seite): Deregulation der sHSP-Expression und Nachweis der DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-transgenen *Arabidopsis* (*HSF3*-TP). Die verschiedenen Temperaturbedingungen waren: Konstante Kultivierung bei 22°C (22°C), Kultivierung bei 22°C dann 3 Tage bei 25°C (3 d 25°C), Kultivierung bei 22°C dann HS einzelner Blätter für 2 h bei 37°C in SIB-Puffer. **A)** *Western*-Analyse der sHSP-Expression in *HSF3*-TP und Wildtyp (WT). Je 15 µg Gesamtprotein wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Immundetektion von Klasse-I-sHSP wurde antiHSP17.6-Antiserum verwendet. Die Position einer nicht-hitzeinduzierten Bande, die daher als unspezifisches Signal bewertet wurde, ist durch einen Stern markiert. **B)** EMSA zum Nachweis der HSE-Bindungsaktivität in *HSF3*-TP und WT. Je 30 µg Gesamtprotein wurde mit 1 ng radioaktiv-markierten HSE bzw. mutierten HSE (HSEm) inkubiert und durch native PAGE elektrophoretisch separiert. Die Positionen dominanter Banden, die auch bei Verwendung mutierter HSE auftauchen und daher als nicht-HSF-spezifisch beurteilt wurden, sind durch Sterne markiert. **C)** *Western*-Analyse zum Nachweis von HSF3 in *HSF3*-TP und WT. Gesamtproteinextrakte (wie für EMSA verwendet) wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit monospezifischen anti Δ HSF3-Antikörpern. **D)** Partielle Reproduktion des unter (B) gezeigten EMSA zur Verdeutlichung entsprechender Effekte durch verbesserte Auftrennung der Banden. Auf die parallele Inkubation der Extrakte mit HSEm wurde hier verzichtet, ansonsten wie für (B) beschrieben. **E)** Immunpräzipitationsassay zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von HSF3 in *HSF3*-TP und WT. Unter Verwendung des anti Δ HSF3-Antiserums wurden Immunpräzipitate aus je 3 mg Gesamtprotein erzeugt und mit 2 ng (141,75 fmol) radioaktiv-markierten HSE inkubiert. Nach Entfernen ungebundener DNA wurde die gebundene DNA-Menge durch LSC bestimmt. Säulen repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

4.7 Charakterisierung von *HSF7*

Basierend auf Sequenzhomologie handelt es sich bei *HSF7* um einen Klasse-B-HSF (Nover *et al.*, 2001; siehe auch: Kap. 7.4). Die Funktion dieser HSF-Klasse ist noch unklar. Die Expressionsanalysen unter 4.3 weisen *HSF7* als hitzeinduziert-exprimierten HSF aus. Im Immunpräzipitationsassay mit anti Δ HSF7-Antiserum wurde eine deutliche Zunahme der HSE-Bindungsaktivität im Verlauf eines 2-stündigen HS gemessen, die in ihrem Ausmaß von allen anderen untersuchten HSF unerreicht bleibt (Abb. 4.6.B).

4.7.1 Regulation der *HSF7*-Expression

4.7.1.1 *HSF7*-Promotor: Transkriptionsstart und Identifizierung von HSE

Aufgrund seiner hitzeinduzierten Expression kann *HSF7* als HS-Gen bezeichnet werden. Falls die Expression dieses HSF direkt unter HSF-Kontrolle steht, setzt dies die Anwesenheit von HSE im *HSF7*-Promotor voraus. Um den Promotorbereich einzugrenzen, wurde der Transkriptionsstart von *HSF7* mittels 5'-RACE bestimmt und die Sequenzen stromaufwärts davon (basierend auf der genomischen Sequenz, Akzessionsnummer AL049500) nach HSE durchsucht.

Bei der 5'-RACE ergibt die Kombination eines Adapter-Primers mit einem genspezifischen Primer, der unmittelbar stromaufwärts des Startcodons ansetzt, ein zirka 250 Bp langes PCR-Produkt (Abb. 4.9.B). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes und der Vergleich mit der

genomischen Sequenz aus der Datenbank ergab für *HSF7* einen 5'-UTR von 210 Bp (Abb. 4.9.C). Stromaufwärts des Transkriptionsstarts sind drei HSE-ähnliche Sequenzmotive lokalisiert. Das Erste (-339 bis -325) und Dritte (-119 bis -105) stimmen perfekt mit der HSE-Konsensussequenz (nGAAnnTTCnnGAAn) überein. Das zweite Sequenzmotiv (-180 bis -166) weicht lediglich in der letzten HS-Einheit vom Konsensus ab (nTCCn statt nTTCn).

A



B

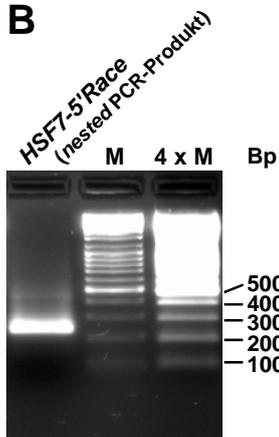
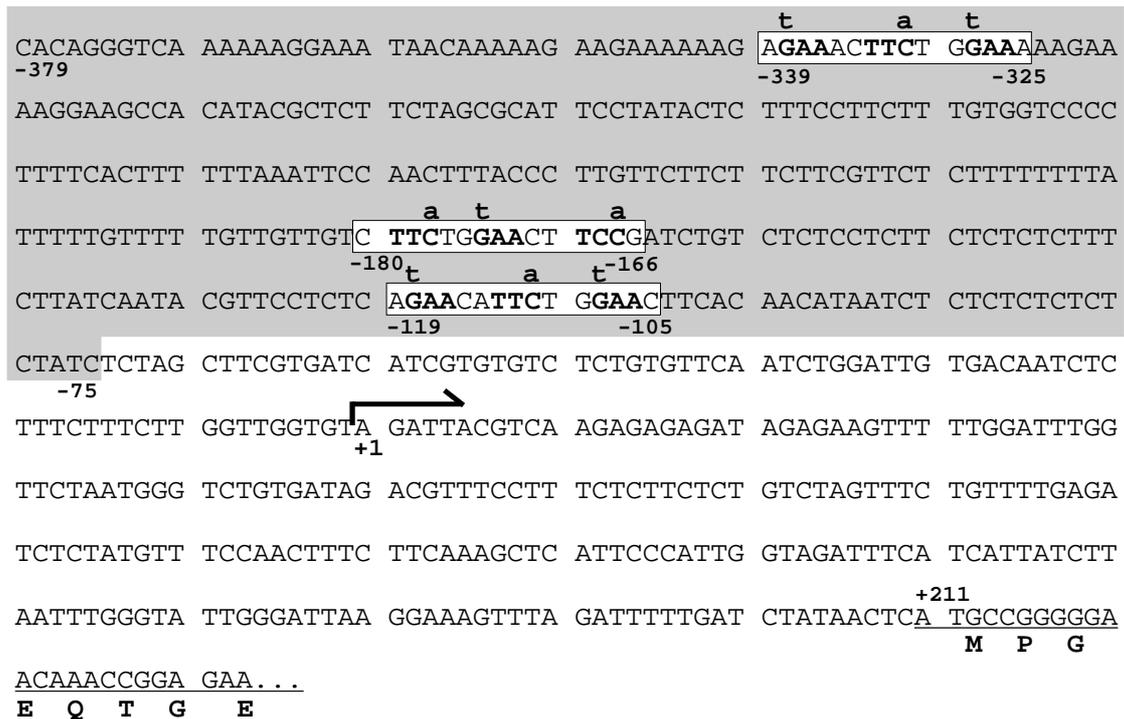


Abbildung 4.9: Bestimmung des Transkriptionsstarts von *HSF7* und Identifizierung HSE-ähnlicher Sequenzmotive. **A)** Schematische Darstellung der *HSF7*-cDNA mit Adapter am 5'-Ende, wie sie nach Anwendung des *GeneRacer*-Kits von Stratagene vorliegen sollte. Mit Pfeilen sind Lage und Orientierung der verwendeten PCR-Primer markiert. UTR: *Untranslated Region*; CDS: *Coding sequence*

B) Agarosegelelektrophorese des erhaltenen PCR-Produktes. Als Molekularmassenstandard (M) wurden zwei verschiedene Mengen der *GeneRuler DNA-ladder* (Gibco BRL) aufgetragen. **C)** Genomische Sequenz von *HSF7* um den Transkriptionsstart. Durch Sequenzierung des unter B) gezeigten PCR-Produktes wurde der Transkriptionsstart (+1) bestimmt und mit einem Pfeil markiert. Relativ dazu sind die Positionen der HSE (umrahmt) und des Startcodons angegeben. Das Promotorfragment, welches im EMSA verwendet wurde, ist grau unterlegt. Kleine Buchstaben geben Basenaustausche an, die durch Mutagenese an der Promotorsequenz vorgenommen wurden.

C



4.7.1.2 Bindung rekombinanter HSF an HSF7-Promotorfragment *in vitro*

Die Funktionalität der HSE im *HSF7*-Promotor wurde durch EMSA mit rekombinanten HSF getestet. Dazu wurde ein EMSA-taugliches, 305 Bp-langes Promotorfragment kloniert, welches die identifizierten HSE beinhaltet. Es wird im Folgenden „*7HSE*“ genannt. Durch *site-directed mutagenesis* der HSE wurde das sogenannte „*mut7HSE*“ hergestellt, welches als Negativkontrolle diente (Abb. 4.9.C).

Alle getesteten rekombinanten HSF binden an *7HSE*, nicht aber an *mut7HSE* (Abb. 4.10.A). Somit ist die HSF-Bindung an das Promotorfragment abhängig von mindestens einem der identifizierten HSE. Ähnlich wie bei der Verwendung von synthetischen HSE (Abb. 4.2) ergeben sich Protein-DNA-Komplexe, deren Mobilität abhängig von der Molekularmasse des jeweiligen HSF ist. Auffällig ist die starke Bindung von HSF6 und HSF7 an *7HSE*, wobei substantielle Mengen der angebotenen DNA gebunden werden, was an der deutlichen Abnahme der freien DNA zu erkennen ist. Außerdem werden bis zu drei Protein-DNA-Komplexe (I, II, III) unterschiedlicher Mobilität gebildet. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die DNA mehrere Bindungsstellen besitzt, jedoch nicht alle Bindungsstellen aufgrund eines zu geringen DNA:Protein-Verhältnis besetzt werden können (siehe auch: Abb. 4.10.C).

Die Spezifität der HSF-Bindung an *7HSE* ist exemplarisch für rekombinanten HSF1 näher untersucht worden und in Abb. 4.10.B gezeigt. Im Gegensatz zu *7HSE* ist *mut7HSE* nicht in der Lage, die HSF-Bindung zu kompetieren (vergleiche Spuren 2 & 3).

Bei der Bindung rekombinanter HSF an *7HSE in vitro* sind alle drei der identifizierten HSE funktionell, da bei einem bestimmten molaren Verhältnis von DNA zu Protein drei Komplexe unterschiedlicher Mobilität entstehen (Abb. 4.10.C). Ein Überschuß an HSF1 führt zur vollständigen Besetzung aller Bindungsstellen der gesamten angebotenen DNA-Moleküle. Es ergibt sich eine Bande geringer Mobilität (Spur 1). Die Verringerung des Protein:DNA-Verhältnisses durch Zugabe von unmarkierter DNA führt zur Bildung von Protein-DNA-Komplexen unterschiedlicher Mobilität, die Zustände zwischen der vollständigen bis hin zur minimalen Besetzung der Bindungsstellen eines DNA-Moleküls repräsentieren (Spuren 3 & 4). Sobald deutliche Mengen freier DNA zu sehen sind, verschwindet die Bande geringster Mobilität, da die vollständige Besetzung aller Bindungsstellen eines DNA-Moleküls unwahrscheinlich wird (Spur 5). Bei DNA-Überschuß ist jeweils nur eine Bindungsstelle pro Molekül besetzt, weshalb im EMSA nur noch eine Bande hoher Mobilität zu sehen ist (Spur 6).

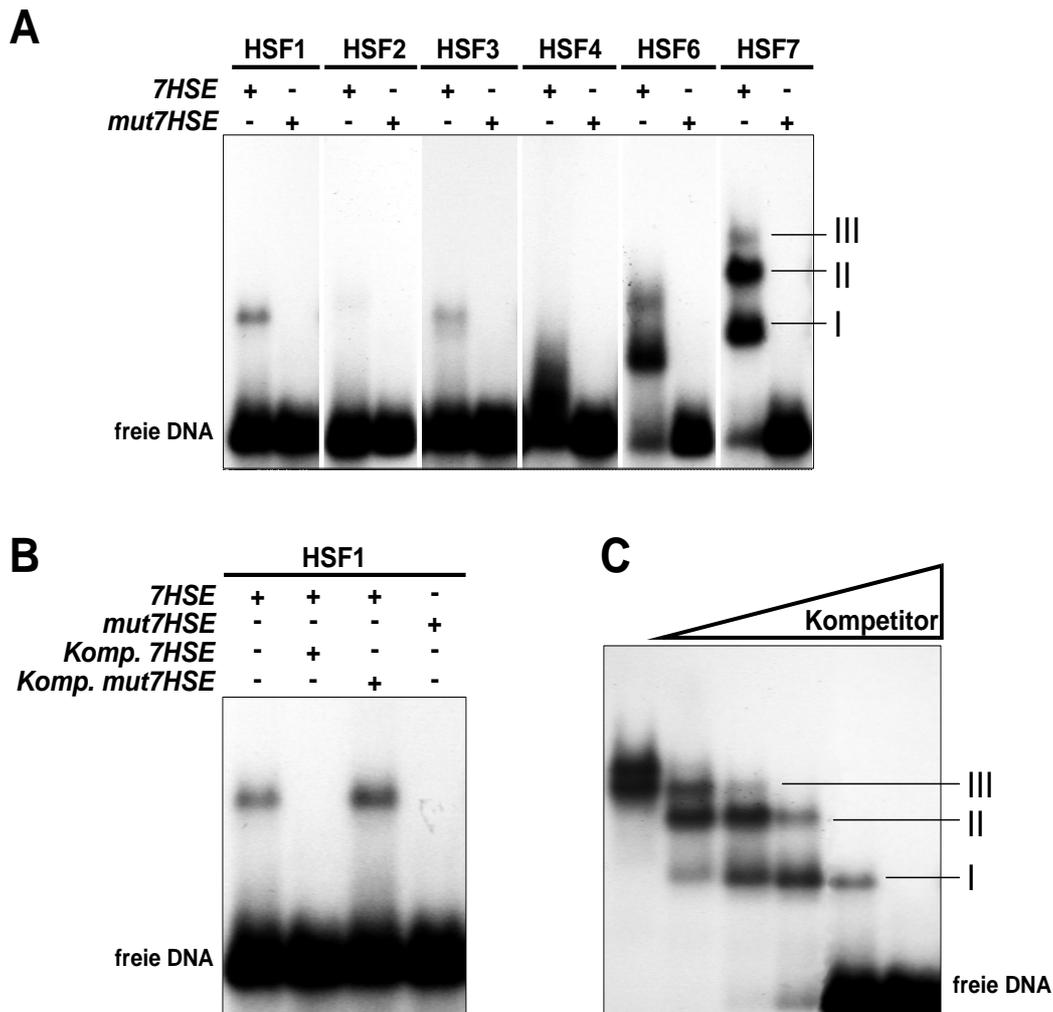


Abbildung 4.10: EMSA-Studien zur Bindung rekombinanter HSF an *HSF7*-Promotorfragment *in vitro*. **A)** Je 0,5 µg Gesamtprotein aus HSF1-7-exprimierenden *E. coli*-Zellen wurde mit 4 ng radioaktiv-markierten *7HSE* bzw. *mut7HSE* inkubiert und durch Agarosegelelektrophorese separiert. **B)** Je 0,5 µg Gesamtprotein aus HSF1-exprimierenden *E. coli*-Zellen wurde mit 4 ng radioaktiv-markierten *7HSE* bzw. *mut7HSE* inkubiert und durch Agarosegelelektrophorese separiert. Für Konkurrenzexperimente (Spuren 2 & 3) wurde den Bindungsreaktionen ein 100-facher Überschuß unmarkierter DNA (*7HSE* bzw. *mut7HSE*) zugegeben. **C)** Je 5 µg Gesamtprotein aus HSF1-exprimierenden *E. coli*-Zellen wurde mit je 4 ng radioaktiv-markiertem *7HSE* inkubiert. Das DNA:Protein-Verhältnis wurde durch Zugabe steigender Mengen unmarkierter Kompetitor-DNA schrittweise erhöht. Im Einzelnen waren dies jeweils 10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng oder 400 ng unmarkiertes *7HSE*.

4.7.1.3 Hitzeinduzierbarkeit des *HSF7*-Promotors

Um zu prüfen, ob der *HSF7*-Promotor die hitzeinduzierte Expression eines *GUS*-Reportergens bewirkt, wurden unter Verwendung des binären Vektors pGPTV-BAR (Becker *et al.*, 1992) *pHSF7::GUS*-Reporterkonstrukte hergestellt und über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in *Arabidopsis*-Pflanzen (Col-0) eingebracht. Dabei wurden zwei verschiedene Konstrukte verwendet: Bei *pHSF7::GUS* steht das *uidA*-Gen unter der Kontrolle der 1730 Bp-langen genomischen Sequenz stromaufwärts des *HSF7*-Startcodons. Bei *pHSF7mut::GUS* steht das *uidA*-Gen unter der Kontrolle des gleichen Sequenzbereichs, allerdings waren hier die identifizierten HSE, wie in Abb. 4.9.C gezeigt, mutiert worden.

Das Ergebnis der GUS-Aktivitätsmessung an Blättern von jeweils 17 unabhängigen Transformanten ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Zwischen einzelnen Transformanten ergeben sich deutliche Unterschiede in der Höhe der absoluten GUS-Aktivität (Abb. 4.11.A und B). Dies kann auf Positionseffekten beruhen und verdeutlicht die Notwendigkeit, eine größere Anzahl unabhängiger Transformanten bei Promotorstudien zu analysieren. Dennoch zeigen 15 von 17 Individuen der Linie *pHSF7::GUS* eine erhöhte GUS-Aktivität nach HS in Blättern (Abb. 4.11.A). Diese Hitzeinduzierbarkeit der GUS-Expression tritt in Blättern der Linie *pHSF7mut::GUS* nicht auf (Abb. 4.11.B). Im Mittel ergibt sich für *pHSF7::GUS* eine 1,8-fache Erhöhung der GUS-Aktivität in Blättern nach HS. In Pflanzen der Linie *pHSF7mut::GUS* ist die GUS-Aktivität nach HS durchschnittlich um 5% verringert (Abb. 4.11.C). Unter Kontrollbedingungen führen beide Konstrukte zu einer vergleichbaren, konstitutiven GUS-Expression.

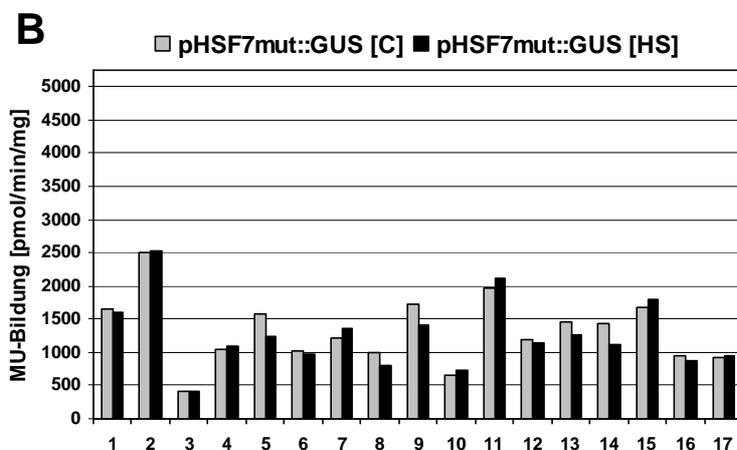
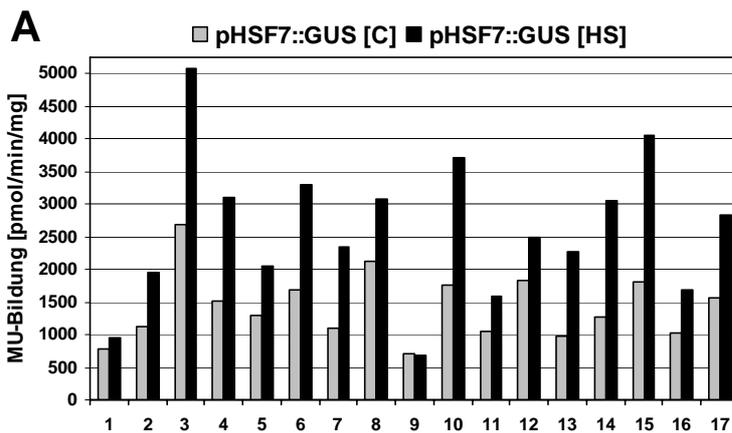
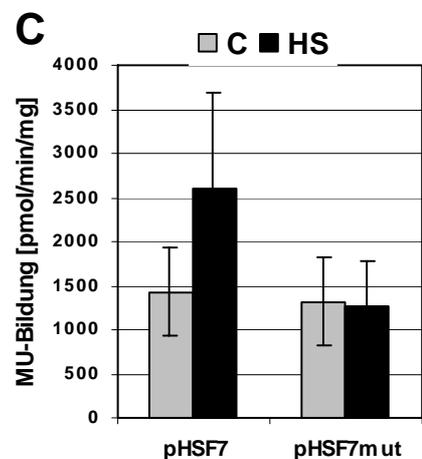


Abbildung 4.11: GUS-Aktivitätsmessung in **A)** *pHSF7::GUS*- und **B)** *pHSF7mut::GUS*-Linien. Von jeweils 17 unabhängigen Transformanten wurde ein Blatt für 2 h bei 22°C (C) oder bei 37°C (HS) inkubiert, bevor eine fluorimetrische GUS-Aktivitätsmessung bezogen auf Methylumbelliferon (MU)-Bildung pro min pro mg Protein erfolgte. **C)** Mittelwerte/Standardabweichungen aus A) und B).



Bei histochemischer GUS-Analyse von Blättern unabhängiger Transformanten zeigen nur die Blätter von *pHSF7::GUS*-Pflanzen eine Intensivierung der Blaufärbung nach HS, vor allem im vaskulären System (Abb. 4.12.A). Nach HS-Behandlung an kompletten Keimlingen konnte niemals eine Zunahme der Blaufärbung nach HS beobachtet werden, oftmals kam es sogar zu einer geringen Abnahme, wie in Abb. 4.12.B exemplarisch gezeigt. Allen Keimlingen gemeinsam war die konstitutive GUS-Expression in sämtlichen Geweben, mit Ausnahme des Hypokotyls.

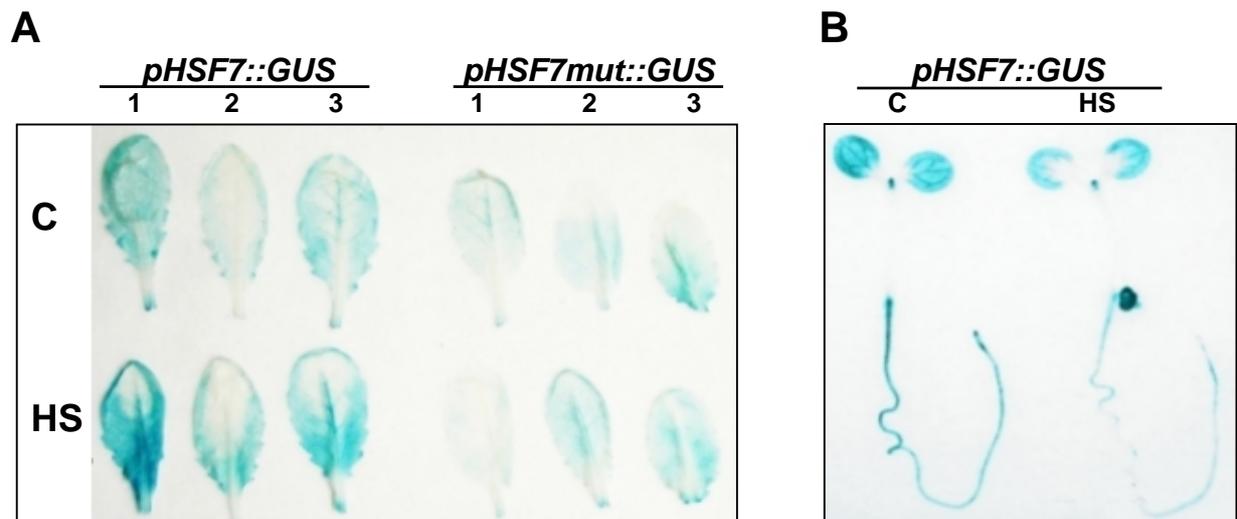


Abbildung 4.12: Histochemische GUS-Analyse von *pHSF7::GUS*- bzw. *pHSF7mut::GUS*-Pflanzen. **A)** Von je drei unabhängigen Transformanten jeder Linie wurde ein nicht-hitzegechocktes (C) und ein hitzegechocktes Blatt (HS) histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht, wie unter 3.12.11 beschrieben. **B)** Histochemische GUS-Analyse von drei Tage alten Nachkommen der Linie *pHSF7::GUS* (#1), vor (C) und nach HS. (C): 6 h bei 22°C in SIB. (HS): 2 h bei 37°C in SIB, anschließend 4 h bei 22°C in SIB.

4.7.2 Charakterisierung *HSF7*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Es wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt, die drei verschiedene *HSF7*-Konstrukte, unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors exprimieren. Das erste Konstrukt, im Folgenden mit römisch „I“ bezeichnet, führt zur Expression von *HSF7*. Das zweite Konstrukt (II) führt zur Expression eines C-terminalen *HSF7*-GUS-Fusionsproteins, zum histochemischen Nachweis der Transgenexpression. Um den Kernimport des transgenen Proteins sicherzustellen, wurde in einem dritten Konstrukt (III) *HSF7* C-terminal mit dem leicht modifizierten NLS des großen T-Antigens aus *Simian Virus 40* (SV40) fusioniert. In transgenem Tabak führte die Fusion dieses NLS mit GUS zum konstitutiven Kernimport des Fusionsproteins (van der Krol & Chua, 1991). Die entsprechenden Konstruktkarten finden sich im Anhang unter 7.1.

4.7.2.1 Nomenklatur *HSF7*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Bei der Transformation von *Arabidopsis* mittels Blütenvakuuminfiltration werden i.d.R. die weiblichen Gametophyten in den Blütenanlagen von T0-Pflanzen transformiert (Bechtold *et al.*, 2000; Desfeux *et al.*, 2000). Sich daraus entwickelnde Nachkommen stellen unabhängige Transformanten der Generation T1 dar. Sie werden primär selektioniert und sind i.d.R. heterozygot. Die T2-Generation spaltet in drei Teile Transgene und einen Teil Nicht-Transgene auf, wenn es während der Transformation zur Integration genau einer T-DNA kam. Erst durch Segregationsanalyse der Folgegeneration (T3) können homozygote Individuen einer Linie identifiziert werden. Im vorliegenden Fall wurden unabhängige Linien eines Konstruktes (hier z.B. Konstrukt I), mit I.1, I.2, I.3 usw. durchnummeriert. Der Zusatz (T1, -2, -3) zeigt an, um welche Generation es sich im Einzelfall handelt.

4.7.2.2 Phänotypische Charakterisierung *HSF7*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Für die primäre Selektion *HSF7*-transgener Pflanzen wurden jeweils etwa 120.000 Samen auf GM-Medium mit Kanamycin ausgelegt. Für Konstrukt I konnten 6 unabhängige Transformanten isoliert werden (*HSF7*-TP). Nach dem Transfer auf Erde starben die Individuen 1-3 innerhalb von 2-3 Wochen. Aus diesem Grund wurde versucht, die Individuen 4-6 *in vitro* auf GM-Medium (ohne Kanamycin mit 30% Saccharose) zur Blüte zu bringen (Abb 4.13.A). Die so kultivierten Pflanzen kamen nach zirka drei Monaten zur Blüte, ohne jedoch Nachkommen zu bilden. Auffällig an *HSF7*-TP war die geringe Lebensdauer einzelner Blätter. Bevor diese voll expandiert waren, bildeten sich nekrotische Sektoren, die meist an den Blattränder be-

gannen und sich schließlich über die gesamte Blattfläche ausdehnten. Dieser Phänotyp zeigte sich vor allem auf Erde und könnte zum Absterben der gesamten Pflanze aufgrund zu geringer Assimilationsleistung geführt haben.

Für das Konstrukt III wurden zunächst 14 Primärtransformanten (*HSF7-NLS-TP*) isoliert. Auf Erde starben 13 Individuen nach mehrwöchigem, stark retardiertem Wachstum (Abb. 4.13.B). Der Phänotyp ähnelte *HSF7-TP*, denn die Blätter starben bereits im Entstehen ab. Auffällig war außerdem eine verstärkte Bildung von Blattanlagen. Ein Individuum blieb ohne phänotypische Auffälligkeiten und bildete Nachkommen, welche kanamycinsensitiv waren. In diesem Fall könnte Transgen-Silencing vorgelegen haben. Zwei weitere Transformanten wurden *in vitro* kultiviert (nicht gezeigt) und gelangten trotz deutlicher Kurzlebigkeit der Blätter zur Blüte, ohne jedoch Nachkommen zu produzieren.

A



Abbildung 4.13: Phänotyp von *HSF7-* und *HSF7-NLS-TP*. A) Vier Wochen alte *HSF7-TP*, die durchgängig auf GM-Medium *in vitro* kultiviert worden waren. Abgebildet sind drei unabhängige Transformanten. B) *HSF7-NLS-TP* nach 7-wöchigem Wachstum auf Erde. Das 1. und 2. Bild von links zeigt je eine unabhängige Transformante. Ein einzelnes Blatt der Pflanze III.2 ist rechts zu sehen.

B

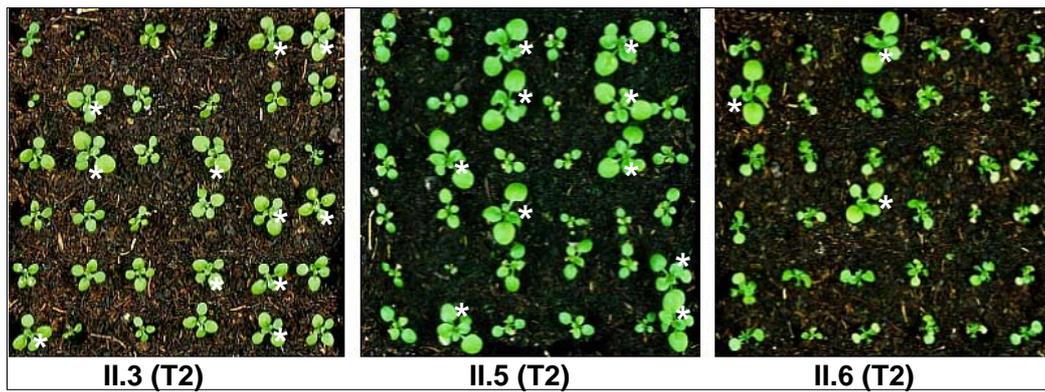


Für Konstrukt II (HSF7-GUS) konnten 9 unabhängige Transformanden isoliert werden. Von diesen zeigten 7 in unterschiedlichem Ausmaß retardiertes Wachstum und nekrotische, kurzlebige Blätter. Zwei dieser Pflanzen ähnelten stark dem Phänotyp von *HSF7-NLS-TP* und starben ohne zur Blüte zu kommen. In der Folgegeneration (T2) der übrigen 5 Linien trat ein deutlich veränderter Phänotyp nur noch in drei Linien auf (Abb. 4.14.A und B). Von 100 T2-Individuen der Linien II.3 und II.5 waren $\frac{1}{4}$ kanamycinsensitiv. Ein solches Segregationsverhalten ist zu erwarten, wenn die Mutterpflanze heterozygot für eine T-DNA war. Nur jede 16. Pflanze unter den Nachkommen der Linie II.6 war kanamycinsensitiv. In diesem Fall war es wahrscheinlich zur unabhängigen Integration von zwei T-DNA-Kopien während der Transformation gekommen.

Das Segregationsverhältnis bezüglich Kanamycinresistenz spiegelte sich auch in der Zahl der Keimlinge wider, die im Alter von 16 Tagen nach Keimung (16 DAG) auf Erde phänotypisch auffielen (Abb. 4.14.A). In diesem Alter konnten bei den Linien II.5 und II.6 deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Individuen der T2 ausgemacht werden, während für die T2 der Linie II.3 Unterschiede zwischen transgenem und aussegregiertem Phänotyp erst nach weiteren 3-4 Wochen deutlich wurde (Abb. 4.14.B, oben links).

Im Alter von 8 Wochen haben *HSF7-GUS-TP* (T2) ebenso wie der nichttransformierte Wildtyp einen Blütensproß gebildet, sie sind aber deutlich kleiner und bis auf Linie II.5 nicht im Besitz voll expandierter Blätter (Abb. 4.14.B). Transgene Pflanzen der Linie II.5 (T2) verlieren nach zirka 30 DAG den typischen Phänotyp und gleichen dann - bis auf eine geringere Gesamtgröße - dem nichttransformierten WT.

A



B

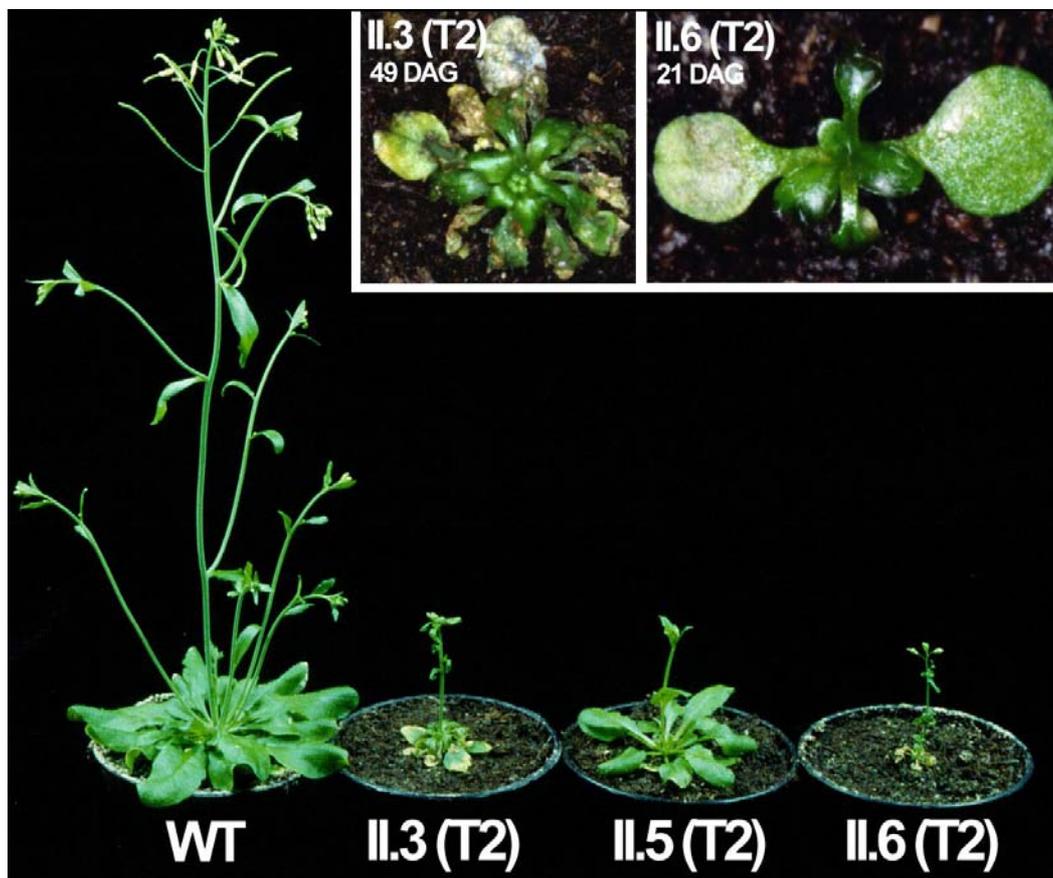


Abbildung 4.14: Phänotyp von *HSF7-GUS-TP*. Gezeigt sind T2-Pflanzen der Linien II.3, II.5 und II.3. **A)** Segregation des Phänotyps. Je 36 Individuen der Generation T2 wurden auf Erde zum Keimen gebracht und im Alter von 16 Tagen nach Keimung (16 DAG) fotografiert. Pflanzen ohne phänotypische Besonderheit sind durch einen Stern markiert. **B)** Vergleich zwischen nichttransformiertem Wildtyp (WT) und *HSF7-GUS-TP* nach 8-wöchigem Wachstum auf Erde. Als Einschub oben: Nahaufnahmen von Individuen der Linien II.3 und II.6.

Durch Segregationsanalyse wurden für die Linien II.3 und II.6 homozygote T2-Pflanzen identifiziert. Die homozygote Folgegeneration (T3) unterschied sich vom nichttransformierten WT nur noch durch eine verringerte Gesamtgröße (Abb. 4.15.A). Nur wenige Individuen besaßen Blätter mit nekrotische Sektoren.

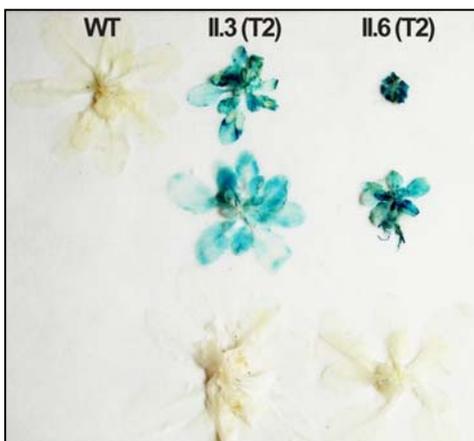
Mittels histochemischer GUS-Analyse konnte gezeigt werden, dass homozygote T3-Pflanzen geringere Mengen an HSF7-GUS exprimierten als einzelne T2-Individuen (Abb. 4.15.B und C). Alle der in Abb. 4.14.A gezeigten T2-Pflanzen, die einen auffälligen Phänotyp besaßen, waren intensiv blau-gefärbt. Individuen mit normalem Phänotyp blieben ungefärbt, hier war die T-DNA offensichtlich ausgesegregiert (exemplarisch in Abb. 4.15.B). HSF7-GUS-TP der Generation T3 zeigten eine deutliche GUS-Expression nur noch in der Wurzel. Nur bei stärkster phänotypischer Auffälligkeit waren auch Blätter blaugefärbt (Abb. 4.15.C). Insgesamt zeigte die histochemische GUS-Färbung einen deutlichen Zusammenhang zwischen Ausmaß der GUS-Expression und Auffälligkeit des Phänotyps.

A

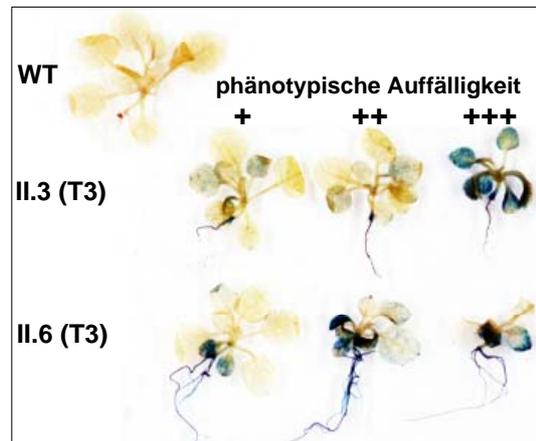


Abbildung 4.15: Phänotyp und histochemische GUS-Analyse von HSF7-GUS-TP. **A)** Vergleich von T2- und T3-Pflanzen der Linien II.3 und II.6 mit nichttransformiertem Wildtyp (WT) nach 8-wöchigem Wachstum auf Erde. **B)** und **C)** Histochemische GUS-Analyse von WT und HSF7-GUS-TP im Alter von 5 Wochen. **B)** Je drei Einzelpflanzen (T2) der Linien II.3 und II.6 mit von unten nach oben zunehmender Auffälligkeit des Phänotyps. **C)** Je drei Einzelpflanzen (T3) der Linien II.3 und II.6 mit von links nach rechts zunehmender Auffälligkeit des Phänotyps.

B



C



4.7.2.3 HSF7-Expression und DNA-bindende Komplexe in HSF7-transgenen Pflanzen

Die Expression entsprechender *HSF7*-Konstrukte wurde durch *Western*-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus Blättern der *in vitro* kultivierten *HSF7*- und *HSF7-NLS*-TP I.4 und III.15 und von *HSF7-GUS*-TP der Generation T2 mit anti Δ *HSF7*-Antikörpern nachgewiesen (siehe Pfeile in Abb. 4.16.A). Für die *HSF7*-TP (I.4) konnte eine Bande bei zirka 55 kDa detektiert werden. Sie ähnelt der Bande, die sich für den Wildtyp nach HS zeigt. Die *Western*-Analyse von Gesamtprotein aus der *HSF7-NLS*-TP (III.15) ergab eine Bande geringerer Signalstärke auf etwa gleicher Höhe (theoretische Molmasse des NLS: 2,1 kDa). Für *HSF7-GUS*-TP wurden multiple Banden detektiert, die wahrscheinlich degradierte oder unvollständige Translationsprodukte darstellen. Die Bande mit dem größten apparenten Molekulargewicht läuft bei zirka 100 kDa, was in etwa der Molmasse der *HSF7-GUS*-Fusion entspricht (theor. Molmasse von *HSF7-GUS*: 39,7 + 68,3 kDa).

EMSA- und *Supershift*-Experimente zeigten, dass der ektopisch exprimierte *HSF7* und auch die *HSF7-GUS*-Fusion in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen konstitutive HSE-Bindungsaktivität besitzen. Auch ohne HS bildeten Gesamtproteinextrakte aus *HSF7*- und *HSF7-GUS*-transgenen Pflanzen HSE-bindende Komplexe (siehe offene Pfeile in Abb. 4.16.B). Wie erwartet ergab sich dabei für *HSF7-GUS*-TP die stärkste Retardation. In manchen Fällen konnte hier eine zusätzliche, niedermolekulare Bande (geschlossener Pfeil) beobachtet werden.

Zu den konstitutiven Protein-DNA-Komplexen in *HSF7*- und *HSF7-GUS*-TP kamen nach 2-stündigem HS die für den WT typischen, hitzeinduzierten Banden hinzu (Abb. 4.16.B). Dabei ergab sich, anders als bei *HSF3*-TP, keine wesentliche Veränderung der konstitutiven, transgen-spezifischen Signale (Abb. 4.16.C). Die Beteiligung von *HSF7* an diesen konstitutiven HSE-bindenden Komplexen in *HSF7*- und *HSF7-GUS*-transgenen Pflanzen konnte durch *Supershift*-Experimente gezeigt werden (Abb. 4.16.D). Ein *Supershift* ergab sich nur, wenn anti Δ *HSF7*-Antikörper verwendet worden waren (gekippte Pfeile in Abb. 4.16.D).

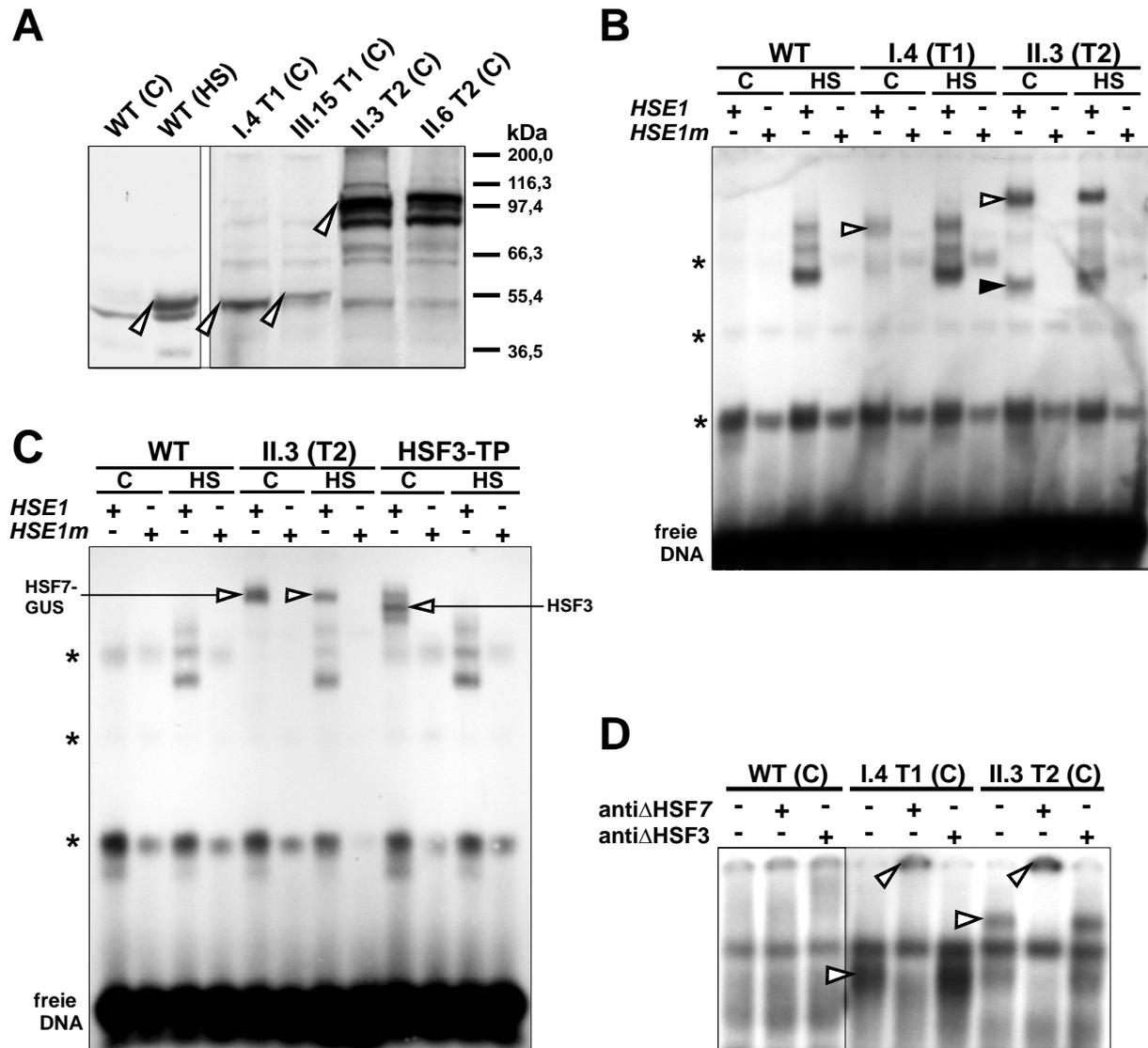


Abbildung 4.16 : Nachweis der Expression und DNA-Bindungsaktivität von HSF7 und HSF7-GUS in transgenen Pflanzen. **A)** Western-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus *HSF7* (I.4)-, *HSF7-NLS* (III.15)- und *HSF7-GUS* (II.3 und II.6)-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Für die Immundetektion von HSF7 wurden monospezifische anti Δ HSF7-Antikörper verwendet. Potentiell spezifische Signale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **B)** EMSA mit *HSF7*- und *HSF7-GUS*-transgenen Pflanzen (I.4 bzw. II.3). Je 30 μ g Gesamtprotein wurde mit 1 ng radioaktiv-markierten HSE bzw. mutierten HSE (HSEm) inkubiert und durch native PAGE elektrophoretisch separiert. Die Positionen dominanter Banden, die auch bei Verwendung mutierter HSE auftauchen und daher als nicht-HSF-spezifisch beurteilt wurden, sind durch Sterne markiert. **C)** EMSA zum Vergleich DNA-bindender Komplexe in *HSF7-GUS*- und *HSF3*-transgenen Pflanzen vor und nach HS. **D)** *Supershift* mit Gesamtproteinextrakten aus WT, *HSF7*- und *HSF7-GUS*-TP. Gesamtproteinextrakte (in 1 x TBE/0,2% Triton X100/Protease-Inhibitor-Cocktail) wurden mit jeweils 200 ng monospezifischen anti Δ HSF7- oder anti Δ HSF3-Antikörpern versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert, bevor die markierte DNA zugegeben wurde. Ansonsten wie für B) beschrieben. Horizontale Pfeile: *Shift*-Banden ohne Antikörper, gekippte Pfeile: *Supershift*-Banden mit Antikörper. C: Kontrolle, HS: 2 h bei 37°C

4.7.2.4 HS-Genexpression in HSF7-GUS-transgenen Pflanzen und Thermotoleranz

Um festzustellen, welche Funktion HSF7 bei der HS-Reaktion in *Arabidopsis* hat, wurde die Expression von sHSP, HSP90, HSF4 und HSF7 in *HSF7-GUS*-TP vor und nach HS untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der *HSF7*-Überexpression auf die Thermotoleranz transgener Pflanzen getestet.

Nach einem 2-stündigem HS bei 37°C haben *HSF7-GUS*-TP der Generation T2 gleiche Mengen von HSP90, aber deutlich geringere Mengen sHSP exprimiert als der nichttransformierte WT (Abb. 4.17.A). Eine verringerte Expression von sHSP war in der T3-Generation nicht mehr zu erkennen (Abb. 4.17.B).

In T2-Pflanzen der Linie II.3, welche auf Proteinebene den größten Unterschied zum WT in Bezug auf hitzeinduzierte Expression von sHSP zeigten, wurde die Genexpression zusätzlich durch *Northern*-Analyse untersucht (Abb. 4.17.C). Dabei konnte die Überexpression von *HSF7-GUS* in der transgenen Linie auf RNA-Ebene gezeigt werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur *Western*-Analyse dieser Pflanzen (Abb. 4.16.A) ergab die Verwendung einer *HSF7*-spezifischen Sonde starke Signale vor und nach HS, die sich über einen weiten Molmassenbereich erstrecken. Für den WT ist ein vergleichsweise schwaches, hitzeinduzierte Signal geringerer Molmasse zu erkennen. Keinen Unterschied gab es auf RNA-Ebene zwischen WT und transgenen Pflanzen bezüglich der hitzeinduzierten Expression von *HSF4*, *HSP83.1* und *HSP17.6*.

Die Überexpression von *HSF7* führte zu keiner wesentlichen Veränderung der basalen oder erworbenen Thermotoleranz der transgenen Pflanzen (Abb. 4.17.D). Ebenso wie WT-Keimlinge überlebten die transgenen Keimlinge einen 2-stündigen HS von maximal 42°C ohne vorherige Konditionierung und maximal 46°C nach einem 2-stündigem Vorschock bei 34°C.

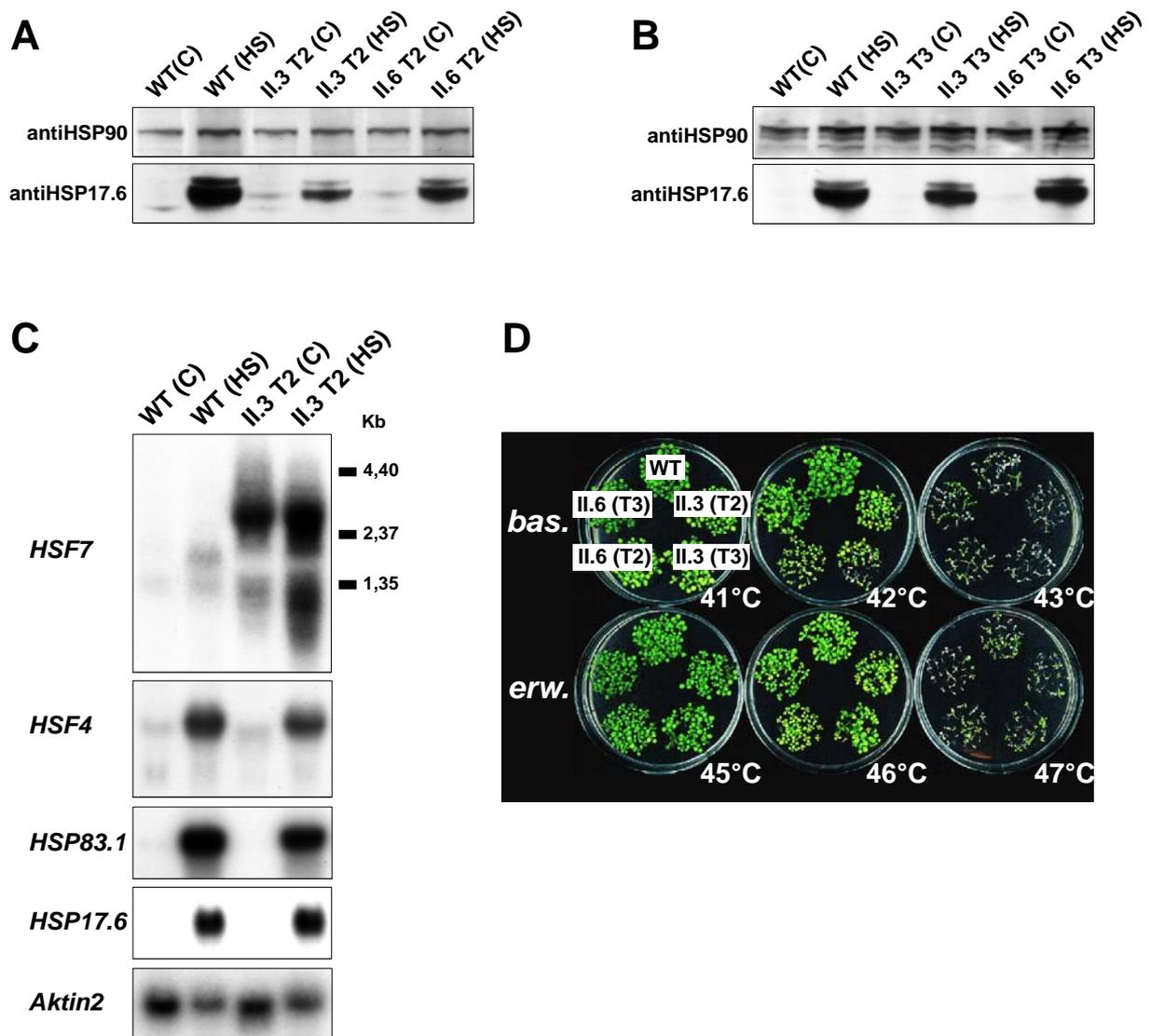


Abbildung 4.17: Genexpression in *HSF7-GUS-TP* und Thermotoleranz. **A)** und **B)** *Western*-Analyse der Expression von HSP90 und cytoplasmatischen Klasse-I-sHSP in *HSF7-GUS-TP* und nichttransformiertem Wildtyp (WT) vor (C) und nach einem 2-stündigen HS bei 37°C. Je 30 µg Gesamtprotein wurde durch SDS-PAGE separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Für die Immundetektion von sHSP wurde antiHSP17.6-Antiserum verwendet. Die Immundetektion von HSP90 erfolgte mit einem polyklonalen antiAtHSP90-Antiserum (Krishna *et al.*, 1997) **A)** *HSF7-GUS-TP* der Generation T2. **B)** *HSF7-GUS-TP* der Generation T3. **C)** *Northern*-Analyse der Expression von *HSF7*, *HSF4*, *HSP83.1* und *HSP17.6* in *HSF7-GUS-TP* der Linie II.3 und WT. Je 20 µg Gesamt-RNA aus nicht-hitzegechockten (C) oder hitzegechockten (HS: 2 h bei 37°C) Blättern wurde für den *Northern-Blot* eingesetzt. Die Hybridisierung mit einer *in vitro* transkribierten *HSF7*-Sonde erfolgte bei 55°C in Hybridisierungslösung mit Formamid. Die übrigen Sonden waren über *random priming* markiert worden. Hier erfolgte die Hybridisierung ohne Formamid bei 65°C. Die Hybridisierung mit einer *Aktin2*-Sonde diente als Ladekontrolle. **D)** Basale (bas.) und erworbene (erw.) Thermotoleranz von 7 Tage alten WT- und *HSF7-GUS*-transgenen Keimlingen. Die *in vitro* kultivierten Keimlinge waren für 2 h bei der jeweils angegebenen Temperatur inkubiert worden. Im Falle der erworbenen Thermotoleranz war eine 2-stündige Inkubation bei 34°C vorausgegangen. Der biologische Effekt wurde nach einer weiteren Woche unter normalen Wachstumsbedingungen fotografiert.

4.8 Isolierung und Charakterisierung von *HSF*-Mutanten

Um *HSF*-Mutanten zu isolieren, wurden insgesamt 73.080 unabhängige *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinien mittels PCR durchmustert (zur Vorgehensweise: Kap. 3.11.5). Dabei wurden für *HSF1*, -2 und -3 je eine Insertionslinie und für *HSF7* drei unabhängige Insertionslinien identifiziert (*hsf1-tt1*, *hsf2-tt1*, *hsf3-tt1* und *hsf7-tt1*, -2, -3). Die Linien *hsf1-tt1*, *hsf2-tt1*, *hsf7-tt2* und *hsf7-tt3* waren in den Subpopulationen CSI3249 bzw. CSI1091 bzw. CSI2653 bzw. CSI745 der Wisconsin-Alpha-Linien vertreten. Die Linien *hsf3-tt1* und *hsf7-tt1* konnten aus den Subpopulationen P6100 bzw. CS2643 der Feldmann-Linien isoliert werden.

4.8.1 Integrationsorte der T-DNA in *HSF*-Insertionsmutanten

Durch gelelektrophoretische Analyse und Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte (Abb. 4.18.A) wurde der jeweilige Integrationsort der T-DNA im entsprechenden *HSF*-Gen bestimmt (Abb. 4.18.B). Die Kombination genspezifischer 5'- und 3'-Primer führte in keinem der Fälle zu einem PCR-Produkt, wenn genomische DNA von homozygoten Pflanzen (bezüglich T-DNA-Insertion) verwendet worden war (nicht gezeigt). Die T-DNA-Integrate waren offensichtlich zu groß (> 4 Kb), um unter den gewählten Bedingungen amplifiziert zu werden. Die Linie *hsf1-tt1* trägt eine T-DNA-Insertion im zweiten Exon von *HSF1*. Sowohl bei *hsf2-tt1* als auch bei *hsf3-tt1* ist die T-DNA in das erste Intron integriert. Die drei unabhängigen *HSF7*-Insertionsmutanten tragen die T-DNA jeweils im 5'-UTR (*hsf7-tt2*), im 2. Exon (*hsf7-tt3*) oder im 3'-UTR (*hsf7-tt1*). Die Übergänge von T-DNA- zu *HSF*-Sequenzen finden sich im Anhang unter 7.6. Die relative Lage der T-DNA-Insertionen bei Übertragung auf die *HSF*-Genprodukte ist in Abb. 4.1 dargestellt.

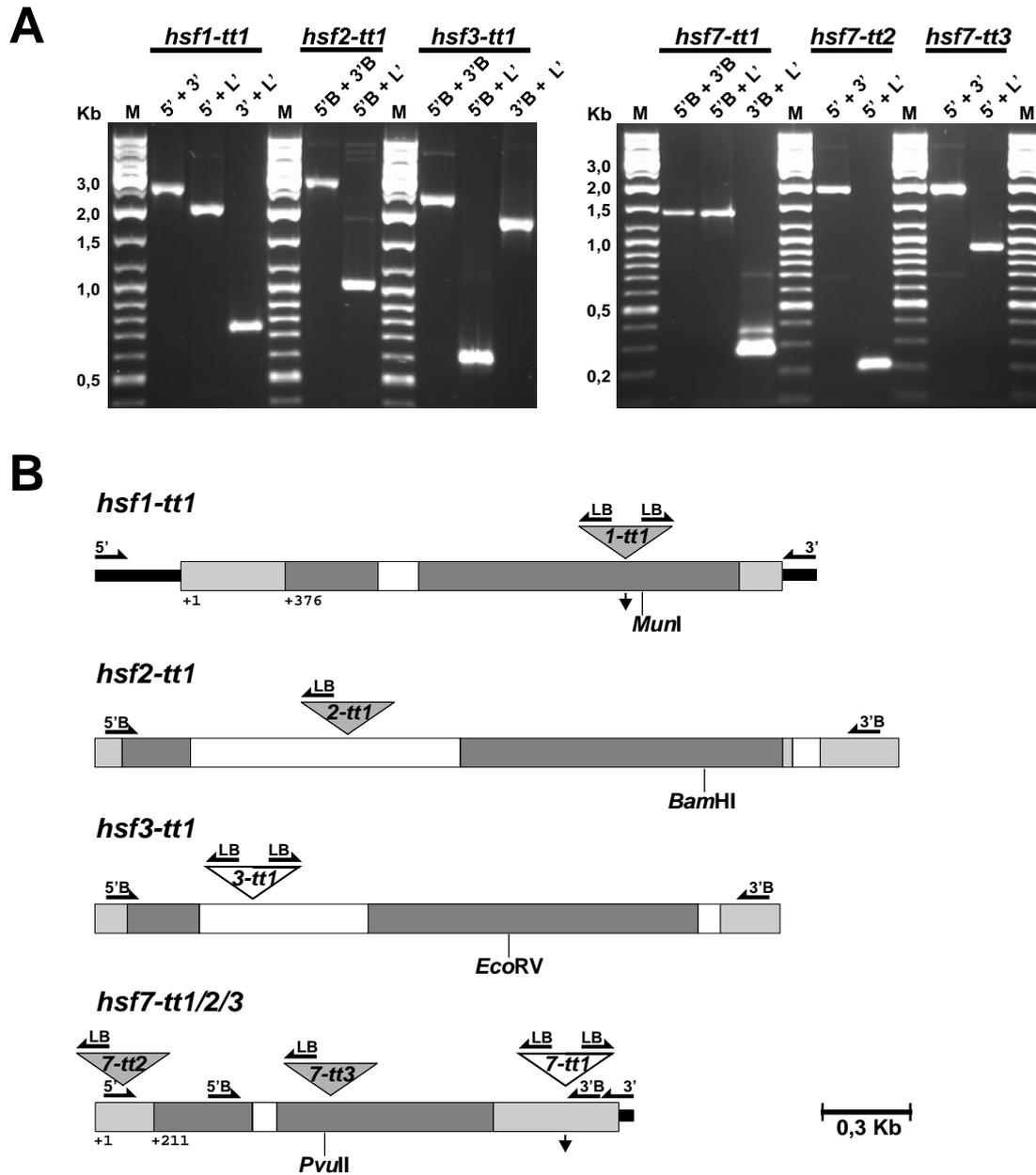


Abbildung 4.18: Integrationsorte der T-DNAs in *HSF*-Genen der Insertionslinien *hsf1-tt1*, *hsf2-tt1*, *hsf3-tt1*, *hsf7-tt1*, *hsf7-tt2* und *hsf7-tt3*. **A)** Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte, nach Verwendung genspezifischer 5'- und 3'-Primer bzw. deren Kombination mit dem T-DNA *left border* Primer (LB). Als *template* war genomische DNA von heterozygoten Pflanzen der jeweiligen Insertionslinie verwendet worden. Als Molekularmassenstandard (M) diente die Gene Ruler™ DNA ladder von MBI Fermentas. **B)** Schematische Darstellung der *HSF*-Genstruktur und Lage der T-DNA. T-DNA-Insertionen aus Wisconsin-Linien sind durch graue Dreiecke, die aus Feldmann-Linien durch offene Dreiecke symbolisiert. Deletionen an Insertionsorten sind durch vertikale Pfeile markiert. Lage und Orientierung verwendeter Primer sind durch horizontale Pfeile markiert. Sofern bekannt, ist der Transkriptionsstart (+1) markiert. Angegeben sind ferner Restriktionschnittstellen, die zur Herstellung spezifischer Gensonden verwendet wurden. Schwarze Balken: NTR, graue Boxen: 5'- und 3'-UTR, grau und schraffiert: CDS, weiße Boxen: Introns. Nicht maßstabsgerecht: Primer und T-DNA-Sequenzen.

4.8.2 Einfluss der T-DNA-Insertion auf die DNA-Bindungsaktivität der HSF

Mittels Immunpräzipitationsassay wurde untersucht, ob die T-DNA-Insertion die DNA-Bindungsaktivität der betroffenen HSF beeinflusst. Dazu wurden von Gesamtproteinextrakten aus nicht-hitzegechockten und hitzegechockten (HS: 2 h 37°C) Blättern der Linien *hsf1-tt1*, *hsf3-tt1*, *hsf7-tt1*, *hsf7-tt2*, *hsf7-tt3* und WT-Pflanzen Immunpräzipitate mit jeweils anti Δ HSF1-, anti Δ HSF3- und anti Δ HSF7-Antiserum hergestellt und die DNA-Bindungsaktivität, wie unter 3.12.6 (b) beschrieben, bestimmt. Da die DNA-Bindungsaktivität von HSF2 mit dieser Methode auch in Wildtyp-Extrakten nicht nachzuweisen ist, wurde die Linie *hsf2-tt1* hier ausgespart.

Wie in Abb. 4.19 zu sehen, ist eine HSF1-HSE-Bindungsaktivität in der Linie *hsf1-tt1* praktisch nicht nachweisbar (durch Pfeile hervorgehoben). In allen anderen Linien ist eine konstitutive HSE-Bindungsaktivität zu messen, die nach HS in etwa um den Faktor 1,8 ansteigt (siehe auch: Kap. 4.5). Ähnlich die Situation für HSF3: Keine HSE-Bindungsaktivität in der Linie *hsf3-tt1*, unveränderte Werte in allen anderen Linien. Bei Verwendung von anti Δ HSF7-Antiserum allerdings zeigen auch die drei *HSF7*-T-DNA-Insertionslinien eine deutlich hitzeinduzierte DNA-Bindungsaktivität, die in ihrem Ausmaß mit den WT-Werten zu vergleichen ist.

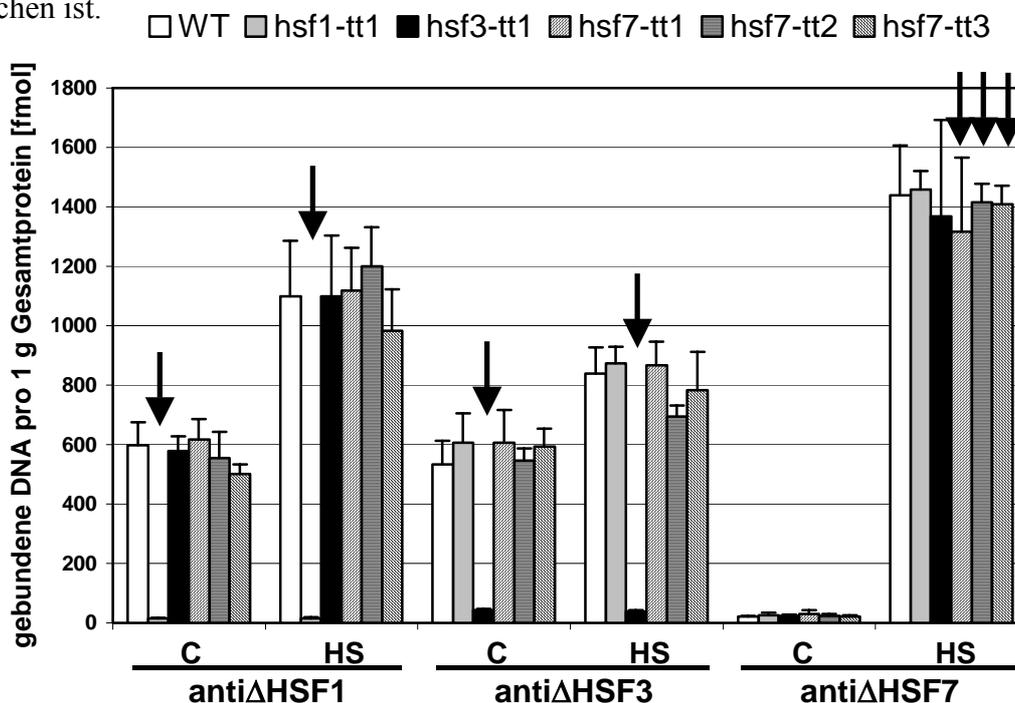


Abbildung 4.19: Immunpräzipitationsassay zur Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität von HSF1, -3 und -7 in den T-DNA-Insertionslinien *hsf1-tt1*, *hsf3-tt1*, *hsf7-tt1*, *hsf7-tt2*, *hsf7-tt3* und WT-Pflanzen vor und nach HS (2 h 37°C). Unter Verwendung entsprechender Antiseren wurden Immunpräzipitate aus je 3 mg Gesamtprotein erzeugt und mit 2 ng (141,75 fmol) radioaktiv-markierten HSE inkubiert. Nach Entfernen ungebundener DNA wurde die gebundene DNA-Menge durch LSC bestimmt. Säulen repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

4.8.3 HSF- und HSP-Expression in *HSF*-Mutanten und Thermotoleranz

In welcher Weise sich die T-DNA-Insertionen auf die Transkription der betroffenen *HSF*-Gene und nachfolgend auf die Expression von HS-Genen auswirken, wurde durch *Northern*-Analyse untersucht. Außerdem wurde exemplarisch die Expression von sHSP bei unterschiedlichen HS-Bedingungen auf Proteinebene und der Einfluss auf basale und erworbene Thermotoleranz der *HSF*-Mutanten ermittelt.

In der *Northern*-Analyse der *HSF1*-Expression in *hsf1-tt1* können die für den WT typischen Banden nicht nachgewiesen werden (Abb.4.20.A). Stattdessen werden neue, niedermolekulare Transkripte detektiert. Diese könnten durch vorzeitige Termination der Transkription von *HSF1* aufgrund der T-DNA-Insertion im 2. Exon zustande gekommen sein.

Die Hybridisierung von *hsf2-tt1*-RNA mit einer *HSF2*-Sonde führt zum Auftreten ähnlicher Signale wie im WT, zusätzlich werden jedoch deutlich stärkere, höhermolekulare Banden detektiert. Dabei könnte es sich um eine neue Spleißvariante von *HSF2* handeln, die durch die T-DNA-Integration im ersten Intron zustande kommt. Denkbar ist auch die Initiation der Transkription durch einen T-DNA-Promotor, welche zur transkriptionellen Fusion von T-DNA- und angrenzenden *HSF2*-Bereichen führt.

In *hsf3-tt1*-Pflanzen kann durch *Northern*-Analyse kein *HSF3*-Transkript detektiert werden. Die T-DNA-Insertion im 1. Intron beendet entweder die Transkription vorzeitig und/oder führt zu einer Destabilisierung des Transkripts.

Die Insertion der T-DNA in den 3'-UTR bleibt ohne Auswirkungen für die hitzeinduzierte Expression von *HSF7* (siehe: *hsf7-tt1* in Abb. 4.20.A). Dagegen kommt es in *hsf7-tt2*-Pflanzen nicht mehr zu Hitzeinduktion der *HSF7*-Expression; hier ist die T-DNA im 5'-UTR lokalisiert. Bei den verbleibenden Banden könnte es sich um konstitutiv-exprimierten *HSF7* handeln. Dabei bleibt jedoch offen, warum die Transkriptgröße nicht durch die T-DNA-Insertion zunimmt. Bei *hsf7-tt3* handelt es sich um einen kompletten *HSF7*-knockout. Die proximale Insertion der T-DNA in Exon 2 verhindert offensichtlich die Bildung detektierbarer *HSF7*-Transkripte.

Aufgrund der ermittelten Daten handelt es sich zumindest bei den Linien *hsf1-tt1*, *hsf3-tt1* und *hsf7-tt3* um *HSF*-knockout-Mutanten. Dennoch konnten bei diesen Linien nach einem 2-stündigen HS bei 37°C im Vergleich zum WT keine reproduzierbaren Unterschiede in der Expression von *HSP83.1* und *HSP17.6* gefunden werden (Abb. 4.20.A). Auch die Immundetektion von Klasse-I-sHSP bei unterschiedlichen HS-Temperaturen ergibt für alle Linien dem WT ähnliche Signalstärken (Abb. 4.20.B). Außerdem besitzen sämtliche *HSF*-Mutanten die gleiche basale und erworbene Thermotoleranz wie WT-Pflanzen (Abb. 4.20.C).

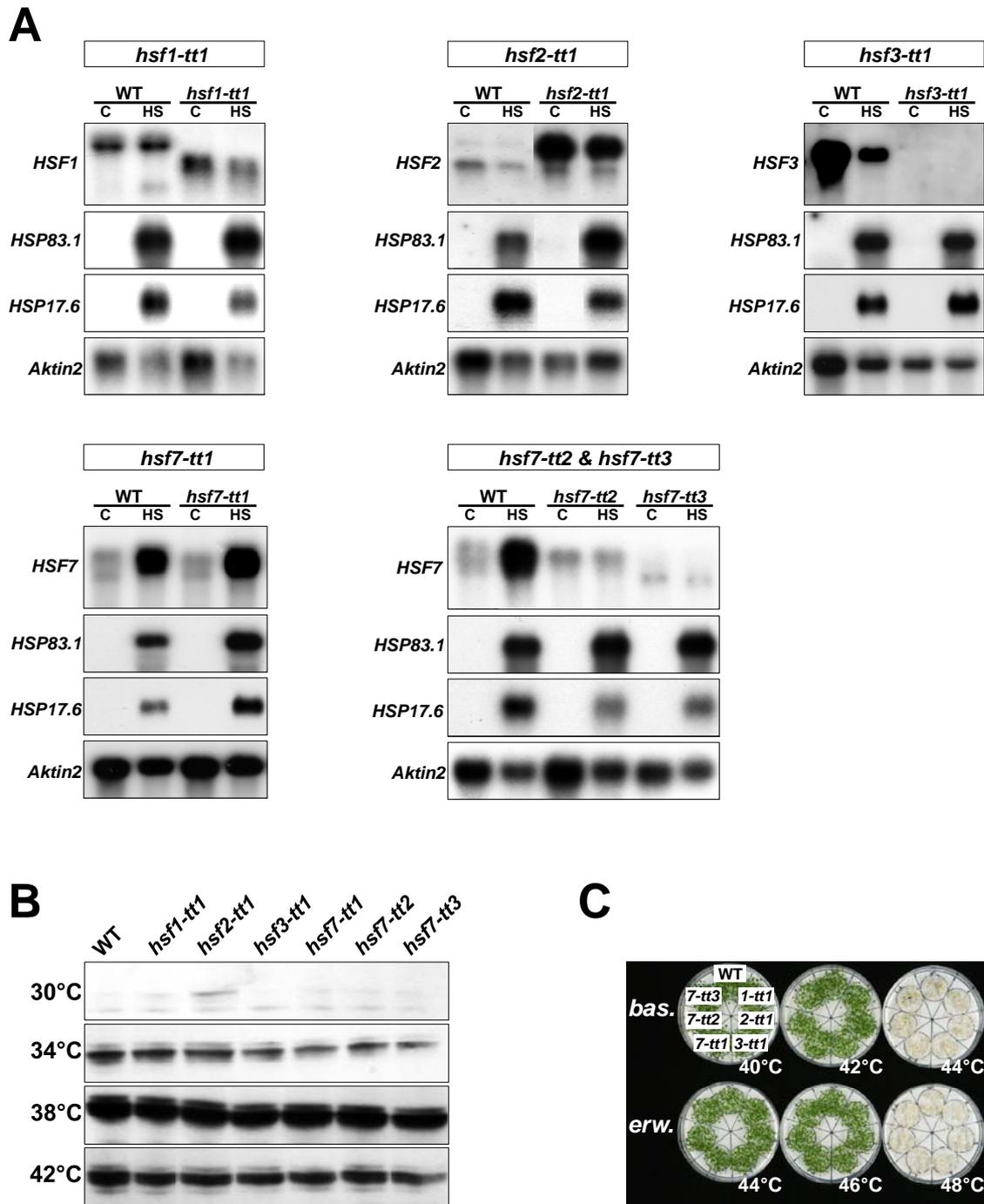


Abbildung 4.20: Genexpression in T-DNA-Insertionslinien *hsf1-tt1*, *hsf2-tt1*, *hsf3-tt1*, *hsf7-tt1*, *hsf7-tt2*, *hsf7-tt3* und Thermotoleranz. **A)** Northern-Analyse. Je 3 μg poly(A)⁺-RNA aus nicht-hitzegechockten (C) und hitzegechockten Blättern (HS; 2 h 37°C) von WT-Pflanzen und T-DNA-Insertionslinien wurden für den Northern-Blot eingesetzt. Die Hybridisierung mit *in vitro* transkribierten HSF-Sonden (Kap. 3.4.1) erfolgte in Hybridisierungslösung mit Formamid bei 55°C. Die übrigen Sonden waren über *random priming* markiert worden. Hier erfolgte die Hybridisierung ohne Formamid bei 65°C. Die Hybridisierung mit einer *Aktin2*-Sonde diente als Ladekontrolle. **B)** Western-Analyse der Expression von Klasse-I-sHSP. Sieben Tage alte Keimlinge wurden auf Platte für 2 h bei der jeweils angegebenen Temperatur inkubiert. Je 30 μg Gesamtprotein wurde durch SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Für die Immundetektion wurde antiHSP17.6-Antiserum verwendet. **C)** Basale (bas.) und erworbene (erw.) Thermotoleranz von 7 Tage alten Keimlingen. Die *in vitro* kultivierten Keimlinge wurden für 2 h bei der jeweils angegebenen Temperatur inkubiert. Im Falle der erworbenen Thermotoleranz war eine 2-stündige Inkubation bei 34°C vorausgegangen. Der biologische Effekt wurde nach einer weiteren Woche unter normalen Wachstumsbedingungen fotografiert.

4.9 Charakterisierung der *HSF1*- und *HSF3*-Doppelmutante *hsf1⁻/hsf3⁻*

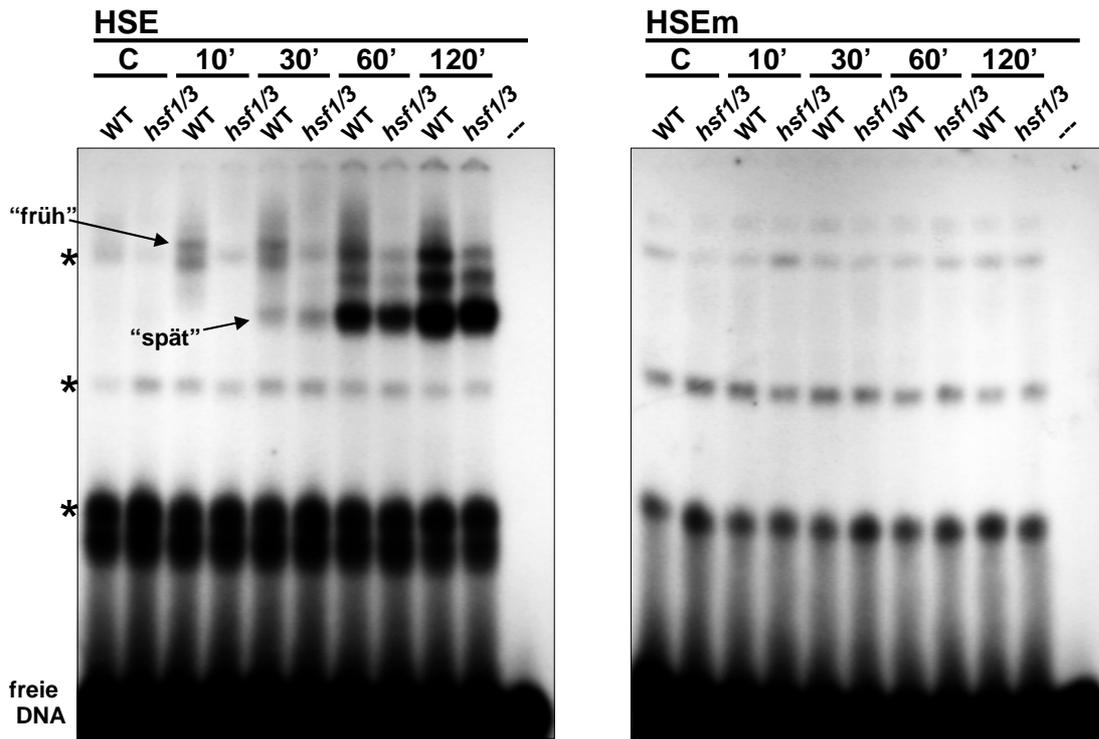
Die beiden Einzelmutanten *hsf1-tt1* und *hsf3-tt1* zeigten keine veränderte HS-Reaktion (4.8). Um zu untersuchen, ob das gleichzeitige Fehlen beider Klasse-A-HSF Auswirkungen auf die HS-Reaktion in *Arabidopsis* hat, wurde durch Kreuzung beider Linien die *HSF1*- und *HSF3*-Doppelmutante *hsf1⁻/hsf3⁻* erzeugt, die im Folgenden mit *hsf1/hsf3* oder verkürzt mit *hsf1/3* bezeichnet wird. Als WT-Kontrolle bei der Analyse von *hsf1/3* wurden Geschwisterpflanzen verwendet, bei denen beide T-DNA-Insertionen aussegregiert waren (Kap. 3.10).

4.9.1 HSE-bindende Komplexe in *hsf1/3*-Pflanzen

Zunächst wurde mittels EMSA untersucht, ob sich das gleichzeitige Fehlen von HSF1 und HSF3 auf die Bildung HSE-bindender Komplexe auswirkt (Abb. 4.21). Der Vergleich mit WT-Pflanzen zeigt das vollständige Fehlen der hochmolekularen Protein-DNA-Komplexe, die in WT-Extrakten bereits nach 10-minütigem HS zu registrieren sind (Abb. 4.21.A, „früh“). Dagegen bleibt die Kinetik und die Stärke, mit der die Komplexe größerer Mobilität nach längerem HS auftreten, fast unverändert (Abb. 4.21.A, „spät“). Bei Verwendung mutierter HSE ergeben sich keine Unterschiede zwischen WT und Doppelmutante (Abb. 4.21.A, rechts).

Im Gegensatz zur Doppelmutante werden in den Einzelmutanten *hsf1-tt1* und *hsf3-tt1* die gleichen Protein-DNA-Komplexe gebildet wie im WT. Auffallend ist jedoch bereits eine Verringerung der Signalstärken der höhermolekularen, früh auftretenden Komplexe, welche schließlich in der Doppelmutante völlig fehlen. (Abb. 4.21.B, „früh“).

A



B

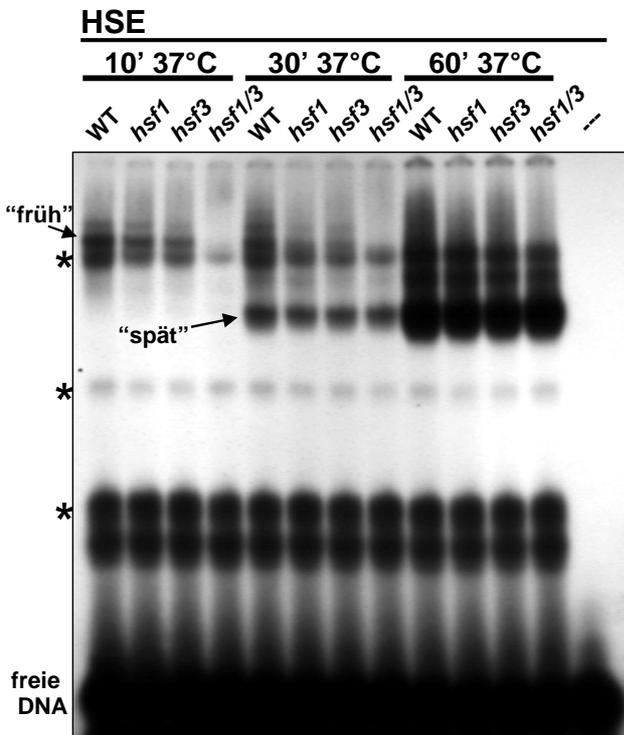


Abbildung 4.21: EMSA mit Gesamtprotein-extrakten aus WT, HSF-Einzelmutanten *hsf1-tt1* (*hsf1*) und *hsf3-tt1* (*hsf3*) und Doppelmutante *hsf1/3*. Je 40 µg Gesamtprotein aus Blättern, die für angegebene Zeiten bei 37°C inkubiert worden waren, wurde mit radioaktiv-markierten HSE bzw. HSEm versetzt und durch native PAGE elektrophoretisch separiert. Die Positionen dominanter Banden, die auch bei Verwendung mutierter HSE auftauchen und daher als nicht-HSF-spezifisch beurteilt wurden, sind durch Sterne markiert. **A)** Vergleich zwischen WT und *hsf1/3*. Links wurden HSE, rechts wurden HSEm verwendet. **B)** Vergleich zwischen WT, Einzelmutanten (*hsf1* & *hsf3*) und Doppelmutante (*hsf1/3*).

4.9.2 Northern- und Western-Analyse der Genexpression in *hsf1/3*-Pflanzen

Durch Northern- und Western-Analysen wurde die hitzeinduzierte Expression von HS-Genen in der *HSF*-Doppelmutante *hsf1/3* untersucht.

Vor allem in der Anfangsphase der HS-Reaktion sind die Transkriptmengen von *HSP83.1* und *HSP17.6* in *hsf1/3*-Pflanzen im Vergleich zum WT und den *HSF*-Einzelmutanten deutlich reduziert (Abb. 4.22.A, 10 min 37°C). Erst nach 30-minütigem HS erreichen die Signale für die Doppelmutante ähnliche Intensitäten wie die der übrigen Linien nach 10 min HS. Nach einem HS von 2 h bei 37°C werden in allen Linien vergleichbare Transkriptmengen von *HSP83.1* und *HSP17.6* detektiert. Die Western-Analyse der Klasse-I-sHSP-Expression ergibt nach 30-minütigem HS schwächere Signale in der Doppelmutante als im WT oder den beiden Einzelmutanten (Abb. 4.22.B). Dabei spielt es keine Rolle, ob die Temperatur 34°C oder 38°C betragen hat. Die Kinetik, mit der detektierbare sHSP-Mengen nach HS auftreten, ist in der Doppelmutante im Vergleich zum WT deutlich verzögert. Sowohl bei 34°C als auch bei 38°C können sHSP im WT bereits nach 15-minütigem HS detektiert werden, für die Doppelmutante ergeben sich vergleichbare Signalstärken erst nach 30-minütigem HS (Abb. 4.22.C). Nach einem HS von 2 h sind die Unterschiede zwischen WT und Doppelmutante nur noch gering. Insgesamt korrelieren daher die Ergebnisse der Western- und der Northern-Analyse.

Falls die verringerte Expression von sHSP in der *HSF*-Doppelmutante alleine von der Zeit abhängt, die der Pflanze für die HS-Reaktion zur Verfügung steht, sollten keine Unterschiede zum WT auftreten, wenn dem HS eine längere Erholungsphase folgt. Dies ist nicht der Fall, wie in Abb. 4.22.D zu sehen. Auch nach einer Erholungsphase von einer Stunde bei 22°C im Anschluß an den HS haben *hsf1/3*-Pflanzen deutlich geringere sHSP-Mengen gebildet als der WT. Unabhängig von der Inkubationszeit treten außerdem die Unterschiede zum WT bezüglich der Expression von sHSP auf, wenn alleine die Temperatur des HS variiert wurde (Abb. 4.22.E). Nach 2-stündiger Inkubation der Pflanzen bei 30°C können im WT, nicht aber in der Doppelmutante sHSP detektiert werden. Erste, schwache Signale ergeben sich für die Doppelmutante bei 31°C. Der Unterschied zum WT bleibt auch bei 32°C deutlich und geht bei 33°C schließlich verloren.

Deutliche Unterschiede zwischen *hsf1/3*- und WT-Pflanzen bezüglich der HSP-Expression ergab vor allem die Reaktion auf niedrige HS-Dosen, welche entweder durch verringerte Inkubationszeiten bei konstanter HS-Temperatur (Abb. 4.22.A-D) oder durch niedrigere HS-Temperaturen bei konstanter Inkubationszeit (Abb. 4.22.E) appliziert werden konnten.

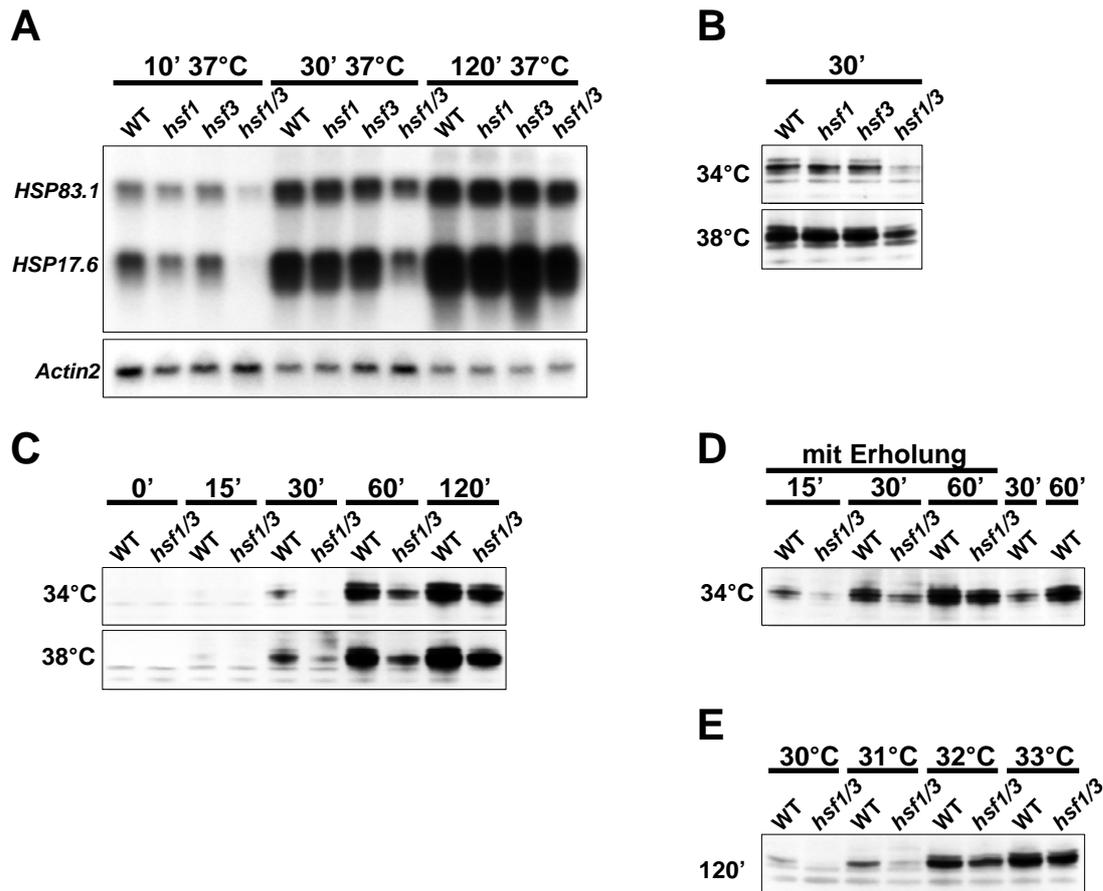


Abbildung 4.22: Genexpression in *HSF1*- und *HSF3*-Doppelmutante *hsf1/3*. **A)** und **B)** Vergleich mit Einzelmutanten *hsf1-tt1* (*hsf1*) und *hsf3-tt1* (*hsf3*). **A)** Für die *Northern*-Analyse wurden je 3 μg poly(A)⁺-RNA aus Blättern, die für angegebene Zeiten bei 37°C in SIB-Puffer inkubiert worden waren, verwendet. Die gleichzeitige Hybridisierung mit einer *HSP17.6* und einer *HSP83.1*-Sonde erfolgte ohne Formamid bei 65°C. Die Hybridisierung mit einer *Aktin2*-Sonde diente als Ladekontrolle. **B)** bis **E)** *Western*-Analyse der Expression von Klasse-I-sHSP. Je 30 μg Gesamtprotein wurde durch SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und auf Nitrocellulose transferiert. Für die Immundetektion wurde antiHSP17.6-Antiserum verwendet. **B)** Blätter waren für 30 min bei 34 oder 38°C inkubiert worden. **C)** Kinetik der Expression von sHSP bei 34°C und 38°C. **D)** Sofern angegeben, war dem jeweiligen HS eine Erholungsphase von 1 h bei 22°C gefolgt, bevor Proteine extrahiert wurden. **E)** HS mit Temperaturgradient von 22°C bis 36°C bei konstanter Inkubationszeit von 2 h.

4.9.3 Real-Time-PCR zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene

Mittels quantitativer *Real-Time-PCR* wurden die Transkriptmengen von *HSF1*, *HSF3*, *HSF4*, *HSF7*, *HSP17.6.A* (Y14070), *HSP18.2* (X17295), *HSP70* (AJ002551), *HSP83.1* (M62984) und *HSP101* (AF218796) in WT- und *hsf1/3*-Pflanzen vor und nach HS bestimmt. Dabei wurden die Transkriptmengen jeweils nicht absolut, sondern in Relation zur *Aktin2*-mRNA-Menge in [%] ausgedrückt (Abb. 4.23 und Abb. 4.24, Y-Achse). Dieser interne Standard wurde gewählt, da *Northern*-Analysen keine Hinweise für eine differentielle Regulation der *Aktin2*-Expression in *HSF*-Mutanten und unter HS-Bedingungen ergeben hatten (Abb. 4.22.A). Die Skalierung der Y-Achse in Abb. 4.24 wurde nicht vereinheitlicht, um eine best-

mögliche graphische Darstellung des Unterschieds von Expressionsstärke und -kinetik einzelner Gene zwischen WT- und *hsf1/3*-Pflanzen zu erreichen.

Die Ergebnisse der *Northern*-Analysen legten bereits nahe, dass es sich bei *hsf1-tt1* und *hsf3-tt1* um Nullmutationen handelt (Abb. 4.20.A). Dies kann mittels *Real-Time-PCR* bestätigt werden. In der Doppelmutante *hsf1/3* können praktisch keine *HSF1*- und *HSF3*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 4.23). Geringfügige Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA könnten die Ursache für das sporadische Entstehen von PCR-Produkten sein, die den Schwellenwert zu einem ähnlichen Zeitpunkt überschreiten wie in Kontrollexperimenten, in denen mRNA ohne cDNA-Synthese als *template* eingesetzt worden war (nicht gezeigt).

Im WT schwanken die Transkriptmengen von *HSF1* und *HSF3* je nach Dauer des HS (Abb. 4.24). Aufgrund der insgesamt sehr niedrigen Werte für diese beiden HSF könnten diese Unterschiede durch experimentell bedingte Schwankungen bei der Bestimmung des internen Standards (*Aktin2*) zustande kommen. Nicht auszuschließen ist außerdem eine geringe Hitze-regulation der *Aktin2*-Expression, welche sich vor allem bei der Verrechnung mit den niedrigen HSF-Werten sichtbar auswirken könnte. Die Standardabweichungen lassen jedoch den Schluss zu, dass die Expression von *HSF1* und *HSF3* hitzereguliert ist. In welcher Weise einzelne Schwankungen signifikant und typisch für den Verlauf der HS-Reaktion sind, muss durch zusätzliche Messpunkte verifiziert werden.

Die hitzeinduzierte Expression von *HSF4* und *HSF7* in WT-Pflanzen, welche bereits in *Northern*-Analysen gezeigt wurde (Abb. 4.4), wird durch die Ergebnisse der *Real-Time-PCR* quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass *HSF4* unter Kontrollbedingungen zirka 17-fach stärker exprimiert wird als *HSF7*. *HSF4*-mRNA ist somit ohne HS abundanter als alle anderen gemessenen mRNAs (Abb. 4.23). Die zweitabundanteste mRNA in *Arabidopsis*-Blättern unter Nichthitzeschockbedingungen ist in dieser Analyse die von *HSF3* gefolgt von der mRNA für das Hitzeschockprotein *HSP83.1*. Die relativen Expressionsstärken von *HSF4* und *HSF7* erreichen im WT nach 1-stündigem HS ein Maximum, wobei sie um den Faktor 68 bzw. 36 hitzeinduziert sind. Nach 2-stündigem HS haben die Werte bereits wieder deutlich abgenommen (Abb. 4.24). Dieser Kinetik der Hitzeinduktion folgen im WT sämtliche HSP-Gene mit Ausnahme von *HSP18.2*, dessen Expressionsstärke zwischen 1 h und 2 h HS weiter zunimmt (Abb. 4.24). Beim Vergleich mit *HSP17.6A*, einem Vertreter der zytoplasmatischen Klasse-II-sHSP, fällt eine verzögerte HS-Induktion des zytoplasmatischen Klasse-I-*HSP18.2* auf. Während die *HSP17.6A*-mRNA innerhalb der ersten 10 min HS um den Faktor 605 zunimmt, erreicht die *HSP18.2*-mRNA in diesem Zeitraum lediglich das 29-fache der Ausgangsmenge und somit den mit Abstand geringsten Wert aller untersuchten *HSP*-mRNAs

(Abb. 4.23). Nach 1-stündigem HS hat die mRNA-Menge von *HSP17.6A* um den Faktor 58.600 gegenüber dem Kontrollwert zugenommen (Abb. 4.23). *HSP17.6A* weist daher die höchste relative Hitzeinduktion auf. Am abundantesten aber ist nach 1-stündigem HS die mRNA von *HSP101*, die Menge entspricht dann dem 119-fachen der *Aktin2*-mRNA.

In *hsf1/3*-Pflanzen werden *HSF4*, *HSF7* und alle untersuchten HSP-Gene in ähnlichem Ausmaß konstitutiv exprimiert wie im WT (Abb. 4.23). Auch in *hsf1/3*-Pflanzen steigen die HSP-Transkriptmengen bereits nach 10-minütigem HS an, jedoch deutlich geringer als im WT. So werden erst nach 1-stündigem HS mRNA-Mengen gemessen, wie im WT nach zirka 20 min HS. Am stärksten betroffen ist die hitzeinduzierte Expression von *HSP18.2* in *hsf1/3*-Pflanzen. Hier erfolgt innerhalb der ersten 10 min keine HS-Induktion und auch nach 1-stündigem HS ist die *HSP18.2*-mRNA-Menge immer noch um den Faktor 110 niedriger als im WT (Abb. 4.23). Auch der im WT deutliche Rückgang der Transkriptmengen im weiteren Verlauf der HS-Reaktion findet so in *hsf1/3*-Pflanzen nicht statt. Vielmehr erreichen die mRNA-Mengen nach 30 - 60 min HS ein niedriges, aber konstantes Plateau (*HSF4*, *HSF7*) oder nehmen sogar weiterhin zu (*HSP17.6A*, *HSP18.2*, *HSP70*, *HSP101*). Lediglich die mRNA-Menge von *HSP83.1* nimmt auch in *hsf1/3*-Pflanzen zwischen 1 h und 2 h HS signifikant ab (Abb. 4.24).

HS[min]	<i>HSF1</i>		<i>HSF3</i>		<i>HSF4</i>		<i>HSF7</i>	
	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>
0	1,41	0,02	4,03	0,05	16,96	14,37	0,90	1,30
10	0,59	0,00	3,49	0,04	184,29	41,86	9,04	4,66
30	0,73	0,02	3,08	0,02	767,71	70,31	21,07	11,05
60	2,74	0,00	4,18	0,01	1153,12	110,50	31,97	14,36
120	4,32	0,06	1,76	0,02	430,17	103,21	9,68	13,79
IF	2	-	1	-	68	8	36	11

HS[min]	<i>HSP17.6A</i>		<i>HSP 18.2</i>		<i>HSP70</i>		<i>HSP83.1</i>		<i>HSP101</i>	
	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>	WT	<i>hsf1/3</i>
0	0,08	0,07	0,44	0,37	0,78	0,34	3,52	3,73	1,33	1,09
10	604,99	113,07	12,76	0,18	518,15	131,79	625,14	256,86	938,51	289,96
30	3182,77	929,31	513,10	6,67	2896,38	898,12	3363,00	1187,30	6225,86	2743,53
60	4686,33	1486,13	1653,51	12,44	6831,99	1551,79	6466,63	3032,39	11934,89	3411,14
120	2883,09	2257,25	1927,87	259,51	3168,99	2509,42	3226,54	1904,81	5840,03	4768,23
IF	58579	21230	3758	34	8759	4564	1837	813	8974	3129

Abbildung 4.23: Transkriptmengen verschiedener *HSF*- und *HSP*-Gene in Blättern von WT- und *hsf1/hsf3*-Pflanzen vor HS (0) bzw. nach 10-, 30, 60- oder 120-minütigem HS bei 37°C. Die durch *Real-Time-PCR* ermittelten Transkriptmengen sind relativ zur *Aktin2*-mRNA-Menge in [%] angegeben. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. In der jeweils letzten Zelle einer Spalte sind die Induktionsfaktoren (IF) angegeben, um welche die entsprechenden Transkriptmengen während 1-stündigem HS zunehmen.

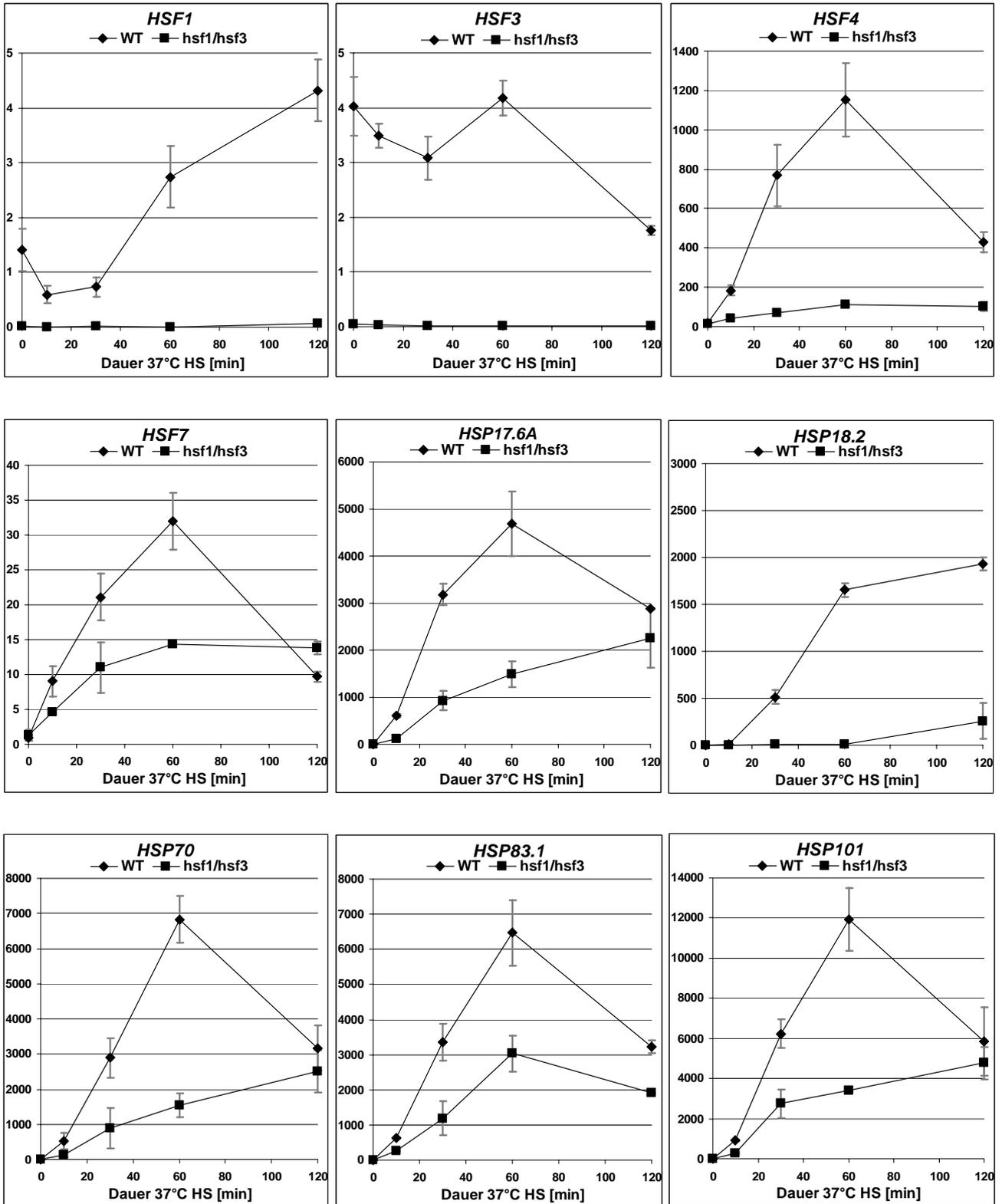


Abbildung 4.24: Transkriptmengen verschiedener *HSF*- und *HSP*-Gene in Blättern von WT- und *hsf1/hsf3*-Pflanzen vor HS (0) bzw. nach 10-, 30, 60- oder 120-minütigem HS bei 37°C. Die durch *Real-Time-PCR* ermittelten Transkriptmengen sind relativ zur *Aktin2*-mRNA-Menge in [%] angegeben. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

4.9.4 Thermotoleranz von *hsf1/3*-Pflanzen

Die *HSF1*- und *HSF3*-Doppelmutante zeigt im Vergleich zum WT keine veränderte Thermotoleranz (Abb. 4.25). Nach 1-stündiger Vorinkubation bei 34°C überleben *HSF*-Doppelmutanten den gleichen Hitzestress wie WT-Pflanzen (Abb. 4.25.A). *HSF*-Doppelmutanten waren phänotypisch nicht von WT-Pflanzen zu unterscheiden; auch nicht wenn beide Linien in einer Langzeitstudie mehrmaligen Hitzestress-Phasen ausgesetzt worden waren (Abb. 4.25.B). Ein biologischer Effekt der reduzierten HSP-Expression in *hsf1/hsf3*-Pflanzen konnte somit nicht gezeigt werden.

A

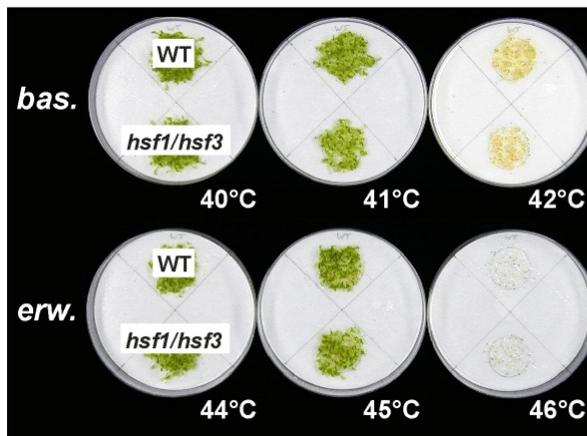
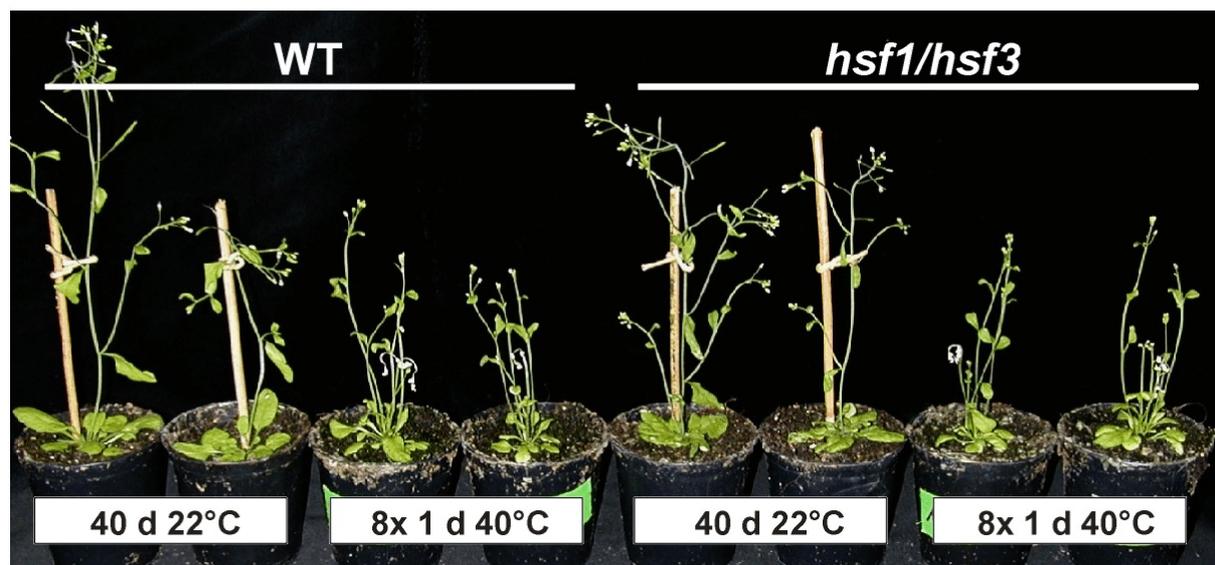


Abbildung 4.25: Thermotoleranz und Phänotyp der *HSF1*- und *HSF3*-Doppelmutante *hsf1/hsf3* **A**) Basale (bas.) und erworbene (erw.) Thermotoleranz von 7 Tage alten Keimlingen. Die *in vitro* kultivierten Keimlinge wurden für 1 h bei der jeweils angegebenen Temperatur inkubiert. Im Falle der erworbenen Thermotoleranz war eine 1-stündige Inkubation bei 34°C vorausgegangen. Der biologische Effekt wurde nach einer weiteren Woche unter normalen Wachstumsbedingungen fotografiert. **B**) Phänotyp von 40 d alten Pflanzen ohne (40 d 22°C) und nach wiederholtem HS (8x 1 d 40°C) auf Erde. Ab dem Alter von zwei Wochen waren die Pflanzen achtmal in regelmäßigen Abständen für 24 h bei 40°C inkubiert worden.

B



4.9.5 Einfluss von *HSF-loss-of-function* und *HSF-gain-of-function* auf sHSP-Expression

Das Ausmaß der hitzeinduzierten HSP-Expression ist in der *HSF*-Doppelmutante *hsf1/3* deutlich verringert (Kap. 4.9.2 und 4.9.3). So führt ein 2-stündiger HS bei 30°C in Blättern von WT-Pflanzen zur Expression detektierbarer sHSP-Mengen, nicht aber in Blättern der *HSF*-Doppelmutante (Abb. 4.22.E). Im Gegensatz dazu führt eine mehrtägige Kultivierung bei 25°C zur sHSP-Expression in *HSF3*-überexprimierenden Pflanzen, nicht aber in WT-Pflanzen (Abb. 4.8.A). *HSF-loss-of-function* und *HSF-gain-of-function* haben also gegensätzliche Auswirkungen auf die Temperaturschwelle, die zum Auslösen der HS-Reaktion überschritten werden muss. Um diesen Effekt vergleichend zu untersuchen, wurden *HSF3*-transgene Pflanzen, *hsf1/3*-Doppelmutanten und die entsprechenden WT-Linien parallel für jeweils 2 h bei Temperaturen von 22°C bis 36°C inkubiert. Das Ergebnis der anschließenden *Western*-Analyse mit antiHSP17.6-Antiserum ist in Abb. 4.26 zu sehen.

Die in diesem Fall sehr hohe Sensitivität der Immundetektion ermöglicht den Nachweis von geringen sHSP-Mengen in *HSF3*-transgenen Pflanzen bereits bei Temperaturen von 22 bis 26°C. Zu einer deutlichen Zunahme dieses konstitutiven Expressionsniveaus führt eine 2-stündige Inkubation bei 28°C. Die Expression substantieller sHSP-Mengen in den beiden WT-Linien C24 und WS2 erfordert eine 2-stündige Inkubation bei 32°C. In der *HSF*-Doppelmutante *hsf1/3* können vergleichbare sHSP-Mengen erst nach 2-stündiger Inkubation bei 34°C nachgewiesen werden.

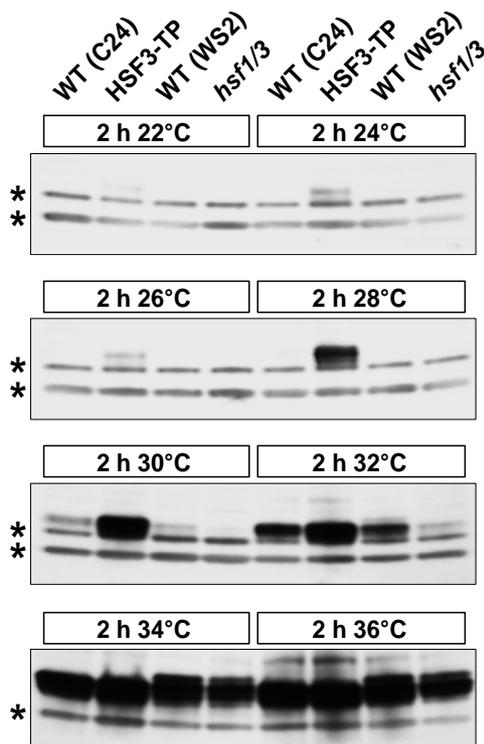


Abbildung 4.26: *Western*-Analyse der Klasse I sHSP-Expression in *HSF3*-transgenen- (*HSF3*-TP) und *hsf1/3*-Pflanzen und in den entsprechenden Wildtyplinien (Ecotyp C24 bzw. WS2). Analysiert wurde jeweils 30 µg Gesamtprotein aus Blättern, die für 2 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert worden waren. Die Immundetektion erfolgte mit antiHSP17.6-Antiserum. Die Positionen nicht-hitzeinduzierter Banden, die daher als unspezifische Signale bewertet wurden, sind durch Sterne markiert.

5 DISKUSSION

Die ersten drei pflanzlichen *HSF*-Gene waren bereits 1990 durch Scharf *et al.* beschrieben worden und somit ein Jahr früher als die *HSF1*- und *HSF2*-Gene des Menschen (Rabindran *et al.*, 1991; Schuetz *et al.*, 1991). Seit dieser Zeit konnten in beiden Systemen weitere *HSF*-Gene identifiziert und die entsprechenden Genprodukte charakterisiert werden. Individuelle *HSF*-Funktionen von drei der vier Vertebraten-*HSF* konnten mittlerweile in *HSF-knockout*-Mäusen bzw. -Vogelzellen detailliert untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass einzelne *HSF* nicht nur essentiell für die stressinduzierte Expression von *HS*-Genen sind, sondern auch Funktionen bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen ausüben (McMillan *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Nakai & Ishikawa, 2001; Kallio *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Ferner wurde ersichtlich, dass zwei der vier Vertebraten *HSF* (nämlich *HSF2* und -4) keine Rolle bei der allgemeinen Stressantwort spielen, ihre Funktion beschränkt sich auf bestimmte Zelltypen und -stadien (Pirkkala *et al.*, 2001). Dass hingegen das pflanzliche *HSF*-System vergleichsweise unverstanden blieb, liegt sicherlich auch an der großen Anzahl von *HSF*-Genen in Pflanzen. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält 21 *HSF*-Homologe und die Analyse von EST-Datenbanken von Tomate und Sojabohne lassen vermuten, dass die *HSF*-Familie auch in diesen beiden pflanzlichen Modellorganismen mehr als 15 Mitglieder umfasst (Schöffl & Prändl, 1999; Nover *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit sollten 6 verschiedene *HSF* aus *Arabidopsis thaliana* funktionell charakterisiert werden. Ihre Expressionsmuster und Aktivitätsprofile, die Analyse von *HSF*-überexprimierenden Pflanzen und vor allem die Isolierung und Analyse von *HSF*-Mutanten sollte Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Weise die untersuchten *HSF* an der *HS*-Reaktion in *Arabidopsis* beteiligt sind. Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Zugänglichkeiten einzelner *HSF* und der endlichen Zeit, die zur Verfügung stand, konnten nicht alle *HSF* in komplettem Umfang analysiert werden.

5.1 Beteiligung einzelner *HSF* an der *HS*-Reaktion

Die Expression von *HSF* in *Arabidopsis*-Blättern: Die Beteiligung einzelner *HSF* an der *HS*-Reaktion in vegetativem *Arabidopsis*-Gewebe setzt ihre Expression und Aktivität bzw. Aktivierbarkeit voraus. Die hier untersuchten *HSF* waren - mit Ausnahme von *HSF1* - aus einer cDNA-Bibliothek von *Arabidopsis*-Samenschoten und -Samen verschiedener Reifestadien isoliert worden (Prändl *et al.*, 1998). Wie bereits für *HSF1*, -3 und -4 geschehen (Hübel & Schöffl, 1994; Prändl *et al.*, 1998), musste daher die Expression der übrigen *HSF* in vegeta-

tivem Gewebe, also beispielsweise in Blättern, zunächst noch gezeigt werden.

Northern-Analysen zeigten, dass sämtliche HSF auch im Blatt exprimiert werden. Die Ergebnisse für HSF1, -3, -4 und -7 wurden mittels *Real-Time-PCR* und auf Proteinebene durch *Western*-Analysen bestätigt (Kap. 4.3 und 4.9.3). Dabei ergab sich für die Klasse-A-HSF *HSF1*, *HSF2*, *HSF3*, ebenso wie für den Klasse-B-HSF *HSF6* eine konstitutive Expression, die nach HS weitgehend unverändert blieb. Die beiden Klasse-B-HSF *HSF4* und *HSF7* waren deutlich hitzeinduziert exprimiert. Aufgrund ihrer Expression können somit alle untersuchten HSF an der HS-Reaktion im Blatt beteiligt sein. Dieses Ergebnis war nicht von vornherein zu erwarten, da nicht alle pflanzlichen HSF ubiquitär exprimiert werden, wie für HSFA10 der Sonnenblume durch Almoguera *et al.* (2002) gezeigt. HSFA10-mRNA und -Protein können nur während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Dies ist ein wesentlicher Hinweis dafür, dass HSFA10 die entwicklungspezifische HSP-Expression reguliert und nicht an der HS-Reaktion im Blatt partizipiert. Eine in ähnlicher Weise gewebespezifische Funktion übt HSF4 in Vertebraten aus, dessen mRNA im Gehirn, Herz, Lunge, Skelettmuskel und Pankreas detektiert werden kann (Nakai *et al.*, 1997), sich auf Proteinebene aber vor allem im Gehirn und in der Lunge anreichert (Tanabe *et al.*, 1999).

DNA-Bindungsaktivitäten von HSF vor und während der HS-Reaktion: Die Expression eines HSF in vegetativem Gewebe ist Voraussetzung, nicht jedoch Beweis für seine Beteiligung an der HS-Reaktion. Sowohl HSF1 als auch HSF2 werden in Säugerzellen konstitutiv und ubiquitär exprimiert. Mittels spezifischer Antikörper wurde in *Supershift*-Experimenten gezeigt, dass durch HS die DNA-Bindungsaktivität von HSF1, nicht aber von HSF2 induziert wird (Baler *et al.*, 1993; Sarge *et al.*, 1993). Die daraus abgeleitete Annahme, dass in Säugerzellen HSF1 und nicht HSF2 für die HS-Reaktion verantwortlich ist (Morimoto *et al.*, 1994b), wurde schließlich durch die Analyse von HSF1- und HSF2-defizienten Zellen bestätigt (McMillan *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Kallio *et al.*, 2002, McMillan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Aussagen über die Funktion einzelner HSF lassen sich daher nicht alleine aufgrund von Expressionsmustern treffen, zielführender in diesem Zusammenhang ist der Nachweis der HSF-Aktivität.

Alle HSF-Homologe weisen zwei konservierte Regionen auf: (1) die N-terminal gelegene HSF-typische DNA-Bindungsdomäne (DBD), die eine spezifische Bindung an HSE ermöglicht und (2) eine bipartite, leuzinzipperartige Oligomerisierungsdomäne (OLD), die eine Trimerisierung zulässt (Abb. 4.1 und *AS-Alignment* in Kap. 7.4). Dementsprechend binden alle untersuchten HSF-Homologe, nach ihrer Expression in *E. coli*, in homooligomerer Form

spezifisch an synthetische HSE (Abb. 4.2). Es darf daher angenommen werden, dass die Bindung an HSE-beinhaltende Promotoren einen wesentlichen Bestandteil der biologischen Aktivität dieser HSF ausmacht.

Immunpräzipitationsassay zur Bestimmung von HSE-Bindungsaktivitäten von HSF:

Mit Hilfe HSF-spezifischer Antikörper wurden die Unterschiede im Aktivierungsmuster von HSF1, HSF2 und HSF3 der Vertebraten in *Supershift*-Experimenten gefunden (u.a.: Sistonen *et al.*, 1992; Tanabe *et al.*, 1997 & 1998; Mathew *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse trugen wesentlich zum Verständnis der unterschiedlichen HSF-Funktionen bei. Um in ähnlicher Weise die Funktion der *Arabidopsis*-HSF zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit spezifische HSF-Antikörper generiert. Sowohl anti Δ HSF3-Antikörper (nicht gezeigt) als auch anti Δ HSF7-Antikörper (Abb. 4.16.D) führen in Gesamtproteinextrakten aus transgenen Pflanzen, welche HSF3 bzw. HSF7 überexprimieren, zu *Supershifts*. Bei Verwendung von Gesamtproteinextrakten aus *Arabidopsis*-WT-Pflanzen konnte die Technik des *Supershifts* hingegen nicht etabliert werden. Dies kann daran liegen, dass die Multiplizität der an den *Shift*-Banden beteiligten HSF in *Arabidopsis* zu nicht-detektierbaren *Supershift*-Ereignissen einzelner HSF führt. Die Möglichkeit, dieses Problem durch die Verwendung größerer Proteinmengen zu umgehen, ist bei elektrophoretischen Methoden sehr begrenzt. Daher wurde eine auf Immunpräzipitation basierende Methode zur Bestimmung der HSE-Bindungsaktivität einzelner HSF entwickelt.

Zentraler Bestandteil dieses Assays ist eine Immunpräzipitation mit HSF-spezifischen Antikörpern in Gesamtproteinextrakten. Die im Präzipitat enthaltenen HSF binden quantitativ an zugegebene, radioaktiv-markierte HSE-Moleküle. Die Menge der gebundenen Radioaktivität gibt letztlich Auskunft über die DNA-Bindungsaktivität des entsprechenden HSF im untersuchten Proteinextrakt.

Mit dieser Technik konnten im Verlauf eines 2-stündigen HS in *Arabidopsis*-Blättern die HSE-Bindungsaktivitäten von HSF1, -3 und -7, nicht aber von HSF2, -4 und -6 nachgewiesen werden (Abb. 4.6.B). Das Ergebnis impliziert die Beteiligung von mindestens HSF1, -3 und -7 an der HS-Reaktion in *Arabidopsis*-Blättern. Zu HSF2 läßt sich diesbezüglich keine Aussage treffen, da das anti Δ HSF2-Antiserum nicht in der Lage war, rekombinanten, HSE-bindenden HSF2 zu präzipitieren (Kap. 4.4).

HSE-Bindungsaktivitäten von HSF1 und HSF3 und der Vergleich von Ergebnissen aus EMSA und Immunpräzipitationsassay: Ein Nachteil des Immunpräzipitationsassays im Vergleich zum *Supershift* ist die fehlende Visualisierung der Antikörper-HSF-DNA-Komplexe und die fehlende Aussage über ihr Molekulargewicht. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden die verwendeten Gesamtproteinextrakte parallel in einem herkömmlichen EMSA untersucht. Dabei kann in Extrakten aus nicht-hitzegechocktem *Arabidopsis*-Gewebe keine HSE-Bindungsaktivität nachgewiesen werden, wohl aber nach 10-minütigem HS (Abb. 4.6.A). Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Ergebnissen aus *Arabidopsis* (Hübel *et al.*, 1995) und Tomate (Scharf *et al.*, 1990) und bedeutet, dass die DNA-Bindungsaktivität der konstitutiv-exprimierten *Arabidopsis*-HSF unter Kontrollbedingungen negativ reguliert ist und erst durch Stresseinwirkung induziert wird. Die Regulation der HSF-Aktivität in *Arabidopsis* ähnelt somit der des humanen HSF1 und des *Drosophila*-HSF, deren hochaffine HSE-Bindung ebenfalls erst durch eine stressinduzierte Monomer-zu-Trimer-Transition ermöglicht wird (Baler *et al.*, 1993; Sarge *et al.*, 1993; Westwood *et al.*, 1991; Westwood & Wu, 1993).

Das Erscheinen von HSE-bindenden Komplexen geringer Mobilität im EMSA zu einem frühen Zeitpunkt nach HS korreliert qualitativ mit dem hitzeinduzierten Anstieg der DNA-Bindungsaktivität von HSF1 und HSF3 im Immunpräzipitationsassay. Außerdem fehlen diese hochmolekularen HSE-bindenden Komplexe in Extrakten der HSF1- und HSF3-defizienten Doppelmutante *hsf1/3*, in welcher mittels Immunpräzipitation keine HSF1- oder HSF3-DNA-Bindungsaktivität zu messen ist (Abb. 4.19). Es liegt daher nahe anzunehmen, dass es sich bei diesen frühen *Shift*-Banden tatsächlich um HSF1 und HSF3 handelt. Widersprüchlich ist allerdings, dass im Vergleich zum EMSA im Immunpräzipitationsassay bereits unter Nicht-hitzeschockbedingungen deutliche HSE-Bindungsaktivitäten von HSF1 und -3 gemessen wurden, welche nach 10-minütigem HS lediglich auf das zirka Zweifache anstiegen (Abb. 4.6.A & B). Im EMSA verschwanden außerdem die frühen, hochmolekularen *Shift*-Banden im Verlauf eines 2-stündigen HS, während mittels Immunpräzipitation keine signifikante Abnahme der HSE-Bindungsaktivität von HSF1 oder HSF3 gemessen wurde. In ähnlicher Weise widersprachen sich die Ergebnisse von EMSA und Immunpräzipitation bei der Analyse von *HSF3*-transgenen Pflanzen (*HSF3*-TP): Nach 2-stündigem HS entsprachen sich die *Shift*-Banden von WT und *HSF3*-TP, während durch Immunpräzipitation nach wie vor hohe *HSF3*-HSE-Bindungsaktivitäten gemessen wurden (Abb. 4.7 und Abb. 4.8.D).

Eine mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse beider Experimente ergeben sich aus Untersuchungen von Zimarino *et al.* (1990). Hier führte die Zugabe von antiDmHSF-

Antikörpern *in vitro* zur Aktivierung des *Drosophila*-HSF. Eine solche Überführung von inaktivem HSF in eine aktive, DNA-bindende Form wäre denkbar, wenn die Antikörper beispielsweise intramolekulare, negativ-regulierende Wechselwirkungen stören oder aber die Dissoziation von HSF und *trans*-aktiven Repressormolekülen (z. B. HSP70, HSP90) bewirken.

Im weiteren Verlauf der HS-Reaktion in *Arabidopsis* war im EMSA eine dynamische Veränderung des Bandenmusters zu registrieren. Zusätzlich zu den frühen, hochmolekularen HSE-bindenden Komplexen traten später, nach etwa 30–60 minütigem HS, niedermolekulare Komplexe auf, die nach einem 2-stündigen HS das Bandenmuster dominierten (Abb. 4.6.A). Eine ähnliche Veränderung des Bandenmusters ergab der EMSA mit Zellkernextrakten aus hitzeshockten Tomatenzellen, in denen nach 40-minütigem HS ebenfalls HSE-bindende Komplexe größerer Mobilität gebildet werden (Scharf *et al.*, 1990).

Worum es sich bei diesen späten, niedermolekularen HSE-bindenden Komplexen handelt bleibt unklar. Die Kinetik ihres Auftauchens entspricht zwar der hitzeinduzierten Expression von *HSF4* und *HSF7*, die HSE-Bindungsaktivitäten dieser beiden Klasse-B-HSF konnten jedoch in *Arabidopsis*-Blättern während eines 2-stündigen HS nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Da diese späten, niedermolekularen HSE-Bindungsaktivitäten in der HSF1- und HSF3-defizienten Doppelmutante *hsf1/3* im Vergleich zum WT unverändert waren (Abb. 4.21.A), kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um HSF1 und/oder HSF3 mit höherer elektrophoretischer Mobilität handelt.

HSE-Bindungsaktivitäten von HSF4 und HSF6: Da mit anti Δ HSF4- bzw. anti Δ HSF6-Antikörpern die DNA-Bindung von rekombinanten HSF4 bzw. HSF6 in *E. coli*-Gesamtproteinextrakten präzipitiert werden konnte (Abb. 4.5), ergeben sich folgende Interpretationsmöglichkeiten für die nicht nachzuweisenden Bindungsaktivitäten dieser HSF in Proteinextrakten aus *Arabidopsis*-Blättern:

1) Beide HSF sind in Blättern nicht exprimiert bzw. nicht an der HS-Reaktion beteiligt. Dies würde vor allem für HSF4 überraschen, da *HSF4* bereits unter Nichthitzeshockbedingungen sehr stark exprimiert wird und durch HS noch viel höhere mRNA-Mengen induziert werden, ähnlich hoch wie die mRNA-Mengen der HSP.

2) Beide HSF werden exprimiert, ihre Funktion während eines 2-stündigen HS besteht aber nicht darin, an HSE zu binden. Obwohl der hohe Konservierungsgrad der DBD und die gute HSE-Bindung des rekombinanten HSF4 und HSF6 dagegensprechen, könnte ihre Funktion *in vivo* beispielsweise darin bestehen, den Kernimport anderer HSF zu gewährleisten.

Eine solche Rolle spielt LpHSFA1 der Tomate beim Kernimport von LpHSFA2 (Scharf *et al.*, 1998).

3) Die gewählten experimentellen Bedingungen waren nicht geeignet, HSF4 bzw. HSF6 aus Gesamtzellextrakten von *Arabidopsis*-Blättern zu präzipitieren. Dies könnte beispielsweise durch eine Kompartimentierung erklärt werden, die HSF für eine Antikörperbindung unzugänglich macht. Für *Arabidopsis* gibt es dazu keine Hinweise, allerdings wurde für LpHSFA2, einem Tomaten-HSF, eine Assoziation mit hochmolekularen, cytoplasmatischen HS-Granula beschrieben (Scharf *et al.*, 1998).

4) HSF4 und/oder HSF6 benötigen für die HSE-Bindung *in vivo* Interaktionspartner, von denen sie während der Immunpräzipitation dissoziieren. Solche Interaktionspartner könnten beispielsweise andere HSF sein, mit denen Heterooligomere gebildet werden. Hinweise für die Existenz von HSF-Heterooligomere in Pflanzen ergeben sich vor allem in der Tomate, hier benötigt LpHSFA2 die Interaktion mit LpHSFA1 um in den Zellkern zu gelangen (Scharf *et al.*, 1998). Außerdem gelang Bharti *et al.* (2000) die Isolierung von LpHSFA3 aufgrund seiner Eigenschaft, im Hefe-Zwei-Hybridsystem mit dem LpHSFA1-Köder zu assoziieren. Das Fehlen ausreichender Mengen an Interaktionspartnern könnte ebenfalls die Erklärung dafür sein, dass die Überexpression von HSF4 in transgenen Pflanzen zu keiner Veränderung des Bandenmusters im EMSA führt (Hinderhofer, 1998).

HSE-Bindungsaktivität von HSF7: HSF7 scheint keine in ihrer Menge limitierten zusätzlichen Interaktionspartner zu benötigen, da die DNA-Bindungsaktivität des ektopisch exprimierten HSF7 in *HSF7*-transgenen Pflanzen im EMSA vor und nach HS nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.16). Der Immunpräzipitationsassay ergab für HSF7 in WT-Blättern eine Hitzeinduktion der HSE-Bindungsaktivität, sie korreliert mit dem hitzeinduzierten Anstieg der *HSF7*-mRNA. Da die mit anti Δ HSF7-Antikörpern gemessene HSE-Bindungsaktivität in *HSF7-knockout*-Linien nicht signifikant abnimmt (Abb. 4.19), entspricht sie offensichtlich jedoch nicht oder nur teilweise HSF7. Es muss angenommen werden, dass die anti Δ HSF7-Antikörper mit einer noch unbekanntem, hitzeinduzierten HSE-Bindungsaktivität kreuzreagieren. Ein vorläufiges Durchmusterung der Proteindatenbank (*NCBI-BLAST-Search*) nach homologen Sequenzen zu Δ HSF7, welches als Antigen zur Generierung der anti Δ HSF7-Antikörper verwendet wurde, verlief negativ.

5.2 Funktion der Klasse-A-HSF, HSF1 und HSF3 in *Arabidopsis thaliana*

Allgemeine strukturelle Eigenschaften von Klasse-A-HSF: Von den 21 HSF-Homologen, die im Genom von *Arabidopsis* identifiziert worden sind, gehören 15 der Klasse A an (Nover *et al.*, 2001). Diese HSF-Klasse zeichnet sich durch eine 21 AS-lange *Linker*-Region aus, welche die hydrophoben Bereiche HR-A und HR-B verbindet und deren funktionelle Bedeutung unbekannt ist. Im Gegensatz zu Klasse-B-HSF enthalten die C-terminalen Bereichen von Klasse-A-HSF Blöcke von aromatischen, hydrophoben und sauren AS (AHA-Motive). Auch in der Aktivierungsdomäne von hHSF1 wurden solche AHA-Motive gefunden, welche essentiell für die transaktivierende Eigenschaft der beiden Tomaten-HSF LpHSFA1 und LpHSFA3 sind (Döring *et al.*, 2000).

HSF1 und HSF3 sind für die schnelle Induktion von HS-Genen nach HS verantwortlich:

Die Überexpression von *HSF1*- und *HSF3*-Konstrukten in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen führte zur HSP-Expression auch unter Nicht-Hitzeschockbedingungen, was vermuten liess, dass diese beiden Klasse-A-Faktoren wichtige, positive Regulatoren der HS-Reaktion in *Arabidopsis* darstellen (Lee *et al.*, 1995; Prändl *et al.*, 1998). Die Identifizierung der HSE-Bindungsaktivität von HSF1 und HSF3 in Gesamtproteinextrakten aus hitze-geschocktem *Arabidopsis*-Gewebe mittels nativer Immunpräzipitation stellt ein weiteres Indiz für die Beteiligung beider Faktoren an der HS-Reaktion dar. Dennoch zeigten *Arabidopsis*-Linien, die *knockout*-Mutationen in *HSF1* oder in *HSF3* tragen, keine sichtbaren Beeinträchtigungen der HS-Reaktion (Abb. 4.20). Die Analyse der *hsf1/3*-Doppelmutante ergab aber, dass beide Faktoren in ähnlicher Weise und offensichtlich synergistisch an der HS-Reaktion partizipieren (Kap. 4.9). Sie sind für die unmittelbare und starke Hitzeinduktion von HS-Genen verantwortlich und können sich dabei funktionell ersetzen.

In Vogelzellen agieren HSF1 und HSF3 in ähnlicher Weise synergistisch. Beide HSF sind an der stressinduzierten HSP-Expression beteiligt, wobei HSF3 eine dominante Rolle zukommt. So führt der *HSF1-knockout* zu keiner wesentlichen Veränderung der HS-Reaktion, wogegen in *HSF3*-Nullzellen auch *HSF1* weitgehend inaktiv bleibt und die stressinduzierte HSP-Expression deutlich verringert ist (Tanabe *et al.*, 1998). Zu einem vollständigen Verlust stressinduzierter HSP-Expression kommt es jedoch erst, wenn beide HSF-Genprodukte fehlen. Insbesondere unter Nicht-Hitzeschockbedingungen ist eine Reduktion der HSP-Expression nur in *hsf1/hsf3*-Doppelmutanten zu registrieren (Nakai & Ishikawa, 2001). Die Parallelen in der Bezeichnung von HSF1 und HSF3 in *Arabidopsis* und Vogelzellen sind übrigens rein

zufällig entstanden und nicht funktional begründet.

Die Analyse der Genexpression in *hsf1/3*-Pflanzen zeigte, dass HSF1 und -3 für den schnellen und immensen Anstieg von hitzeinduzierten Transkripten verantwortlich sind. Sie können aber nicht die einzigen positiven Regulatoren der HS-Reaktion sein, da trotz HSF1- und HSF3-Defizienz die mRNA-Mengen aller untersuchten HS-Gene nach HS - wenn auch deutlich langsamer - anstiegen und nach 2 h ungefähr das gleiche Niveau wie im WT erreichten (Abb. 4.24).

Postranskriptionelle Kompensation in *hsf1/3*-Pflanzen: Obwohl sich im WT innerhalb eines 2-stündigen HS weit größere Transkriptmengen von HS-Genen anreicherten, war der Unterschied zur Doppelmutante *hsf1/3* auf Proteinebene relativ gering. Offensichtlich werden die unterschiedlichen Transkriptmengen auf posttranskriptioneller Ebene kompensiert, da nach 2-stündigem HS in der Doppelmutante ähnliche Mengen an sHSP wie im WT detektiert werden konnten (Abb. 4.22.C & E). Dies dürfte auch der Grund dafür sein, dass *hsf1/3*-Pflanzen keine verringerte basale oder erworbene Thermotoleranz besaßen, zumindest wenn Testsysteme verwendet wurden, die auf Überlebensraten basieren (Abb. 4.25.A). Im Anschluss an diese Arbeit konnten mit einem sensitiveren Testsystem zur Bestimmung der erworbenen Thermotoleranz, dem das Maß des Elektrolytenverlusts nach HS zugrunde liegt, signifikant größere Zellschädigungen der HSF-Doppelmutante gemessen werden (Lohmann *et al.*, 2004). Zusammenfassend deuten sämtliche Daten darauf hin, dass HSF1 und HSF3 vor allem die frühe Phase der HS-Reaktion koordinieren. Sie sind für den schnellen Anstieg von HS-Transkripten verantwortlich und ermöglichen offensichtlich die Anpassung an sich schnell verändernde Umweltbedingungen.

Die Attenuation der HS-Reaktion in *hsf1/3*-Pflanzen: Die Transkriptmengen aller untersuchten HS-Gene in *Arabidopsis*, mit Ausnahme von *HSP18.2*, erreichten nach ca. 1 h HS ein Maximum, um im weiteren Verlauf der HS-Reaktion drastisch abzunehmen (Abb. 4.24). Dieses bekannte Phänomen spiegelt den transienten Charakter der HS-Reaktion wider und wird als Attenuation bezeichnet. In *hsf1/3*-Pflanzen aber waren lediglich die Transkriptmengen von *HSP83.1* nach 2-stündigem HS schwach rückläufig, eine deutliche Attenuation wie im WT war nicht zu erkennen. Dieser Befund unterstützt das Modell der negativen Autoregulation der HS-Reaktion, nach dem ab einem gewissen Titer an neusynthetisierten HSPs, welcher in *hsf1/3*-Pflanzen offensichtlich nicht bzw. verzögert erreicht wird, die HSF-Aktivität abnimmt (Kap. 2.3.2.2). Zu ähnlichen Ergebnissen führten Experimente von Lee &

Schöffl (1996): Die Reduktion von HSP70-Transkripten mittels *Antisense*-Technik führte zu einer verlängerten *Recovery*-Phase nach HS, gekennzeichnet durch den im Vergleich zum WT verzögerten Abbau von HSF-Trimeren.

Die Expression von *HSP18.2* in *hsf1/3*-Pflanzen: Mittels *Real-Time-PCR* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression aller untersuchten HS-Gene in *hsf1/3*-Pflanzen beeinträchtigt ist (Abb. 4.24). Am stärksten betroffen war die Hitzeinduktion des zytoplasmatischen Klasse-I-sHSP *HSP18.2* (*HSP18.1-CI*). Für die Aktivierung des *HSP18.2*-Promotors scheinen daher HSF1 und -3 wichtiger zu sein als für andere HSP-Promotoren. Auch im WT unterschied sich *HSP18.2* von den übrigen untersuchten HSP durch ein verzögertes An- und Abschalten seiner Expression während HS. Auffallend war insbesondere die Zunahme der Expressionstärke zwischen 1- und 2-stündigem HS. Aufgrund der gewählten Untersuchungszeitpunkte ist nicht auszuschließen, dass die RNA-Menge nach zirka 1,5 h ein Maximum erreicht und der 2 h-Wert bereits wieder auf der abfallenden Seite der Induktionskurve liegt. Vorläufige Ergebnisse zur Expression von *HSP18.2* und anderen HSP mehrere Stunden nach HS unterstützen jedoch die Annahme, dass sich die hitzeinduzierte Expression von *HSP18.2* durch eine zeitlich ausgedehnte Plateauphase auszeichnet (Lemin Zhang, persönliche Mitteilung). Neben dieser besonderen Regulation unter Hitzeschockbedingungen, die stark von HSF1 und HSF3 abhängt, ist auch die entwicklungspezifische Regulation der *HSP18.2*-Expression außergewöhnlich, denn *HSP18.2* wird im Gegensatz zu vielen anderen sHSP nicht während der Embryonalentwicklung exprimiert (Takahashi *et al.*, 1992; Coca *et al.*, 1996; Wehmeyer *et al.*, 1996; Hinderhofer, 1998). Die fehlende Expression von *HSP18.2* während der Embryonalentwicklung könnte daran liegen, dass in diesem Entwicklungszustand seine beiden Hauptregulatoren, HSF1 und HSF3 nicht aktiv sind. Hinweise für oder gegen diese Hypothese würden sich aus der Analyse der entwicklungspezifischen HSP-Expression in Embryonen der HSF1- und HSF3-defizienten Doppelmutante ergeben.

Genspezifitäten von HSF: In der *hsf1/3*-Doppelmutante war die Expression aller in dieser Arbeit untersuchten hitzeinduzierten Gene beeinträchtigt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass HS-Gene existieren, die nicht von HSF1 und/oder HSF3, sondern durch andere, gengruppenspezifische HSF reguliert werden. Promotorspezifitäten, d. h. unterschiedlich starke Affinitäten einzelner HSF zu verschiedenartigen Promotoren wurden für Tomaten-HSF beschrieben (Treuter *et al.*, 1993; Bharti *et al.*, 2000). Allerdings wurden bei den zugrundeliegenden Experimenten die einzelnen HSF transient und heterolog in Hefe oder

Tabakprotoplasten exprimiert und synthetische Promotor::Reporter-Konstrukte verwendet. Auf ähnliche Weise entstand die Hypothese, dass die entwicklungspezifische Regulation von *HSP17.6 G1* in der Sonnenblume durch die selektive Aktivierung durch individuelle HSF zustande kommt. Sie beruht auf der Beobachtung, dass die beiden Tomaten-HSF, LpHSFA1 und LpHSFA2, nach ihrer heterologen Expression in Hefe oder Sonnenblumen-Embryonen deutliche Unterschiede in der Transaktivierung von *HSP17.6 G1*-Promotor::Reporter-Konstrukten zeigten (Rojas *et al.*, 2002). Interessant aber war der Befund, dass LpHSFA1 *in vitro* zwar effizient an den *HSP17.6 G1*-Promotor bindet, im Gegensatz zu LpHSFA2 *in vivo* jedoch nicht zu einer Aktivierung des Promotors führt. Dies verdeutlicht, dass der Promotorspezifität einzelner HSF nicht ausschließlich die Bindungsaffinität zugrunde liegen muss, sondern über die DNA-Bindung hinaus auch die Fähigkeit eines HSF beschreibt, die Transkription des entsprechenden Gens zu bewirken. Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte kurz darauf die Identifizierung des embryo-spezifischen HaHSFA10, welcher ausschließlich während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und sehr wahrscheinlich für die entwicklungspezifische Expression von *HSP17.6 G1* in der Sonnenblume verantwortlich ist (Almoguera *et al.*, 2002).

Die Analyse des Transkriptom von *hsf1/3*-Pflanzen und weiterer HSF-Mutanten in *Arabidopsis* mittels *Microarray*-Experimenten wäre eine Möglichkeit, stichhaltige Hinweise auf Genspezifitäten von HSF zu erlangen. Zur Verifizierung solcher Hinweise bietet sich im Anschluss die Technik des UV-crosslinkings von Transkriptionsfaktor und Promotor *in vivo* an, mit der die Bindung von HSF1 an die Promotoren von *HSP18.2* und *HSP70* in *Arabidopsis*-Zellen gezeigt werden konnte (Zhang *et al.*, 2003).

Andere pflanzliche HSF-Mutanten: Mishra *et al.* (2002) berichteten von transgenen Tomaten-Pflanzen, in denen die ektopische Expression von *LpHSFA1*-Konstrukten zur siRNA-vermittelten, vollständigen Cosuppression des endogenen LpHSFA1 führte. Die hitzeinduzierte Expression von *HSP*- und *HSF*-Genen war in solchen LpHSFA1-defizienten Pflanzen drastisch reduziert und führte zu deutlich verringerter Thermotoleranz. Es wird daher angenommen, dass im Tomaten-HSF-System, welches aus mindestens 17 Mitgliedern besteht, LpHSFA1 die Rolle eines übergeordneten, nicht zu ersetzenden Regulators der Thermotoleranz spielt.

Für *Arabidopsis* ergeben sich zum jetzigen Zeitpunkt keine Hinweise für die Existenz eines solchen Hauptregulators der HS-Reaktion. Ein ähnlicher Phänotyp, wie für LpHSFA1-Cosuppressions-Linien beschrieben, wurde in transgenen *Arabidopsis*-Linien beobachtet, die

AtHSF1-Repressorprotein-Fusionen überexprimierten (Wunderlich *et al.*, 2003). Eine solche dominant-negative Mutation führt auch in *Arabidopsis* zu einer weitaus größeren Verringerung der HSP-Expression und Thermotoleranz als der spezifische *knockout* von AtHSF1 durch T-DNA-Insertion.

Die Kartierung der *Spl7*-Mutation, dem *rice spotted leaf*-Gen in *Oryza sativa*, mündete in der Identifizierung eines HSFA4-Gens in Reis (Yamanouchi *et al.*, 2002). Bei der Mutation handelt es sich um die Substitution genau eines Basenpaars, welche den Tryptophan-zu-Cystein-Austausch innerhalb der DNA-Bindungsdomäne von Spl7 bewirkt. Dieser AS-Austausch verhindert offensichtlich die Bindung an die Promotoren der Spl7-Zielgene, hat aber keine Konsequenzen auf die Expression von Spl7 selbst. Die Ergebnisse von Komplementationsversuchen legen nahe, dass die Spl7-Mutation dominant-negativ ist, mutiertes Spl7 könnte Heterooligomere mit WT-Spl7 bilden und somit auch die Funktion des an sich integren Proteins blockieren. Die Zielgene von Spl7 sind bisher unbekannt. Die Expressionsanalyse von 20 *HSP*-Genen lieferte keine Hinweise für eine Beteiligung von Spl7 an der HS-Reaktion.

Das Durchmustern von *Arabidopsis*-Mutationslinien nach thermosensitiven Individuen bzw. Individuen, die eine reduzierte Induktion von HS-Promotoren zeigten, führte bisher nicht zur Isolierung von HSF-Mutanten (Severin *et al.*, 1995; Hong & Vierling 2000; Hong *et al.*, 2003) oder anderen zentralen Regulatorgenen. Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass in Pflanzen bis heute keine mit Sicherheit ausschließlich *cis*-aktiven Mutationen isoliert wurden, die Hinweise auf die Existenz eines Hauptregulators der HS-Reaktion geben. Im Gegensatz zu Vertebratenzellen, in denen der *knockout* einzelner *HSF*-Gene (*HSF1* oder *HSF3*) deutliche Beeinträchtigungen der HS-Reaktion und Thermotoleranz bewirkt (McMillan *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999), scheinen Pflanzen eine komplexere Absicherung und Kontrolle des HS-Reaktionssystems zu besitzen.

5.3 Funktion der Klasse-B-HSF, HSF4 und HSF7 in *Arabidopsis thaliana*

Unter den 21 HSF-Homologen in *Arabidopsis* finden sich 5 Klasse-B-HSF. Strukturell zeichnet sich diese HSF-Klasse durch eine kompakte Oligomerisierungsdomäne aus, deren hydrophobe Regionen HR-A und HR-B lediglich durch 7 AS voneinander getrennt sind. Sie gleichen diesbezüglich allen nicht-pflanzlichen HSF, unterscheiden sich aber deutlich von pflanzlichen Klasse-A-HSF, deren HR-A und -B Regionen durch einen hydrophoben Linker von insgesamt 28 AS miteinander verbunden werden (Abb. 2.3; Nover *et al.*, 1996). Ob und welche Konsequenzen verschieden lange hydrophobe Linkerregionen auf die HSF-Funktion ausüben, ist unbekannt. Es liegt aber nahe, dass Charakteristika der intra- oder intermolekula-

ren Proteininteraktionen betroffen sind, für welche die Oligomerisierungsdomäne im Allgemeinen verantwortlich ist. Zusätzlich zum Oligomerisierungsverhalten könnte davon die Möglichkeit beeinflusst werden, mit anderen, regulatorischen Proteinen zu interagieren. So wurde beispielsweise gezeigt, dass HSBP1 über die HSF-Oligomerisierungsdomäne mit HSF1 interagiert und dessen DNA-Bindungsaktivität negativ beeinflusst (Satyal *et al.*, 1998). Von den Klasse-A-HSF unterscheiden sich die Klasse-B-HSF außerdem durch das Fehlen einer typischen Aktivierungsdomäne. Diese strukturelle Eigenschaft und die Ergebnisse verschiedener Experimente (Kap. 2.4) führten zur Hypothese, dass Klasse-B-HSF Repressoren der HS-Genexpression darstellen und an der Attenuation der HS-Reaktion beteiligt sein könnten (Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich weder Hinweise für noch gegen diese Hypothese. Bei der Analyse der isolierten *HSF7-knockout* Mutanten fielen keine Veränderungen der hitzeinduzierten HSP-Expression und Thermotoleranz auf (Abb. 4.20). Im *gain-of-function*-Ansatz führte die ektopische Expression von *HSF7*-Konstrukten zu kaum lebensfähigen und daher schwer analysierbaren Pflanzen, deren stark veränderter Phänotyp auf pleiotrope Effekte der *HSF7*-Überexpression schließen lässt (Kapitel 4.7.2). Zwar erschienen in einigen Linien die Mengen an sHSP nach HS reduziert (Abb. 4.17.A), die Aussagekraft dieser Beobachtung ist jedoch schwach, da dieser Effekt in den Folgegenerationen nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.17.B) und die durchgeführte *Western*-Analyse keine genaue Quantifizierung zuließ.

Um die pleiotropen Effekte der *HSF7*-Überexpression zu vermeiden, wäre die Verwendung induzierbarer und/oder transienter Expressionssysteme geeignet. Veränderungen im Expressionsmuster ließen sich dann mittels quantitativer *Real-Time-PCR* nachweisen, wobei immer auch Expressionskinetiken berücksichtigt werden sollten. Sinnvoll wäre sicherlich auch die in dieser Arbeit isolierten *HSF7-knockout*-Mutanten einer genaueren Expressionsanalyse bezüglich potentieller Zielgene zu unterziehen.

Der Versuch, *HSF4*-Mutanten zu isolieren, blieb in dieser Arbeit erfolglos. Die Isolierung solcher Mutanten ist wichtig, da *gain-of-function*-Ansätze offensichtlich ungeeignet sind, Aussagen über die Funktion von *HSF4* bei der HS-Reaktion in *Arabidopsis* zu treffen (Prändl *et al.*, 1998). Außerdem ergäbe sich dann die Möglichkeit *hsf7/hsf4*-Doppelmutanten zu generieren. Falls *HSF7* und *HSF4* ähnliche Funktionen ausüben, sollten die Unterschiede zum Wildtyp in der Doppelmutante leichter nachzuweisen sein als in den entsprechenden Einzelmutanten, ähnlich wie für *HSF1* und *HSF3* in dieser Arbeit gezeigt.

***HSF4* und *HSF7* sind HS-Gene und abhängig von *HSF1* und *HSF3*:** Die hitzeinduzierte Expression einzelnen *HSF*-Gene ist ein bekanntes Phänomen in Pflanzen (zur Übersicht: Nover *et al.*, 1996) und auch für *HSF4* bereits von Prändl *et al.* (1998) beschrieben worden. Bisher fehlten jedoch genauere Untersuchungen zur Kinetik und Quantifizierung der Hitzeinduktion von *HSF*, ebenso wie experimentelle Hinweise auf den zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismus. Mittels *Real-Time-PCR* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Kinetik, mit der die Transkriptmengen von *HSF4* und *HSF7* während HS steigen und dann wieder abfallen, große Ähnlichkeiten zur Induktionskinetik des Großteils der untersuchten *HSP*-Gene zeigt (Abb. 4.24). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Stärke der Hitzeinduktion von *HSF4* auch quantitativ mit der von *HSP* zu vergleichen ist (Abb. 4.23, vergleiche mit *HSP18.2*). Aufgrund dieser Übereinstimmungen können sowohl *HSF4* als auch *HSF7* als HS-Gene bezeichnet werden.

Im *HSF7*-Promotor konnten drei HSE identifiziert werden (Abb. 4.9.C). Sowohl der Konservierungsgrad als auch die relative Lage (-339 bis -105) zum Transkriptionsstart belegen die klassische Struktur eines HS-Promotors, wie z. B. in *sHSP*-Genen vorhanden (Takahashi & Komeda, 1989; zur Übersicht: Scharf *et al.*, 2001). Die identifizierten HSE waren essentiell für die Bindung rekombinanter HSF *in vitro* und für die Hitzeinduzierbarkeit des *HSF7*-Promotors in GUS-Reporterlinien (Abb. 4.10 & 4.11). Die genannten strukturellen und funktionellen Eigenschaften des *HSF7*-Promotors ergeben somit deutliche Hinweise dafür, dass die hitzeinduzierte Expression von *HSF7* auf transkriptioneller Ebene unmittelbar von HSF reguliert wird.

Die konstitutive Aktivität des *HSF7*-Promotors war unabhängig von den identifizierten HSE (Abb. 4.11.C), was darauf schließen lässt, dass sie HSF-unabhängig ist. In Übereinstimmung dazu war die Menge der *HSF7*-mRNA in *hsf1/3*-Pflanzen nicht verringert (Abb. 4.23). Bei der Bewertung der konstitutiven *HSF7*-Promotoraktivität in GUS-Reporterlinien muss die hohe Halbwertszeit des GUS-Proteins berücksichtigt werden, die in Tabakpflanzen 3-4 Tage beträgt (Weinmann *et al.*, 1994). Aus diesem Grund könnte selbst eine geringe konstitutive Aktivität des *HSF7*-Promotors zur Akkumulation entsprechender GUS-Mengen innerhalb mehrerer Tage vor HS führen, die dann durch einen 2-stündigen HS lediglich um den Faktor 2 zu steigern waren (Abb. 4.11.C). Mittels *Real-Time-PCR* wurde gezeigt, dass *HSF7*-mRNA vor HS cirka zehnmal abundanter ist als beispielsweise *HSP17.6A*-mRNA. Nach 1-stündigem HS stieg die Menge der *HSF7*-mRNA auf das 36-fache an, die Menge an *HSP17.6A*-mRNA aber auf das 58.579-fache (Abb. 4.23). Der *HSF7*-Promotor ist also stärker konstitutiv aktiv, jedoch schwächer hitzeinduziert als „klassische“ *HSP*-Promotoren. Trotzdem ergeben sich

aufgrund des Nachweises funktioneller HSE im *HSF7*-Promotor deutliche Hinweise für eine direkte Induktion der *HSF7*-Expression durch HSF. Dafür spricht auch, dass die Hitzeinduktion der *HSF7*-mRNA in der *HSF*-Doppelmutante *hsf1/hsf3* in gleicher Weise beeinträchtigt ist, wie die der untersuchten HSP-Gene (Abb. 4.24).

Auch die hitzeinduzierte Expression von *HSF4* ist in *hsf1/3*-Pflanzen deutlich verringert und daher ebenfalls HSF-abhängig. Unklar bleibt allerdings, ob *HSF4* wie *HSF7* auf transkriptioneller Ebene unmittelbar HSF-reguliert ist, da innerhalb von 1.500 Bp genomischer Sequenz stromaufwärts des *HSF4*-Startcodons keine eindeutigen HSE-Motive identifiziert werden konnten (nicht gezeigt). Nover *et al.* (2001) finden bei wenig stringenter Definition der HSE-Konsensussequenz Sequenzen im putativen *HSF4*-Promotor, die ähnlich unvollkommen sind wie das funktionelle HSE im Promotor von *HaHSP17.6 G1* (Carranco *et al.*, 1999). Dieses sHSP wird in der Sonnenblume jedoch nicht während der HS-Reaktion, sondern während der Samenreifung exprimiert. Es ist daher fraglich, ob unvollkommene HSE wie sie im *HSF4*- oder im *HaHSP17.6 G1*-Promotor vorkommen, für eine HSF-vermittelte Hitzeinduktion in vegetativem Gewebe ausreichen. Allerdings sollten theoretische, alleine auf DNA-Sequenzen basierende Überlegungen zur möglichen HSF-Bindung nicht überbewertet werden: In humanen Zellen beträgt die Wahrscheinlichkeit 60%, dass ein Promotor, der ein perfektes HSE enthält, von HSF1-gebunden wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Promotor, der kein perfektes HSE enthält, von HSF1-gebunden wird, beträgt immerhin noch 38% (Trinklein *et al.*, 2004).

Die RNA von *PsHSFA* der Erbse kann nur nach HS nachgewiesen werden (Aranda *et al.*, 1999). Da es bislang keinen Hinweis auf einen präexistierenden, konstitutiv-exprimierten HSF in der Erbse gibt, könnte die Hitzeinduktion von *PsHSFA* durch andere stressinduzierte Transkriptionsfaktoren bewirkt werden, z.B. durch Msn-Homologe ähnlich der STRE-abhängigen Induktion von HSP-Genen während der allgemeinen Stressantwort in Hefe (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Falls solche alternativen Transkriptionsfaktoren auch für die Expression von *HSF4* in *Arabidopsis* verantwortlich sind, so müsste ihre Aktivität unter HS-Bedingungen HSF-reguliert sein, da die hitzeinduzierte *HSF4*-Expression in der *HSF*-Doppelmutante *hsf1/3* reduziert ist (Abb. 4.24). Eine Regulation von Transkriptionsfaktoren durch HSF auf transkriptioneller Ebene ist bisher nicht bekannt, könnte aber durch die Analyse des Transkriptoms von *hsf1/hsf3*-Pflanzen mittels *Microarray*-Technik überprüft werden. Denkbar wäre aber auch, dass *HSF4*-regulierende Transkriptionsfaktoren oder Mitglieder ihrer Aktivierungskaskade unter HS-Bedingungen durch HSP stabilisiert werden müssen. Reduzierte HSP-Mengen könnten dann der Grund für die unvollständige *HSF4*-Induktion in

der *HSF*-Doppelmutante sein. In ähnlicher Weise regulieren HSF1 und HSF3 in Vogelzellen die Zellteilung, die in HSF1- und HSF3-defizienten Zellen bereits unter mildem HS blockiert ist. Verantwortlich für diese Blockade ist die reduzierte Menge an HSP90 α , welches unter HS-Bedingungen für die Stabilisierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 benötigt wird (Nakai & Ishikawa, 2001).

Neben transkriptionellen könnten aber auch posttranskriptionelle Mechanismen für die hitzeinduzierte Zunahme der *HSF4*-mRNA verantwortlich sein. Bereits unter Nichtthitzeschockbedingungen ist die *HSF4*-mRNA deutlich abundanter als die RNA aller anderen, untersuchten Gene (Abb. 4.23). Ein vergleichsweise starker konstitutiv-aktiver *HSF4*-Promotor könnte bei Erhöhung der Halbwertszeit der *HSF4*-mRNA unter HS-Bedingungen zu der gemessenen Hitzeinduktion von HSF4 führen. Aufgrund der reduzierten Hitzeinduktion der *HSF4*-mRNA in *hsf1/3*-Pflanzen müssten solche posttranskriptionellen Mechanismen auf jeden Fall aber HSF-abhängig sein.

Dass posttranskriptionelle Mechanismen nicht unwesentlich an der hitzeinduzierten Akkumulation von Transkripten beteiligt sind, zeigten kürzlich die Ergebnisse von Trinklein *et al.* (2004). In einer genomweiten Analyse identifizierten sie zunächst 437 humane Gene, welche entweder hitzeinduziert exprimiert werden oder deren Promotoren HSE enthalten oder deren Promotorsequenzen nach Formaldehyd-*Crosslinking* mit antiHSF1-Antikörpern präzipitiert werden konnten. Ob diese 437 Kandidaten tatsächlich von HSF1 auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, wurde dann im Folgenden untersucht. Es zeigte sich, dass 24 von 93 hitzeinduzierten Genen weder HSE im Promotor haben noch HSF1-gebunden sind. Dementsprechend werden 36 Gene in *HSF1-knockout*-Zellen (Mausfibroblasten) ebenso hitzeinduziert exprimiert wie in WT-Zellen. Das bedeutet, dass nicht alle hitzeinduzierten Gene HSF1-abhängig sind. Umgekehrt sind nur die Hälfte aller Gene, deren Promotoren HSE besitzen und für die HSF1-Bindung nachgewiesen werden konnte, hitzeinduziert. Schlussfolgerung hier: HSF1-Bindung führt nicht zwingend zu Hitzeinduktion. Trinklein *et al.* (2004) favorisieren posttranskriptionelle Mechanismen zur HSF1-unabhängigen Hitzeinduktion, da nur Promotoren von Genen, die hitzeinduziert und HSF1-gebunden sind, in der Lage waren, in Promotor::Luciferase-Assays die hitzeinduzierte Expression des Reportergens zu vermitteln. Dagegen führten Promotoren von hitzeinduzierten Genen, für die keine HSF1-Bindung nachgewiesen werden konnte, nicht zur Hitzeinduktion des Reporters.

Bilden Klasse-B-HSF eine funktionelle Einheit? Die vergleichsweise starke konstitutive und zusätzlich hitzeinduzierte Expression von Klasse-B-HSF wie HSF4 und HSF7 passt gut in das von Czarnecka-Verner *et al.* (1997) vorgeschlagene Modell, nach dem Klasse-B-HSF als Repressoren der HS-Genexpression unter Nicht-Hitzeschockbedingungen und als Attenuatoren der HS-Reaktion fungieren. Allerdings existieren Klasse-B-HSF, die nur schwach konstitutiv und nicht hitzeinduziert exprimiert werden (HSF6, diese Arbeit). Andererseits werden auch einzelne Klasse-A-Faktoren hitzeinduziert exprimiert, beispielsweise LpHSFA2 (Scharf *et al.*, 1990), PsHSFA (Aranda *et al.*, 1999) und HSFA2 aus *Arabidopsis*, dessen mRNA nach HS sogar abundanter sein soll als die des HSF4 (Nover *et al.*, 2001). Vom Expressionsmuster einzelner Klasse-B-HSF kann somit nicht auf eine allgemeine Funktion von Klasse-B-HSF geschlossen werden.

Von den Tomaten-HSF sind die Klasse-A-HSF, LpHSFA1, LpHSFA2 und LpHSFA3 in der Lage den Hefe-HSF zu komplementieren, nicht aber der Klasse-B-HSF LpHSFB1 (Boscheinen *et al.*, 1997; Bharti *et al.*, 2000). Daraus abzuleiten, dass LpHSFB1 oder sogar alle Klasse-B-HSF keine aktivierenden, sondern reprimierenden Eigenschaften besitzen, wäre jedoch gewagt, denn auch einzelne Vertebraten-HSF verhalten sich bei der Komplementation von Hefe-*HSF*-Mutanten anders als im homologen System. So können HSF2 und HSF4, nicht jedoch HSF1 den Hefe-HSF komplementieren (Liu *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1999). Außerdem führte die transiente Expression von LpHSFB1 (ehemals LpHSF24) in Tabakprotoplasten durchaus zur Aktivierung von HS-Promotoren (Treuter *et al.*, 1993; Czarnecka-Verner *et al.*, 1997 & 2000).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass LpHSFB1, nicht aber HSF4 (AtHSFB1) als Co-Aktivator der HS-Genexpression wirken kann und zwar immer dann, wenn die Anordnung der HSE innerhalb des Promotors die gleichzeitige Bindung von LpHSFA1 zulässt (Bharti *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass Klasse-B-HSF sehr wahrscheinlich keine funktionelle Einheit bilden. Einige könnten sozusagen als Gegenspieler der aktivierenden Klasse-A-HSF die Expression von HS-Genen vor oder nach HS reprimieren. Andere könnten als Co-Aktivatoren von Klasse-A-HSF oder anderen Transkriptionsfaktoren die Expression ihrer Zielgene modulieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarts MGM, Corzaan P, Stiekema WJ, Pereira A** (1995) A two-element enhancer-inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **247**: 555-564
- Abrevaya KA, Myers M, Murphy SP, Morimoto RI** (1992) The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev* **6**: 1153-1164
- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D, Jordano J** (1995) Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol* **29**: 1093-1099
- Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N** (1998) HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **18**: 4949-4960
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J** (1998) Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J* **13**: 437-446
- Almoguera C, Rojas A, Diaz-Martin J, Prieto-Dapena P, Carranco R, Jordano J** (2002) A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *J Biol Chem* **277**: 43866-72
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Amin J, Mestril R, Lawson R, Klapper H, Voellmy R** (1985) The heat shock consensus sequence is not sufficient for hsp70 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **5**: 197-203
- Amin J, Ananthan J, Voellmy R** (1988) Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* **8**: 3761-3769
- Amin J, Fernandez M, Ananthan J, Lis JT, Voellmy R** (1994) Cooperative binding of heat shock transcription factor to the Hsp70 promoter in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **269**: 4804-11
- An Y-Q, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB** (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* **10**: 107-121
- Anathan J, Goldberg AL, Voellmy R** (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**: 522-524
- Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Zimmerman JL, Goldberg RB** (2001) The *Arabidopsis* embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60alpha gene. *Plant Physiol* **126**:717-730
- Aranda MA, Escaler M, Thomas CL and Maule AJ** (1999) A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *Plant J* **20**: 153-161
- Baler R, Welch WJ, Voellmy R** (1992) Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J Cell Biol* **117**: 1151-9
- Baler R, Dahl G, Voellmy R** (1993) Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **13**: 2486-2496
- Baler R, Zou J, Voellmy R** (1996) Evidence for a role of HSP70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* **1**: 33-39

- Ballinger DG, Benzer S** (1989) Targeted gene mutations in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 9402-9406
- Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C** (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. Mol Cell Biol **19**: 4535-4545
- Bancroft I, Jones JDG, Dean C** (1993) Heterologous transposon tagging of the *DRL1* locus in *Arabidopsis*. Plant Cell **5**: 631-638
- Barros MD, Czarnecka E, Gurley WB** (1992) Mutational analysis of a plant heat shock element. Plant Mol Biol **19**: 665-675
- Baulcombe DC** (1996) RNA as a target and an initiator of posttranscriptional gene silencing in transgenic plants. Plant Mol Biol **32**: 79-88
- Bechtold N, Pelletier G** (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. Methods Mol Biol **82**: 259-266
- Bechtold N, Jaudeau B, Jolivet S, Maba B, Vezon D, Voisin R, Pelletier G** (2000) The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Genetics **155**: 1875-1887
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol Biol **20**: 1195-1197
- Benson DA, Boguski M, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF** (1998) GenBank. Nucleic Acids Res **26**: 1-7
- Ben-Zvi AP, Goloubinoff P** (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. J Struct Biol **135**: 84-93
- Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mangia F** (1997) Developmental activation of an episomic hsp70 gene promoter in two-cell mouse embryos by transcription factor Sp1. Nucleic Acids Res **25**: 1333-1338
- Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mangia F** (2000) A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation. Development **127**: 1541-1551
- Bharadwaj S, Hnatov A, Ali A, Ovsenek N** (1998) Regulation of the DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1 is uncoupled in *Xenopus* oocytes. Biochim Biophys Acta **1402**: 79-85
- Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N** (1999) Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 *In vivo*. Mol Cell Biol **19**: 8033-8041.
- Bharti K, Schmidt E, Lyck R, Heerklotz D, Bublak D, Scharf K-D** (2000) Isolation and characterization of HsfA3 a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. Plant J **22**: 355-366
- Bharti K, Von Koskull-Doring P, Bharti S, Kumar P, Tintschl-Korbitzer A, Treuter E, Nover L** (2004) Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfB1 Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1. Plant Cell **16**: 1521-35
- Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, Morimoto RI** (1998) BAG-I, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. EMBO J **17**: 6871-6878
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid and alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res **7**: 1513-1523

- Bonner JJ, Heyward S, Fackenthal DL** (1992) Temperature-dependent regulation of a heterologous transcriptional activation domain fused to yeast heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **12**: 1021-1030
- Bonner JJ, Ballou C, Fackenthal DL** (1994) Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor. *Mol Cell Biol* **14**: 501-508
- Boorstein WR, Craig EA** (1990a) Transcriptional regulation of SSA3, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 3262-3267
- Boorstein WR, Craig EA** (1990b) Structure and regulation of the SSA4 HSP70 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**: 18912-18921
- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S** (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* **9**: 3919-3930
- Boscheinen O, Lyck R, Queitsch C, Treuter E, Zimarino V, Scharf K-D** (1997) Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **255**: 322-331
- Bose S, Weikl T, Bügl H, Buchner J** (1996) Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* **274**: 1715-1717
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* **32**: 191-222
- Bouché N, Bouchez D** (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 111-117
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Buchner J** (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* **10**: 10-9
- Bukau B, Horwich AL** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366
- Carranco R, Almoguera C, Jordano J** (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J Biol Chem* **272**: 27470-27475
- Carranco R, Almoguera C, Jordano J** (1999) An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene. *Plant Physiol* **121**: 723-730
- Chen YQ, Barlev NA, Westergaard O, Jakobsen BK** (1993) Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor -independent control of transient and sustained transcriptional activity. *EMBO J* **12**: 5007-5018
- Chen S, Smith DF** (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* **273**: 35194-35200
- Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ** (2000) Maternal effect of *Hsf1* on reproductive success. *Nature* **407**: 693-694
- Chu B, Soucin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK** (1996) Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem* **271**: 30847-30857
- Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert K, Wu C** (1990) Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* **63**: 1085-1097

- Clos J, Rabindran S, Wisniewski J, Wu C** (1993) Induction temperature of human heat shock factor is reprogrammed in a *Drosophila* cell environment. *Nature* **364**: 252-255
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Coca MA, Almoguera C, Jordano J** (1994) Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible function implications. *Plant Mol Biol* **25**: 479-492
- Coca MA, Almoguera C, Thomas TL, Jordano J** (1996) Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Mol Biol* **31**: 863-876
- Conner TW, LaFayette PR, Nagao RT, Key JL** (1990) Sequence and expression of a HSP83 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **94**: 1685-1695
- Cotto JJ, Fox S, Morimoto RI** (1997) HSF1 granules: A novel stress-induced nuclear compartment of human cells. *J Cell Sci* **110**: 2925-2934
- Craig EA** (1985) The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* **18**: 239-280
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ** (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* **57**: 402-414
- Cunniff NF, Morgan WD** (1993) Analysis of heat shock element recognition by saturation mutagenesis of the human HSP70.1 gene promoter. *J Biol Chem* **268**: 8317-8324
- Cutforth T, Rubin GM** (1994) Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell* **77**: 1027-1036
- Czarnecka E, Ingersoll JC, Gurley WB** (1992) AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene Gmhsp17.5E bind two distinct sets of nuclear proteins in vitro. *Plant Mol Biol* **19**: 985-1000
- Czarnecka-Verner E, Yuan CX, Fox PC, Gurley WB** (1995) Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean. *Plant Mol Biol* **29**: 37-51
- Czarnecka-Verner E, Yuan C-X, Nover L, Scharf K-D, English G, Gurley WB** (1997) Plant heat shock transcription factors: positive and negative aspects of regulation. *Acta Physiol Plant* **19**: 529-537
- Czarnecka-Verner E, Yuan C-X, Scharf K-D, English G, and Gurley WB** (2000) Plants contain a novel multi-member family of heat shock transcription factors without the transcriptional activation potential. *Plant Mol Biol* **43**: 459-471
- Darwin C** (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London
- DeRocher AE, Helm KW, Lauzon LM, Vierling E** (1991) Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol* **96**: 1038-1047
- Desfeux C, Clough SJ, Bent AF** (2000) Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* **123**: 895-904
- DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S** (1982) The heat shock response is self-regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* **31**: 593-603
- Döring P, Treuter E, Kistner C, Lyck R, Chen A, Nover L** (2000) Role of AHA motifs for the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* **12**: 265-278

- Eggers DK, Welch WJ, Hansen WJ** (1997) Complexes between nascent polypeptides and their molecular chaperones in the cytosol of mammalian cells. *Mol Biol Cell* **8**:1559-1573
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J** (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* **16**: 221-229
- Fang X, Chen T, Tran K, Parker CS** (2001) Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin- α 3. *Development* **128**: 3349-3358
- Feldmann KA, Marks MD** (1987) Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet* **208**: 1-9
- Feldmann KA** (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*- mutational spectrum. *Plant J* **1**: 71-82
- Feldmann KA** (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Seed infection/transformation. In: *Methods in Arabidopsis research*. Koncz C, Chua N-H, Schell J (eds). World Scientific, London: 274-289
- Feldmann KA, Malmberg RL, Dean C** (1994) Mutagenesis in *Arabidopsis*. In: *Arabidopsis*. Meyerowitz EM, Somerville CR (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 137-172
- Fernandes M, Xiao H, Lis JT** (1994a) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* **22**: 167-173
- Fernandes M, O'Brien T, Lis JT** (1994b) Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 375-393
- Fernando A, Torres G, Bonner JJ** (1995) Genetic identification of the site of DNA contact in the yeast heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **15**: 5063-5070
- Fiorenza MT, Farkas TD, Dissing M, Kolding D, Zimarino V** (1995) Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* **23**: 467-474
- Flick KE, Gonzales L(Jr.), Harrison CJ, Nelson CM** (1994) Yeast heat shock factor contains a flexible linker between the DNA-binding and trimerization domains. *J Biol Chem* **269**: 12475-12481
- Frejtag W, Zhang Y, Dai R, Anderson MG, Mivechi NF** (2001) Heat shock factor-4 (HSF-4a) represses basal transcription through interaction with TFIIF. *J Biol Chem* **276**: 14685-14694
- Fritsch M, Wu C** (1999) Phosphorylation of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Cell Stress Chaperones* **4**: 102-117
- Georgopoulos CP** (1977) A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. *Mol Gen Genet* **151**: 35-9
- Gershoni JM, Palade GE** (1983) Protein Blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**: 1-15
- Giardina C, Perez-Riba M, Lis JT** (1992) Promotor melting and TFIID complexes on *Drosophila* genes *in vivo*. *Genes Dev* **6**: 2190-2200
- Gibson TJ** (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph.D. thesis, Cambridge University, England
- Gilmour DS, Lis JT** (1986) RNA polymerase II interacts with the promotor region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* **6**: 3984-3989

- Glover JR, Lindquist S** (1998) Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82
- Goodson ML, Sarge KD** (1995) Heat-inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem* **270**: 2447-2450
- Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD** (1995) Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* **15**: 5288-5293
- Green M, Schuetz TJ, Sullivan EK, Kingston RE** (1995) A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol* **15**: 3354-3362
- Greene JM, Larin Z, Taylor IC, Prentice H, Gwinn KA, Kingston RE** (1987) Multiple basal elements of a human hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol Cell Biol* **7**: 3646-3655
- Gross DS, English KE, Collins KW, Lee S** (1990) Genomic footprinting of the yeast HSP82 promoter reveals marked distortion of the DNA helix and constitutive occupancy of heat shock and TATA elements. *J Mol Biol* **216**: 611-631
- Guo Y, Guettouche T, Fenna M, Boellmann F, Pratt WB, Toft DO, Smith DF, Voellmy R** (2001) Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem* **276**: 45791-45799
- Hamilton BA, Palazzolo MJ, Chang JH, VijayRaghavan K, Mayeda CA, Whitney MA, Meyerowitz EM** (1991) Large scale screen for transposon insertions into cloned genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2731-2735
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-560
- Hanahan D** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning: A practical approach. Volume I. Glover DM, IRL-Press, Oxford, Washington DC: 109-135
- Härndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C** (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* **4**:129-138
- Harrar Y, Bellini C, Faure JD** (2001) FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci* **6**: 426-431
- Harrison C, Bohm AA, Nelson HCM** (1994) Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* **263**: 224-227
- Hartl FU** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-580
- Heckathorn SA, Downs CA, Sharkey TD, Coleman JS** (1998) The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol* **116**: 439-444
- Heerklotz D, Döring P, Bonzelius F, Winkelhaus S, Nover L** (2001) The balance of nuclear import and export decides on the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol Cell Biol* **21**: 1759-1768
- Helm KW and Vierling E** (1989) An *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a low molecular weight heat shock protein. *Nucleic Acids Res* **17**: 7995
- Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ** (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**: 330-334

- Hensold JO, Hunt CR, Calderwood SK, Housman DE, Kingston RE** (1990) DNA-binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **10**: 1600-1608
- Hershko A, Ciechanover A** (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-79
- Hershko A** (1988) Ubiquitin-mediated protein degradation. *J Biol Chem* **263**: 15237-15240
- Hightower LE** (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones and prototoxicity. *Cell* **66**: 191-197
- Hill JE, Hemmingsen SM** (2001) *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones* **6**: 190-200
- Hinderhofer K** (1998) Untersuchungen der Expression von Hitzeschockgenen, deren Regulation und der Einfluss von ABI3 während der Samenreifung in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Verlag Ulrich E Grauer, Stuttgart
- Höfgen R, Axelsen KB, Kannangara CG, Schuttke I, Pohlenz HD, Willmitzer L, Grimm B, Wettstein Dv** (1994) A visible marker for antisense RNA expression in plants: Inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1726-1730
- Høj A, Jakobsen BK** (1994) A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J* **13**: 2617-2624
- Holland N, Belkind H, Holland D, Pick U, Edelman M** (1998) Stress-responsive accumulation of plastid chaperonin 60 during seedling development. *Plant J* **13**: 311-316
- Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, Hellman J, Morrice N, MacKintosh C, Morimoto RI, Eriksson JE, Sistonen L** (2001) Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* **20**: 3800-3810
- Höhfeld J, Minami Y, Hartl FU** (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**: 589-598
- Hong SW, Vierling E** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4392-4397
- Hong SW, Vierling E** (2001) Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J* **27**: 25-35
- Hong SW, Lee U, Vierling E** (2003) *Arabidopsis* hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiol* **132**: 757-67
- Horwich AL** (1995) Molecular chaperones: Resurrection or destruction. *Curr Biol* **5**: 455-458
- Hübel A, Schöffl F** (1994) *Arabidopsis* heat shock factor: isolation and characterization of gene and the recombinant protein. *Plant Mol Biol* **26**: 353-362
- Hübel A, Lee JH, Wu C, Schöffl F** (1995) *Arabidopsis* heat shock factor is constitutively active in *Drosophila* and human cells. *Mol Gen Genet* **248**: 136-141
- Hubl ST, Owens JC, Nelson HC** (1994) Mutational analysis of the site of DNA contact in the yeast heat shock transcription factor. *Nature Struct Biol* **1**: 615-620
- Jakobsen BK, Pelham HRB** (1991) A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *EMBO J* **10**: 369-375
- Jedlicka P, Mortin MA, Wu C** (1997) Multiple functions of *Drosophila* heat shock factor *in vivo*. *EMBO J* **16**: 2452-2462
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D** (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8447-8451

- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plants. The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**: 387-405
- Johnson JL, Craig EA** (2000) A role for the Hsp40 Ydj1 in repression of basal steroid receptor activity in yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 3027-3036
- Jolly C, Morimoto RI, Robert-Nicoud M, Vourc'h C** (1997) HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: Relationship with transcription sites. *J Cell Sci* **110**: 2935-2941
- Jolly C, Usson Y, Morimoto RI** (1999) Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear stress granules. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6769-6774
- Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI** (1992) Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* **255**: 1243-1245
- Kaiser K, Goodwin SF** (1990) „Site-selected“ transposon mutagenesis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1686-1690
- Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V** (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* **21**: 2591-2601
- Kanei-Ishii C, Tanikawa J, Nakai A, Morimoto RI** (1997) Activation of heat shock transcription factor 3 by c-Myb in the absence of cellular stress. *Science* **277**: 246-248
- Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lam E** (1997) Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* **389**: 802-3
- Kim B-H** (2001) Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem *Arabidopsis thaliana* Hitzeschockfaktor 1 und den potentiell negativen Regulatoren, HSP/HSC70 und HSBP1. Dissertation, Universität Tübingen, Germany
- Kim S-J, Tsukiyama T, Lewis MS, Wu C** (1994) Interaction of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock factor with its cognate DNA site: a thermodynamic analysis using analytical ultracentrifugation. *Protein Sci* **3**: 1040-1051
- Kitagawa M, Matsumura Y, Tsuchido T** (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 165-171
- Knauf U, Newton EM, Kyriakis J, Kingston RE** (1996) Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev* **10**: 2782-2793
- Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hagaman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, Smithies O** (1989) Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8927-31
- Kooter JM, Mol JNM** (1993) *Trans*-inactivation of gene expression in plants. *Curr Opin Biotechnol* **4**: 166-171
- Krishna P, Reddy RK, Sacco M, Frappier JR, Felsheim RF** (1997) Analysis of the native forms of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in plant cytosolic extracts. *Plant Mol Biol* **33**: 457-66
- Kroeger PE, Morimoto RI** (1994) Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* **14**: 7592-7603
- Krysan PJ, Young JC, Tax F, Sussman MR** (1996) Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8145-8150

- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR** (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283-2290
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larson JS, Schuetz TJ, Kingston RE** (1988) Activation *in vitro* of sequence specific DNA binding by a human regulatory factor. *Nature* **335**: 372-375
- Larson JS, Schuetz TJ, Kingston E** (1995) *In vitro* activation of purified human heat shock factor by heat. *Biochemistry* **34**: 1902-1911
- Laufs P, Autran D, Traas J** (1999) A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J* **18**: 131-139
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E** (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO J* **16**: 659-671
- Lee GJ, Vierling E** (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**: 189-198
- Lee H, Kraus KW, Wolfner MF, Lis JT** (1992) DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes Dev* **6**: 284-295
- Lee JH, Hübel A, Schöffl F** (1995) Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J* **8**: 603-612
- Lee JH, Schöffl F** (1996) An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **252**: 11-19
- Leppa S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge KD, Sistonen L** (1997) Overexpression of HSF2-b inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem* **272**: 15293-15298
- Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL, Lee WM** (1991) Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1681-1685
- Li J, Chory J** (1998) Preparation of DNA from *Arabidopsis* *Methods Mol Biol* **82**: 55-60
- Lin BL, Wang JS, Liu HC, Chen RW, Meyer Y, Barakat A, Delseny M** (2001) Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* **6**: 201-208
- Lindquist S** (1986) The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* **55**: 1151-1191
- Lindquist S, Craig EA** (1988) The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* **22**: 631-677
- Lindquist S, Kim G** (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5301-5306
- Ling J, Wells DR, Tanguay RL, Dickey LF, Thompson WF, Gallie DR** (2000) Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulator γ element and mediates its high translational activity. *Plant Cell* **12**: 1213-1227
- Liu XD, Liu PC, Santoro N, Thiele DJ** (1997) Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J* **16**: 6466-77
- Liu PCC, Thiele DJ** (1999) Modulation of human heat stress factor trimerization by the linker domain. *J Biol Chem* **274**: 17219-17225

- Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schöffl F.** (2004) Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genomics* **271**: 11-21
- Ludwig-Müller J, Krishna P, Forreiter C** (2000) A glucosinolate mutant of *Arabidopsis* is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. *Plant Physiol* **123**: 949-958
- Lyck R, Harmening U, Höhfeld I, Treuter E, Scharf KD, Nover L** (1997) Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**: 117-125
- Malik MK, Slovin JP, Hwang CH, Zimmerman JL** (1999) Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *Hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J* **20**: 89-99
- Marchler G, Wu C** (2001) Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *EMBO J* **20**: 499-509
- Martinez E, Givel F, Wahli W** (1991) A common ancestor DNA motif for invertebrate and vertebrate hormone response elements. *EMBO J* **10**: 263-268
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-responsive elements (STRE). *EMBO J* **15**: 2227-2235
- Mason PB Jr, Lis JT** (1997) Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem* **272**: 33227-33233
- Mathew A, Mathur SK, Morimoto RI** (1998) Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* **18**: 5091-5098
- Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S, Morimoto RI** (2001) Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* **21**: 7163-7171
- McBride KE, Summerfelt KR** (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **14**: 269-276
- McClellan AJ, Frydman J** (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nature Cell Biol* **3**: E51-E53
- McGarry TJ, Lindquist S** (1986) Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 399-403
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB** (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant J* **8**: 613-622
- McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ** (1998) Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* **273**: 7523-7528
- McMillan DR, Christians E, Forster M, Xiao X, Connell P, Plumier JC, Zuo X, Richardson J, Morgan S, Benjamin IJ** (2002) Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol* **22**: 8005-14
- Mehlen P, Briolay J, Smith L, Diaz-latoud C, Fabre N, Pauli D, Arrigo AP** (1993) Analysis of the resistance to heat and hydrogen peroxide stresses in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the *Drosophila* 27-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem* **215**: 277-284

- Meissner RC, Jin HL, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A, Martin C, Paz-Ares J, Smeekens S, Tonelli C, Weisshaar B, Baumann E, Klimyuk V, Marillonnet S, Patel K, Speulman E, Tissier AF, Bouchez D, Jones JJD, Pereira A, Wisman E, Bevan M** (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**: 1827-1840
- Mercier PA, Foska J, Ovsenek N, Westwood JT** (1997) *Xenopus* heat shock factor 1 is a nuclear protein before heat stress. *J Biol Chem* **272**: 14147-14151
- Mercier PA, Winegarden NA, Westwood JT** (1999) Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J Cell Sci* **112**: 2765-2774
- Mestrlil R, Schiller P, Amin J, Klapper H, Ananthan J, Voellmy R** (1986) Heat shock and ecdysterone activation of the *Drosophila melanogaster* hsp23 gene; a sequence element implied in developmental regulation. *EMBO J* **5**: 1667-1673
- Miernyk JA** (1999) Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol* **121**: 695-703
- Mirault ME, Southgate R, Delwart E** (1982) Regulation of heat shock genes: A DNA sequence upstream of *Drosophila* hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. *EMBO J* **1**: 1279-1285
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf KD** (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev* **16**: 1555-67
- Morano KA, Liu PCC, Thiele DJ** (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 197-203
- Morgan WD** (1989) Transcription factor Sp1 binds to and activates a human hsp70 gene promoter. *Mol Cell Biol* **9**: 4099-4104
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C** (1994a) Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 1-31
- Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE, Mathur SK, Murphy SP, Nakai A, Sarge K, Abravaya K, Sistonen LT** (1994b) Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 417-455
- Morimoto RI** (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**: 3788-3796
- Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T** (1999) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* **13**: 655-665
- Mosser DD, Kotzbauer PT, Sarge KD, Morimoto RI** (1990) *In vitro* activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 3748-3752
- Mosser DD, Duchaine J, Massie B** (1993) The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated *in vivo* by Hsp70. *Mol Cell Biol* **13**: 5427-5438
- Müller A** (1961) Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Die Kulturpflanze* **9**: 364-393

- Mullis KB, Falcoona FA** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Murphy PJ, Kanelakis KC, Galigniana MD, Morishima Y, Pratt WB** (2001) Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **276**: 30092-30098
- Nacry P, Camilleri C, Courtial B, Caboche M, Bouchez D** (1998) Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* **149**: 641-650
- Nagao SC, Gurley WB** (1999) Use of heat-shock promoters to control gene expression in plants. In: Inducible gene expression in plants. Reynold (ed) CABI Publ, NY: 97-126
- Nakai A, Morimoto RI** (1993) Characterization of a novel heat shock transcription factor, HSF3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* **13**: 1983-1997
- Nakai A, Kawazoe Y, Tanabe M, Nagata K, Morimoto RI** (1995) The DNA-binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian erythroblast cell line HD6. *Mol Cell Biol* **15**: 5268-5278
- Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K** (1997) HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **17**: 469-481
- Nakai A** (1999) New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. *Cell Stress Chaperones* **4**: 86-93
- Nakai A, Ishikawa T** (2001) Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *EMBO J* **20**: 2885-2895
- Nathan DF, Vos MH, Lindquist S** (1997) *In vivo* functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12949-12956
- Neves AM, Barahona J, Galego J, Rodrigues-Pousada C** (1988) Ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis* and their expression during heat shock. *Gene* **73**: 87-96
- Newton EM, Knauf U, Green M, Kingston RE** (1996) The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol* **16**: 839-846
- Nieto-Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A, Parker CS** (1990) The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* **62**: 807-817
- Nover L** (1991) Heat shock response. Boca Raton FL: CRC Press 1st ed.
- Nover L, Scharf K-D, Gagliardi D, Vergne P, Czarnecka-Verner E, Gurley WB** (1996) The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* **1**: 215-223
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra S, Ganguli A, Scharf K-D** (2001) *Arabidopsis* and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* **6**: 177-189
- O'Brien T, Lis JT** (1993) Rapid changes in *Drosophila* transcription after an instantaneous heat shock. *Mol Cell Biol* **13**: 3456-3463
- Olmstedt JB** (1981) Affinity purification of antibodies from diazotized paper *Blots* of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem* **256**: 11955-11957
- Orosz A, Wisniewski J, Wu C** (1996) Regulation of *Drosophila* heat shock factor trimerization: global sequence requirements and independence of nuclear localization. *Mol Cell Biol* **16**: 7018-7030
- Parinov S, Sundaresan V** (2000) Funktional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 157-161

- Parker CS, Topol J** (1984) A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell* **63**: 357-369
- Parsell DA, Lindquist S** (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496
- Parsell DA, Lindquist S** (1994) Heat shock proteins and stress tolerance. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 457-494
- Pelham HRB** (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell* **46**: 959-961
- Pelham HRB, Bienz M** (1982) A synthetic heat shock promoter element confers heat inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *EMBO J* **1**: 1473-1477
- Perisic O, Xiao H, Lis JT** (1989) Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* **50**: 797-806
- Peteranderl R, Nelson HCM** (1993) Trimerization of the heat shock gene transcription factor by a triple stranded α -helical coiled-coil. *Biochem* **13**: 12272-12276
- Petko L, Lindquist S** (1986) Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* **45**: 885-894
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L** (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* **15**: 1118-1131
- Plasterck RAH** (1993) Reverse genetics of *Caenorhabditis elegans*. *BioAssays* **14**: 629-633.
- Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S** (1996) Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* **10**: 1371-1378
- Prändl R, Schöffl F** (1996) Heat shock elements are involved in heat shock promoter activation during tobacco seed maturation. *Plant Mol Biol* **31**: 157-162
- Prändl R, Hinderhofer K, Eggers-Schumacher G, Schöffl F** (1998) HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **258**: 269-278
- Pratt WB, Krishna P, Olsen LJ** (2001) Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci* **6**: 54-58
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH** (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**: 65-75
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S** (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 479-492
- Rabindran S, Giorgi G, Clos J, Wu C** (1991) Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6906-6910
- Rabindran S, Haroun R, Clos J, Wisniewski J, Wu C** (1993) Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**: 230-234
- Rabindran SK, Wisniewski J, Li L, Li GC, Wu C** (1994) Interaction between heat shock factor and hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA binding activity *in vivo*. *Mol Cell Biol* **14**: 6552-6560
- Raitt DC, Johnson AL, Erkinen AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH** (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 *in vivo* and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* **11**: 2335-2347

- Ranson NA, White HE, Saibil HR** (1998) Chaperonins. *Biochem J* **333**: 233–242
- Reindl A, Schöffl F, Schell J, Koncz C, Bako L** (1997) Phosphorylation by a cyclin-dependent kinase modulates DNA-binding of the *Arabidopsis* heat shock factor *in vitro*. *Plant Physiol* **115**: 93–100
- Reindl A, Schöffl F** (1998) Interaction between the *Arabidopsis thaliana* heat shock transcription factor HSF1 and the TATA binding protein TBP. *FEBS Lett* **436**: 318–322
- Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ** (1988) Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* **242**: 433–436
- Riddihough G, Pelham HRB** (1986) Activation of the *Drosophila* hsp27 promoter by heat shock and by ecdysone involves independent and remote regulatory sequences. *EMBO J* **5**: 1653–1658
- Rieping M, Schöffl F** (1992) Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Gen* **231**: 226–232
- Rojas A, Almoguera C, Jordano J** (1999) Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. *Plant J* **20**: 601–610
- Rojas A, Almoguera C, Carranco R, Scharf KD, Jordano J** (2002) Selective activation of the developmentally regulated Ha hsp17.6 G1 Promoter by heat stress transcription factors. *Plant Physiol* **129**: 1207–1215
- Rollet E, Lavoie JN, Landry J, Tanguay RM** (1992) Expression of *Drosophila*'s 27 kDa heat shock protein into rodent cells confers thermal resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 116–120
- Rushforth AM, Saari B, Anderson P** (1993) Site-selected insertion of the transposon Tc1 into a *Caenorhabditis elegans* myosin light chain gene. *Mol Cell Biol* **13**: 902–910
- Rutherford SL, Lindquist S** (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**: 336–342
- Sabehat A, Weiss D, Lurie S** (1998) Heat shock proteins and cross tolerance in plants. *Physiol Plant* **103**: 437–441
- Saiki RK, Scharf S, Falcoona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of β -Globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**: 1350–1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY
- Sanchez Y, Lindquist SL** (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112–1115
- Sandaltzopoulos R, Becker PB** (1998) Heat shock factor increases the reinitiation rate from potentiated chromatin templates. *Mol Cell Biol* **18**: 361–367
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–5467
- Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI** (1991) Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev* **5**: 1902–1911
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI** (1993) Activation of heat shock gene transcription by HSF1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* **13**: 1392–1407

- Sarge KD, Park-Sarge OK, Kirby JD, Mayo KE, Morimoto RI** (1994) Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat shock gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* **50**: 1334-1343
- Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI** (1998) Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev* **12**: 1962-1974
- Scharf KD, Rose S, Zott W, Schöffl F, Nover L** (1990) Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region remarkable homology to the DNA binding domain of yeast HSF. *EMBO J* **9**: 4495-4501
- Scharf KD, Materna T, Treuter E, Nover L** (1994) Heat stress promoters and transcription factors. In: *Plant promoters and transcription factors*. Nover L (ed) Springer Verlag Berlin: 121-158
- Scharf K-D, Heider H, Höhfeld I, Lyck R, Schmidt E, Nover L** (1998) The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol* **18**: 2240-2251
- Scharf K-D, Siddique M, Vierling E** (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins (sHsps) and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chap* **6**: 225-237
- Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E** (1994) An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**: 1899-1909
- Schlesinger MJ** (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem* **265**: 12111-12114
- Schmitz G, Schmidt M, Feierabend J** (1996) Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descent and analysis of its mRNA and protein expression. *Plant Mol Biol* **30**: 479-92
- Schöffl F, Rieping M, Baumann G** (1987) Constitutive transcription of a soybean heat shock gene by a cauliflower mosaic virus promoter in transgenic tobacco plants. *Dev Genet* **8**: 365-374
- Schöffl F, Prändl R, Reindl A** (1998) Regulation of the heat shock response. *Plant Physiol* **117**: 1135-1141
- Schöffl F, Prändl R** (1999) De-repression of heat shock protein synthesis in transgenic plants. In: *Plant Responses to Environmental Stress*. Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ (eds) Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers Limited: 65-73
- Schöffl F, Prändl R, Reindl A** (1999) Molecular responses to heat stress. In: *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants*. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (eds) RG Landes company, Texas: 81-98
- Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE** (1991) Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in human. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6911-6915
- Schultheiss J, Kunert O, Gase U, Scharf KD, Nover L, Rüterjans H** (1996) Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat-stress transcription factor HSF24. *Eur J Biochem* **236**: 911-921
- Severin K, Wagner A, Schöffl F** (1995) A heat-inducible *Adh* gene as a reporter for a negative selection in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Res* **4**: 163-172
- Sheldon LA, Kingston RE** (1993) Hydrophobic coiled-coil domains regulate the subcellular localization of human heat shock factor-2. *Genes Dev* **7**: 1549-1558

- Shi Y, Kroeger PE, Morimoto RI** (1995) The carboxy-terminal transactivation domain of heat shock factor 1 is negatively regulated and stress-responsive. *Mol Cell Biol* **15**: 4309-4318
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI** (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* **12**: 654-666
- Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI** (1992) Activation of heat shock factor 2 during hemin induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **12**: 4104-4111
- Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI** (1994) Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* **14**: 2087-2099
- Smith DE, Fisher PA** (1984) Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose *Blots*. *J Cell Biol* **99**: 20-28
- Smýkal P, Hrdý I, Pechan PM** (2000) High-molecular-mass complexes formed *in vivo* contain smHSPs and HSP70 and display chaperone-like activity. *Eur J Biochem* **267**: 2195-2207
- Solomon JM, Rossi JM, Golic K, McGarry T, Lindquist S** (1991) Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat shock regulation in *Drosophila*. *New Biol* **3**: 1106-1120
- Sorger PK, Pelham HRB** (1987a) Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells *EMBO J* **6**: 993-998
- Sorger PK, Pelham HRB** (1987b) Purification and characterization of a heat shock element binding protein from yeast. *EMBO J* **6**: 3035-3041
- Sorger PK, Pelham HRB** (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* **54**: 855-864
- Sorger PK, Nelson HCM** (1989) Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled coil Motif. *Cell* **59**: 807-813
- Sorger PK** (1990) Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained transcriptional activators. *Cell* **62**: 793-805
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L** (1999) Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol* **120**: 521-528
- Spena A, Hain R, Ziervogel U, Saedler H, Schell J** (1985) Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila* hsp70 promoter in plants. *EMBO J* **4**: 2739-2743
- Stone DE, Craig EA** (1990) Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 1622-1632
- Strepp R, Scholz S, Kruse S, Speth V, Reski R** (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4368-4373
- Sun W, Bernard C, van De Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N** (2001) At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J* **27**: 407-415

- Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H, Martienssen R** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* **9**: 1797-1810
- Sussman MR, Amasino RM, Young JC, Krysan PJ, Austin-Phillips S** (2000) The Arabidopsis knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol* **124**: 1465-1467
- Taira T, Narita T, Iguchi-Arigo SM, Arigo H** (1997) A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res* **25**: 1975-1983
- Takahashi T, Komeda Y** (1989) Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **219**: 365-372
- Takahashi T, Naito S, Komeda Y** (1992) The *Arabidopsis* HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. *Plant J* **2**: 751-761
- Tanabe M, Nakai A, Kawazoe Y, Nagata K** (1997) Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3. *J Biol Chem* **272**: 15389-15395
- Tanabe M, Kawazoe Y, Takeda S, Morimoto RI, Nagata K, Nakai A** (1998) Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of the heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J* **17**: 1750-1758
- Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Liu XD, Liu PC, Thiele DJ, Nakai A** (1999) The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J Biol Chem* **274**: 27845-27856
- Tatsuta T, Joob DM, Calendar R, Akiyama Y, Ogura T** (2000) Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of sigma 32. *FEBS Lett* **478**: 271-275
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Tilly K, Murialdo H, Georgopoulos C** (1981) Identification of a second *Escherichia coli* groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 1629-1633
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM** (1974) Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**: 389-398
- Tomoyasu T, Gamer J, Bukau B, Kanemori M, Mori H, Rutman AJ, Oppenheim AB, Yura T, Yamanaka K, Niki H, et al.** (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J* **14**: 2551-2560
- Topol J, Ruden DM, Parker CS** (1985) Sequences required for *in vitro* transcriptional activation of a *Drosophila* hsp70 gene. *Cell* **42**: 527-537
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354
- Treuter E, Nover L, Ohme K, Scharf K-D** (1993) Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol Gen Genet* **240**: 113-125
- Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM** (2004) The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* **15**: 1254-61
- Tsukiyama T, Becker PB, Wu C** (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* **367**: 525-532

- Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 5536-5540
- Van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR** (1990) Antisense chalcone synthase genes in petunia: Visualization of variable transgene expression. Mol Gen Genet **220**: 204-212
- Van der Krol AR, Chua N-H** (1991) The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. Plant Cell **3**: 667-675
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van-den-Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J** (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature **252**: 169-170
- Van Sluys MA, Tempe J, Fedoroff N** (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize *Activator* element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. Embo J **13**: 3881-3889
- Velten J, Schell J** (1985) Selection-expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. Nucleic Acids Res **13**: 6981-6998
- Vogel JL, Parsell DA, Lindquist S** (1995) Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. Curr Biol **5**: 306-317
- Volloch V, Gabai VL, Rits S, Force T, Sherman MY** (2000) HSP72 can protect cells from heat-induced apoptosis by accelerating the inactivation of stress kinase JNK. Cell Stress Chaperones **5**: 139-147
- Vuister GW, Kim S-J, Wu C, Bax A** (1994a) NMR evidence for similarities between the DNA-binding regions of *Drosophila melanogaster* heat shock factor and the helix-turn-helix and HNF/fork head families of transcription factors. Biochemistry **33**: 10-16
- Vuister GW, Kim SJ, Orosz A, Marquardt I, Wu C, Bax A** (1994b) Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. Structural Biol **1**: 605-614
- Wang Z, Lindquist S** (1998) Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in *Drosophila* embryos enable the heat shock response. Development **125**: 4841-4850
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J Exp Bot **47**: 325-338
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. Plant Physiol **112**: 747-757
- Wei R, Wilkinson H, Pfeifer K, Schneider C, Young R, Guarente L** (1986) Two or more copies of *Drosophila* heat shock consensus sequence serve to activate transcription in yeast. Nucleic Acids Res **14**: 8183-8188
- Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H, Gatz C** (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. Plant J **5**: 559-569
- Wells DR, Tanguay RL, Le H, Gallie DR** (1998) HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. Genes Dev **12**: 3236-3251
- Welte MA, Tetrault JM, Dellavalle RP, Lindquist SL** (1993) A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex multicellular organism. Curr Biol **3**: 842-853
- Westneat DF, Noon WA, Reeve HK, Aquadro CF** (1988) Improved hybridization conditions for DNA "fingerprints" probed with M13. Nucleic Acids Res **16**: 4161

- Westwood JT, Clos J, Wu C** (1991) Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalisation of heat shock factor. *Nature* **353**: 822-827
- Westwood JT, Wu C** (1993) Activation of *Drosophila* heat shock factor: conformational change associated with a monomer to trimer transition. *Mol Cell Biol* **13**: 3481-3486
- Wiederrecht G, Shuey DJ, Kibbe WA, Parker CS** (1987) The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. *Cell* **48**: 507-515
- Wiederrecht G, Seto D, Parker S** (1988) Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces* heat shock transcription factor. *Cell* **54**: 841-853
- Wilkins RC, Lis JT** (1997) Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res* **25**: 3963-3968
- Wisniewski J, Orosz A, Allada R, Wu C** (1996) The C-terminal region of *Drosophila* heat shock factor (HSF) contains a constitutively functional transactivation domain. *Nucleic Acids Res* **24**: 367-374
- Wu C** (1984) Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* **311**: 81-84
- Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroun RI, Kim SJ, Rabindran SK, Westwood JT, Wisniewski J, Yim G** (1994) Structure and regulation of heat shock transcription factor. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 395-416
- Wu C** (1995) Heat shock transcription factors: Structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-469
- Wunderlich M, Werr W, Schöffl F** (2003) Generation of dominant-negative effects on the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a chimaeric HSF1 protein fusion construct. *Plant J* **35**: 442-51
- Xavier IJ, Mercier PA, McLoughlin CM, Ali A, Woodgett JR, Ovsenek N** (2000) Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* **275**: 29147-29152
- Xiao H, Lis JT** (1988) Germline transformation used to define key features of the heat shock response element. *Science* **239**: 1139-1142
- Xiao H, Perisic O, Lis JT** (1991) Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* **64**: 585-593
- Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ** (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J* **18**: 5943-5952
- Yamanouchi U, Yano M, Lin H, Ashikari M, Yamada K** (2002) A rice spotted leaf gene, Spl7, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7530-7535
- Yeh CH, Chang PF, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY** (1997) Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10967-10972
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU** (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool *J Cell Biol* **154**: 267-274
- Yuan CX, Gurley WB** (2000) Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell Stress Chaperones* **5**: 229-242

- Yura T, Nakahigashi K** (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**: 153-158
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J** (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* **2**: 2143-2150
- Zandi E, Tran TN, Chamberlain W, Parker CS** (1997) Nuclear entry, oligomerization, and DNA binding of the *Drosophila* heat shock transcription factor are regulated by a unique nuclear localization sequence. *Genes Dev* **11**: 1299-1314
- Zhang L, Lohmann C, Prändl R, Schöffl F** (2003) Heat stress-dependent DNA binding of *Arabidopsis* heat shock transcription factor HSF1 to heat shock gene promoters in *Arabidopsis* suspension culture cells *in vivo*. *Biol Chem* **384**: 959-63
- Zhang Y, Frejtag W, Dai R, Mivechi NF** (2001) Heat shock factor-4 (HSF-4a) is a repressor of HSF-1 mediated transcription. *J Cell Biochem* **82**: 692-703
- Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF** (2002) Targeted disruption of *hsf1* leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* **86**: 376-393
- Zhong M, Orosz A, Wu C** (1998) Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol Cell* **2**: 101-108
- Zimarino V, Wilson S, Wu C** (1990) Antibody-mediated activation of *Drosophila* heat shock factor *in vitro*. *Science* **249**: 546-549
- Zuo J, Baler R, Dahl G, Voellmy R** (1994) Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol Cell Biol* **14**: 7557-7568
- Zuo J, Rungger D, Voellmy R** (1995) Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol* **15**: 4319-4330
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R** (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**: 471-480

7 ANHANG

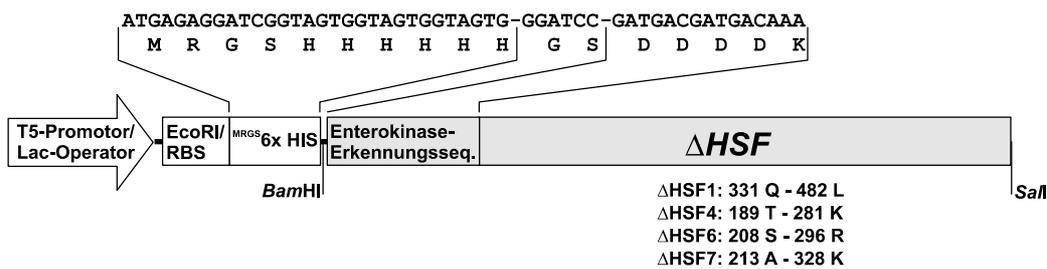
7.1 Konstruktarten

Konstrukte zur Expression von *Arabidopsis*-HSF in *E. coli*

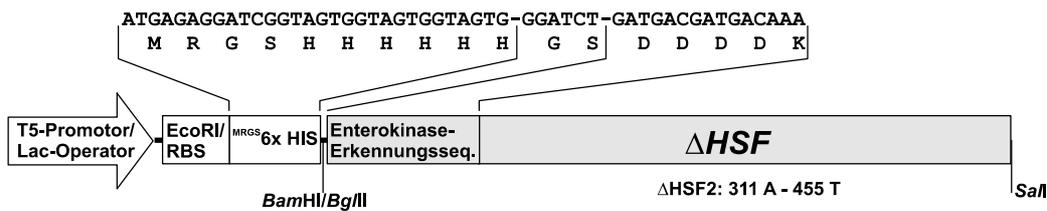
pQE30- HSF7



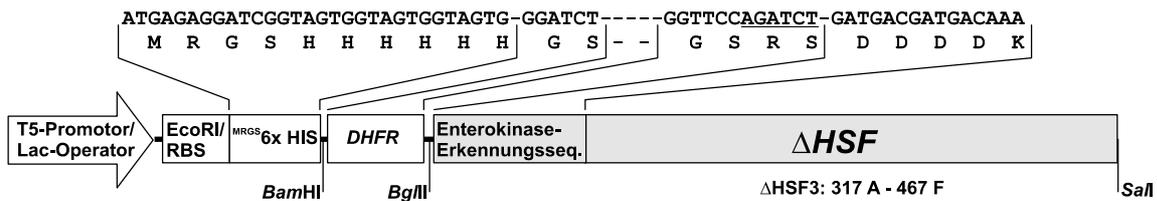
pQE30- ΔHSF1/ΔHSF4/ΔHSF6/ΔHSF7



pQE30- ΔHSF2

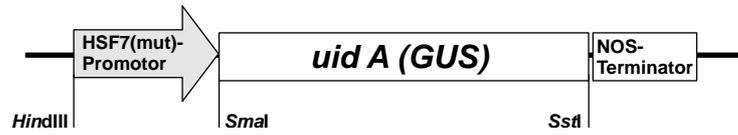


pQE40- (DHFR)ΔHSF3



Konstrukte zur Analyse des *HSF7*-Promotors

pGPTV-pHSF7::*GUS* und pGPTV-pHSF7mut::*GUS*

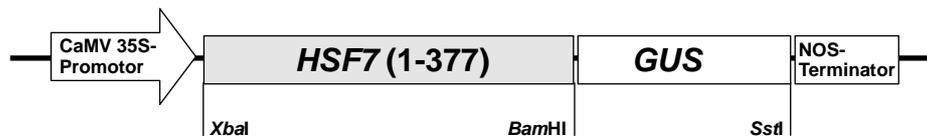


Konstrukte zur ektopischen Expression von *HSF7* in *Arabidopsis*

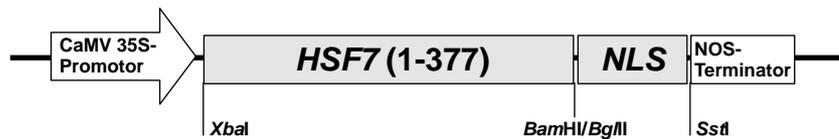
pBI121-*HSF7*



pBI121-*HSF7*-*GUS*



pBI121-*HSF7*-NLS



NLS

CTAGAGAGATCTACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTGAGAGCTCCAGTC
 R S T M A P K K K R K V D P R V G S .

Restriction sites are indicated by vertical lines: BglII (under CTAGAGAGATCTACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTGAGAGCTCCAGTC), BamHI/BglII (under CTAGAGAGATCTACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTGAGAGCTCCAGTC), BamHI (under CTAGAGAGATCTACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTGAGAGCTCCAGTC), and SstI (under CTAGAGAGATCTACAATGGCTCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTAGATCCCCGGGTAGGATCCTGAGAGCTCCAGTC).

7.2 Feldmann-Linien

Übersicht über die als „Feldmann-Linien“ bezeichneten 12.600 T-DNA Insertionslinien, die im Rahmen dieser Arbeit durchmustert wurden. Angegeben sind die Bezeichnungen der vereinigten Samenpopulationen von je 100 unabhängigen Transformanden, wie sie von den entsprechenden Samen-*Stock-Centern* angefordert werden können. Für das Durchmustern mittels PCR wurde genomische DNA dieser Samenpopulationen wie angegeben zu 13 *Superpools* (SP) vereinigt. 45 x CS = Arabidopsis Biological Resource Center 15 x N = Nottingham Arabidopsis Stock Center; 66 x P = DuPont Collection. (f) DNA dieser Population stand nicht zur Verfügung.

SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7
N2606	CS2616	CS2626	CS2638	CS2648	CS6484	P1000
N2607	N2617	CS2627	CS2639	CS2649	CS6485	P1200 (f)
N2608	CS2618	CS2628	CS2640	CS2650	CS6486	P1400
N2609	N2619	N2629	CS2641	CS2651	CS6487	P1500
CS2610	CS2620	CS2632	CS2642	CS2652	CS6488	P1600
N2611	CS2621	N2633	CS2643	CS2653	CS6490	P1700
N2612	CS2622	CS2634	CS2644	CS2654 (f)	CS6491	P1800
N2613	CS2623	CS2635	CS2645	CS6481	CS6494	P1900
N2614	CS2624	CS2636	CS2646	CS6482	CS6496	P2000
N2615	CS2625	CS2637	CS2647	CS6483	P700	P2100
SP8	SP9	SP10	SP11	SP12	SP13	
P2200	P3400	P4000	P6000	P7600	P3900	
P2300	P3500	P4100	P6100	P7700	P4200	
P2400	P3600	P4500	P6200	P7900	P4300	
P2500	P3700 (f)	P4600	P6300	N2630	P4400	
P2600	P3800	P4800	P6400	N2631	P4700	
P2700	P7100 (f)	P5100	P6500	P1200	P5000	
P2800	P7200	P5400	P6600	P1300	P5300	
P2900	P7300	P5600	P6700	P3200	P5800	
P3000	P7400	P5700	P6800	P3300	P7000	
P3100	P7500	P5900	P6900	P3700	P7800	

7.3 Übersichtstabelle: 21 HSF-Homologe aus *Arabidopsis thaliana*

Angegebene HSF-Bezeichnungen nach Nover *et al.* (2001). Grau unterlegt sind die Daten der sechs HSF, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden. Genbank-Akzessionsnummern von Sequenzen, die für theoretische Analysen (Genstruktur, AS-Alignment) verwendet wurden, sind fett hervorgehoben. (*) Hier wurde der entsprechende ORF sehr wahrscheinlich falsch vorhergesagt. (§) Hier wurde sehr wahrscheinlich ein falsches Startcodon zugrunde gelegt. (!) Für HSF1 gibt es klonale Unterschiede in der Länge des C-terminalen Asparagin (N) *stretches*. Hier wurden entsprechend der Genbankangaben 20 N zugrunde gelegt. *HSF1*-Expressionsklone, die in dieser Arbeit verwendet wurden, besitzen 16 N.

N ^o	Bezeichnung (alte Bezeichnungen)	Chromo- som	ORF (AS)	MW (kDa)	pI	Genbank-Akzessions-Nummer	
						cDNA/Protein (Referenz)	Genomische DNA/Protein (Referenz)
Klasse A							
1	AtHsfA1a (HSF1)	IV	495!	55.7!	4.9!		X76167 / CAA53761 (Hübel & Schöffl, 1994) Z97344 / CAB10555 AL391147 / CAC01846 [§]
2	AtHsfA1b (HSF3)	V	481	53.6	4.6	Y14068 / CAA74397 (Prändl <i>et al.</i> 1998)	
3	AtHsfA1d	I	482	54.2	4.7	EST: N38285	AC007767 / AAF81328 AC084110 / AAG60176
4	AtHsfA1e (HSF2)	III	468	52.0	4.6	AJ251865 / CAB63800 (Schöffl & Prändl 1999)	AC018363 / AAF26960
5	AtHsfA2	II	345	39.1	5.0		AC004747 / AA31222
6	AtHsfA3	V	412	46.5	5.2		AL162506 / CAB82937 *
7	AtHsfA4a (HSF21)	IV	401	46.2	5.2	U68561 / AAC31792 (Nover <i>et al.</i> 1996)	AL021711 / CAA16745 AL161549.2 / CAB78890
8	AtHsfA4c	V	345	39.6	5.5	EST: H37587 EST: A1995151	AB012245 / BAB09213
9	AtHsfA5 (At-HsfA4b, Bharti <i>et al.</i> 2000)	IV	466	52.4	6.2	AY039528 / AAK62584	Z97335 / CAB10177 * AL161537 / CAB78440 *
10	AtHsfA6a	V	282	33.2	5.4		NC_003076 / NP_199197 AB026651 / BAB11313 *
11	AtHsfA6b	III	406	46.7	4.7	AY045974 / AAK76648	AB022223 / BAB01258
12	AtHsfA7a (At-HsfA3, Bharti <i>et al.</i> 2000)	III	272	31.8	6.0	EST : R65204	AL049711 / CAB41311
13	AtHsfA7b	III	282	32.6	5.0		AL138648 / CAB86436
14	AtHsfA8 (HSF5)	I	374	42.6	4.6	AJ251866 / CAB63801 (Schöffl & Prändl, 1999)	AC012563 / AAG51992 NC_003070 / NP_176964
15	AtHsfA9	V	331	38.2	5.4	cDNA: HSF6 Fragment (Prändl, unpubl.)	AB018115 / BAA97129 NC_003076.1 NP_200218
Klasse B							
16	AtHsfB1 (HSF4)	IV	284	31.3	6.3	U68017 / AAC31756 (Nover <i>et al.</i> 1996) Y14069 / CAA74398 (Prändl <i>et al.</i> 1998)	Z99707 / CAB16764 AL161590 / CAB80365
17	AtHsfB2a (HSF6)	V	299	34.1	5.8	AJ251867 / CAB63802 (Schöffl & Prändl 1999)	AJ251867 / CAB63802 AB016880 / BAB10163
18	AtHsfB2b (HSF7) (At-HsfB2, Bharti <i>et al.</i> 2000)	IV	377	39.7	4.7	AJ251868 / CAB63803 (Schöffl & Prändl 1999) [unvollst. ORF, 328 AS]	AL049500 / CAB39937 AL161532 / CAB78209
19	AtHsfB3	II	244	28.3	5.1		AC002510 / AA84350
20	AtHsfB4	I	348	39.6	7.6		AC083835 / AA50634
Klasse C							
21	AtHsfC1	III	330	37.7	5.7	EST: H36030 EST: T21116	AB020746 / BAB02003 NC_003074 / NP_189095

7.4 AS-Alignment von HSF1-4 und HSF6-7

AS-Alignment wurden in Megalign (DNA-Star von Lasergene) unter Verwendung der Clustal-Methode erstellt. Schwarz unterlegt sind Aminosäuren, die in mindestens 4 Sequenzen übereinstimmen. Funktionelle Proteindomänen wurden basierend auf Sequenzhomologie identifiziert und gekennzeichnet. Grau unterlegt sind die C-terminalen Bereiche, die zur Generierung entsprechender Antikörper in *E. coli* exprimiert wurden. HR-A bzw -B: Hydrophobe Region A bzw. B, NLS: Nuclear Localization Signal, AHA: aromatische, hydrophobe und saure (acidic) Aminosäuren innerhalb der Aktivierungsdomäne, NES: Nuclear Export Signal.

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 49 columns of amino acid sequences.

DNA-Bindungsdomäne (DBD)

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 100 columns of amino acid sequences for the DNA-binding domain.

DNA-Bindungsdomäne (DBD)

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 150 columns of amino acid sequences for the DNA-binding domain.

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 200 columns of amino acid sequences.

HR-A

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 250 columns of amino acid sequences for HR-A, with 'd a d a d a d a d a d' above.

Linker HR-A/B

HR-B

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 279 columns of amino acid sequences for Linker HR-A/B and HR-B, with 'a d a d a d a d d a a d d' above.

NLS

(NLS?)

Table with 7 rows (AtHsfA1a-HSF1 to AtHsfB2b-Hsf7) and 329 columns of amino acid sequences for NLS and (NLS?).

```

AtHsfA1a-HSF1  M M W N M M K T D D K Y P F L D G F - - - - - S S P N Q V S G V 328
AtHsfA1e-HSF2  T N T M L Q Q I Q Q M S N A P S H E S L S S N N G S F L L G D V P N S N I S D N G S S S N G S P E V 308
AtHsfA1b-HSF3  A Q N M L R Q F L N T S T S P R Y E S V S N N P D S F L L G D V P S S T S V D N G N P S S R V S G V 314
AtHsfB1 -HSF4  Y V V S G S R M T E I K N V D F H A P L W K S S K V C N 284
AtHsfB2a-HSF6  V G E N S D E E T P W L R H Y N R T N Q R - - - V C N 299
AtHsfB2b-Hsf7  E L G A A E E E D D D R R E A A A Q E G E Q S S D V K A E P M E E N N S G N H N G S W L E L G K 377

```

```

AtHsfA1a-HSF1  T L Q E V L P I T S G Q S Q A Y A S V P S G Q P L S Y L P S T S T S L P D T I M P E T S Q I P Q L T 378
AtHsfA1e-HSF2  T L A D V S S I P A G F Y P A M K Y H E P C E T N Q V M E T N L P F S Q G D L L P P T Q G A A A S G 358
AtHsfA1b-HSF3  T L A E F S P N T V Q S A T N Q V P E A S L A H H P Q A G L V Q P N I G Q S P A Q G A A P A D S W S 364
AtHsfB1 -HSF4  284
AtHsfB2a-HSF6  299
AtHsfB2b-Hsf7  377

```

```

AtHsfA1a-HSF1  R E S I N D F P T E N F M D T E K N V P E A F I S P S P F L D G G S V P I Q L E G I P E D P E I D E 428
AtHsfA1e-HSF2  S S S S D L V G C E T D N G E C L D P I M A V L D G A L E L E A D T L - - - - N E L L P E V Q - - 401
AtHsfA1b-HSF3  P E F - D L V G C E T D S G E C F D P I M A V L D E S E G D A I S P E G E G K M N E L L E G V P K L 413
AtHsfB1 -HSF4  284
AtHsfB2a-HSF6  299
AtHsfB2b-Hsf7  377

```

Aktivierungsdomäne (AHA)

```

AtHsfA1a-HSF1  L M S N F E F L E E Y M P E S P V F G D A T T L E N N N N N N N N N N N N N N N N N N N T N G - - 476
AtHsfA1e-HSF2  - - - D S F W E Q F I G E S P V - I G E T D E L I S G S V E N E - L I L E Q L E L Q S T L S N V W 445
AtHsfA1b-HSF3  P G I Q D P F W E Q F F S V E L P A I A D T D D I L S G S V E N N D L V L E Q E P N E W T R N E - - 461
AtHsfB1 -HSF4  284
AtHsfB2a-HSF6  299
AtHsfB2b-Hsf7  377

```

Kernexport-Signal (NES)

```

AtHsfA1a-HSF1  - - - R H M D K L I E E L G L L T S E T E H 495
AtHsfA1e-HSF2  S K N Q Q M N H L T E Q M G L L T S D A L R K 468
AtHsfA1b-HSF3  - - - Q Q M K Y L T E Q M G L L S S E A Q R K 481
AtHsfB1 -HSF4  284
AtHsfB2a-HSF6  299
AtHsfB2b-Hsf7  377

```


7.6 Übergänge von *HSF*-Genen und T-DNA in T-DNA-Insertionslinien

Basen, die mit HSF-Sequenzen übereinstimmen, sind unterstrichen. Basen, die mit T-DNA-Sequenzen übereinstimmen sind fett dargestellt. Unbekannte Sequenzen, die weder *HSF*- noch T-DNA-Sequenzen zugeordnet werden können, sind kursiv hervorgehoben. In manchen Fällen, in denen beide Übergänge von *HSF* zu T-DNA bzw. von T-DNA zu *HSF* isoliert und sequenziert werden konnten, wurden Deletionen einiger Nukleotide am Insertionsort festgestellt. Sämtliche Nukleinsäuren sind in 5'→3' Orientierung dargestellt.

hsf1-tt1

5'-Übergang:

... AGGACAGCCT TTATCATACT TACCCTCTAC *GACAATTGTA* **AATGGCTTCA** *TGTCGGGAA* TC...

3'-Übergang:

... **CATGTAGATT** **TCCCGGACAT** **GAAGCCATTT** ACAATTGACA *CGAGAGAGTA* TCAACGACTT...

An Insertionsort Deletion von 48 Bp:

TTCAACTTCT CTCCCGGATA CCATAATGCC AGAGACTTCC CAGATACC

hsf2-tt1:

5'-Übergang:

... CTCTTGCGTA GCTTGTTCCCT CCCCTGTTCT *AACAAGTGTA* *TACTCTTACA* *TACATGATAA*
CAAGTATGAG *TATACATTAT* **AATATAGGAT** **ATATTCAATT** **GTAAATGGCT** **TCATGTCCGG**
GAAATCTA...

hsf3-tt1:

5'-Übergang:

... ACTCATCAA AGATTCCACA GAAC TTTGCA *CATATGAAAA* **CAACTTAATA** **ACACATTGCG**
GACGTTTTTA...

3'-Übergang:

... **ACGTCCGCAA** **TGTGTTATTA** **AGTTGTCTAA** GCGCACTGTC ACATATGTCT GAAGATTGTT
TCCTCAATTG...

An Insertionsort Deletion von 1 Bp: G

hsf7-tt1:**5'-Übergang:**

... CTTGATGGAA CTGAAACTAT TCTGGCTTGC CGGGTCCTCA ACTTAATAAA **CAAATTGACG**
CTTAGACAA **CTTAATAAZIRKA..**

3'-Übergang:

... **TCAATTTGTT** **TACACCACAA** **TATATCCTGC** TAGGCTGGCG GGTTGCCTG ATTCTCCTGA
GTTGTGCTTC TCACGATTC GGATAAAGCA GGCAGATTC...

An Insertionsort Deletion von 18 Bp:

TGTGCTCCAG TGAGTGGA

hsf7-tt2**5'-Übergang:**

... CCTTTCTCTT CTCTGTCTAG TTTCTGTTTT **CAATTGTAAA** **TGGCTTCATG** **TCCGGGAAAT...**

hsf7-tt3**5'-Übergang:**

... TTACAGTAGC AGCTGTTTCT GTTGTAGCTC ATATTCAATT **GTAAATGGCT** **TCATGTCCGG**
GAAAT...

7.7 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AtHSF	<i>Arabidopsis thaliana</i> Hitzeschockfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Bis	Bisacrylamid
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	<i>Control</i> (Kontrolle)
cDNA	komplementäre DNA
cpm	<i>counts per minute</i>
CsCl	Caesiumchlorid
DAG	<i>days after germination</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
dmHSF	<i>Drosophila-melanogaster</i> -Hitzeschockfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGS	Ethylen-glycol-bis-hydroxy-succimide
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
hHSF	humaner Hitzeschockfaktor
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HS	Hitzeschock
HSC	<i>heat shock cognate</i>
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-thiogalaktosid
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
KBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin

KOAc	Kaliumacetat
l	Liter
lacZ	β -Galaktosidase-Gen
M	molar
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
MS	<i>Murashige and Skoog Medium</i>
NaOAc	Natriumacetat
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
N ^o	Nummer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pmol	Picomol
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
unpubl.	unpubliziert
U _{pm}	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VT	Volumenteile
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galaktosid
μ Ci	Mikrocurie
°C	Grad Celsius

Curriculum Vitae

Personalien

Name: Klaus Christian Lohmann
geboren am: 24.02.1971 in Bad Kreuznach
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

1981 – 1990 Lina-Hilger-Gymnasium in Bad Kreuznach
Abschluss: Abitur

1990 - 1991 Wehrdienst ABC-Abwehrkompanie in Zweibrücken

Okt. 1991 - Juni 1997 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen.
Studienschwerpunkte: Genetik, Tierphysiologie, Virologie

Diplomarbeit *Quartärstruktur und DNA-Bindungseigenschaften dreier in E. coli exprimierter Hitzeschockfaktoren aus Arabidopsis* am Lehrstuhl für Allgemeine Genetik bei Herrn Prof. F. Schöffl.
Studienabschluss: Diplom-Biologe

Sept. 1997 - Juli 2002 Dissertation am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP), Lehrstuhl für Allgemeine Genetik, Universität Tübingen bei Herrn Prof. F. Schöffl: *Funktionelle Charakterisierung von Hitzeschockfaktoren aus Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.*

Okt. 2002 - Jan. 2003 Wissenschaftl. Mitarbeiter am MPI für Neurobiologie/Martinsried, Abteilung *Systems and Computational Neurobiology.*

seit Februar 2003 Angestellter bei der Peqlab Biotechnologie GmbH