

Funktionelle Charakterisierung der  
Wechselwirkungen zwischen HsfA1 und  
HsfA2 aus *Lycopersicon esculentum*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

von  
Kwan Yu Chan  
aus Hongkong, China

vorgelegt  
beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main, April 2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1	Regulatoren der Hitzestressantwort.....	7
1.2	Struktur von Hitzestresstranskriptionsfaktoren.....	9
1.2.1	DNA Bindungsdomäne (DBD).....	10
1.2.2	Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region).....	11
1.2.3	Lokalisationssignale für Kernimport und -export (NES, NLS).....	12
1.2.4	Aktivator motive (AHA Motive).....	12
1.3	Funktionelle Diversität im Hsf Netzwerk.....	13
1.4	Kombinatorische Hsf Wechselwirkungen.....	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	22
2.2	Expressions- und Reporterkonstrukte.....	22
2.3	Expressionsanalysen in Tabak Mesophyll Protoplasten.....	23
2.3.1	Immunoblots.....	23
2.3.2	Immunfluoreszenz.....	23
2.3.3	GFP-Hsf Fusionsproteine.....	24
2.4	GUS Reporter Assays.....	24
2.5	Coimmunpräzipitation.....	25
2.6	Gelfiltrationschromatographie.....	25
2.7	DNA Electrophoretic Mobility Shift Assays.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1	Spezifität der Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2.....	27
3.2	Synergistische Aktivierung.....	33
3.3	Beitrag funktioneller Domänen.....	35
3.4	Funktionelle Analysen mit chimären Hsf Konstrukten.....	43
3.5	Funktionelle Analyse der HR-A/B Region von HsfA2.....	48
3.6	DNA Bindungseigenschaften.....	54
3.7	Heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe.....	60
3.8	Kooperativität der C-terminalen Aktivator motive.....	61

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1	Spezifität und Funktionalität .....	65
4.1.1	Spezifität der HsfA1 HsfA2 Interaktion in Arabidopsis .....	66
4.1.2	Kombinatorische Regulation durch HsfA2 .....	66
4.2	Funktionelle Aspekte der synergistischen Aktivierung .....	67
4.2.1	Regulatorischer Aspekt des HsfA2 Levels .....	67
4.2.2	Die Rolle von HsfA2 im Heterokomplex .....	68
4.2.3	Die Rolle von HsfA1 im Heterokomplex .....	70
4.2.4	Eigenschaften heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe .....	70
4.3	Modell der synergistischen Aktivierung .....	73
4.4	Weiterführende Arbeiten .....	75
4.4.1	Phylogenie-basierte Analyse des Hsf Netzwerkes .....	75
4.4.2	Dynamik der Heterooligomerisierung .....	75
4.4.3	Aufreinigung von HsfA1/HsfA2 Heterokomplexen .....	75
4.4.4	Interaktionskinetik mit Coaktivatoren .....	76
4.4.5	Identifizierung von unbekanntem Interaktionspartnern .....	76
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	77
4.6	Zusammenfassung .....	78
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>90</b>
6.1	Lebenslauf .....	102

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AHA	Aromatic, hydrophobic and acidic motif (Aktivatormotiv)
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäurenrest
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BD	DNA Bindungsdomäne mit L1
bp	Basenpaar
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
CBP	CREB binding protein
CHO cells	Chinese Hamster Ovary cells (Chinesische Hamster Ovarzellen)
CoIP	Co-Immunpräzipitation
CTAD	C-terminale Aktivierungsdomäne
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DBD	DNA Bindungsdomäne
DNP	DNA-Protein Komplex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EST	Expressed Sequence Tag
FPLC	Fast protein chromatography (Schnelle Protein Flüssigkeits-Chromatographie)
HAC1	Homologous to acetyltransferase CBP
HAT	Histone acetyl transferase
HR-A/B, HR-C	Heptad Repeat Regionen A und B, Heptad Repeat Region C
Gm	<i>Glycine max</i>
GUS	$\beta$ -Glucuronidase (Reportergen)
HA-Markierung	Haemagglutinin-Markierung
HPLC	High Pressure liquid chromatography (Hochdrucks-Flüssigkeits-Chromatographie)
HRP	Horse raddish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Hsf	Hitzestresstranskriptionsfaktor
HS	Hitzestress
HSB	High salt buffer (Hochsalzpuffer)
HSE	Hitzestresselement
HSG	Hitzestressgranula
Hsp	Hitzestressprotein
HTH	Helix-Turn-Helix Motiv
Hsp	Hitzestressprotein
kDa	Kilodalton

L1	Linker 1 Region
L2	Linker 2 Region
Lp	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i>
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MtSB	Mikrotubuli-stabilisierender Puffer
NEB	Nuclei extraction buffer (Kernextraktionspuffer)
NES	Nuclear Export Signal (Kernexportsignal)
Np	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (Tabak)
NLS	Nuclear Localization Signal (Kernimportsignal)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B)
Os	<i>Oryza sativa</i> (Reis)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasenkettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PIC	Präinitiationskomplex
Pfu-Polymerase	Proof-reading-Polymerase
PIPES	Piperazin-N,N-bis-(2-Ethansulfonsäure)
RPM	Round per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RFU	Relative fluorescence units (Relative Fluoreszenzeinheit)
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TRIS	Tris-(Hydroxyl)-Methylamin
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TAF	TATA associated factor (TATA assoziierte Faktoren)
TATA	TATA Box, AT reiche Sequenz
TBP	TATA binding protein (TATA Bindeprotein)
SDS	Natriumdodecylsulfat

#### Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäurereste

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

# 1 Einleitung

## 1.1 Regulatoren der Hitzestressantwort

Eine der wichtigsten Entdeckungen in der molekularen Zellbiologie machte F. Ritossa 1962: Er beobachtete bei *Drosophila* Larven, die versehentlich erhöhter Temperatur ausgesetzt waren, die Bildung von Puffs in Polytän Chromosomen, ein Zeichen erhöhter Genaktivität. Erst ein Jahrzehnt später konnte die induzierte Genaktivität in Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese von Hitzestressproteinen (Hsp) gebracht werden (Tissieres et al., 1974) und führte 1977 zur Identifizierung der korrespondierenden mRNA durch McKenzie und Meselson. Dies belegte, dass Ritossa tatsächlich den zentralen Aspekt der Hitzestressantwort entdeckt hatte. Ebenso bemerkenswert war die Tatsache, dass das Prinzip der stressinduzierbaren Hsp Genexpression zwischen Prokaryoten und Eukaryoten entwicklungsgeschichtlich konserviert ist. Hsps regulieren die zelluläre Proteinhomeostase, indem sie Schäden, die durch suboptimale Umwelteinflüsse wie Hitze, Schwermetalle, Toxine, Oxidanzien, virale und bakterielle Infektionen verursacht werden, verhindern und reparieren (Vierling und Kimpel, 1992, Parsell und Lindquist 1993, Wu 1995, Nover und Scharf, 1997, Scharf et al., 1998a, Morimoto 1998, Bharti und Nover, 2002). Desweiteren erfüllen Hsps Haushaltsfunktionen in der Proteinfaltung, -topogenese, -translokation und dem Proteinabbau in Form von Multichaperonkomplexen (Hartl 1996, Forreiter und Nover, 1998, Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Während des Hitzestresses (HS) kommt es zu einer Verarmung von frei verfügbaren Hsps, die durch den erhöhten Hsp Bedarf für die Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase verursacht wird. Um dies auszugleichen, werden Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsfs) aktiviert, die für eine rasche Expression von Hsp-Genen sorgen und zur Wiederherstellung der Proteinhomeostase beitragen.

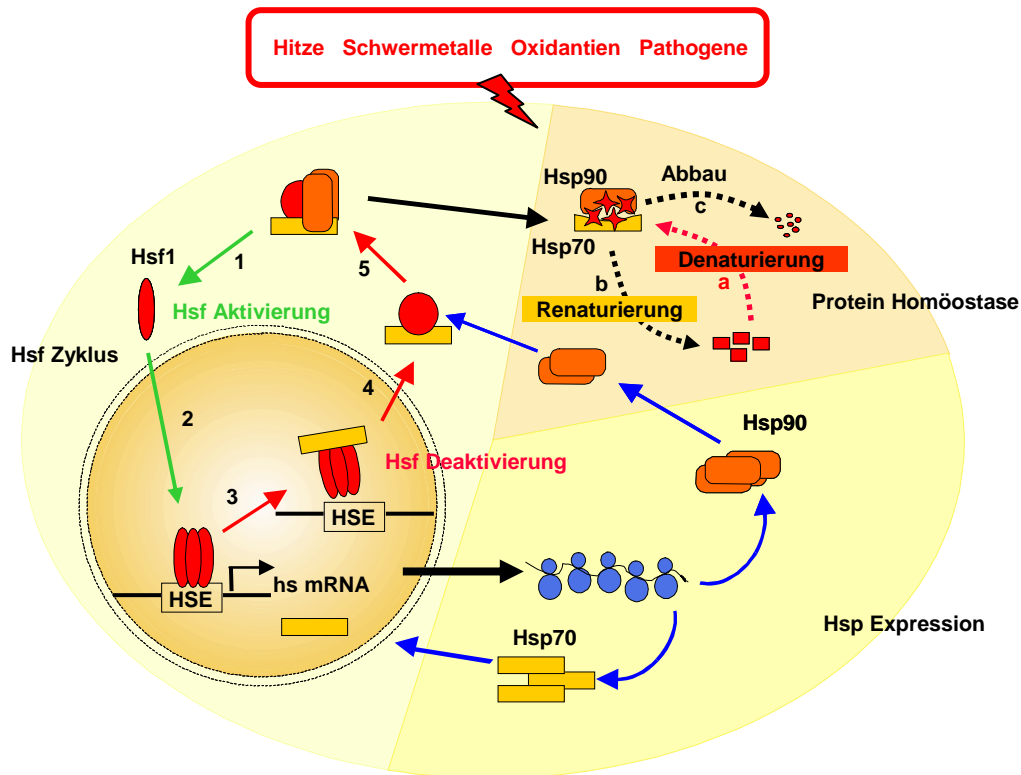


Abbildung 1: **Modell der Hitzestressantwort in Säugern.**

Als Regulatoren der Hitzestressprotein (Hsp) Expression sorgen Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsfs) für die Erhaltung der Protein Homöostase, dem Gleichgewicht zwischen Synthese, Faltung und Abbau von Proteinen. Stressfaktoren, die zur Denaturierung zellulärer Proteine führen, lösen die Hitzestressantwort aus: (a) Der erhöhte Bedarfs an Hsps für die Wiederherstellung der zellulären Proteinhomöostase (b, c) setzt Hsf1 aus dem Hsf1/Hsp70/90 Komplexe frei (1). Hsf transloziert in den Kern und bindet als Hsf Trimer an Hitzestress-elementen (HSE) im Promoterbereich von Hitzestress (HS)-Genen und leitet ihre Expression ein (2) (Westwood et al., 1991, Baler et al., 1993, Rabindran et al., 1993, Sarge et al., 1993). Neugebildete Hsp70 beteiligen sich an der Inaktivierung vom Hsf durch Reduzierung seiner DNA Bindeaffinität (3) (Kim et al., 1995, Baler et al., 1996, Shi et al., 1998). Als Konsequenz wird Hsf aus dem Kern exportiert (4), dissoziiert zum Monomer und bildet mit Hsp90 den attenuierten Hsf1/Hsp70/90 Komplex (5) (Baler et al., 1996, Ali et al., 1998, Zuo et al., 1998, Bharadwaj et al., 1999, Hu und Mivechi 2003). (Abbildung aus Baniwal et al., 2004, modifiziert).

## 1.2 Struktur von Hitzestresstranskriptionsfaktoren

Hsfs repräsentieren terminale Komponenten der Hitzestress-Signaltransduktion und sind direkt an der Aktivierung von Hsp-Genen beteiligt. Sie besitzen als Transkriptionsfaktoren einen modularen Aufbau mit mehreren funktionellen Domänen, die für die DNA Bindung, Oligomerisierung, die Regulation der intrazellulären Lokalisation und transkriptionelle Aktivierung sorgen (Abb. 2). Jede einzelne Domäne ist essenziell für die Funktionalität des Hsfs, sie können aber mit Domänen mit ähnlichen Funktionen ausgetauscht werden wie z.B. die Oligomerisierungsdomäne durch die Leucin-Zipper Domäne von GCN4 (Drees et al., 1997).

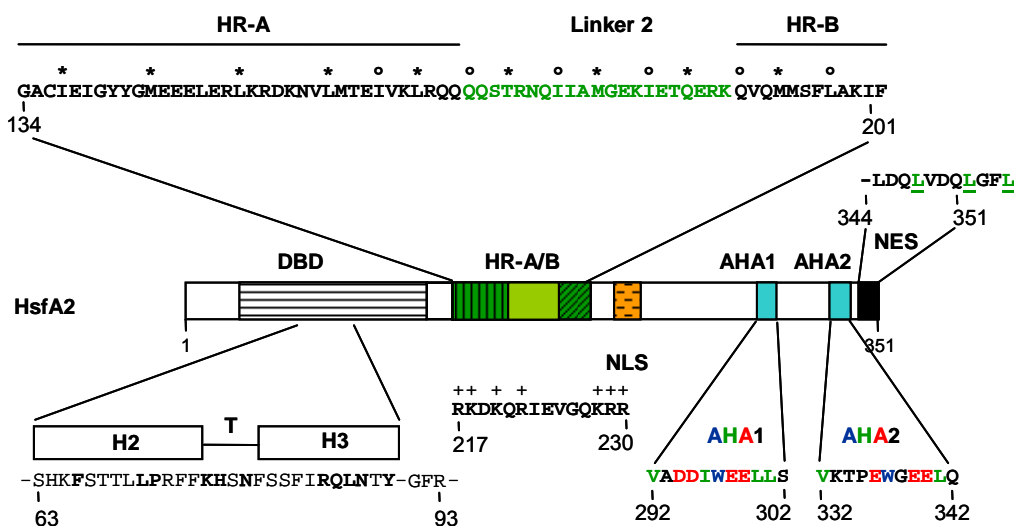


Abbildung 2: **Grundstruktur von pflanzlichen Hsfs.**

Die Struktur und Sequenzdetails von funktionellen Domänen werden am Beispiel von HsfA2 aus *Lycopersicon esculentum* gezeigt. Das Helix-Turn-Helix Motiv der DNA Bindungsdomäne enthält die strukturellen Voraussetzungen für die spezifische Erkennung von HSEs mit der Konsensussequenz (5'-AGAAnnTTCT-3') mit n als variable Base. In der Oligomerisierungsdomäne bzw. HR-A/B Region sind hydrophobe Heptad Repeats verantwortlich für die Coiled-Coil vermittelte Interaktionen und Oligomerisierung des Hsfs. Die erweiterte Linker 2 Region ist ein Charakterisierungsmerkmal für pflanzliche Klasse A (21 AS) und Klasse C Hsfs (7 AS). Im C-Terminus befinden sich das Nuclear Localization Signal (NLS), bestehend aus basischen Aminosäureseitenketten (AS) und das Nuclear Export Signal (NES), ein Leuzin-reiches Motiv, die die intrazelluläre Lokalisation des Hsfs regulieren. Insbesondere die AHA Motive aus aromatischen, hydrophoben und sauren AS sind essenziell für die transkriptionelle Aktivität. (Nover et al., 2001, modifiziert).



### 1.2.1 DNA Bindungsdomäne (DBD)

**DBD-HSE Struktur:** Strukturelle Daten existieren nur für die N-terminalen DNA Bindungsdomäne (DBD), da diese in der DNA gebundenen Form stabilisiert ist. Die Struktur von HSE-DBD Komplexen unterschiedlicher Organismen offenbarten eine hohe strukturelle Konserviertheit der Domäne, die die Identifizierung weiterer Hsf Genen ermöglichte (Vuister et al., 1994, Harrison et al., 1994, Damberger et al., 1995, Schultheiss et al., 1996). Sie besteht aus einem Bündel von 3  $\alpha$ -Helices und 4 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern in der ein zentrales Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv für die spezifische Erkennung von Hitzestress-elementen mit der Konsensussequenz (5'-AGAAnnTTCT-3') sorgt (Pelham 1982, Bienz und Pelham, 1986, Nover 1987). Untersuchungen der Promoterarchitektur von HS Genen zeigen, dass HSEs im Verbund (Cluster) vorkommen und unvollständige bzw. nichtfunktionelle HSE enthalten können (Nover et al., 2001). Ein besonderes Merkmal des HTH Motiv von Hsfs ist eine abgeknickte Helix  $\alpha_2$ , die durch Helix  $\alpha_1$  stabilisiert wird (Ceruso und Weinstein, 2002). Aufgrund dieser Struktur passt sich die amphipatische Helix  $\alpha_3$  in die großen Furche der DNA ein und sorgt mit positiv geladenen Aminosäureseitenketten (R, S) für den direkten Kontakt zu den Hitzstresselementen (HSE). Studien mit *Arabidopsis* HsfA2 zeigten eine bevorzugte Bindung von TATA proximale HSE Cluster (Schramm et al., 2006).

**Kooperativität:** Am C-terminalen Teil der DBD existiert zwischen den  $\beta_3$  und  $\beta_4$  Strängen bei nicht-pflanzlichen Hsfs eine Loop Region, bestehend aus 10 AS. Im Gegensatz zu anderen „winged“ Helix-Turn-Helix DNA-bindenden Proteinen ist dieser Loop nicht direkt an der DNA Bindung beteiligt und auch nicht essenziell für die DNA Bindung (Cicero et al., 2001). Aber sowohl die Loop Region als auch der Linker zwischen DBD und der HR-A/B Region stehen in Zusammenhang mit der Regulation der kooperativen Promoterbindung und der spezifische Erkennung von Promoterstrukturen (Bonner et al., 1994, Erkinen et al., 1999). Auch die HS-abhängige Trimerisierung wird von der Loop und der Linker (L1) Region reguliert (Flick et al., 1994, Liu und Thiele, Ahn et al., 2001). Eine weitere Funktion des L1 mit variabler Länge unter den Hsfs (15-80 bp) besteht in der korrekten Positionierung der DBDs von oligomeren Hsfs.

### 1.2.2 Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B Region)

**Coiled-Coil Leucin-Zipper:** Im Anschluss an L1 befindet sich die HR-A/B Region bzw. Oligomerisierungsdomäne (OD), die Coiled-Coil vermittelte Interaktionen nach dem Prinzip eines Leucin-Zippers ermöglichen (Sorger und Nelson, 1989, Peteranderl und Nelson, 1992). Sie besteht aus hydrophoben Heptad Repeats mit Wiederholungen hydrophober Aminosäureseitenketten (L, I, V, M) an jeder 7. Position, wobei ein zweites, versetztes Repeat-Muster an 4. Position enthalten sein kann (4-3 Heptad Repeats) (Zuo et al., 1993, Nover et al., 2001). Die Oligomerisierungsdomäne ermöglicht sowohl Homo- als auch Heterooligomerisierungen von Hsfs (Scharf et al., 1998b, He et al., 2003). Pflanzen-Hsfs der Klasse A und C besitzen eine charakteristische Erweiterung der Linker 2 (L2) Region um 21 bzw. 7 Aminosäurenreste. Im Gegensatz dazu fehlt tierischen Hsfs und pflanzlichen Klasse B Hsfs eine Erweiterung der L2 (Nover et al., 1997). Die Oligomerisierung des Hsfs ist essenziell für die hohe DNA Bindungsaffinität des Hsf Trimers (Boscheinen et al., 1997).

**Regulation der Oligomerisierung:** In Säuger Hsf1 existieren Mechanismen, die die Trimerisierung regulieren, wie die intramolekulare Interaktion durch die C-terminale HR-C Region (Baler et al., 1993, Rabindran et al., 1993) und die Interaktion mit Hsf bindenden Proteinen (HSBP), die ausschließlich aus Coiled-coils bestehen (Satyal et al., 1998, Tai et al., 2002). Die Trimerisierung ist jedoch nur eine von vielen Voraussetzungen im Aktivierungsprozess neben weiteren Stress-induzierten posttranslationalen Modifizierungen wie Sumoylierung (Hong et al., 2001) und Phosphorylierungen (Cotto et al., 1996, Xia und Voellmy, 1997, Holmberg et al., 2001, Kim et al., 2005) und die Beteiligung des Ribonucleoproteinkomplex aus eIF1A und die nicht-codierende RNA HSR1 an der Aktivierung und Stabilisierung aktiver Hsf1 Trimere in der Hitzestressantwort (Shamovsky et al., 2006). Mittlerweile wurde bei Pflanzen zwei HSBP Gene in Mais charakterisiert (Fu et al., 2002). Der Transposon verursachte Knock-out von HSBP1 zum embryoletalen Empty pericarp 2 (emp2) Phänotyp, der aus einer unkontrollierten Synthese von Hitzestressgenen während der Embryogenese resultiert. Mit HSBP2 konnte in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen die direkte Interaktion mit der HR-A/B Region von Klasse A Hsfs HsfA2c und HsfA4a von Mais gezeigt werden. Durch Mutationsanalyse in der

HR-A/B Region und HSBP konnte die Spezifität der Interaktion verifiziert werden (Fu et al., 2006).

### 1.2.3 Lokalisationssignale für Kernimport und -export (NES, NLS)

Die intrazelluläre Lokalisation spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Aktivität von Hsfs. Unmittelbar nach der OD befindet sich das Kernlokalisationsignal (Nuclear Localization Signal, NLS), das aus ein- oder zweiteiligem Motiv basischer Aminosäureresten (K/R Motiv) besteht. Von den zwei identifizierten K/R Motiven besitzt nur das C-terminale Motiv die Funktionalität einer NLS, während das am N-Terminus der DBD lokalisierte K/R-Motiv die Stabilität der DNA Bindung beeinflusst (Lyck et al., 1997). In HsfA2 wurde erstmals ein Leucin-reiches Nuclear Export Signal (NES) am C-terminalen Ende charakterisiert (Heerklotz et al., 2001). In Analysen zur funktionellen Charakterisierung von *Arabidopsis* Hsfs konnte eine Signaturkombination für Klasse A Hsfs identifiziert werden, die aus dem C-terminalen AHA Motiv und der NES besteht (Kotak et al., 2004).

### 1.2.4 Aktivator motive (AHA Motive)

Die C-terminale Aktivierungsdomäne (CTAD) ist die variabelste Region im Hsf, die in der Länge und Anzahl von Lokalisationssignalen und Aktivator motiven variiert (Nover et al., 2001). Der funktionelle Kern der CTAD enthält sogenannte AHA Motive, die aus aromatischen, großen hydrophoben und sauren Aminosäureseitenketten bestehen (Treuter et al., 1993, Döring et al., 2000, Bharti et al., 2000) und mit Coaktivatoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren können (Kotak et al., 2004). Insbesondere der Tryptophanrest im Zentrum der AHA Motive ist für die Funktionalität der Motive verantwortlich (Döring et al., 2000). Im Gegensatz zu Klasse A Hsfs besitzen Klasse B Hsfs keine transkriptionelle Aktivität aufgrund fehlender AHA Motive. Auch sind Klasse B Hsfs nicht wie Klasse A Hsfs in der Lage, die Funktion von Hefe Hsf1 im Hsf-Disruptionsstamm zu komplementieren (Boscheinen et al., 1997). Sie können abhängig vom Promoterkontext sogar als Repressoren wirken (Czarnicka-Verner et al., 2000, Czarnicka-Verner et al., 2004).

### 1.3 Funktionelle Diversität im Hsf Netzwerk

In Vertebraten, Evertebraten und Hefen eine geringere Anzahl von bis zu vier Hsf codierenden Genen (Wiederrecht et al., 1988, Clos et al., 1990, Sarge et al., 1991, Rabindran et al., 1991, Schuetz et al., 1991, Nakai und Morimoto 1993, Nakai et al., 1997, Tessari et al., 2004). Dagegen konnten mindestens 19 Hsf codierenden Genen in Pflanzen mit Hilfe konservierte Sequenzen der DNA Bindungs- und Oligomerisierungsdomäne identifiziert werden (Scharf et al., 1990, Nover et al., 2001, Baniwal et al., 2004, Xiong et al., 2005).

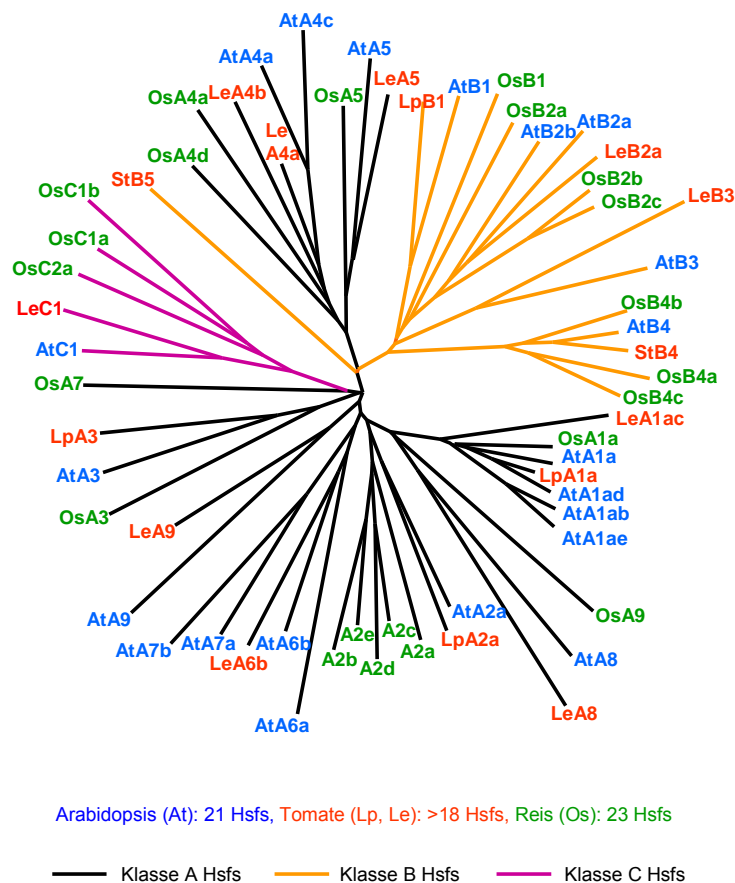


Abbildung 3: **Multiplizität der Hsfs in Pflanzen.**

Phylogenetischer Stammbaum generiert aus konservierten Regionen (DBD, HR-A/B) Hsf codierender Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon peruvianum* (LpA1a, LpA2a, LpA3) bzw. *L. esculentum*, *Solanum tuberosum* und *Oryza sativa*. Klasse A Hsfs bildet die größte Gruppe, neben Klasse B und Klasse C Hsfs. Als Vertreter der Monokotyledonen besitzt Reis auffallend große Hsf Subgruppen von A2, B2, B4 und C1 im Vergleich zu den Dikotyledonen. (Abbildung aus Baniwal et al., 2004, modifiziert)

In *Arabidopsis thaliana* wurden 21, in *Oryza sativa* 23 und *Lycopersicon esculentum* 19 Hsf codierende Gene identifiziert, deren phylogenetische Analyse der pflanzlichen Hsfs nicht nur die Aufteilung der drei große Hauptgruppen, Klasse A, Klasse C und Klasse B Hsf, sondern auch Subgruppierungen innerhalb der Hauptgruppe von Klasse A Hsfs zeigen (Abb. 3). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse sprechen für die funktionelle Diversität der Hsfs.

1) In *Lycopersicon esculentum* ist HsfA1 konstitutiv exprimiert und verantwortlich für die hitzestressabhängige Expression von HsfA2, HsfB1 und Hsps. Transgene Tomatenpflanzen mit reduzierter HsfA1 Expression zeigen einen thermosensitiven Phänotyp (HsfA1 Cosuppressionslinien, CS), während erhöhte HsfA1 Expression zur verbesserten Thermotoleranz führt (HsfA1 Überexpressionslinien, OE) (Abb. 4). Obwohl noch weitere Hsfs existieren, sind diese nicht in der Lage, die Funktion von HsfA1 zu übernehmen.

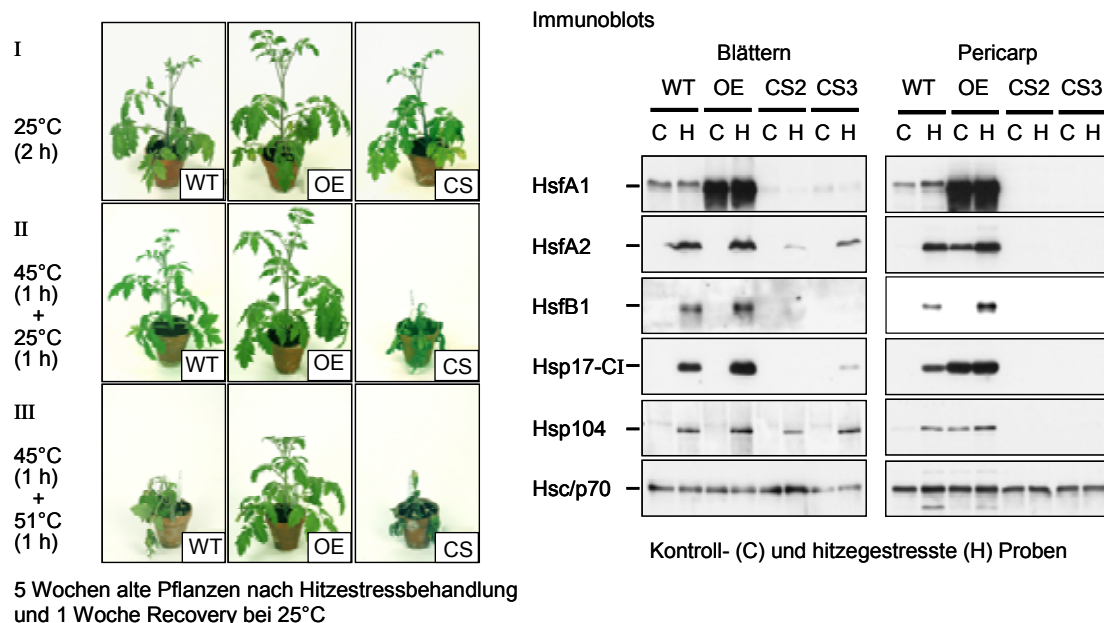


Abbildung 4: **HsfA1 ist der Master Regulator für Thermotoleranz in Tomate.**

Die Höhe des HsfA1 Expressionslevel korreliert mit der Thermotoleranz von *Lycopersicon esculentum*. Sublethale (I) und lethale (II) Hitzestressbehandlungen von transgenen Tomatenlinien mit veränderter Expression von HsfA1 lassen die Phänotypen einer erhöhten Thermotoleranz in HsfA1 Überexpressionslinien (OE) und Thermosensitivität in HsfA1 Cosuppressionslinien (CS) erkennen. Expressionsanalysen zeigen die HsfA1 abhängige und stressinduzierte Expression von HsfA2, HsfB1, Hsp17-CI (Abbildung aus Mishra et al., 2002, modifiziert).

2) HsfA2 gehört zu den stressinduzierten Hsfs, der im Gegensatz zu HsfB1 in thermotoleranten Zellen akkumuliert und bisher als einziger Hsf unter Hitze-stress in den für Pflanzen charakteristischen, cytosolischen Hitzestressgranula gebunden und in der Erholungsphase freigesetzt wird (Abb. 5) (Scharf et al., 1998b, Mishra et al., 2002, Port et al., 2004, Schramm et al., 2005). Ein wichtiger Aspekt beinhaltet die synergistische Kooperation von HsfA1 und HsfA2 als HsfA1/A2 Heterooligomere (Scharf et al., 1998b). Die Wechselwirkungen zwischen HsfA1 und HsfA2 wurden in transienten Reporter-genassays durch Coexpression dieser beiden Hsfs in Mesophyllproto-plasten wie auch in CHO Zellen beobachtet. Sie beruhen auf der durch HsfA1 vermittelten Kernlokalisierung von HsfA2 (Kernretentionseffekt), da HsfA2 alleine exprimiert aufgrund seiner starken NES intrazellulär zwischen Cytoplasma und Kern pendelt (Shuttling) (Scharf et al., 1998b, Heerklotz et al., 2001). Der spezi-fische Repressor von HsfA2 Hsp17.4-CII führt zur Bildung von unlöslichen, cytosolischen HsfA2/Hsp17.4-CII Aggregaten und steht außerdem in Zu-sammenhang mit der HS-induzierten Assoziation in Hitzestressgranula-komplexen zusammen mit anderen Hsps (Abb. 5). Bindung und Freisetzung von HsfA2 führen in wiederholten Zyklen von HS und Erholungsphasen zur Akkumulation von HsfA2 in thermotoleranten Zellen.

3) Da die HsfA3 Expression bisher nur in Zellkulturen detektiert werden konnte (Bharti et al., 2000), ist möglicherweise die Expression von HsfA3 in Tomaten-pflanzen gewebsspezifisch reguliert. HsfA3 gehört zu den besonders aktiven Hsfs, wenn die transkriptionelle Aktivität im GUS Reporter Assay mit HsfA1 und HsfA2 verglichen wird, und kann außerdem mit HsfA1 und HsfA2 interagieren (Calligaris, Dissertation 2001). Im Vergleich zu HsfA1 oder HsfA2 fallen die vier Tryptophan-haltigen und AHA Motiv-ähnlichen C-terminalen Aktivator-motive in Tomaten HsfA3 auf sowie die eingeschränkte Fähigkeit, in Hefe die Funktion von Hsf1 zu ersetzen. Hefestämme mit HsfA3 wachsen unter Hitzestress-bedingungen nur bis zu einer Temperatur von 33°C, während Stämme mit HsfA2 unter allen drei Klasse A Hsfs A1, A2 und A3 die höchste Thermo-toleranz vermittelt und das Hefewachstum bis zu 37°C zulässt (Bharti et al., 2000).

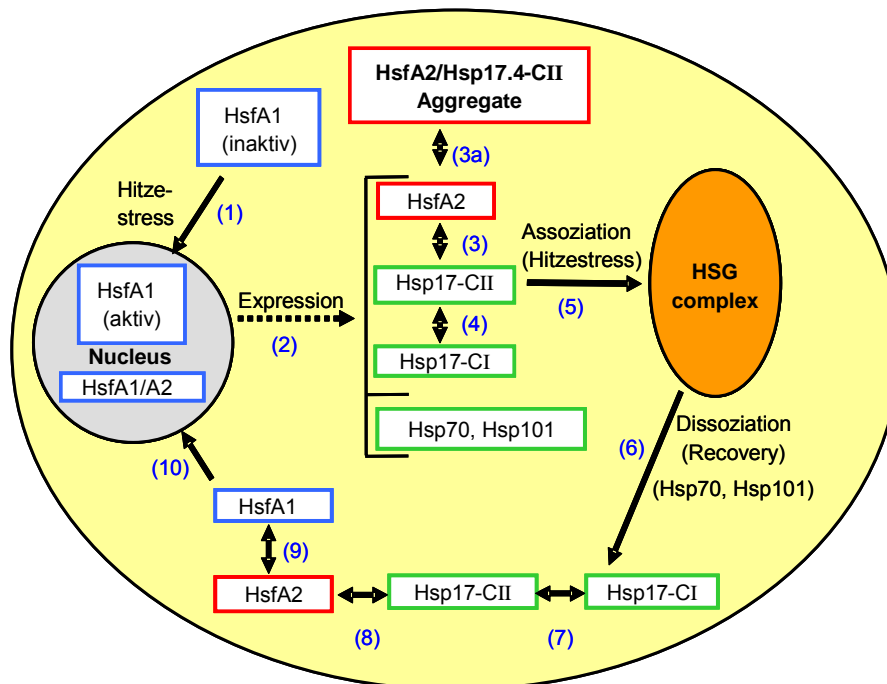


Abbildung 5: **Regulationszyklus von HsfA2**

Der stressinduzierte HsfA2 assoziiert unter anhaltendem HS in Hitzestressgranula, wird in der Erholungsphase freigesetzt und ermöglicht eine erhöhte Hsp Expression durch Kooperation mit HsfA1 unter wiederholter Stresseinwirkung. Eine weitere Rolle in der Regulation der HsfA2 Aktivität spielt der spezifische Regulator Hsp17.4-CII (Scharf et al., 1998b, Mishra et al., 2002, Port et al., 2004). (1) Hitzestress führt zur Aktivierung von HsfA1 und Expression von Hs Genen (2). HsfA2 kann mit Hsp17-CII unter Testbedingungen unlösliche Aggregate bilden, assoziiert in der nativen Zelle mit anderen Hsps (4) in Hitzestressgranula-Komplexen (5). In der Erholungsphase werden Hsps und HsfA2 unter dem Einfluss von Hsp70/101 freigesetzt (6) durch Hsp17-CI resolubilisiert (7) und die Dissoziation von HsfA2 und Hsp17-CII gefördert (8). HsfA2 kann im Anschluss mit HsfA1 wechselwirken (9) und als Heterooligomere in der Hs Genexpression kooperieren (Abbildung aus Port et al., 2004, modifiziert).

4) Als einer der transkriptionell aktivsten Hsfs gehört HsfA4b, der in Blütengeweben exprimiert wird und spezifisch durch HsfA5 reprimiert wird. HsfA5 selbst ist trotz vorhandenem AHA Motiv inaktiv, beeinflusst aber durch direkte Interaktion mit HsfA4b die DNA Bindung von HsfA4b in heterooligomeren HsfA4b/A5 Komplexen. Die Spezifität der HsfA4-A5 Interaktion lässt sich sogar durch einen Oligomerisierungsdomänenaustausch auf HsfA1 übertragen, so dass HsfA1 durch HsfA5 reprimieren wird. (Baniwal et al., 2007). In Mono-

kotyledonen steht HsfA4d in Zusammenhang mit der allgemeinen Stress-toleranz, da mutante HsfA4d (spl7) Linien unter Feldbedingungen mit natürlichem, lichtinduziertem oxidativen Stress zu unkontrollierter Apoptose neigen (Yamanouchi et al., 2002).

5) Ein weiterer gewebsspezifischer Hsf, HsfA9 reguliert die Hsp Genexpression während der Samenentwicklung (Kotak, et al., 2007). Der Signaltransduktionsweg, die Regulation der HsfA9 Expression durch ABI3 und die Induktion der Hsp Expression durch HsfA9, ist ein bemerkenswertes Beispiel für ein streng gewebes- und entwicklungs-spezifisch wirkenden Hsf. Außerdem steht HsfA9 im Zusammenhang mit der Regulation des Übergangs in die Samenruhe, die begleitet wird von einer erhöhten Trocknungstoleranz durch die Anwesenheit der kleinen Hsps.

6) Die Haushaltsgenexpression unter Stressbedingungen reguliert der stress-induzierte HsfB1 zusammen mit HsfA1. Durch die Bildung eines ternären, enhanceosom-ähnlichen Komplexes mit HsfA1 und HAC1, dem Arabidopsis CBP Ortholog, erfolgt eine synergistische Aktivierung von Haushaltsgenpromotoren (Bharti et al., 2004). Eine Rolle in der entwicklungsbedingten Regulation steht möglicherweise HsfB1 zu, da transgene Pflanzen mit ver-ringerter HsfB1 (HsfB1 Antisense) Expression in der Entwicklung unregel-mäßige Wuchsformen zeigen (Mishra, Dissertation 2003).

#### **1.4 Kombinatorische Hsf Wechselwirkungen**

Die Möglichkeit von Wechselwirkungen zwischen Hsfs erweitert die Komplexität der transkriptionellen Regulation durch Hsfs. Sie repräsentiert eine weitere Ebene der Feinregulation, die eine Aktivierung spezieller Untergruppen stress-abhängiger und/oder gewebsspezifischer Zielgene erlaubt (Singh 1998, Rojas et al., 2002, Lohmann et al., 2004). In einer Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsanalyse der 21 *Arabidopsis* Hsfs durch wechselseitige Kombination aller Hsfs zeigte das Ergebnis eine signifikante Anhäufung von Interaktionen zwischen der Klasse A Hsfs und zwischen Klasse C und A Hsfs, während bei Klasse B Hsfs nur Interaktionen innerhalb der HsfB2 Gruppe bestätigt wurden.



Insbesondere AtHsfA2 verdeutlicht das Potenzial von Klasse A Hsfs multiple Klasse A Hsf Interaktionspartnern zu besitzen (Port, Dissertation 2005).

Sowohl transkriptionsaktivierende als auch -reprimierende Wirkungen werden von heterooligomeren Hsf Komplexe induziert (Scharf et al., 1998b, Baniwal et al., 2007). Bisher sind die molekularen Eigenschaften der heterooligomeren Hsf Komplexe weitgehend ungeklärt, die zur synergistischen Aktivität führen. Synergismus beschreibt eine besonders hohe Rate der Transkription, die durch eine spezifische Kombination von Transkriptionsfaktoren hervorgerufen wird und mehr als die summierten additiven Effekte der einzelnen Transkriptionsfaktoren entspricht. Zu dem besonderen Aspekte der kombinatorischen Hsf-Hsf Wechselwirkungen zählen:

**Promoterspezifität:** Die spezifische Anordnung von regulatorischen Elementen innerhalb der Promoterstruktur ermöglicht die entwicklungs- und stimulusbedingte Genexpression zum definiertem Zeitpunkt. Als sequenzspezifische Aktivatoren können regulatorische Transkriptionsfaktoren oftmals die korrespondierenden regulatorischen Bindungsstellen nur besetzen, wenn sie mit anderen Aktivatoren interagieren und dadurch eine ausreichende Bindungsaffinität aufbauen, um eine stabile Transkription zu initiieren. Die Architektur des Promoters setzt unter Umständen voraus, dass Aktivatorkomplexe strukturelle Voraussetzungen, z.B. über ihre spezifische Oligomerisierung, erfüllen müssen, um eine effiziente Wechselwirkung mit dem Promoter und Coaktivatoren zu erzielen. Bei Tomaten Hsfs kann beispielsweise der ternäre Komplex aus HsfA1/B1/HAC1 nur an solchen Promoterstrukturen synergistisch wirken, die eine spezifische Kombination aus funktionellen trimeren und dimeren HSE Modulen in einem definierten Abstand enthalten und mit dem Oligomerisierungszustand der beiden Aktivatoren übereinstimmen (Bharti, Dissertation 2003).

**Konzertierte Rekrutierung:** Im Vergleich zur schrittweise ablaufenden Transkriptionsaktivierung ermöglicht die kombinatorisch geregelte Aktivierung eine synergistisch geförderte Transkription durch die konzertierte Rekrutierung von Coaktivatorkomplexen. Der Zugang zu Chromatin verpackten Genen und

deren Promoterbereich bedarf einer Modifizierung der DNA assoziierten Histone sowie die anschließende Rekrutierung von Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie. Die Rekrutierung von Coaktivatoren zählt zu den ersten Schritte der Transkriptionsinitiierung durch transkriptionelle Aktivatoren. Coaktivatoren besitzen Histonacetylierungsaktivität (HAT) oder beinhalten ATP abhängige Remodeling-Komplexe, die die Affinität zwischen DNA und Histonen bzw. Nucleosomen reduzieren oder durch Veränderung der Nucleosomposition die Öffnung der Chromatinstruktur bewirken (Becker und Hörz 2002). Ebenso essenziell ist die Rekrutierung des TFIID Komplexes, ein Komponent der generellen Transkriptionsmaschinerie, das für die Stabilisierung des Prä-Initiationskomplexes (PIC) am Promoter und die Rekrutierung des Holoenzym der RNA Polymerase II benötigt wird. Der TFIID Multiprotein-komplex besteht aus TBP assoziierte Faktoren, den sogenannten TAFs sowie das TATA bindende Protein (TBP), das für die Erkennung AT reichen Sequenzen (TATA Boxen) im Promoterbereich sorgt. Ein weitere Komponente der generellen Transkriptionsmaschinerie, der Mediator/SRB-Komplex, überbrückt TFIID und regulatorischen Transkriptionsfaktoren und stabilisiert beide DNA bindenden Komplexe. Durch die spezifische Interaktion innerhalb der Komponenten im Aktivator-komplex und Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie wird eine kooperative DNA Bindung, die Bildung von Nukleoproteinkomplexen höherer Ordnung (Enhanceosomen) mit synergistischem Aktivierungspotential erzielt. In der Parallelität der konzertierten Rekrutierung von Coaktivatoren, die für die Zugänglichkeit des Zielpromoters sorgen, sowie von Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie, die die Transkription einleiten, beruht die Effizienz von Enhanceosomen. Insbesondere die Adapter Funktion von Coaktivatoren wie z.B. das CREB Bindeprotein CBP ermöglicht die Bildung von Enhanceosomen mit unterschiedlicher Promoterspezifität.

**Integration und Modulation von Signalen:** Eine weitere wichtige Rolle spielt die spezifische Interaktion innerhalb der Komponenten der Aktivator-Coaktivatorenkomplexe, die für die Promoterspezifität und Stabilität der PIC sorgt. Die flexible Interaktion zwischen unterschiedlichen Aktivatoren ermöglicht die Regulation mehrerer Signalwege und Modulation der transkriptionellen

Aktivität, die mit einer kleineren Anzahl von Aktivatoren für die Regulation komplexer Vorgänge erlaubt. Veränderbare Zusammensetzung zwischen Aktivator und Coaktivator-Komplexen kann die Umkehr der Funktionalität (Aktivierung/Repression) des Aktivator-Komplexes bedeuten und bietet eine weitere Ebene der Transkriptionsregulation (Rosenfeld et al., 2006). Dies bietet der Zelle die Möglichkeit, differenzielle Genaktivierungsprogramme zu verwirklichen, die insbesondere in der koordinierten Expression während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Shirasaki und Pfaff 2002).

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Durch die Charakterisierung der funktionellen Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2 mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Ansätze zur Analyse funktioneller Eigenschaften von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen werden neue Aspekte der spezifischen und synergistischen Aktivierung erarbeitet. Das Resultat ist ein Modell, das sich aus mehreren spezifischen Effekten zusammensetzt und in der Summe für die Effizienz der synergistischen Aktivierung sorgt.

1. **Spezifische Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2:** Die Spezifität der funktionellen Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 wird in Vergleich mit weiteren Klasse A Hsfs, HsfA3, HsfA4b und HsfA5 anhand von GUS Reporter Assays, Co-Immünpräzipitationen und der interaktionsvermittelten Kernretention von GFP-HsfA2 untersucht.
2. **Synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2:** Für die Analyse der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 werden 3HA-HsfA1 und 3HA-HsfA2 in unterschiedlichen Mengenverhältnissen coexprimiert. Sowohl am Hsp17.3B-CI::GUS Reporter als auch an der induzierten endogenen Tabak Hsp17-CI Expression kann der spezifische Effekt der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 demonstriert werden.
3. **Strukturelle Voraussetzungen der synergistischen Aktivierung:** Um die strukturellen Voraussetzungen der synergistischen Aktivierung zu definieren, werden HsfA1 und HsfA2 Mutanten mit Defekten in der DNA Bindung, Oligomerisierung und Aktivierung eingesetzt. Funktionellen Analysen der

transkriptionellen Aktivität (GUS Reporter Assays, Induktion endogener Hsp17-CI Expression), Komplexbildung (Co-Immunpräzipitation) und die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2 (Immunfluoreszenz) sollen die Wirkung mutierter Domänen auf die Funktion des heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexes untersuchen.

4. **Funktionelle Unterschiede zwischen HsfA1 und HsfA2:** Die funktionellen Unterschiede zwischen HsfA1 und HsfA2 werden mit Hilfe von HsfA1-HsfA2 Hybriden durch Coexpression mit HsfA1 und HsfA2 Wildtypformen identifiziert. Aus der Kombination von Hybrid und Wildtyp Hsf entstehen Komplexe mit homologen bzw. heterologen Domänenkombinationen, die einen Einfluss auf die synergistische Aktivierung ausüben.
5. **Funktionelle Eigenschaften von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen:** Die Eigenschaften von DNA-Hsf Komplexen in Anwesenheit von HsfA1 und HsfA2 werden in Hinblick auf kooperative Bindung und qualitative Veränderung der DNA-Hsf Komplexe näher untersucht. Native Komplexe von HsfA1 und HsfA2 sowie durch Coexpression induzierte Veränderungen an der Komplexgröße werden anhand der Gelfiltrationsanalysen betrachtet.
6. **Funktionsanalyse der HR-A/B Region von HsfA2:** Die Interaktion ist eines der Voraussetzungen für die synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2. Zur Verifizierung der interaktionsvermittelten, synergistischen Aktivierung wird die Oligomerisierung partiell deletierter HsfA2 HR-A/B Mutanten ermittelt. Durch Mutationsanalyse der HR-A/B Region von HsfA2 in GUS Reporter Assays und Co-Immunpräzipitation werden strukturellen Voraussetzungen der Oligomerisierungsdomäne für die synergistische Aktivierung charakterisiert.
7. **Analyse der kooperativen Aktivierung durch AHA Motive:** Beide Hsfs sind verantwortlich für die synergistische Aktivität. In der Charakterisierung der kooperativen, synergistischen Aktivierung durch beide CTADs werden Mutanten jeder der vier vorhandenen AHA Motive von HsfA1 und HsfA2 jeweils durch Coexpression mit dem Wildtyp Hsf Partner getestet.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Die gentechnologischen Arbeiten, Herstellung von Stammlösungen, Puffern und Medien wurden nach den Standardprotokollen aus den Methodensammelwerken von Ausubel et al. (1993) und Sambrook et al. (2001) durchgeführt. Für die Produktion von Plasmid DNA wurden der *E. coli* Laborstamm DH5 $\alpha$  verwendet (Hanahan, 1983). Die Enzyme zur DNA Modifizierung (Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligasen, Kleenow Fragment, Taq und Pfu DNA Polymerase) wurden von der Firma MBI Fermentas, (St. Leon-Rot) bezogen. Für die PCR basierte Klonierung wurden Oligonucleotidprimer der Firmen Biospring (Frankfurt) und MWG (Ebersberg) eingesetzt (Tab. 3). Die PCR basierte Mutagenese ermöglichte gezieltes Einführen von Punktmutationen und Deletionen in Hsf codierenden Expressionskonstrukten (Treuter et al., 1993, Lyck et al., 1997). Die PCR Reaktionen wurden im Thermocycler GeneAmp PE9600 Perkin Elmer, Applied Biosystem (Langen) mit Hilfe eines Präzisions-Taq/Pfu DNA Polymerase (1:10) Gemisches unter Standardbedingungen bei 55°C Annealing Temperatur amplifiziert. DNA Aufreinigungskits von QIAGEN (Hilden) (QIAquick PCR Purification, QIAquick Gel-Extraction) wurden nach Herstellerempfehlung verwendet.

### **2.2 Expressions- und Reporterkonstrukte**

Pflanzliche Expressionskonstrukte basierten auf pRT101 Vektoren unter der Kontrolle des konstitutiv aktivem 35S Blumenkohlmosaikvirus Promoter (CaMV) (Töpfer et al., 1988). Der Hsf abhängige GmHsp17.3B-CI-GUS Reporter besteht aus dem Promoterfragment (-321 bis -12) von *Glycine max.* in Fusion mit dem bakteriellen  $\beta$ -Glucuronidasegen (GUS) (Treuter et al., 1993).

### **2.3 Expressionsanalysen in Tabak Mesophyll Protoplasten**

Die Isolation, Aufreinigung und PEG vermittelte Transformation und Fixierung von Tabak (*Nicotiana glauca*) Mesophyllprotoplasten, immunologische Detektion von Hsfs und Hsp17-CI Proteinen auf Immunoblots und intrazellulär in fixierten Mesophyllprotoplasten erfolgten nach Scharf et al., 1998, Heerklotz et al., 2001. Spezifische Tomaten Hsf Antikörper gegen HsfA1, HsfA2, HsfA3 wurden in Lyck et al. (1997) und Bharti et al. (2000) beschrieben. Anti-HA Antiseren und sekundäre, Meerrettichperoxidase konjugierte Antiseren wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

#### **2.3.1 Immunoblots**

Für die Analyse endogener Hsp17-CI Proteine wurden  $1 \times 10^5$  Protoplasten mit  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-DNA aus je  $5 \mu\text{g}$  HsfA1 und HsfA2 Plasmid DNA transformiert. Nach 20 h erfolgte die Extraktion in  $75 \mu\text{l}$  Hochsalzpuffer durch Ultraschallbehandlung (Scharf et al., 1998b). Extrakte wurden mit 4x SDS Ladepuffer versetzt und eine Menge, die etwa  $2 \times 10^4$  Protoplasten entspricht, für Immunoblotanalysen verwendet. Densitometrische Bestimmungen von Proteinexpressionslevel wurden mittels ImageMaster 1D Software von GE Healthcare (München) an 3 unterschiedliche lang belichteten Filmen durchgeführt und auf Referenzproben standardisiert. Zur Berechnung des synergistischen Wertes (Synergismus) wird der Expressionslevel der Coexpression durch die Summe der Einzelexpression dividiert. Die Parallele Evaluierung von GUS Reporter Assay und Aktivierung endogener Hsp17-CI Expression wurde nur für den GUS Assay in Abb. 9 zur Verifizierung des Testsystems durchgeführt.

#### **2.3.2 Immunfluoreszenz**

Intrazelluläre Analysen durch indirekte Immunfluoreszenz erfolgten nach Heerklotz et al. (2001) mit einer Änderung: Für die Transformation von  $1 \times 10^5$  Protoplasten wurden  $20 \mu\text{g}$  Gesamt DNA mit je  $10 \mu\text{g}$  HsfA1 und HsfA2 verwendet. Die Protoplasten wurden mit 3,7% Paraformaldehyd (w/v) in Microtubuli-stabilisierendem Puffer (100mM PIPES Puffer, pH 6,8, 2mM EGTA, 1mM

MgSO<sub>4</sub>) fixiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss Axiophot Mikroskop (Oberkochen) kombiniert mit einem „Colour View F12 System“ von Olympus (Hamburg) verwendet. Die statistische Evaluierung einer Zellpopulation von mindestens 100 Zellen erfolgte nach drei unterschiedlichen Kriterien (Lokalisationstypen) (Scharf et al., 1998b).

### *2.3.3 GFP-Hsf Fusionsproteine*

Die Verwendung von grünem Fluoreszenzprotein (GFP) zur Analyse von intrazellulären Lokalisation von Proteinen in mono- und dikotyledonen Pflanzenzellen wurde bereits beschrieben (Reichel et al., 1996). Lokalisationsanalysen an lebenden Zellen wurden mit GFP-HsfA2 durchgeführt, um die Hsf Wechselwirkung vermittelte Kernretention von GFP-HsfA2 zu analysieren. Je  $1 \times 10^5$  Protoplasten wurden mit 10 µg pRT-GFP-HsfA2 und 10 µg Hsf codierende Plasmide oder pRT-Neo transformiert. Nach 20 h wurde mit 1 ml W5 Waschlösung (Scharf et al., 1998b) die Protoplasten 5 min bei 1000 rpm, RT vorsichtig sedimentiert, der Überstands abpipettiert (etwa 1,8 ml) und die Protoplasten vorsichtig resuspendiert. Mikroskopie und Dokumentation erfolgte mittels identischen Geräten wie bei der Immunfluoreszenz.

## **2.4 GUS Reporter Assays**

Bis auf die folgenden Abweichungen wurde die GUS Reporter Assays nach Scharf et al., 1998b und Döring et al., 2000 durchgeführt. Für einen Probeansatz wurden 3 parallele Transformationsansätze ( $2 \times 10^4$  Protoplasten) mit insgesamt 5 µg Gesamt DNA, bestehend aus 3 µg Aktivator und 2 µg Reporter Plasmid-DNA, transformiert. Für gleichbleibende Transformationsbedingungen wurde das pRT-Neo Konstrukt (Expressionskonstrukt für Neomycin Phosphotransferase II) zum Angleichen der DNA Mengen verwendet. Nach der Transformation wurden die Protoplasten 20 h bei 25°C unter Schwachlicht inkubiert. Bei den Titrationsanalysen in Abb. 7 wurden für HsfA1 und HsfA2, die jeweils mit vier unterschiedlichen Klasse A Hsfs cotransformiert wurden, sowohl Transformationsansätze als auch die Messung der Reporteraktivität parallel durchgeführt, so dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Cotransformationen ge-

währleistet wurde. Die Berechnung des synergistischen Wertes (Synergismus) erfolgt mittels der Formel:  $(\text{Aktivität coexprimierter Hsfs} - \text{Aktivität Neo}) / ((\text{Einzelaktivität 1} - \text{Aktivität Neo}) + (\text{Einzelaktivität 2} - \text{Aktivität Neo}))$

## **2.5 Coimmunpräzipitation**

An NHS-aktivierte Sepharose Beads von GE Healthcare (München) wurden 1ml Antiserum Primärantikörper nach Herstellerangaben gekoppelt. 400µl der gekoppelten Antikörper-Sepharose Beads wurden intensiv gewaschen (4x mit RIPA Puffer/0.1% SDS, 3x mit sterilem PBS/0.1% Natriumazid) und mit ca. 800µl sterilem PBS/0.1% Natriumazid auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Für die Immunpräzipitationsproben wurden je  $4 \times 10^5$  Protoplasten mit je 10µg Total-DNA, bestehend aus 5µg HsfA1 und 5µg HsfA2 Expressionsplasmiden, transformiert. Nach 20 h erfolgte die Extraktion in 100µl NEB500 Lysispuffer (Scharf et al., 1998) durch Ultraschallaufschluss. Nach einer Zentrifugation (8000 rpm, 5 min, 4°C) wurde 5µl des Extrakts für die Expressionskontrolle (Input) entnommen und der Rest mit 300µl NEB0 verdünnt (125mM NaCl Endkonzentration). 40µl Sepharose Beads mit immobilisierten Antikörper wurden zum Extrakt gegeben und mit Rotation bei 15 rpm, 4°C über Nacht inkubiert. Die Beads wurden bei 1000 rpm, 4°C, 5 min sedimentiert und 3x mit 1x PBS mit Proteinase-Inhibitoren gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurden die präzipitierten Proteine mit 30µl 1x SDS Ladepuffer ohne β-Mercaptoethanol 15 min bei 4°C eluiert, die Beads bei 14.000 rpm, 4°C, 1 min sedimentiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 3µl β-Mercaptoethanol, Denaturierung bei 95°C, 5 min, konnten die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot analysiert werden.

## **2.6 Gelfiltrationschromatographie**

Native Extrakte von  $1 \times 10^6$  Protoplasten wurden in 200µl NEB500 hergestellt, bei 14.000 rpm, 15 min, 4°C zentrifugiert und 100µl des Extraktes mittels einer ÄKTA Basic HPLC auf einer Sephadex 200 PC3.2 Säule aufgetrennt. Für die Equilibrierung der Gelfiltrationssäule und Elution der Proteine wurde ein Puffer mit 25mM HEPES mit 150mM NaCl verwendet. Das verwendete Programm



regelte die Elution mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu$ l/min und sammelte 50 $\mu$ l Fraktionen. Nach der säulenchromatographischen Auftrennung wurden die Fraktionen mit Aceton gefällt und im Immunoblot analysiert (Abb. 17). Durch Bezug auf die Verteilung der Eichproteine (High Molecular Calibration Kit, GE Healthcare (München)) konnten die relativen Größen der Proteinkomplexe ermittelt werden. Bei der FPLC Gelfiltration der HsfA2 HR-A/B Mutanten (Abb. 18) an der Pharmacia FPLC wurden identische Puffer für Äquilibration einer manuell gepackte Sephadex 200 Säule mit 25ml Volumen verwendet. Es wurde die identische Menge an Extrakten injiziert und aufgetrennt, die nach der obigen Beschreibung hergestellt wurden. Als Flussgeschwindigkeit wurde 0,4ml/min eingestellt sowie Fraktionen von 0,8ml gesammelt, die nach Acetonpräzipitation im Immunoblot analysiert wurden.

## **2.7 DNA Electrophoretic Mobility Shift Assays**

Native Extrakte von  $2 \times 10^6$  Tabak Mesophyllprotoplasten, die mit je 10 $\mu$ g HsfA1 und HsfA2 transformiert wurden, werden in 1x EMSA Puffer durch dreimaliges Einfrieren in Flüssigstickstoff und Auftauen bei 4°C hergestellt und für die Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) nach Vorschriften in Lyck et al. (1997) verwendet. Die Analyse der DNA Bindefähigkeit erfolgte auf nativen, mit TBE Puffer hergestellten 6%igen Polyacrylamidgelen mit nativen Extrakten aus  $2 \times 10^5$  Protoplasten in 1x EMSA Puffer. Als Sonde wurde HSE3 Oligonukleotide, die radioaktiv mit  $^{32}$ P-dCTP mittels Kleenow Fragment enzymatisch an den freien Enden markiert wurden und PCR amplifizierte Sonden von Arabidopsis Hsp17.4-CI Promoterfragmenten verwendet (Vorwärts-Primer (Nr. 918) 5'-CAACCGGATCCATAGAAGCTTCTTGAAGCC-3', Revers-Primer (Nr. 785) 5'-CGATGTCGACAAATGATGGTAGAGAAGAGGATAAGAG-3').

### **3 Ergebnisse**

In den Analysen dient die synergistische Aktivierung durchgehend als Anhaltspunkt für die funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2. Die vorliegenden Ergebnisse der funktionellen Charakterisierungen gliedert sich inhaltlich in drei Teile. Im ersten Teil wird die spezifische Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 im direkten Vergleich mit anderen Klasse A Hsfs verdeutlicht. Teil zwei enthält die Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Aspekte der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2. Im dritten Teil werden die besonderen Eigenschaften von synergistischen HsfA1/HsfA2 Komplexen besprochen.

#### ***3.1 Spezifität der Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2***

Angesichts der Multiplizität von Hsf Genen in Pflanzen ist es sinnvoll, die Spezifität einer Hsf-Hsf Interaktion im Vergleich mit weiteren Hsfs zu testen, die als potenzielle, alternative Interaktionspartner wirken können. Von den Tomaten Klasse A Hsfs ist HsfA3 phylogenetisch näher mit HsfA1 und HsfA2 verwandt als mit HsfA4b und HsfA5 (Abb. 6). Der phylogenetische Baum orientiert sich an HsfA1 als Konsensussequenz, an welcher die anderen Hsf Sequenzen im Alignment angepasst wurden. Trotzdem ändern sich die spezifischen Hsf Paare (HsfA1/HsfA2 und HsfA4b/HsfA5) nicht, auch wenn andere Sequenzen (HsfA2, HsfA3, HsfA4b oder HsfA5) als Bezugssequenzen definiert werden (nicht gezeigt). Im N-terminalen Teil unterscheiden sich die ausgewählten Klasse A Hsfs nur wenig. Variationen kommen in der N-terminalen DBD Verlängerung, Linker 1 und im Sequenzbereich zwischen HR-B und NLS vor, während der C-Terminus eine höhere Variabilität zwischen HsfA1, HsfA2, HsfA3, HsfA4b und HsfA5 aufweist. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die phylogenetischen Beziehungen der untersuchten Hsfs experimentell bewahrheiten.

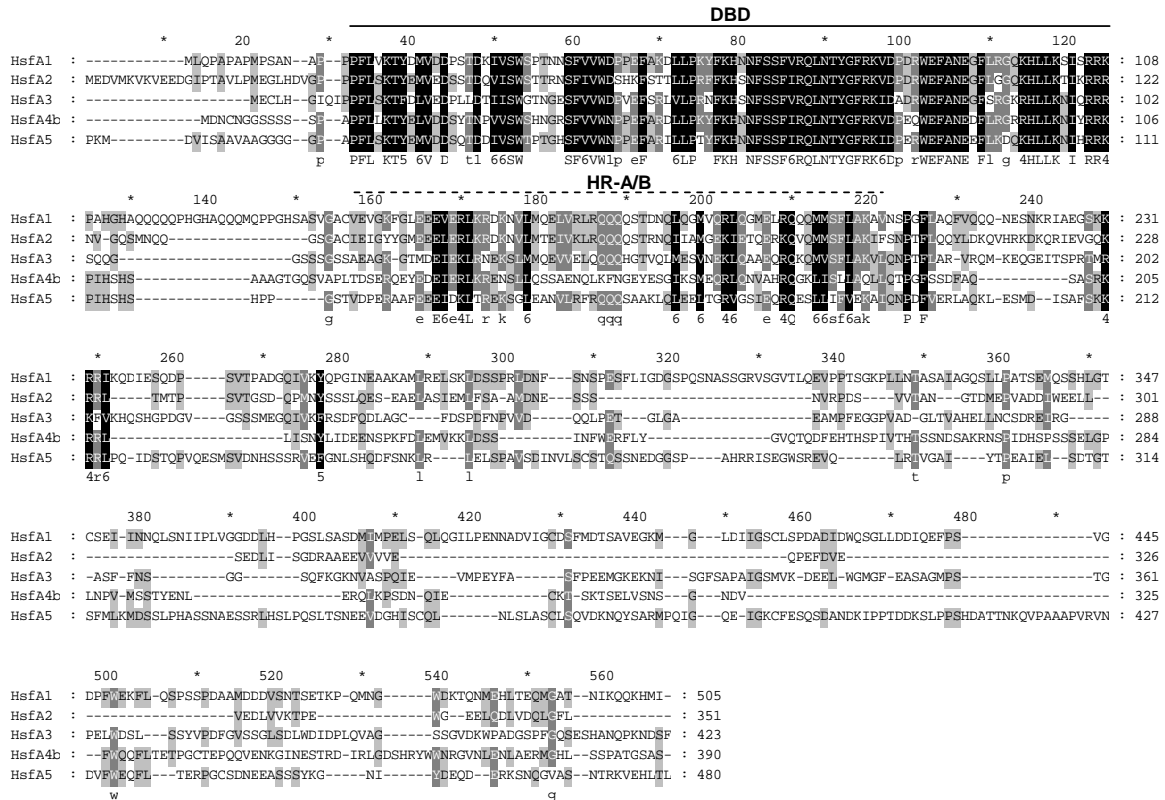


Abbildung 6: **Sequenz Alignment der Klasse A Hsfs A1, A2, A3, A4b und A5 aus Tomate.** Mittels Clone Manager 7 Professional Suite und GeneDoc 2.6 Software wurde ein multiples Alignment aus den Vollängen Aminosäuresequenzen von Hsfs A1, A2, A3, A4b und A5 hergestellt, das die konservierten Regionen DBD und HR-A/B hervorhebt. Im unteren Teil zeigt ein mittels ClustalX 1.83 (Bootstrap tree) und Treeview Software erzeugter phylogenetischer Baum die Ähnlichkeiten der Sequenzen untereinander.

Um die Spezifität der Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2 zu untersuchen, werden beide HsfA1 und HsfA2 jeweils mit den Hsfs A3, A4b, A5 co-exprimiert und mit der Kombination HsfA1/HsfA2 verglichen (Abb. 7). In den Titrationsanalysen werden sowohl HsfA1 als auch HsfA2 in unterschiedlichen Mengenverhältnissen (1:10, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1) mit HsfA3, HsfA4b und HsfA5 co-exprimiert.

**1) Spezifische synergistische Aktivierung:** Die Titrationsexperimente mit HsfA1 und Klasse A Hsfs A2, A3, A4b, A5 zeigen nur im Fall der Coexpression von HsfA2 eine signifikant gesteigerte Aktivität. Sie entspricht einer synergistischen Aktivierung, die die Summe der Einzelaktivitäten übertrifft. Einzig die Kombination HsfA1 und HsfA3 führt zu einer minimal synergistischen Aktivität bei einem 1:10 Verhältnis, die bei höheren HsfA3 Konzentrationen im Verhältnis zu HsfA1 (1:4, 1:2, 1:1) wieder abflacht. In den Titrationsexperimenten mit HsfA2 erzeugt die Coexpression von Klasse A Hsfs A1, A3, A4b, A5 unterschiedlich starke Stimulierung der Aktivität, wobei ebenfalls bei der Coexpression von HsfA1 eine hohe synergistische Aktivierung induziert wird. Bei der Coexpression mit HsfA3 wurde dagegen eine mäßige bzw. mit HsfA5 eine schwache synergistische Aktivität induziert. Diese synergistische Aktivierung erreicht bereits bei 1:4 und 1:2 Verhältnissen die Maximalaktivität und sinkt danach ab (Abflachen der Kurve).

**2) Titrationseffekte:** Interessanterweise besitzt der Kurvenverlauf in den Coexpressionsexperimenten mit HsfA1 und HsfA2 abhängig vom dominierenden Hsf einen steilen (HsfA1 + HsfA2) bzw. einen flacheren Anstieg (HsfA2 + HsfA1). Dieser Aspekt wird in der Diskussion näher besprochen.

Da sowohl HsfA1 als auch HsfA2 eine stark erhöhte Aktivität bei limitierenden (1:10, 1:4, 1:2) und nicht limitierenden Verhältnissen (1:1, 1:2) des hinzutitrierten Co-Hsfs im Gegensatz zu den anderen Klasse A Hsfs (HsfA3, HsfA4b, HsfA5) zeigen, sprechen die Befunde für eine hohe Spezifität zwischen HsfA1 und HsfA2. Für die Verifizierung der Spezifität wird die Hsf-Hsf Interaktion analysiert.

## GUS Reporter Assay

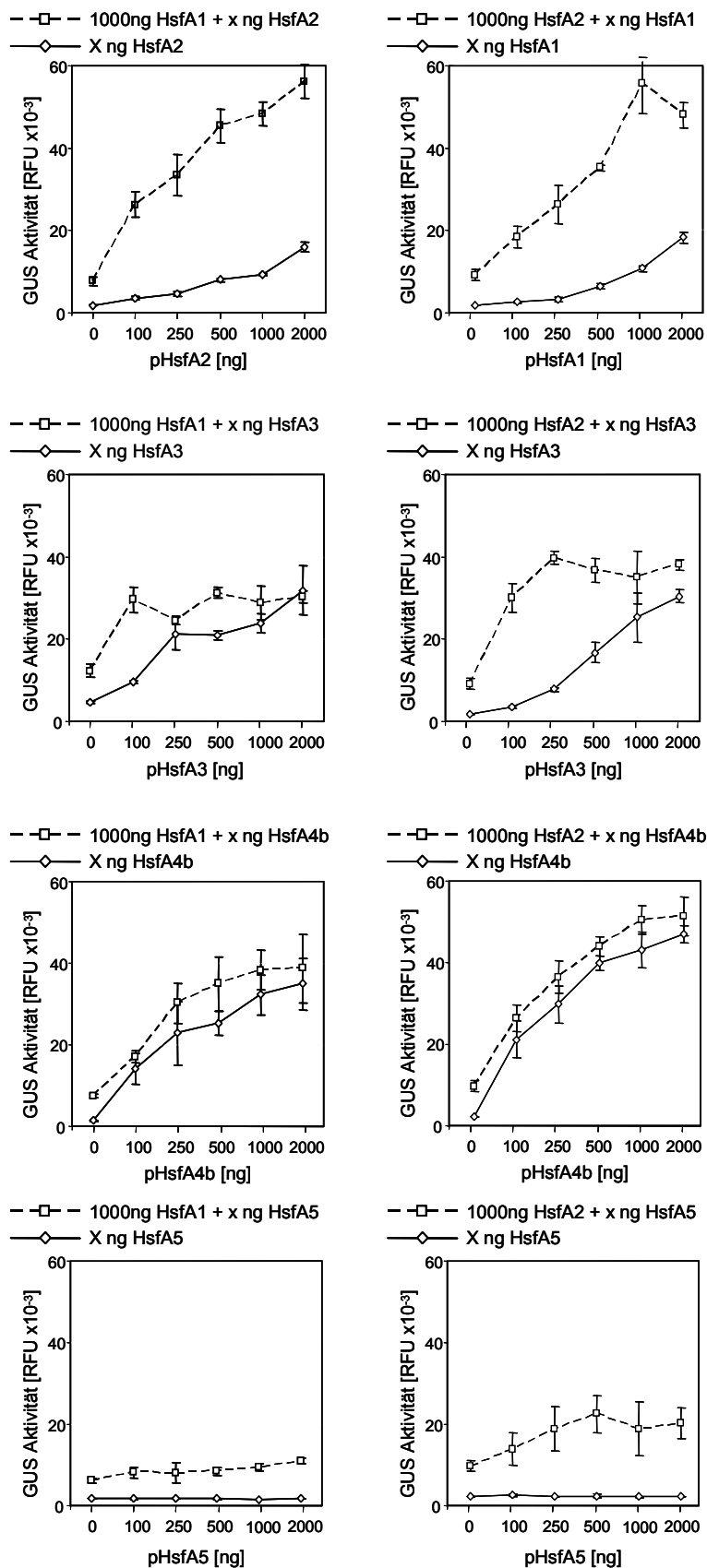


Abbildung 7: **Spezifität zwischen HsfA1 und HsfA2 im GUS Reporter Assay.**

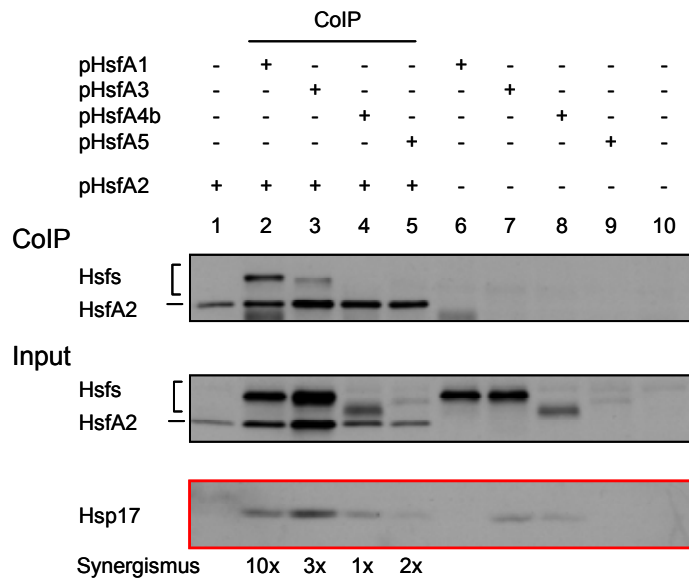
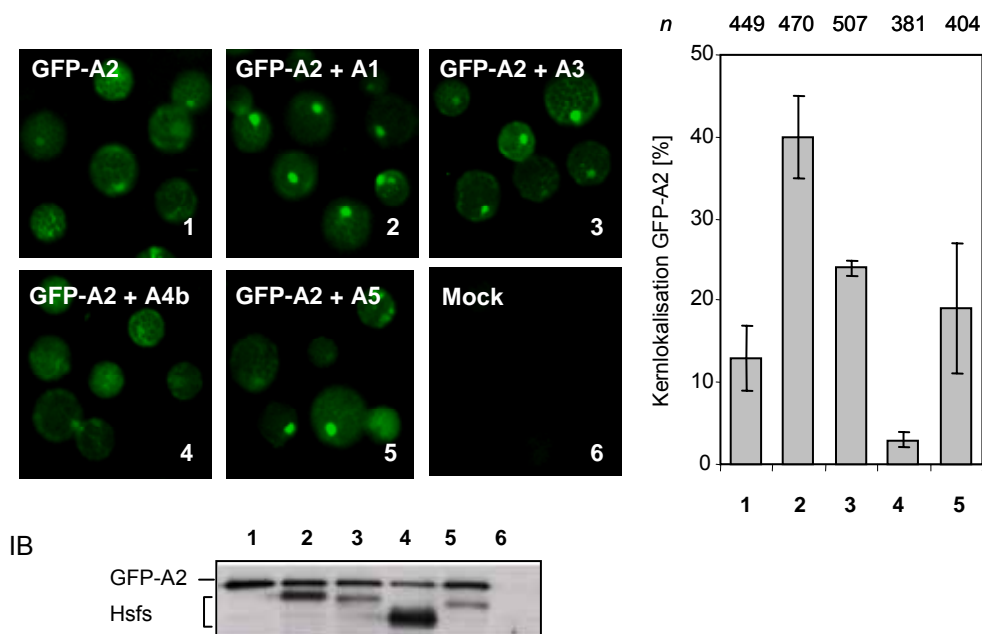
Innerhalb der Klasse A Hsfs A1, A2, A3, A4b und A5 zeigen HsfA1 und HsfA2 eine hohe Spezifität im GUS Reporter Assay. Eine konstante Menge von HsfA1 bzw. HsfA2 Expressionsplasmiden werden mit steigende Mengen Klasse A Hsfs in den Verhältnissen (1:10, 1:4, 1:2, 1:1 und 1:2) coexprimiert. Da die Transformationen und Messungen der GUS Assays (A1 + A2/3/4b/5 bzw. A2 + A1/3/4b/5) parallel erfolgen, sind die Effekte direkt vergleichbar. Die Mittelwerte und Fehlerbalken beziehen sich drei unabhängigen Transformationen einer Hsf Kombination. Die unterbrochenen Linien repräsentieren die Aktivität coexprimierter Hsfs, die durchgezogenen Linien die Einzelaktivität des variablen Hsfs.

Der mäßige bzw. schwache synergistische Aktivierung durch HsfA2 und HsfA3 bzw. HsfA2 und HsfA5 lässt auf weitere Interaktionen von HsfA2 schließen. Aus diesem Grund wird die Komplexbildung von HsfA2 mit den Hsfs A1, A3, A4b, A5 untersucht und miteinander verglichen. Als Testsystem für die Hsf Aktivität wird die Hsf induzierte Expression endogener Tabak Hsp17-CI Gene evaluiert, die standardmäßig als interne Kontrolle für die transkriptionelle Aktivierung Chromatin-eingebetteten Genen verwendet werden (Bharti et al., 2004, Baniwal et al., 2007). Zusätzlich wird die HsfA1 vermittelte Kernretention als weiteres Testsystem zur Analyse der Klasse A Hsf Interaktion verwendet und auf die Hsfs A3, A4b und A5 erweitert (Abb. 8).

**1) Interaktionsaffinität und Spezifität:** HsfA1 und HsfA3 können mit HsfA2 heterooligomere Komplexe bilden. Jedoch bildet HsfA3 im Vergleich zu HsfA1 weniger stabile Komplex mit HsfA2. Dies ist möglicherweise ein Resultat der niedrig affinen Interaktion.

**2) Interaktionsaffinität und Kernretention:** In der Analyse der Kernretention von GFP-HsfA2 durch die Hsfs A1, A3, A4b und A5 induziert die Coexpression mit HsfA1 den größten Effekt mit dem größten Anteil kernlokalisierter Zellen. HsfA3 erzielte einen intermediären und HsfA5 einen schwachen Anstieg der kernlokalisierten Zellen. Interessanterweise führt HsfA4b zur Verringerung des Anteils kernlokalisierter Zellen. Dies ist dadurch zu erklären, dass HsfA4b durch Konkurrenz HsfA2 an der Bindung hindert, da beide nicht miteinander interagieren, und/oder HsfA4b die Expression von endogenen Hsp17-CII Isoformen induziert, die als cytoplasmatische Retentionsfaktoren und Repressoren von HsfA2 wirken (Port et al., 2004, Baniwal et al., 2007). Die induzierte Hsp17-CI Expression korreliert mit den Ergebnissen der Kernretentionsanalyse mit GFP-HsfA2. Möglicherweise spiegelt die Qualität der interaktionsvermittelten Kernretention das Aktivierungspotenzial der Hsfs wider.

Trotz weiterer Interaktionspartner von HsfA2 ist die Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 von hoher Affinität geprägt. Diese Affinität korreliert mit den Kernretentionswerten, die auch *in vivo* die hohe Spezifität von HsfA1 und HsfA2 reflektieren.

**A** Coimmunpräzipitation ( $\alpha$ -HsfA2)**B** GFP Fluoreszenz**Abbildung 8. Selektive Interaktion von HsfA2**

A. Durch Coimmunpräzipitation wurde die Interaktion zwischen HsfA2 und Klasse A Hsfs A1, A3, A4b und A5 getestet. Die Tomaten Hsfs induzieren die Expression endogener Hsp17-CI Gene. Anhand der Synergismuswerte wird die Höhe der Induktion angegeben, die die Steigerung gegenüber die Summe der Einzelaktivitäten wiedergibt. B. GFP-HsfA2 wurde mit Klasse A Tomaten Hsfs A1, A3, A4b und A5 cotransformiert und lebende Zellen mit kernlokalisiertem GFP-HsfA2 statistisch ausgewertet. Das Balkendiagramm repräsentiert die Zahl evaluierter Zellen (n) und den Prozentanteil mit Kernlokalisierung. Ein Immunoblot (IB) zeigt die Expressionskontrolle für GFP-HsfA2 und die cotransformierten Hsfs A1, A3, A4b und A5.

### 3.2 Synergistische Aktivierung

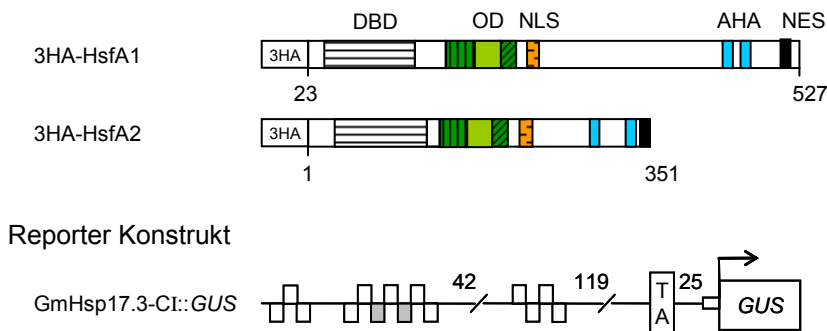
Die Spezifität, die durch die hohe Präferenz in der Interaktion verdeutlicht wird, benötigt eine genaue Verifizierung im GUS Reporter Assay und die Induktion endogener Hsp17-CI Gene. Für die Analyse der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 werden beide Faktoren N-terminal mit einem 3HA Epi-top-Tag markiert, um eine direkte Vergleichbarkeit beider Hsfs auf Basis ihrer Expressionslevel zu gewährleisten. Mit diesem Ansatz werden beide Reporterformen, Plasmidreporter und endogene Hsp17-CI Expressionslevel parallel evaluiert und folgende Fragestellungen behandelt:

- Welchen Einfluss hat das Verhältnis zwischen HsfA1 und HsfA2 auf die Gesamtaktivität?
- Spielt die Stabilisierung der Hsf Expressionslevel eine Rolle?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Aktivierung des Plasmid Reporters und endogener Hsp17-CI Gene?

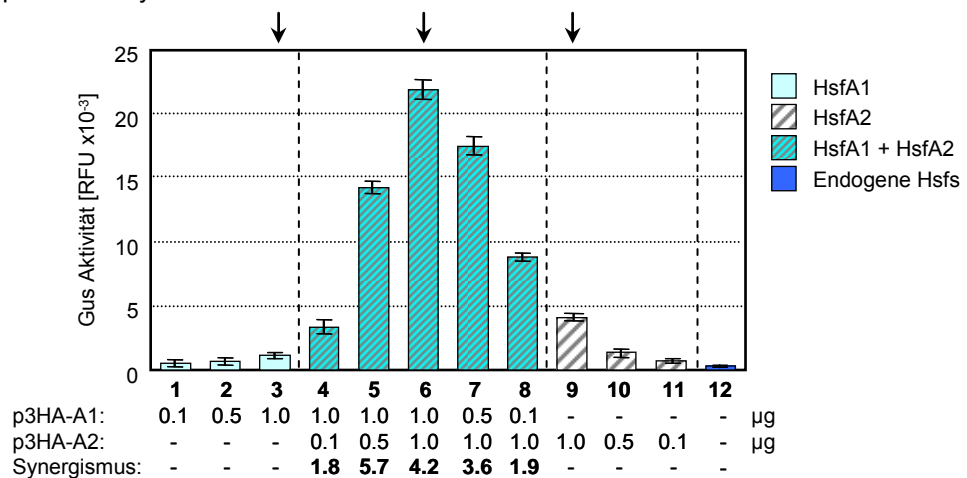
**Synergistische Aktivierung zweier Reporter Systeme:** Die Coexpression beider 3HA markierter Hsfs führt zur synergistischen Aktivierung von GUS Reporter und endogenen Hsp17-CI Genen. Die Gesamtaktivität ist hierbei abhängig vom limitierten Hsf. Die durch Coexpression induzierte Stabilisierung der Hsf Expressionslevel führt maximal zur 1,4 fachen Erhöhung des HsfA2 Levels (Nr. 6), während die synergistische Induktion endogener Hsp17-CI Gene einen 2,2 fachen Synergismus erreicht. Aufgrund dieses Unterschieds ist die synergistische Aktivierung nicht nur mit einer erhöhten Stabilität des Hsf Expressionslevel zu begründen. Eine qualitative Korrelation besteht zwischen der GUS Reporter Aktivität und dem induzierten, endogenen Hsp17-CI Expressionslevel, da bei hohen synergistischen Werten die Limitation des endogenen Systems sichtbar wird und beide Systeme quantitativ nicht mehr miteinander korrelieren. Ein Vergleich der Aktivitäten zeigt, dass für die Bewertung der synergistischen Effizienz die berechneten Synergismusergebnisse alleine nicht ausreichen, sondern die Gesamtaktivitäten berücksichtigt werden müssen (Nr. 5, 6).



**A** Hsf Konstrukte



**B** GUS Reporter Assay



**C** Endogener Hsp17-CI

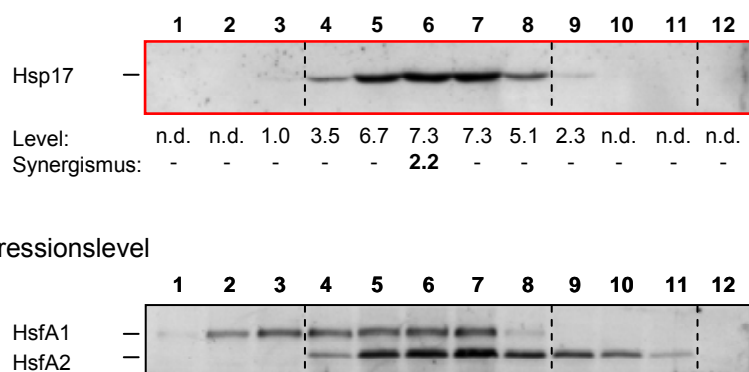


Abbildung 9: **Synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2**

A. Struktur der N-terminalen 3HA markierten HsfA1 und HsfA2 Expressionskonstrukte und des Hsf abhängige GUS Reporterkonstrukts. B. Die synergistische Aktivierung im GUS Reporter Assay durch Coexpression von 3HA-HsfA1 und 3HA-HsfA2. Pfeile markieren die Referenzproben für den Vergleich zwischen Coexpression und Einzelexpression von HsfA1 und HsfA2. Synergismuszahlen sind angegeben. C. Induktion endogener Tabak Hsp17-CI Gene durch Hsfs. Immunoblots zeigen die Expressionslevel endogener Hsp17-CI Isoformen und der Hsfs. Die densitometrisch ermittelten Werte sind angegeben.

Die Effizienz heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe in der transkriptionellen Aktivierung deutet offenbar auf neue Qualitäten des heterooligomeren Komplexes hin, die nicht durch erhöhte Expression der einzelnen Hsfs erreicht wird. Weitere funktionelle Analysen helfen bei der Identifizierung und Charakterisierung der verantwortlichen Funktionsdomänen, die dann detailliert untersucht werden.

### **3.3 Beitrag funktioneller Domänen**

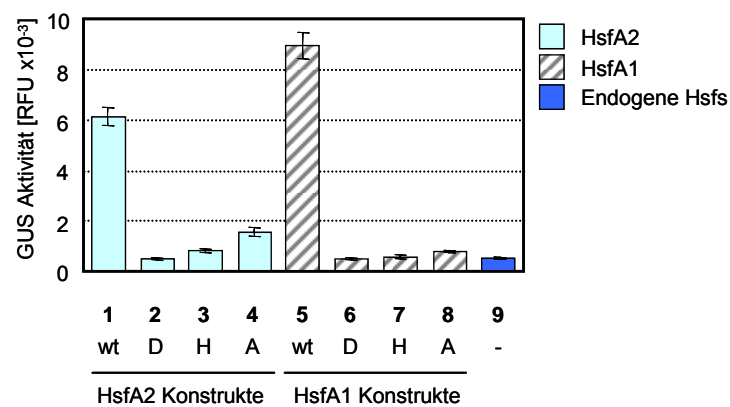
Da die synergistische Aktivierung die Coexpression von HsfA1 und HsfA2 erfordert, können die strukturellen Voraussetzungen nur in Coexpressionsanalysen identifiziert werden. Zu diesem Zweck werden Mutanten der funktionellen Domänen (DBD, HR-A/B, CTAD) für beide Hsfs erzeugt, die in Coexpressionsanalysen verwendet werden (Abb. 10). Die DBD und CTAD Mutanten besitzen Aminosäuresubstitution von funktionell wichtigen Aminosäureresten, die für die HSE Erkennung und Aktivierung benötigt werden. Nur die Oligomerisierungsmutanten enthalten jeweils eine Deletion der HR-A/B Regionen. Im GUS Reporter Assay bleiben die Mutanten inaktiv und sind detektierbar. Obwohl HsfA1 eine höhere Aktivität im GUS Reporter Assay aufweist, induziert HsfA2 im Vergleich zu HsfA1 eine stärkere Expression endogener Hsp17-CI Gene, wie auch schon in Abb. 9 gezeigt wurde.

Durch Funktionsanalysen, die die Aspekte der transkriptionellen Aktivierung (Abb. 11A), Interaktion (Abb. 11B) und HsfA1 vermittelte Kernlokalisierung (Abb. 11C) untersuchen, wird versucht, die funktionellen Unterschiede zwischen heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexen aufzuklären. Dabei steht die Identifikation der Domänen im Vordergrund, die entscheidend zur synergistischen Aktivierung von HsfA1 und HsfA2 beitragen.

## Hsf Mutanten

Domäne	Code	HsfA1 Mutation	HsfA2 Mutation
DBD	D	R95D	R85D
HR-A/B	H	$\Delta$ 165-238	$\Delta$ 137-210
CTAD (AHA1/2)	A	AHA1: W452A L455A L456A AHA2: F469A W470A F473A L474A	AHA1: W297A AHA2: W456E L341A

## GUS Reporter Assay



## Endogener Hsp17-CI und Hsf Expressionslevel

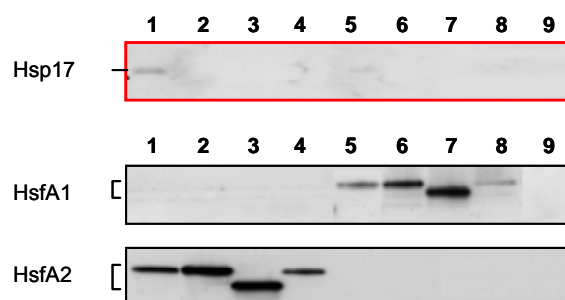


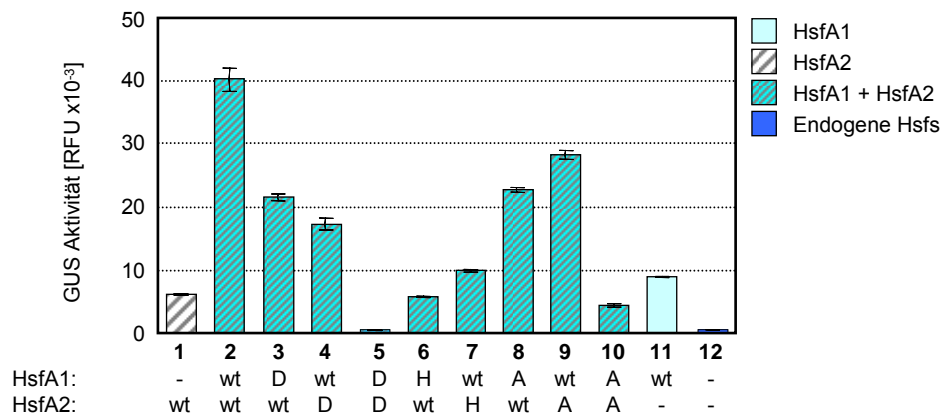
Abbildung 10: DBD Mutanten, HR-A/B Mutanten und CTAD Mutanten von HsfA1 und HsfA2 sind inaktiv auf beiden Reporter Systemen.

Die Details der inaktivierenden Mutationen in den funktionellen Domänen von HsfA1 und HsfA2 beinhalten Aminosäuresubstitutionen und Deletionen funktionell wichtiger Aminosäurereste. Im GUS Reporter Assay wurden die HsfA2 und HsfA1 Mutanten getestet und die Expressionslevel von endogenem Hsp17-CI und Hsfs im Immunoblot nachgewiesen.

**1) Synergistische Aktivierung durch CTADs:** Die Wildtyp Hsfs erreichen im Gegensatz zu den 3HA markierten Formen eine höhere synergistische Aktivität. Obwohl HsfA1 etwas stärker als HsfA2 im GUS Reporter Assay aktiviert, induziert HsfA2 einen höheren Expressionslevel endogener Hsp17-CI Gene. Interessanterweise werden Defekte in der DNA Bindungsfunktion durch den coexprimierten Wildtyp Partner Hsfs kompensiert, wenn auch der Level der synergistischen Aktivierung geringer ausfällt als die Wildtyp Kombination. Dies impliziert, dass durch die Wechselwirkung und Funktion der übrigen Domänen wie Oligomerisierungs- und C-terminale Aktivierungsdomänen die synergistische Aktivierung ermöglicht wird. Ein quantitativer Unterschied zwischen dem Level der synergistischen Aktivierung mit mutierter DBD, bei der die Mutation der HsfA2 DBD einen stärkeren inhibierenden Effekt bewirkt, ist ein erster Hinweis auf differenzielle Beiträge durch beide Hsfs.

**2) Interaktionsvermittelte synergistische Aktivierung:** Durch Mutation der HR-A/B Region bzw. Oligomerisierungsdomäne bricht die synergistische Aktivierung ein. Möglicherweise fördert die Promoterarchitektur im Falle der niedrigen synergistischen Aktivierung durch Wildtyp HsfA2 und monomeren HsfA1 die Bindung dieser beiden Faktoren, die durch sekundäre Interaktion über Coaktivatoren stabilisiert sein kann. Auch hier fällt die besondere Stellung der HsfA2 DNA Bindungsfähigkeit auf.

**3) Kooperation der CTADs:** Während für die Aktivierung des GUS Reporters bereits eine funktionelle CTAD ausreicht, fällt dagegen die Aktivierung des endogenen Hsp17-CI Reporters aus. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zum Plasmid Reporter endogene Hsp17-CI Gene die chromatin-modifizierende Aktivität von Coaktivatoren benötigen, die möglicherweise erst durch die Kooperation der CTAD rekrutiert werden. Die CTAD von HsfA1 in Kombination mit mutierter CTAD von HsfA2 zeigt eine höhere Restaktivität als die Coexpression von Wildtyp HsfA2 und HsfA1 mit mutierter CTAD. In dieser Kombination besitzt die inaktive CTAD von HsfA1 sogar eine reprimierende Wirkung ähnlich HsfA1 $\Delta$ C394, dessen dominant negativen Wirkung sich auf die endogene Hitzestressantwort von Tabak auswirkt (Baniwal et al., 2007). Ein weiteres Indiz für individuelle Beiträge im heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplex zeigt sich hier in Form der dominierenden CTAD von HsfA1.

**A** GUS Reporter Assay

## Endogener Hsp17-CI und Hsf Expressionslevel

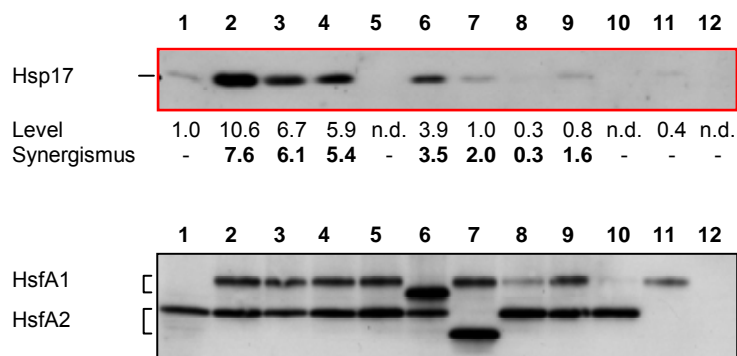


Abbildung 11A: **Auswirkungen der Defekte in der DNA Bindungs-, Oligomerisierungs- und Aktivierungsdomänen auf die synergistische Aktivität von HsfA1 und HsfA2.**

Hsf Wildtyp (wt) und Mutanten (D, H, A) wurden in abwechselnden Kombination cotransformiert und ihre Aktivität im GUS Reporter Assay gemessen. Die Abkürzungen beschreiben funktionelle Mutanten von HsfA1 und HsfA2 mit Defekten in DNA Bindung (D), Oligomerisierung (H) und Aktivierung (A). Details der Mutationen befinden sich in Abb. 10. Immunoblots zeigen die Expressionslevel endogener Hsp17-CI Gene und Hsfs. Die densitometrisch bestimmte Expressionslevel der Hsp17-CI und Hsf Proteine sind auf den Level von HsfA2 Wildtyp standardisiert. Synergismus beschreibt die Nettosteigerung gegenüber der Summe der Aktivitäten der Einzelfaktoren. Aufgrund der parallel durchgeführten Experimente in Abb. 10 und 11A konnten die Synergismuswerte berechnet werden.

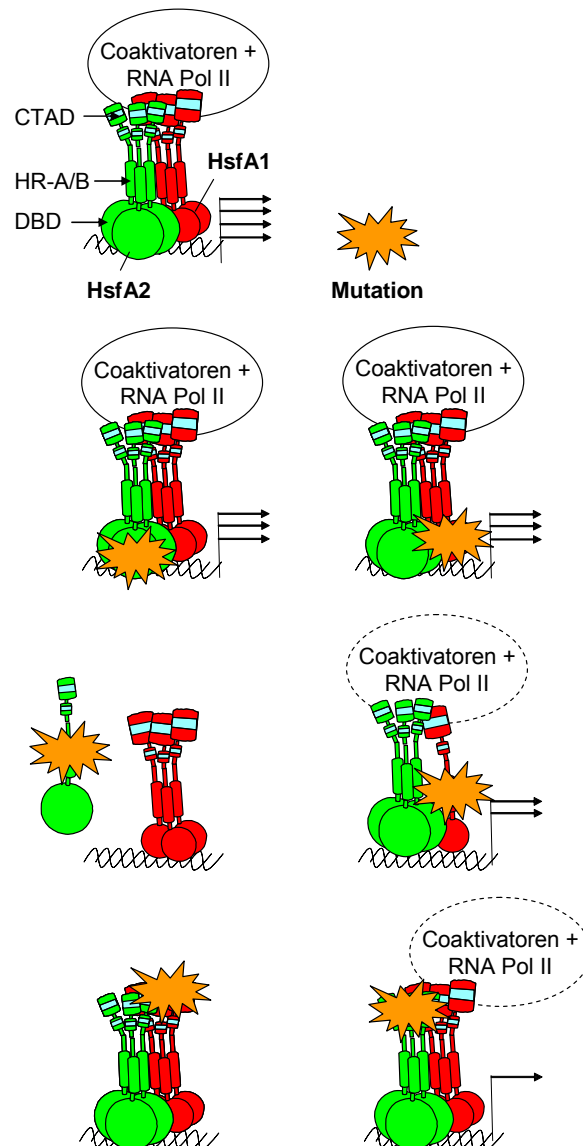


Abbildung 11A (Fortsetzung): **Schematische Darstellung der Ergebnisse in Abb. 11A**

Die funktionellen Beiträge der Domänen (DBD, HR-A/B, CTAD) von HsfA1 und HsfA2 für die synergistische Aktivierung werden durch eine Mutationsanalyse aufgeklärt. Mutationen der DBD haben die geringste Auswirkungen, während HR-A/B Regionen und CTADs eine wichtige Rolle für die Etablierung der synergistischen Aktivierung spielen. Die proportional hervorgehobenen Domänen beruhen auf ihrer dominanten Funktion im heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplex, die experimentell gezeigt wurden.

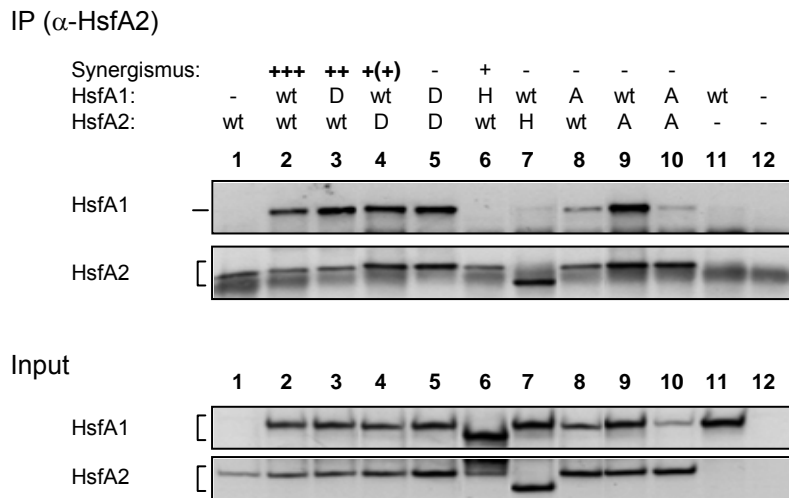
**B** Coimmunpräzipitation

Abbildung 11B: **Auswirkungen der Defekte in DNA Bindungs-, Oligomerisierungs- und Aktivierungsdomänen auf die Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe.**

Hsf Wildtyp (wt) und Mutanten (D, H, A) wurden in abwechselnden Kombination cotransformiert und ihre Interaktion durch Coimmunpräzipitation analysiert. Die Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 wird nicht von Mutationen in DBD (D) und CTAD (A) beeinträchtigt. Für die Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe wird von beiden Hsfs die Oligomerisierungsdomäne benötigt. Die Präzipitierbarkeit von HsfA2 und Mutanten blieb unverändert und auch die Menge der co-präzipitierten HsfA1 Formen. Da die HsfA1 CTAD Mutante eine geringere Stabilität besitzt, wurde eine geringere Menge HsfA1 in Proben Nr. 8 und 9 copräzipitiert. Eine durchgehende, unspezifische Bande ist mit (\*) markiert.

**4) Direkte Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2:** Für die Interaktion und Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe spielt es keine Rolle, ob DBD oder CTAD mutiert sind. Einzig die funktionellen HR-A/B Regionen von beiden Hsfs reichen dafür aus. Das Ergebnis impliziert, dass HsfA1 und HsfA2 ohne die Hilfe „interaktionsvermittelnder“ Mechanismen wie Promoterbindestellen oder Adapterproteinen (Scaffolds) auskommen und sehr wahrscheinlich selbstständig Heterooligomere bilden können (Abb. 11B).

**5) HsfA2 DBD abhängige Kernretention:** Die Analyse der HsfA1 vermittelten Kernretention von HsfA2 zeigt unerwartete Befunde, die zur Formulierung mechanistischen Hypothesen der Kernretention dienen können. Ähnlich wie in den Ergebnissen der Analyse der synergistischen Aktivierung besitzt die HsfA2 DBD einen dominanten Einfluss auf die Effizienz der HsfA1 vermittelten Kern-

retention. Während die Mutation der HsfA1 DBD keine Veränderung der Kernretention verursacht, führt die Mutation der HsfA2 DBD zur Verringerung der Kernretentionsereignisse. Die Mutation der Oligomerisierungsdomäne verhindert die HsfA1 vermittelte Kernretention.

#### **6) Verbindung zwischen Kernretention und Aktivierung:**

Überraschenderweise schwächt die Mutation der CTAD den dominanten Kernexport von HsfA2, der jedoch durch Leptomycin B Behandlung weiterhin inhibierbar ist und nahezu ausgeschaltet wird. Auch die HsfA1 vermittelte Kernretention funktioniert mit der CTAD Mutante. Analysen der intrazellulären Lokalisation von HsfA2 AHA1 und AHA2 Mutanten zeigen, dass die Mutation des AHA2 Motivs ähnlich der CTAD Mutante zur Erhöhung der Kernlokalisierung führt. Vermutlich ist AHA2 an der Regulation des Kernexports beteiligt - eine Überlappung mit dem räumlich nahen Kernexportsignal ist denkbar. Die HsfA1 vermittelte Kernretention könnte die Folge gesteigerter DNA Bindungsaffinität von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen bedeuten, die eine längere Verweildauer im Kern besitzen. Transkriptionell aktive Komplexe könnten ebenfalls ein Grund für die Kernretention sein, die aufgrund der besetzten Aktivator-motive denselben Effekt wie die CTAD Mutanten erzielen.

#### **Abbildung 11C: Auswirkungen der Defekte in DNA Bindungs-, Oligomerisierungs- und Aktivierungsdomänen auf die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2. (nächste Seite)**

Hsf Wildtyp (wt) und Mutanten (D, H, A) wurden in abwechselnden Kombination cotransformiert und die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2 (Nr. 1-9) mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zur Kontrolle der Kernimportfunktion der HsfA2 (D, H, A) Konstrukte wurden die Einzeltransformationen mit HsfA2 Konstrukten vor der Fixierung 3 h mit Leptomycin B (LMB) behandelt, um den Kernexport zu blockieren (Nr. 14-17). Die Bilder zeigen die intrazelluläre Lokalisation von HsfA2 Konstrukten stellvertretend für die Funktionalität der HsfA1 vermittelten Kernretention mit den jeweiligen Konstrukt. Im unteren Teil ist eine statistische Auswertung der HsfA2 Lokalisationstypen (N = kernlokalisiert, N/C = nucleo-cytoplasmatisch, C = cytoplasmatisch) von einer Population aus mindestens 100 transformierten Zellen gezeigt. Zur Bewertung der HsfA1 vermittelten Kernretention von HsfA2 ist zu bemerken, dass die nucleo-cytoplasmatische Lokalisation als Kernretention gezählt wurde. Aufgrund der von Zelle zu Zelle variierenden Expression können hohe Expressionslevel von HsfA2 einen höheren Signalhintergrund verursachen, die auch eine Limitation des Kernkompartiments bedeuten könnte. Nucleo-cytoplasmatisch gewertete Zellen besitzen eindeutig ein stärkeres Signal im Kern im Vergleich zum Cytoplasma.



**C** Indirekte Immunfluoreszenz ( $\alpha$ -HsfA2)

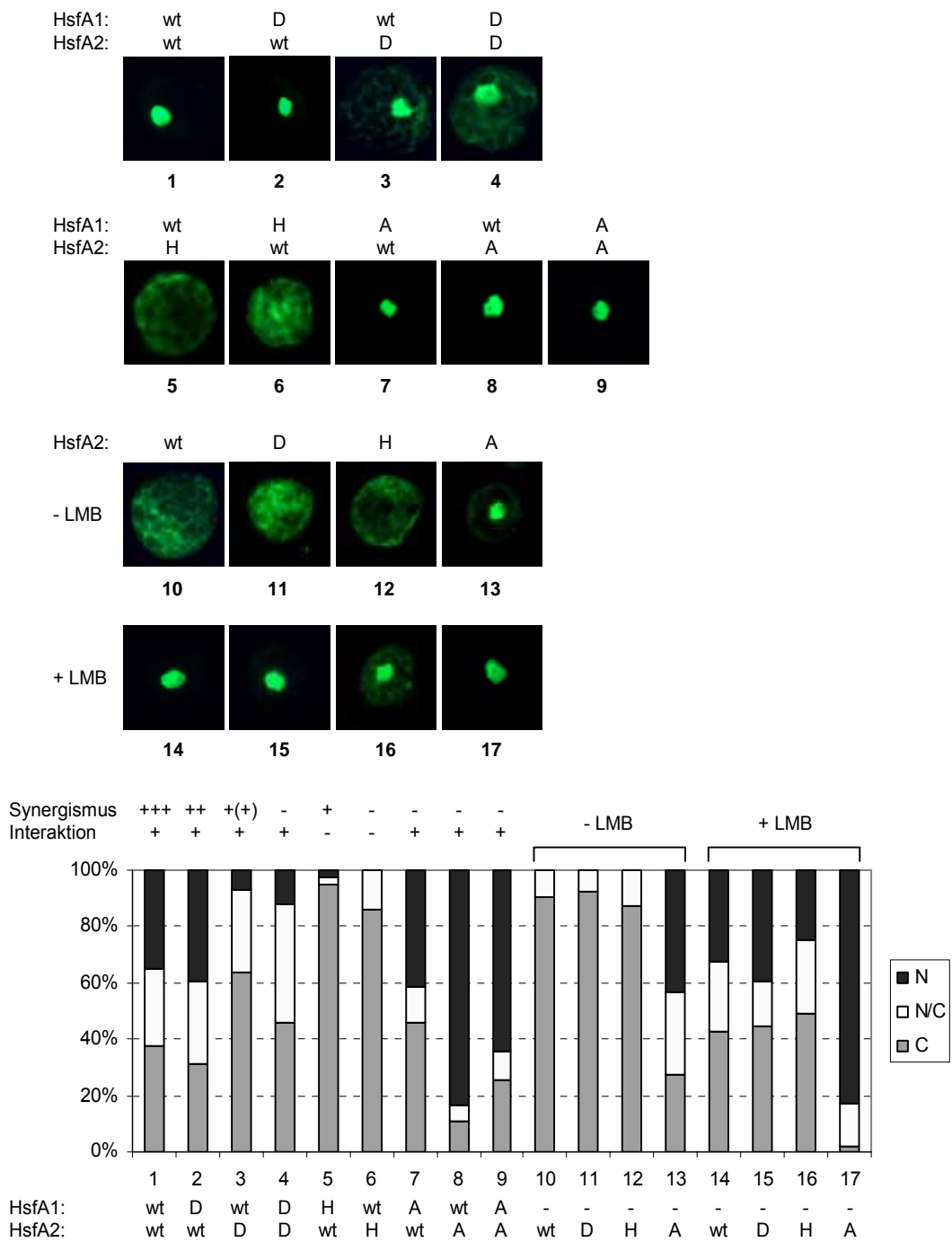


Abbildung 11C: Auswirkungen der Defekte in DNA Bindungs-, Oligomerisierungs- und Aktivierungsdomänen auf die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2.

Abbildungstext auf der vorherigen Seite.

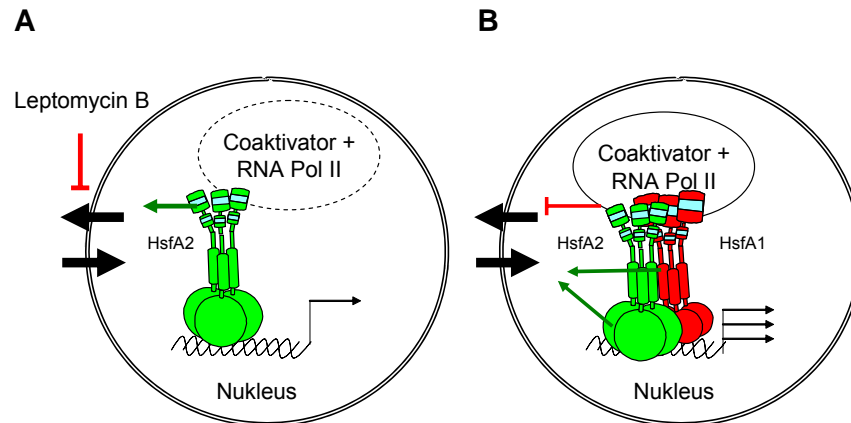


Abbildung 11C (Fortsetzung): **Modell der HsfA1 vermittelten Kernretention**

A. Aufgrund der starken NES liegt das Gleichgewicht der intrazellulären Lokalisation von HsfA2 auf Seiten des Cytoplasmas (Heerklotz et al., 2001). Leptomycin B inhibiert den Exportin-1 vermittelten Kernexport, so dass HsfA2 im Zellkern sich anreichert. B. In der Coexpressions-situation bilden heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe eine erhöhte DNA Bindungsaffinität, die durch Interaktion mit HsfA1 begünstigt wird die HsfA2 DBD benötigt. Zusätzlich verhindert die vermutlich verbesserte Interaktionsaffinität mit Coaktivatorkomplexen die Bindung von Exportin-1 an die ausgedehnte NES im CTAD, die sich über die AHA Aktivator motive von HsfA2 erstrecken.

### 3.4 Funktionelle Analysen mit chimären Hsf Konstrukten

Neben der Analyse mit Hsf Mutanten mit defekten funktionellen Domänen bietet der Einsatz von HsfA1-A2 Hybriden eine weitere Möglichkeit, die funktionellen Unterschiede der individuellen Hsfs und ihrer Domänen zu untersuchen. In der Coexpression von Wildtyp Hsfs und HsfA1-A2 Hybriden werden heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe gebildet, die gleichartige bzw. Domänen eines Hsf Typs enthalten, so dass der Einfluss Domänen-spezifischer Effekte von beiden Hsfs ermittelt werden kann (Abb. 12).

**1) Synergistische Aktivierung mit heterologen CTADs:** HsfA1/HsfA2 Komplexe mit heterologen CTADs (Nr. 5, 8, 12, 15) sind synergistisch aktiv im Vergleich zu Komplexen mit homologen CTADs (Nr. 6, 9, 11, 14). Dagegen reicht die Verschiedenartigkeit der DBD alleine nicht für eine synergistische Aktivierung aus. Sie ist jedoch für einen geringen Anstieg der Gesamtaktivität in der Coexpression verantwortlich, wenn beide C-Termini vom HsfA2 Typ sind

(Nr. 6, 9). Bei den Kombinationen mit HsfA2-A1 Hybrid, die bereits eine höhere Basalaktivität besitzen, bleibt dieser Effekt beim dereguliertem Konstrukt (d) aus.

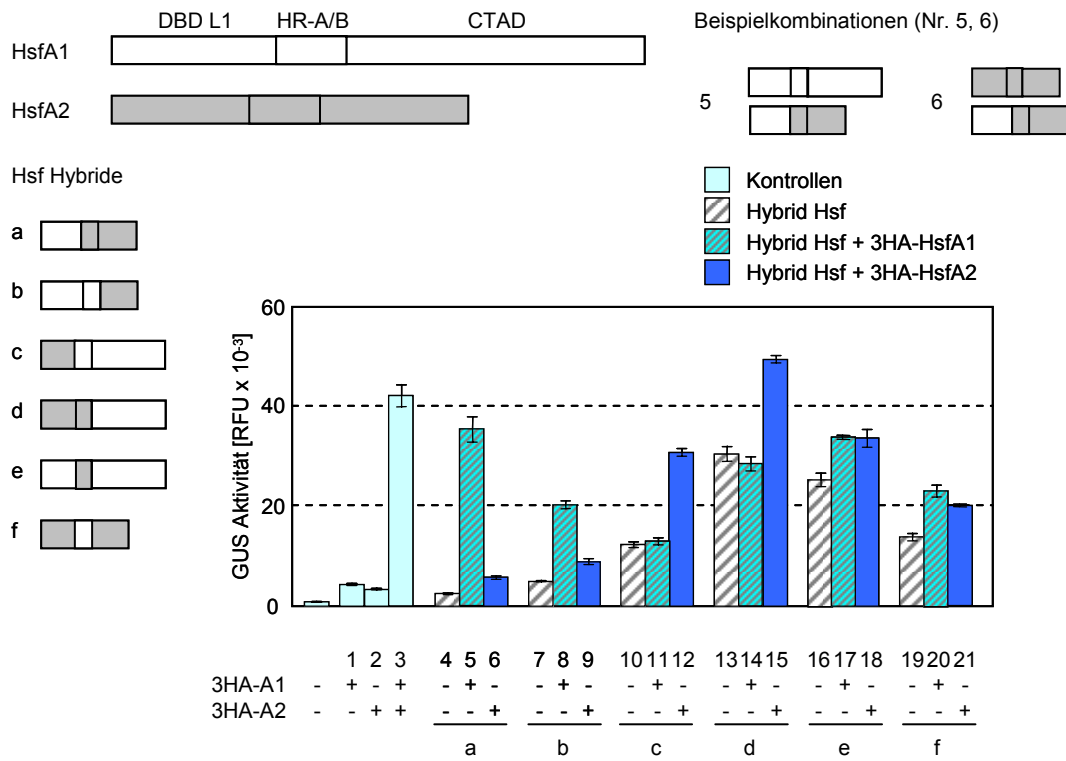
**2) Beitrag heterologer HR-A/B Regionen:** Neben der Funktionalität gemischter CTADs in HsfA1/HsfA2 Komplexen sind heterologe HR-A/B Regionen wichtig für die höhere synergistische Aktivierung (Vergleich Nr. 5, 8 und Nr. 12, 15). Heterooligomerisierung und die Kombination der CTADs bilden wichtige Voraussetzungen für die synergistische Aktivierung. Die HR-A/B Hybride (Nr. 16-21) zeigen eine stark reduzierte synergistische Aktivierung, die vermutlich durch die Paarung von homooligomeren HR-A/B Regionen verursacht werden. Dies deutet darauf hin, dass die Heterooligomerisierung für die synergistische Aktivierung förderlich ist oder bevorzugt stattfindet.

**3) Deregulation von HsfA1:** Unter Umständen verhalten sich Hybride durch die strukturellen Veränderung nicht mehr wie die ursprünglichen Wildtyp Proteine. Dies hat zur Folge, dass Wechselwirkungen mit Repressoren oder intramolekulare Interaktionen nicht mehr stattfinden, die für die reprimierte Aktivität des Wildtyp Proteins verantwortlich sind. Beispiele hierfür sind der HsfA2 DBD-HsfA1 CTD Hybrid (d) und HR-A/B Hybride (e, f), die eine de-reprimierte Aktivität aufgrund der „nicht-nativen“ HR-A/B Region aufweisen.

**Abbildung 12: Funktionelle Analyse mit HsfA1-A2 Hybriden (nächste Seite).**

A. Die weißen und grauen Blockdiagramme repräsentieren HsfA1 (weiß) und HsfA2 (grau), die als Hybride Austausch der N-terminalen DBD und L1 Region, der HR-A/B Region oder der CTAD besitzen. In den Blockdiagrammen a-f sind Hsf Hybride mit ausgetauschten Domänen gezeigt. Durch Kombination mit Wildtyp Hsfs werden beispielsweise HsfA1/HsfA2 Komplexe erzeugt, die in der Kombination mit HsfA1 nur DBDs vom HsfA1 Typ besitzen (Nr. 5) oder in der Kombination mit HsfA2 die beiden Domänen HR-A/B und CTAD vom HsfA2 Typ sind (Nr. 6). Mit Hilfe der beiden Reporter Systemen, (A) GUS Reporter Assay und (B) Induktion endogener Hsp17-CI Expression, werden die Effekte homologer Regionen im HsfA1/HsfA2 getestet, die durch Kombination aus HsfA1-A2 Hybriden und 3HA-HsfA1 und 3HA-HsfA2 entstehen. Die Expressionslevel endogener Hsp17-CI Gene, HsfA1-A2 Hybride und der 3HA markierte Hsfs wurden durch Immunoblotting evaluiert. Zusätzlich wurde die synergistische Aktivierung der Wildtyp/Hybrid Komplexe ausgewertet.

**A** GUS Reporter Assay



**B** Expressionslevel von Hsf Hybriden, Hsfs und endogenen Hsp17-CI

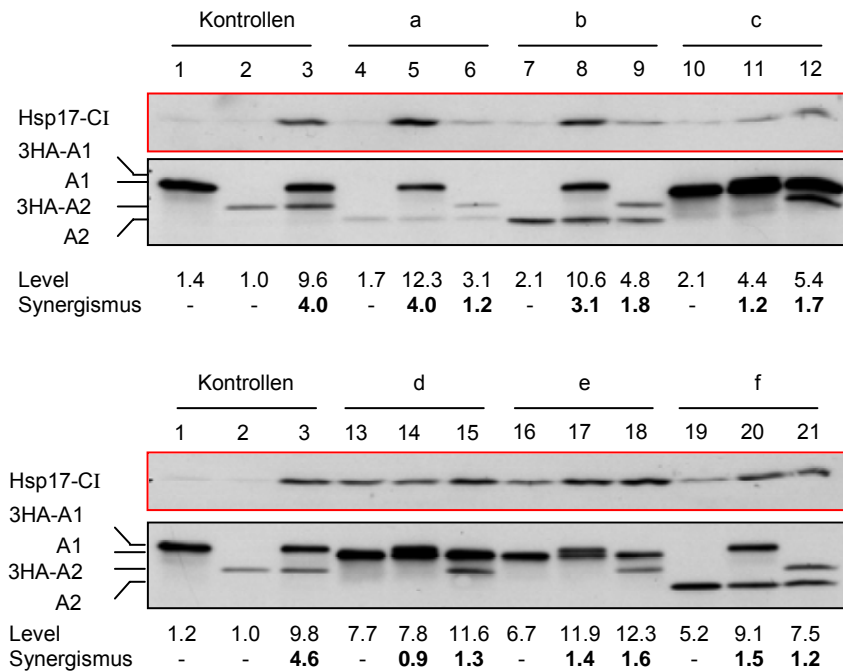


Abbildung 12: Funktionelle Analyse mit HsfA1-A2 Hybriden.

Abbildungstext auf der vorherigen Seite.

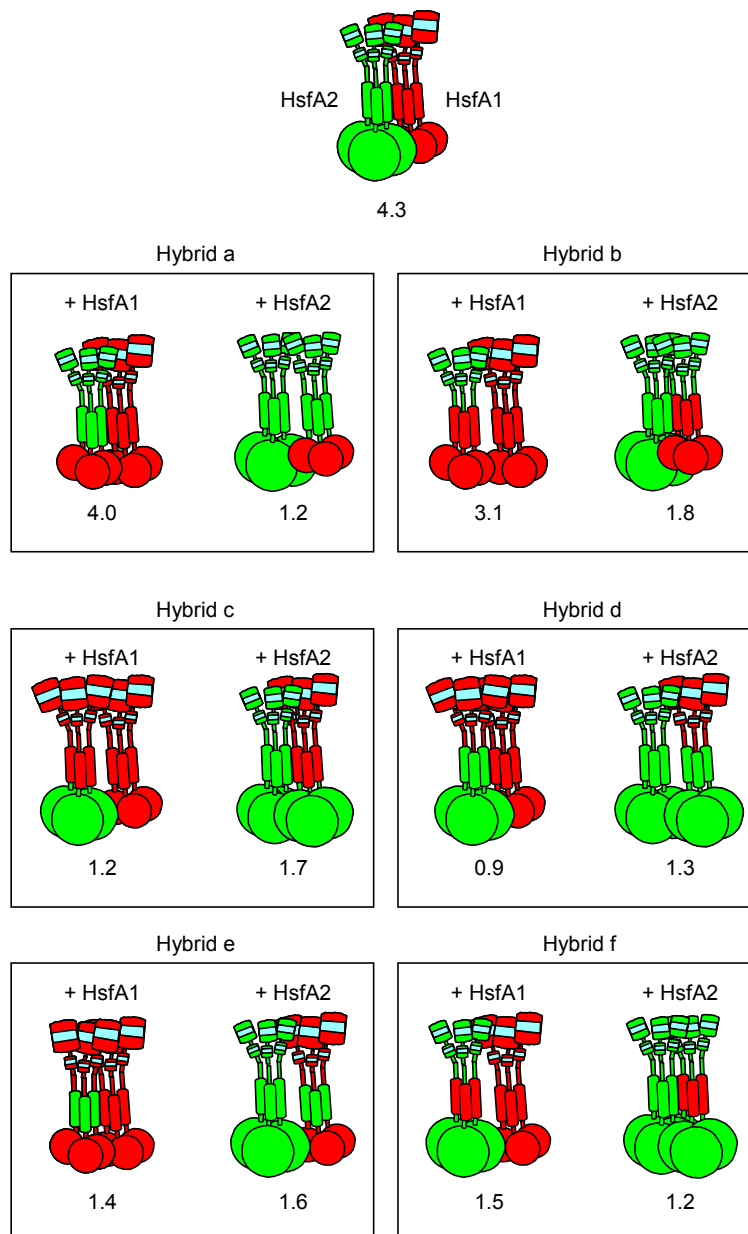


Abbildung 12 (Fortsetzung): **Schematische Darstellung der Ergebnisse.**

Die Konstellationen der Hsf/Hsf-Hybrid Kombination und ihre synergistischen Aktivierung endogener Hsp17-CI werden zur Veranschaulichung der funktionellen Voraussetzungen synergistisch aktiver Komplexe dargestellt. Rot repräsentiert die HsfA1 Anteile, grün die HsfA2 Anteile in den Hsf Hybriden. Der Synergismuswert der Wildtyp HsfA1/HsfA2 Kombination ist der aus zwei Experimenten ermittelte Mittelwert.

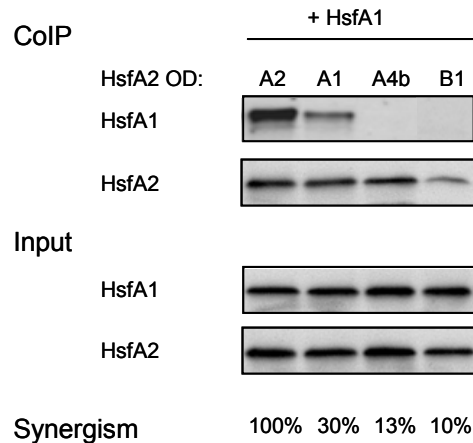


Abbildung 13: **Coimmunpräzipitation mit HsfA2 HR-A/B Austauschmutanten.**

HsfA2 HR-A/B mit korrespondierenden HR-A/B Regionen von HsfA1, HsfA4b und HsfB1 im Vergleich mit der Wildtypkombination zeigen Unterschiede in der Interaktionsaffinität. Synergistische Aktivierung mit HsfA2 HR-A/B Hybriden im Vergleich zur Wildtypkombination.

**Spezifität und bevorzugte Heterooligomerisierung:** Die Untersuchungen mit HsfA2 HR-A/B Hybriden mit HR-A/B Regionen von HsfA1, HsfA4b und HsfB1 im Coimmunpräzipitationsexperiment zeigt erstaunliche Eigenschaften der funktionellen Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 (Abb. 13). Die HsfA2 HR-A/B Hybriden besitzen im Vergleich zu der Wildtyp Kombination eine reduzierte Interaktionsaffinität im Falle von HsfA2 mit HsfA1 HR-A/B und nicht detektierbare Interaktion mit HsfA1, wenn die HR-A/B Region aus HsfA4b oder HsfB1 stammen. In Korrelation mit der reduzierten Interaktionsaffinität sinkt die Fähigkeit zur synergistischen Aktivierung mit HsfA1. Die schwache synergistische Aktivierung mit den HsfA4b und HsfB1 HR-A/B Austauschmutanten deuten möglicherweise auf sekundäre Interaktion, die bereits in Abb. 11A, Nr 6 beobachtet wurde. Mögliche Interaktionen mit Coaktivatorkomplexen, die eine Zusammenführung beider Hsfs ermöglichen sind nicht auszuschließen.

- Die heterologen Oligomerisierungsdomänen und CTADs im HsfA1/HsfA2 Komplex sind essenziell für die Ausprägung einer synergistischen Aktivierung.
- Eine bevorzugte Heterooligomerisierung sorgt für eine effiziente synergistische Aktivierung.

### 3.5 Funktionelle Analyse der HR-A/B Region von HsfA2

Da die Interaktion eine wichtige Voraussetzung für die HsfA1 vermittelte Kernretention und synergistische Aktivierung darstellt, bietet eine Mutationsanalyse der HsfA2 HR-A/B die Möglichkeit, strukturellen Voraussetzungen der HsfA2 HR-A/B Region für die synergistische Aktivierung mit HsfA1 zu untersuchen. Vorherige Ergebnissen mit Volldeletionsmutanten der HR-A/B Regionen belegen die Wichtigkeit der HR-A/B Regionen für die Interaktion (Abb. 11B) sowie die Präferenz heterologer HR-A/B Regionen für die Bildung stabiler HsfA1/HsfA2 Komplexe (Abb. 13). Für die Verifizierung, dass die HR-A/B Region an der synergistische Aktivierung beteiligt ist, wird eine Strategie angewandt, in der interaktionsfähige HsfA2 HR-A/B Mutanten die funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 belegen sollen. Mittels partiellen Deletionen der HR-A/B von HsfA2 sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Können HsfA2 Mutanten mit partiellen HR-A/B oligomerisieren und mit HsfA1 synergistisch aktivieren?
- Lässt sich die strukturelle Eigenschaft der erweiterten L2 Region von Klasse A Hsfs mit der synergistischen Aktivierung in Verbindung bringen?
- Existiert in der Sequenz der L2 Region die strukturellen Informationen für die Interaktion mit HsfA1?

**1) Oligomerisierung von HsfA2:** Zunächst wird bei HsfA2 Mutanten mit partiellen Oligomerisierungsdomänen untersucht, ob HsfA2 mit einer verkürzter HR-A/B Region zur Oligomerisierung in der Lage ist (Abb.14). HsfA2 Wildtyp bildet hexamere Homooligomere, während die Volldeletion der HR-A/B monomere HsfA2 Formen hervorbringt. Die Deletion der HR-A und HR-B Region führt zur eingeschränkten Oligomerisierung der Mutanten. HsfA2 mit deletierter HR-A Region ist auf eine Dimerisierung beschränkt. Bei Deletion der HR-B Region von HsfA2 kann eine Trimerisierung noch erfolgen. Obwohl die HR-B Region zum kleinsten Teil der HR-A/B gehört, ist ihre Funktion für die Bildung stabiler Hexamere essenziell.

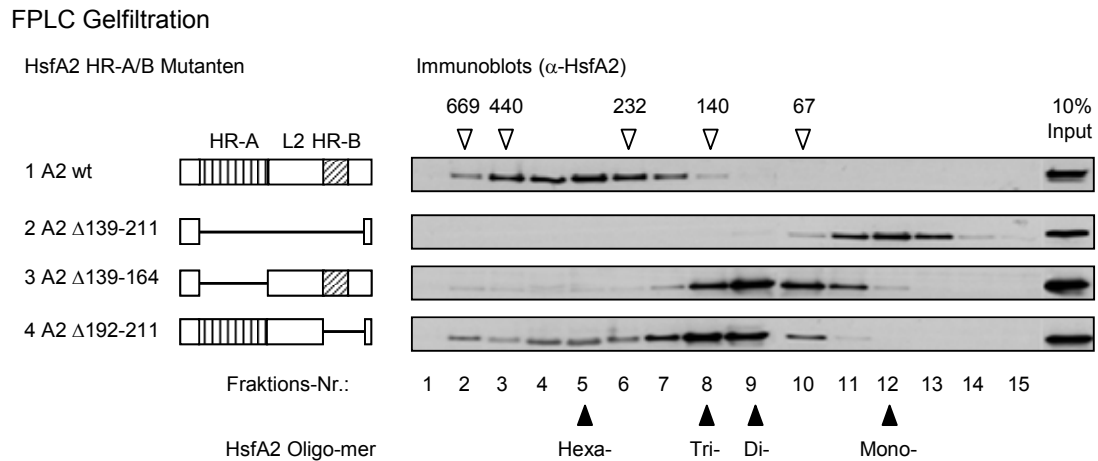


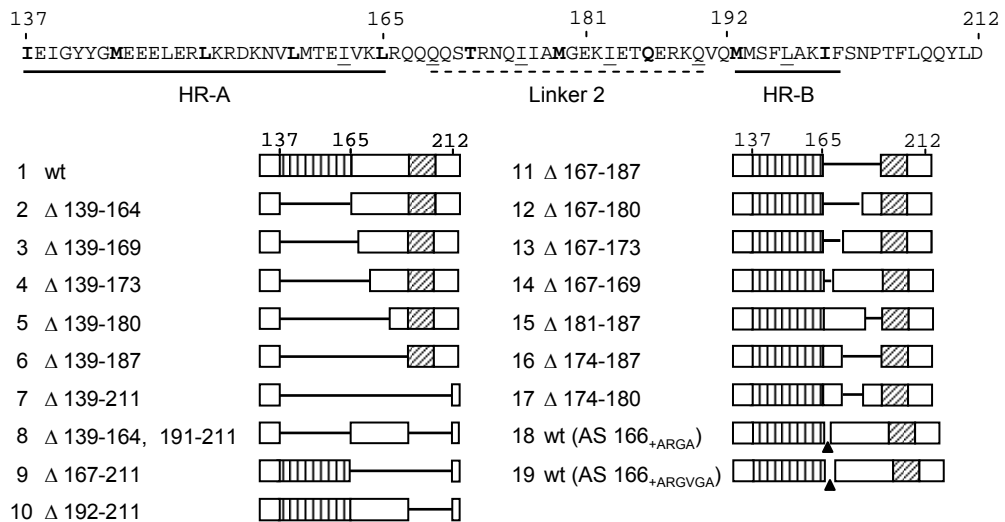
Abbildung 14: **Native Komplexgrößen von HsfA2 und HsfA2 HR-A/B Mutanten.**

Die Blockdiagramme zeigen die HsfA2 HR-A/B und die Deletionsmutationen in Nr. 2-4 an. Die HsfA2  $\Delta$ 139-211 Mutante beschreibt die Volldeletion der HR-A/B Region, während HsfA2  $\Delta$ 139-164 eine HR-A Region Deletionsmutante und HsfA2  $\Delta$ 192-211 eine HR-B Region Deletionsmutante beschreibt. Die Immunoblots zeigt die Detektion von HsfA2 in FPLC Fraktionen nach Gelfiltration von nativen Extrakten aus transformierten Protoplasten. Anhand der offenen Pfeilspitzen über den Immunoblots werden die Position der im Kalibrierungslauf eluierten Eichproteine (Thyroglobulin, 669kDa, Ferritin, 440kDa, Katalase, 232kDa, Aldolase, 140kDa, und BSA, 67kDa) Markiert. Die theoretische Oligomerisierung von HsfA2, Hexamerisierung, Trimerisierung und Dimerisierung sind mit gefüllten Pfeilspitzen angedeutet.

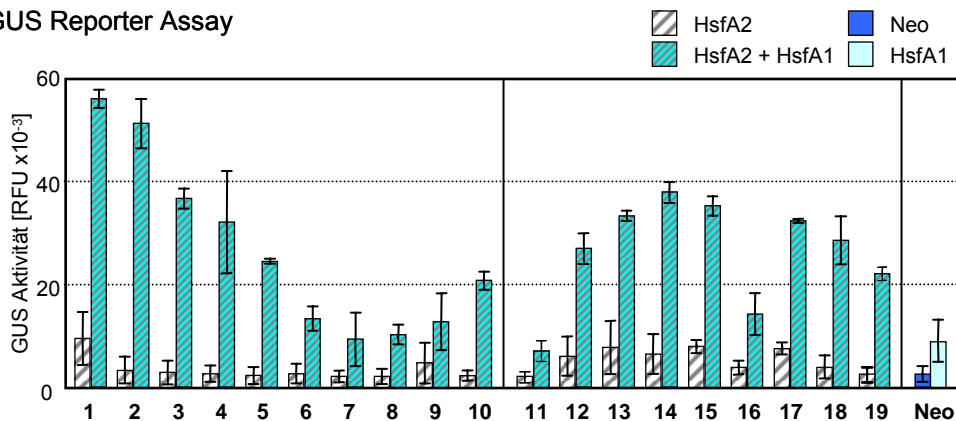
Da die HR-A und HR-B Deletionsformen noch zur Oligomerisierung fähig sind, werden partiell deletierte HsfA2 HR-A/B Deletionsmutanten in der synergistischen Aktivierung mit HsfA1 getestet. Für die funktionelle Analyse der HsfA2 HR-A/B Region wurden Mutanten mit sukzessiven Deletionen der Subregionen (Abb. 15, Nr. 1-17) und Feindeletionen der L2 Region in Heptadschritten (7 Aminosäurereste) (Abb. 15, Nr.: 11-17) konstruiert. Besondere Mutanten, die eine Unterbrechungen der Heptadmusterkontinuität und der putativen Helix-Interaktionsinterfaces durch Heptad-untypische Verkürzung (Deletion von 3 Aminosäurereste) oder eine Verlängerung der L2 Region erzeugen (Insertion von 4 bzw. 6 Aminosäurereste), sollen die Funktionalität der C-terminalen L2 und HR-B Region für die synergistische Aktivierung testen (Abb. 15, Nr.: 18-19).



**A** HsfA2 HR-A/B Mutanten



**B** GUS Reporter Assay



Endogener Hsp17-CI und Hsf Expressionslevel

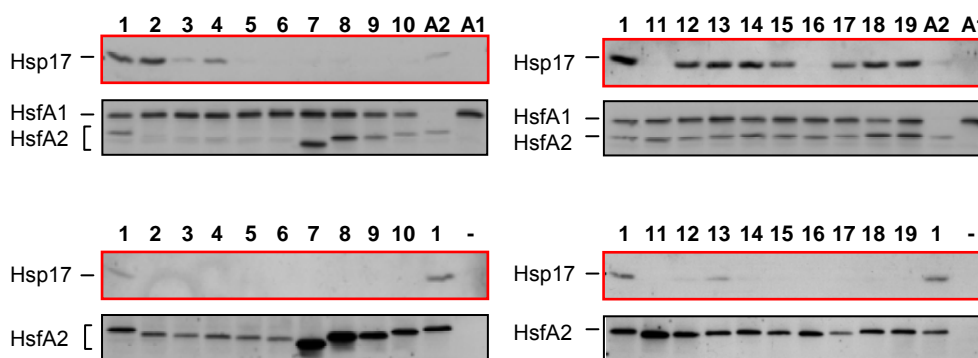


Abbildung 15: Mutationsanalyse der HsfA2 HR-A/B Region

A. Die Sequenz und Struktur der Oligomerisierungsdomäne von HsfA2 und der HR-A/B Deletions- und Insertionskonstrukte mit Angabe der deletierten Aminosäurereste und Insertionen ab AS 166 (Konstrukt Nr. 18, 19) sind dargestellt. B. Die Funktionalität der HsfA2 HR-A/B Mutanten werden im GUS Reporter Assay und Analyse der Expressionslevel von endogenen Hsp17-CI Genen getestet.

**2) Synergistische Aktivierung mit partieller HR-A/B:** Jede Art von Deletion in der OD führt zur Reduzierung der Eigenaktivität und verdeutlicht die Wichtigkeit der Integrität für die Funktion des Hsfs. Unabhängig davon sind HsfA2 HR-A/B Mutanten mit HsfA1 zur synergistischen Aktivierung fähig, dies ist aber von der restlichen HR-A/B Struktur der jeweiligen Mutante abhängig. So ist die Mutante deletierter HR-A Region (Nr 2) mit HsfA1 zur synergistische Aktivierung fähig und induziert eine Aktivität, die mit dem Niveau der Wildtypkombination vergleichbar ist. Dagegen sind Mutanten mit weiterer Deletionen der L2 und HR-B Regionen in der synergistischen Aktivierung inhibiert (Nr. 3-7). Durch die schrittweise Deletion der L2 Region wird verdeutlicht, dass über die Länge der Coiled-Coil Region L2 und HR-B die Interaktionsaffinität aufgebaut wird, da die synergistische Aktivierung der Deletionsmutanten ebenfalls schrittweise zurückgeht (Nr. 3-6).

**3) Funktionalität der L2 HR-B Regionen:** Offenbar besitzen weder einzelne Regionen (HR-A, L2) noch Kombinationen von Regionen (HR-A und L2, HR-A und HR-B) eine vergleichbare Funktionalität wie die L2 und HR-B Regionen (Nr. 2) (Nr. 8-11). Daher sind die C-terminale L2 HR-B Regionen von HsfA2 tatsächlich essenziell für die synergistische Aktivierung mit HsfA1. Untersuchungen mit L2 Mutanten zur Analyse der Funktionalität und Spezifität des Klasse A Hsfs Identifikationsmerkmals zeigen, dass mindestens ein C-terminales Heptad im L2 (ab AS 181) für eine synergistische Aktivierung mit HsfA1 benötigt wird (Nr. 12), wenn HR-A vorhanden ist. Dagegen ist das N-terminale Heptad im L2 für die synergistische Aktivierung unzureichend, da es vorwiegend aus Glutaminsäureketten besteht und daher kein Heptad Repeat darstellt (Nr. 16). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl HsfA2 mit Deletion des mittleren als auch des C-terminalen Heptads noch zur synergistische Aktivierung mit HsfA1 fähig sind, sind die strukturellen Informationen, die für eine spezifische Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 benötigt werden, wahrscheinlich in der erweiterten Region aus L2 und HR-B enthalten.

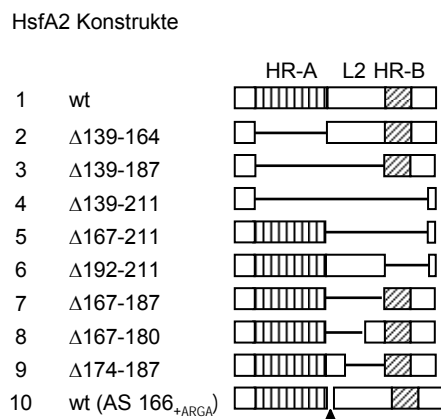
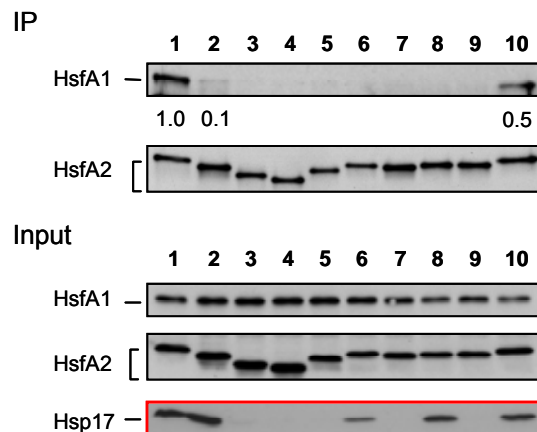
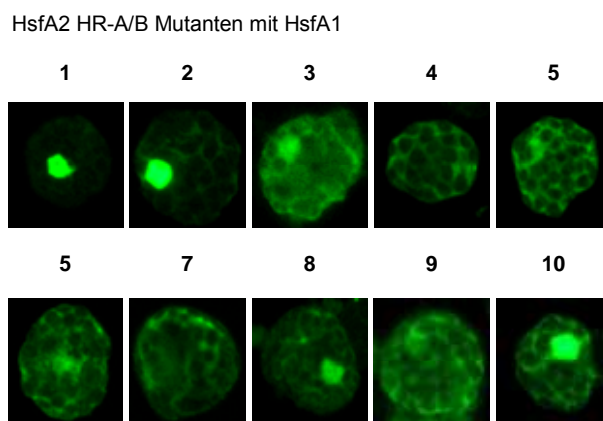
**A** HsfA2 HR-A/B MutantenCoimmunpräzipitation ( $\alpha$ -HsfA2)**B** Immunfluoreszenz ( $\alpha$ -HsfA2)

Abbildung 16: **Die Hsf-Hsf Interaktion ist abhängig von der Integrität der Oligomerisierungsdomäne.**

A. Die Blockdiagramme zeigen die HsfA2 HR-A/B Mutanten, die in Coimmunpräzipitationsanalysen mit HsfA1 untersucht werden. Die Expressionslevel der HsfA2 Mutanten sind im Gegensatz zu Abb. 15 angeglichen, um optimale Bedingungen der Komplexbildung zu erlangen. Eine stabile Interaktion zwischen HsfA2 und HsfA1 benötigt die komplette HR-A/B Region von HsfA2. Transiente Interaktion von HsfA2 HR-A/B Mutanten über den C-terminalen Teil der HsfA2 HR-A/B Region reichen für die synergistische Aktivierung aus (Nr. 6, Nr. 8), während die höher affinen Interaktion der kompletten HR-A/B Region zu höheren synergistischen Aktivierung beiträgt. B. Untersuchungen der Funktionalität von HsfA2 HR-A/B Mutanten korrelieren mit den Aktivitätsdaten in Abb. 15. Die ausgewählte Zellen zeigen die repräsentative intrazelluläre Lokalisation der HsfA2 HR-A/B Mutanten, die zusammen mit HsfA1 coexprimiert wurden.

**4) Integrität der HR-A/B und Stabilität der Interaktion:** Um die spezifische Interaktion zwischen dem C-terminalen Teil der OD von HsfA2 (L2 und HR-B Region) und HsfA1 zu überprüfen, wird ein Teil der HsfA2 HR-A/B Mutanten in Co-Immunpräzipitationsanalysen untersucht und ihre Befähigung zur HsfA1 vermittelten Kernretentionsanalyse getestet (Abb. 16). Die HsfA2 Mutante mit deletierter HR-A Region zeigt eine stark reduzierte Interaktion mit HsfA1 (10%) im Vergleich zur Wildtypkombination (Nr. 2). Offenbar wird für die Bildung stabiler HsfA1/HsfA2 Komplexe eine vollständige HR-A/B benötigt. Weitergehende Deletionen, die sich über L2 und/oder HR-B erstrecken, verhindern die Komplexbildung mit HsfA1 (Nr. 3-9), jedoch sind partiell deletierte Mutanten mit L2 oder C-terminalen Heptad der L2 zur synergistischen Aktivierung mit HsfA1 fähig (Nr. 6, 8). Die L2 Insertionsmutante zeigt sowohl eine reduzierte Interaktionsfähigkeit mit HsfA1 (50%) als auch eine schwächere synergistische Aktivität (Abb. 19, Nr. 10).

Obwohl die Spezifität-bestimmenden Strukturen nicht durch die Mutationsanalyse identifiziert werden können, bestätigt die Serie der HsfA2 L2 Deletions- und Insertionsmutanten, dass die Funktionalität der L2 Region für die synergistische Aktivierung mit HsfA1 essenziell ist. Frühere Ergebnisse über die Charakterisierung der HsfA2 L2 Region mit L2 Austauschmutanten, deren L2 Regionen von Arabidopsis Klasse A Hsfs stammen, zeigten bereits, dass ein gleichwertiges Heptad Repeatmuster als L2 Region für die funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 ausreicht (Chan, Diplomarbeit 2002). Insbesondere für die hohe Flexibilität der HR-A und HR-B Regionen und der hohen Affinität der Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 ist vermutlich die L2 Region verantwortlich. Die Notwendigkeit der Integrität der HsfA2 HR-A/B Region für eine stabile Interaktion wird an der Interaktionsfähigkeit der HsfA2 HR-A/B Mutanten deutlich. Für die Interaktion sind L2 und HR-B Region, die in Konstrukt 2 und 10 vorhanden sind, obligatorisch, wenn auch eine Korrelation zwischen Interaktionsaffinität und Aktivität zunächst nicht ersichtlich ist. Möglicherweise ist eine transiente Interaktion oder eine sekundäre Interaktion über Coaktivatoren ausreichend für eine sichtbare synergistische Aktivierung. Denkbar ist jedoch, dass in der natürlichen Situation eine stabile Interaktion für

die synergistische Aktivierung in wiederholten Zyklen von Hitzestress und Erholungsphase wichtig sein könnte. Dass die Fähigkeit zu transienten Interaktion zur synergistischen Aktivierung ausreichen, zeigen die Ergebnisse im Test der HsfA1 vermittelte Kernretention von den HsfA2 HR-A/B Mutanten, die mit der synergistischen Aktivierung der HsfA2 HR-A/B Mutanten korrelieren. Selbst bei reduzierter Stabilität findet die synergistische Aktivierung und HsfA1 vermittelte Kernlokalisation mit der HR-A Deletionsmutante statt und unterstreicht die Effizienz heterooligomerer Hsf Komplexe in der transkriptionellen Aktivierung.

### **3.6 DNA Bindungseigenschaften**

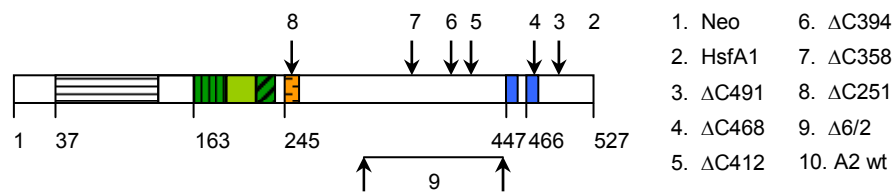
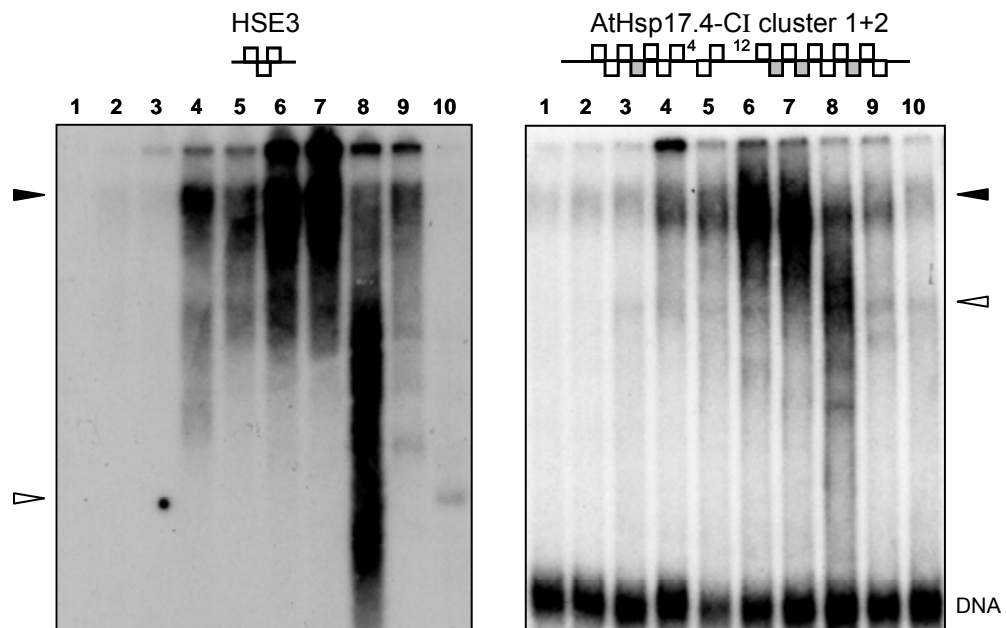
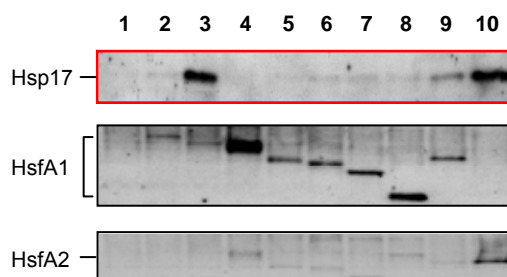
Die synergistische Aktivierung durch die funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 benötigt die Bildung von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen, die veränderte DNA Bindungseigenschaften besitzen können. Anhand der DNA Bindungseigenschaften lassen sich Rückschlüsse auf qualitative Änderungen in heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen ziehen, die für das Verständnis der synergistischen Aktivierung wichtig sein können. Zur Verifizierungen von spezifischen Effekten wird die Deletionsform HsfA1 $\Delta$ C394 mit HsfA2 coexprimiert (Abb. 17).

**1) Intermediäre DNA bindende Komplexe:** In der Wildtyp Kombination zeigt HsfA2 eine definierte Bande eines stabilen DNA-Protein (DNP) Komplexes, während HsfA1 angesichts zweier lang gezogenen DNP Banden ein dynamisches DNA Bindungsverhalten besitzt. Die Coexpression beider Hsfs induziert die Bildung zusätzlicher intermediärer DNP Banden und eine gleichzeitige Abschwächung der HsfA1 und HsfA2 spezifischen DNP Banden. Die Abschwächung des langsamer laufenden, oberen HsfA1 DNP könnte eine Form von HsfA1 darstellen, die mit regulatorischen Proteinen assoziiert ist. Die C-terminale Deletionsform HsfA1 $\Delta$ C394 zeigt eine stark erhöhte DNA Bindungsaffinität im Vergleich zu HsfA1. Hier verschieben sich die relativen Positionen der intermediären Banden. Möglicherweise korrespondieren die intermediären Banden mit heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen.



**2) Regulierte Aktivität und DNA Bindung von HsfA1:** Um die erhöhte DNA Bindungsaffinität von HsfA1 $\Delta$ C394 zu untersuchen, wird HsfA1 $\Delta$ C394 mit einer Serie von C-terminalen HsfA1 Deletionsmutanten hinsichtlich der DNA Bindungsaffinität und Aktivierung endogener Hsp17-CI Expression verglichen (Abb. 18). Eine signifikant erhöhte DNA Bindungsaffinität besitzen Konstrukte mit deletierten AHA Motiven (Nr. 5-8), die nicht durch die Stabilisierung des Expressionslevel hervorgerufen werden aber inaktiv sind. In der Region zwischen NLS und Aktivatormotiven existiert in humanem Hsf1 eine regulatorische Region, die auch mit der Regulation der DNA Bindungsaffinität in Zusammenhang steht (Zuo et al., 1993). Die Mutante mit Deletion der korrespondierenden Region in HsfA1 (Nr. 9) besitzt eine moderat erhöhte DNA Bindungsaffinität, die nicht mit der stark erhöhten DNA Bindungsaffinität der Deletionsmutanten (Nr. 5-8) vergleichbar ist. Auch die DNA Bindungsassays mit dem Hsp17.4-CI Promoterfragment als Sonde zeigen ein ähnliches Verhalten der Deletionsmutanten. Da beim EMSA mit dem Hsp17.4-CI Promoterfragment, das eine höhere Anzahl von Bindungsstellen im Gegensatz zu HSE3 enthält, keine erhöhte Bindungsaffinität von HsfA1 Wildtyp und Mutanten beobachtet wird, ist die gesteigerte DNA Bindungsaffinität der HsfA1 Deletionsmutanten nicht auf eine kooperative Bindung zurückzuführen. Unter den HsfA1 Deletionsmutanten befindet sich eine de-regulierte HsfA1 Mutante, die keine erhöhte DNA Bindungsaffinität besitzt. Im Vergleich mit HsfA1 Wildtyp und einer weiteren de-regulierten HsfA1 Mutante aus Abb. 12 (Hybrid e) induzieren alle drei HsfA1 Formen mit HsfA2 einen vergleichbaren Gesamtlevel von Hsp17-CI (Abb. 19).

**3) Dominant negative Wirkung von HsfA1 $\Delta$ C394:** Das DNA Bindungsverhalten der coexprimierten Hsfs zeigt sowohl eine gesteigerte Bindungsaffinität als auch Veränderungen der DNP Zusammensetzung. Anhand der DNA Bindungsstudien kann die dominant negative Wirkung von HsfA1 $\Delta$ C394 auf eine erhöhte DNA Bindungsaffinität zurückgeführt werden. Die mittels HsfA1 $\Delta$ C394 reprimierte endogene Hitzestressantwort in Tabakprotoplasten könnte auf eine Verdrängung von endogenen Hsfs durch HsfA1 $\Delta$ C394 beruhen, die durch die hohe DNA Bindungsaffinität von HsfA1 $\Delta$ C394 ausgelöst wird (Abb. 19).

**A** HsfA1 C-terminale Deletionsmutanten**B** Electrophoretic Mobility Shift Assay**C** Hsf und Hsp17-CI ExpressionslevelAbbildung 18: **DNA Bindung und Aktivität von HsfA1 C-terminalen Deletionsmutanten.**

A. Am Blockdiagramm von HsfA1 sind die letzten Aminosäurerestpositionen der C-terminalen HsfA1 Deletionsmutanten (Nr. 1-8) und die interne Deletion in der Mutante HsfA1Δ6/2 (Nr. 9) markiert. B. In EMSAs unter Verwendung der HSE3 und PCR generierten Sonde wird der spezifische Effekt von C-terminal deletierten HsfA1 Konstrukte der gesteigerten DNA Bindungsaffinität verifiziert. Die schwarze Pfeilspitze markiert die Position von HsfA1 Wildtyp DNP, die offene Pfeilspitze zeigt die Position des HsfA2 DNP. C. Durch Immunoblotting wurden die Expressionslevel der Hsf Konstrukte und endogener Hsp17-CI analysiert.



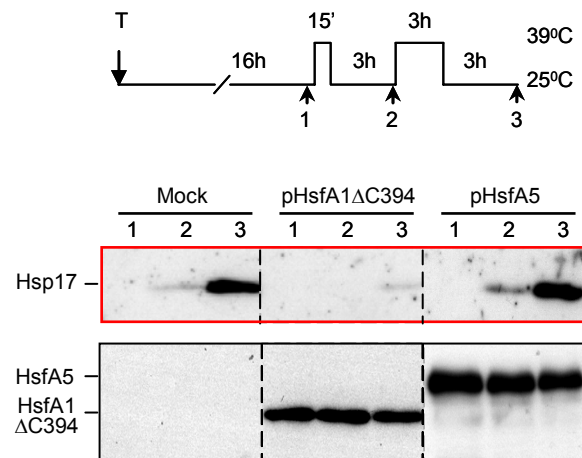
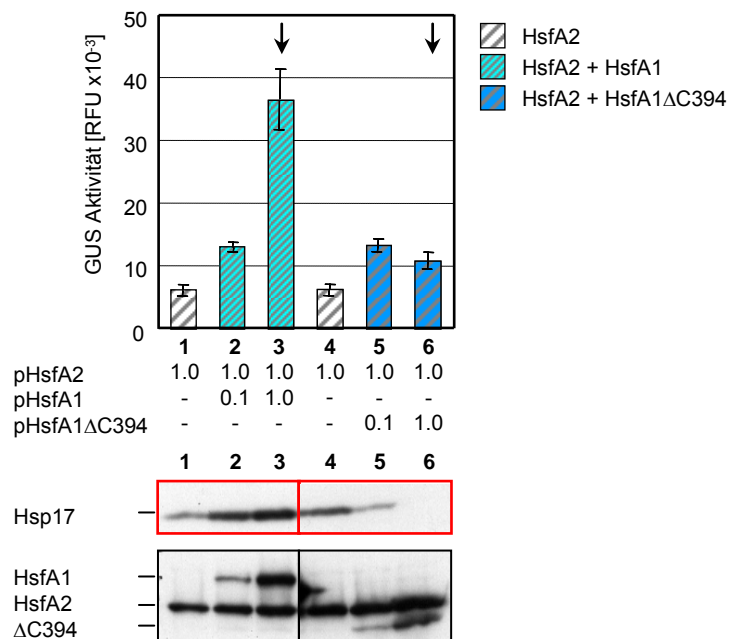
**A Hitzestress Regime****B Gus Reporter Assay**

Abb. 19: **Dominant negativer Effekt von HsfA1ΔC394**

A. Der Dominant negative Effekt von HsfA1ΔC394 wirkt auf die endogene Hitzestressantwort in Tabakprotoplasten. Dagegen reprimiert HsfA5, der spezifische Repressor von HsfA4b, die hitzestressinduzierte Hsp17-CI Expression nicht. Das Hitzestressregime zeigt die Zeitpunkte der geernteten Proben (1, 2, 3). Die Expressionslevel von endogenen Hsp17-CI Genen und Hsfs wurde durch Immunoblotting analysiert (aus Baniwal et al., 2007, modifiziert). B. HsfA1ΔC394 reprimiert die Aktivität von HsfA2 im GUS Reporter Assay und in der Induktion endogener Hsp17-CI Expression.

Weiterhin korreliert die erhöhte DNA Bindungsaffinität von HsfA1 $\Delta$ C394 ebenfalls mit der erhöhte Kernlokalisierung (Scharf et al., 1998b, Abb. 2), so dass die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2 möglicherweise mit der erhöhten DNA Bindungsfähigkeit heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe zurückzuführen ist.

**4) Synergistische Aktivierung mit de-regulierten HsfA1 Formen:** Da auch deregulierten HsfA1 Formen durch die Coexpression mit HsfA2 synergistisch aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass die synergistische Aktivierung unter anderem eine Deregulation von HsfA1 beinhaltet. Dieser Punkt wird in der Diskussion näher erläutert. Da die elektrophoretische Methode Proteinkomplexe sowohl nach größenabhängigen als auch nach ladungsabhängige Kriterien trennt und somit keine präzise Auswertung von Komplexgrößen erlaubt, müssen chromatographische Methoden zur Bestimmung der Komplexgrößen herangezogen werden.

Synergistische Aktivierung de-regulierter HsfA1 Mutanten

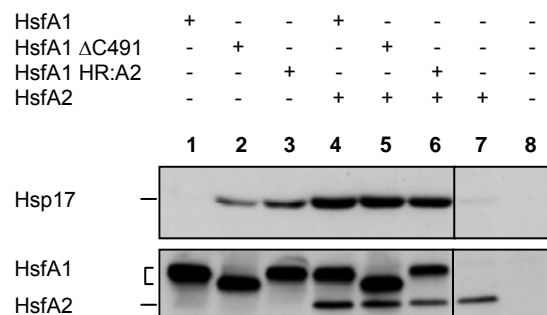


Abbildung 20: **Synergistischen Aktivierung mit HsfA1 Wildtyp und de-regulierten Formen**

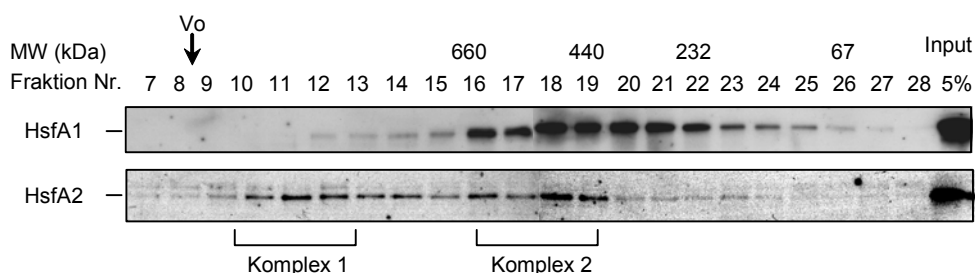
Um die Funktionalität de-regulierter HsfA1 Formen in der synergistischen Aktivierung zu testen, wurden die de-regulierten HsfA1 Mutanten mit HsfA2 coexprimiert. Zu den de-regulierten HsfA1 Mutanten zählen die C-terminale Deletionsmutante HsfA1 $\Delta$ C491 und der Hybrid HsfA1 HR:A2, der die ausgetauschte HR-A/B Region von HsfA2 enthält. (Hybrid e aus Abb. 12). Beide Mutanten zeigen in Coexpression mit HsfA2 eine synergistische Aktivierung endogener Hsp17-CI Gene, die einen vergleichbaren Level erreicht wie die Wildtyp Kombination.

### 3.7 Heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe

Um Veränderung der Komplexzusammensetzung durch die funktionelle Interaktion zu überprüfen, ist es hilfreich, Größenunterschiede zwischen homo- und heterooligomeren Komplexen zu identifizieren (Abb. 21). Beide Hsfs alleine unterscheiden sich wenig in den Größen der nativen Komplexe. HsfA2 bildet interessanterweise hochmolekulare Komplexe, während die Hauptfraktion von HsfA1 zwischen hexameren und trimeren Größenordnungen liegt. Dagegen besitzt HsfA2 keine Komplexe im trimeren Größenbereich. Die Coexpression beider Hsfs führt zur Verschiebung der Hsf spezifischen Fraktionen und zur Bildung von intermediären Komplexen. Besonders die HsfA2 spezifischen Komplexe verschieben sich zu „niedermolekularen“ Positionen und co-fractionieren mit HsfA1, wobei beide Hsfs stabilisiert werden. Insbesondere Komplex 2 reichert sich in Anwesenheit von HsfA1 an.

#### Gelfiltration

##### A. Einzeltransformationenen



##### B. Cotransformation

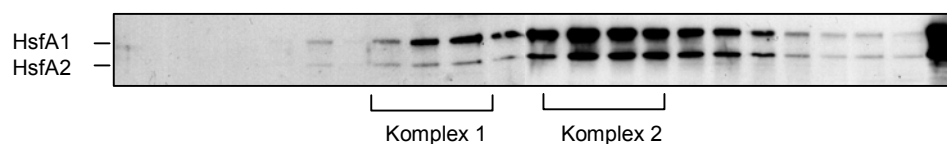


Abbildung 21: **Native Komplexe von HsfA1 und HsfA2 besitzen eine veränderte Zusammensetzung als heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe.**

Die hohe Trennschärfe der HPLC gesteuerten Gelfiltrationschromatographie ermöglicht es, die minimalen Unterschiede zwischen homooligomeren und heterooligomeren Komplexen zu identifizieren, da beide Hsfs A1 und A2 hochmolekulare Komplexe im Bereich von Hexameren bilden. Immunoblotanalysen zeigen die Größenverteilung der nativen Komplexe von HsfA1 und HsfA2 und in der Cotransformation. Insbesondere HsfA2 bildet zwei charakteristische, hochmolekulare Komplexe, die in Anwesenheit von HsfA1 ihre Größen verändern. Die Klammern zeigen die zwei Hauptfraktionen der HsfA2 spezifischen Komplexen alleine und in Anwesenheit von HsfA1.

### 3.8 Kooperativität der C-terminalen Aktivator motive

Die durch Coexpression von HsfA1 und HsfA2 induzierten Veränderungen von DNA-bindenden Komplexen und Komplexzusammensetzungen sind klare Indizien, dass heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexen eine veränderte Qualität im Vergleich zu homooligomeren Hsf Komplexen aufweisen. Trotz der Ähnlichkeit der AHA Motive von HsfA1 und HsfA2 belegen die vorliegenden Ergebnisse qualitative Unterschiede zwischen den CTAD von HsfA1 und HsfA2, die im heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplex ihre synergistische Wirkung entfalten (Abb. 11A, Abb. 13). Um die Kooperation der AHA Motive von HsfA1 und HsfA2 bzw. die Funktion der einzelnen AHA Motive zu untersuchen, werden die AHA Mutanten mit dem Wildtyp Hsf Partner coexprimiert und miteinander verglichen (Abb. 22).

**Individualität der AHA Motive:** Die inaktiven AHA Mutanten zeigen bei der Coexpression mit dem Wildtyp- Partner Hsf eine synergistische Aktivierung, die im Vergleich zur Wildtypkombination niedriger ausfällt. Die aus den drei restlichen funktionellen AHA Motiven resultierende Aktivität reflektieren indirekt die Qualität des mutierten AHA Motivs. Aufgrund der unterschiedlichen Abstufungen der synergistischen Aktivierung ist es naheliegend, dass jedes einzelne AHA Motiv individuell zur synergistische Aktivierung beiträgt.

**Graduierung:** Die Mutation des AHA1 Motivs von HsfA1 und HsfA2 hat im Gegensatz zur Mutation der AHA2 Motive einen geringeren inhibierenden Effekt auf synergistische Aktivierung. Obwohl die Mutation der AHA1 Motive sich auf die Hsfs destabilisierend (HsfA1) und stabilisierend (HsfA2) auswirkt, hat dies keine Auswirkung auf die synergistische Aktivierung. Die AHA2 Mutanten unterscheiden sich zwischen HsfA1 und HsfA2, wobei die Mutation des AHA2 Motivs von HsfA1 den stärksten inhibierenden Effekt auf die synergistische Aktivierung zeigt. Die unterschiedliche Funktionalität der AHA Motive könnte die Kooperation beider CTADs im heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe erklären, die für eine höhere Affinität in der Interaktion mit Coaktivator komplexen sorgt. In Verbindung mit *in-vitro* Pulldown Analysen, in denen die Interaktion mit Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie getestet wurden, konnte die unterschiedliche Qualität von AHA Motive von HsfA1 und HsfA2 belegt werden (Abb. 23, Abb. 24).

**A** AHA Mutanten

Code	HsfA1		HsfA2	
	AHA1 aa 449-457	AHA2 aa 468-476	AHA1 aa 294-301	AHA2 aa 335-342
wt	DDIWQSGLL	PFWEKFLQ	DDIWEELL	PEWGEEELQ
1m	...A...AA	.....	...A....	.....
2m	.....	.AA..AA.	.....	..E...A.
A	...A...AA	.AA..AA.	...A....	..E...A.

**B** Endogener Hsp17-CI

pHsfA1	wt	wt	wt	wt	wt	-	wt	1m	2m	A
pHsfA2	-	wt	1m	2m	A	wt	wt	wt	wt	wt
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Hsp17										
Level:	0.4	11.8	5.9	2.8	0.5	1.0	10.8	7.1	1.0	0.4
Synergismus:	-	<b>8.4</b>	<b>7.4</b>	<b>3.5</b>	<b>0.6</b>	-	<b>7.7</b>	<b>5.1</b>	<b>0.7</b>	<b>0.3</b>

pHsfA1	wt	1m	2m	A	-	-	-	-	-
pHsfA2	-	-	-	-	wt	1m	2m	A	-
	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
Hsp17									

## Hsf Expressionslevel

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
HsfA1										
HsfA2										
	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	
HsfA1										
HsfA2										

**Abbildung 22: Funktionelle Analyse der AHA Motive**

A. Sequenzen der AHA Motive in Wildtyp und Mutanten Hsfs mit Hervorhebung der Alaninsubstitutionsmutationen funktionell wichtiger Tryptophan und Leucin AS (Döring et al., 2000). Mutante A mit Mutation beider AHA Motive wurde bereits in Experimenten der Abb. 10-11 verwendet. B. Kombinationen aus Wildtyp und AHA Mutante zeigen die qualitativen Unterschiede einzelner AHA Motive, die erst im Komplex anhand der Gesamtaktivität sichtbar werden. Die synergistische Aktivität der Wildtyp/AHA Mutanten Kombinationen in der Induktion endogener Hsp17-CI Gene wurde quantifiziert. Der Expressionslevel von Wildtyp und Mutanten Hsfs zeigen die Beeinflussung der Stabilität durch die Mutationen der AHA Motive.

**A** GST-Hsf CTD (AHA Mutanten)

Kontrollen		HsfA1		HsfA2	
		AHA1	AHA2	AHA1	AHA2
1	GST	5	DIDWQSGLL DPFWEKFLQ	4	DIDWEELL PEWGEELQ
2	GST-GAL4AD	6	...A.....	12	...A..... 1m
3	GST-VP16	7	...A...AA	13	...E...A... 2m
4	GST-HsfA2 CTD	8	.....	14	...A... A
		9	.....	15	Δ 289-324
		10	...A.....	16	Δ 289-324 ..E...A..
		11	...A...AA ..AA..AA. A	17	..... ΔC323
				18	...A... ΔC323

**B** Pull Down

3HA-markierte Untereinheiten von Coaktivator-komplexen

- a, TAF130 (TFIID)  
b, ADA3 (SAGA)  
c, SNF2 (SWI/SNF)

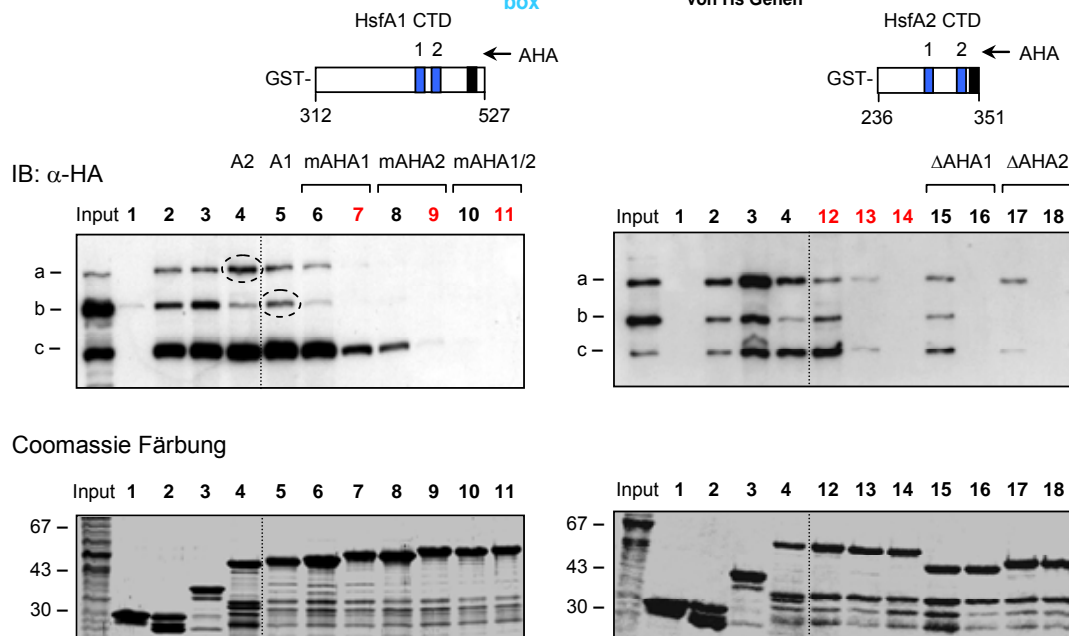
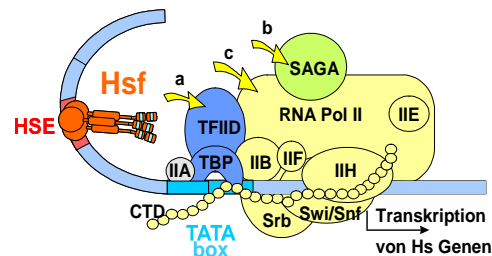


Abbildung 23: **Differenzielle Interaktion C-terminaler Aktivatormotive mit Coaktivator-Komplexen aus Hefe (Abbildung aus Döring, Dissertation 2002, modifiziert).**

A. Die Kontrollkonstrukte (Nr. 1-4), HsfA1 CTD Konstrukte (Nr. 5-11) und HsfA2 CTD Konstrukte (Nr. 4, 12-18) mit graduellen Mutationen der AHA Motive sind aufgelistet. Die Konstrukte 15-18 enthalten zusätzlich noch Deletion der AHA Motive. Rot markierte Konstrukte wurden als Vollängenkonstrukte in Abb. 22 getestet. B. *In-vitro* Pull Down Assays mit GST-Hsf CTD und nativen Coaktivator-komplexen zeigen qualitative Unterschiede der AHA Motive in der Interaktion mit Coaktivator-komplexen und korrelieren mit den Beobachtungen in Abb. 22. Bereits die CTADs von HsfA1 und HsfA2 zeigen Unterschiede in der Interaktionsaffinität mit Coaktivator-komplexen: HsfA1 zeigt erhöhte Affinität mit dem SAGA Komplex, während HsfA2 stärker mit dem TFIID Komplex interagiert (eingekreiste Banden).

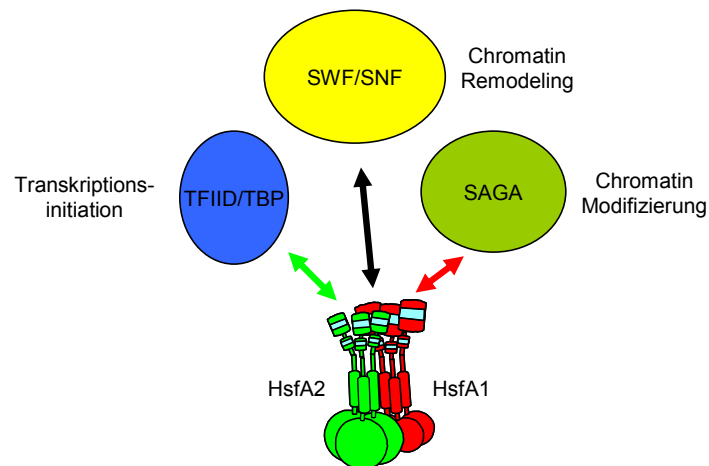


Abbildung 24: **Unterschiedliche Affinität der C-terminalen Aktivator-motive von HsfA1 und HsfA2 für Coaktivator-komplexe TFIID, SAGA und SWF/SNF könnten eine konzertierte Rekrutierung begünstigen.**

Die unterschiedliche Interaktionsaffinität von HsfA1 und HsfA2 für Coaktivator-komplexe wird anhand der entsprechend gefärbten Doppelpfeile verdeutlicht. Beide CTADs besitzen eine gleichwertige Interaktionsaffinität für SWF/SNF Komplexe. Aufgrund der qualitativen Unterschiede der AHA Motive führt die funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 zur Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexen, die über eine kooperative Aktivierung der kombinierten AHA Motive möglicherweise für eine konzertierte Rekrutierung von Coaktivator-komplexen und synergistische Aktivierung sorgen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Spezifität und Funktionalität

Die Multiplizität der Hsf Familie in Pflanzen stellt eine bemerkenswerte Komplexität der Stressregulation dar, die für sessile Organismen wie Pflanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit lebensnotwendig ist, um mit vielfältigen Stresssituationen fertig zu werden. Klasse A Hsfs repräsentieren die größte Subgruppe innerhalb der Pflanzen-Hsf Familie (Nover et al., 2001, Baniwal et al., 2004). Die besonderen Merkmale der Klasse A Hsfs sind eine erweiterte Linker 2 Region und eine Vielzahl von Hsf-Hsf Interaktionen, die den Großteil des Hsf-Hsf Interaktionsnetzwerkes ausmachen (Scharf et al., 1998b, Dissertation Port, 2004). Im Gegensatz zu Arabidopsis ist das Genom von Tomate noch nicht vollständig sequenziert. Bisher konnten fünf cDNA Klone von Hsf codierenden Genen aus Tomate isoliert werden, die für die Untersuchungen der spezifischen Hsf-Hsf Interaktion verwendet wurden. Eine phylogenetische Analyse der fünf Tomaten Klasse A Hsfs A1, A2, A3, A4b, A5 ergab die spezifische Gruppierung von HsfA1/HsfA2 und HsfA4b/HsfA5 (Abb. 7), die sich auch experimentell als spezifisch interagierende Hsf Paare erwiesen.

Zur Bestimmung der spezifischen Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2 wurden als Testsysteme GUS Reporterassays, die Interaktion in Co-Immunpräzipitationsanalyse und die Hsf-Hsf Interaktions-vermittelte Kernretention von GFP-HsfA2 verwendet (Abb. 7, Abb. 8). Interessanterweise wurden für HsfA1 und HsfA2 durchweg eine hohen synergistischen Aktivierung, spezifische Interaktion und effiziente Kernretention ermittelt, die die hohe Spezifität der funktionelle Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 belegen. Auch für HsfA4b und HsfA5 konnte eine hohe Spezifität nachgewiesen werden (Dissertation Baniwal 2007). Die spezifische Wechselwirkung zwischen zwei Hsfs korreliert bei beiden Beispielen mit dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad.



#### 4.1.1 Spezifität der HsfA1 HsfA2 Interaktion in *Arabidopsis*

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei der Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 um eine generelle spezifische Hsf-Hsf Interaktion in Pflanzen handelt, wurden Coexpressionsuntersuchungen mit *Arabidopsis* Hsfs der HsfA1 Gruppe (A1a, A1b, A1d, A1e) und HsfA2 im Rahmen einer vergleichenden Analyse zwischen Tomaten HsfA2 und *Arabidopsis* HsfA2 durchgeführt (Bärenz, Diplomarbeit, 2006). Tatsächlich wurde auch hier die Spezifität zwischen AtHsfA1a und AtHsfA2 über die synergistische Aktivierung in GUS Reporter Assays und spezifische Interaktion in Pulldown-Assays bestätigt. Im Unterschied zur funktionellen Interaktion zwischen Tomaten HsfA1 und HsfA2, in der die HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2 bei der synergistischen Aktivierung eine Rolle spielt, zeigt AtHsfA2 trotz der konstitutiven Kernlokalisation eine synergistische Aktivierung mit AtHsfA1a und belegt damit die Allgemeingültigkeit synergistisch aktivierender HsfA1/HsfA2 heterooligomere in Pflanzen. Interessanterweise induzierte die Coexpression von AtHsfA1a und HsfA2 eine synergistische Aktivierung von AtHsfA2 Zielgenen. Für die zukünftige Überprüfung einer spezifischen Rekrutierung von HsfA1 durch HsfA2 zu HsfA2 Zielgenen müssten Chromatin Immunpräzipitationsanalysen (ChIP) durchgeführt werden, um die stressinduzierte und gleichzeitige Bindung von AtHsfA1a und AtHsfA2 an HsfA2 Zielgenpromotoren zu zeigen. Auch die Generierung von AtHsfA1/A2 Doppel-Knock-Out Pflanzen und konsequente RT-PCR oder Micro-Array basierenden Expressionsanalysen könnten zur Identifizierung von Zielgenen beitragen, die spezifisch durch HsfA1/HsfA2 aktiviert werden.

#### 4.1.2 Kombinatorische Regulation durch HsfA2

Die besondere Fähigkeit von HsfA2, mit mehreren Klasse A Hsfs interagieren zu können (Abb. 8), könnte bedeuten, dass HsfA2 möglicherweise als Coaktivator in unterschiedlichen Stresssignalwegen agiert. Bereits in Interaktionsstudien mit *Arabidopsis* Hsfs konnte gezeigt werden, dass AtHsfA2 mit mehreren Klasse A Hsfs (A1b, A1e, A1, A3, A6a, A6b, A7b) und mit AtHsfC1 interagiert (Disseration Port, 2004). Da das Hefe Zwei-Hybrid Test-

system dimere Interaktionen anzeigt und im nativen System möglicherweise Interaktionen zwischen Trimeren stattfinden, die nicht durch das Hefe Zwei-Hybrid System erfasst werden können, sind weitere Interaktionsassays wie Pulldown Assays und Coimmunpräzipitation notwendig, um die Spezifität der Interaktionskandidaten zu überprüfen. Angesichts der Tatsache, dass in der Natur Hitzestress praktisch nicht alleine sondern in Verbindung mit anderen Stressarten vorkommt wie z.B. Hitze- und Trockenstress, ist die putative Funktion von HsfA2 als allgemeiner Coaktivator für die verstärkte Aktivierung unterschiedlicher Stressantwortprogramme von Vorteil. Obwohl die Thermotoleranz von Tomaten HsfA2 Antisense-Pflanzen sich nicht von Wildtyppflanzen unterschieden d.h. weder Defekte in Entwicklung noch in der Hitzestressantwort zeigten (Mishra, Dissertation 2003), häufen sich die Indizien in *Arabidopsis* über die Relevanz von HsfA2 als Verstärker der Langzeitresistenz gegen Hitzestress und Coregulator in der Stressantwort auf oxidativen Stress (Oxidantien, Starklicht) (Li et al., 2005, Schramm et al., 2006, Nishizawa et al., 2006). Unter Umständen werden phänotypische Merkmale von HsfA2 Knockout Pflanzen erst unter Feldbedingungen mit der natürlichen Variation von Stressoren sichtbar, falls sich die Theorie von HsfA2 als allgemeinen Coaktivator von Stresssignalwegen bewahrheitet.

## **4.2 Funktionelle Aspekte der synergistischen Aktivierung**

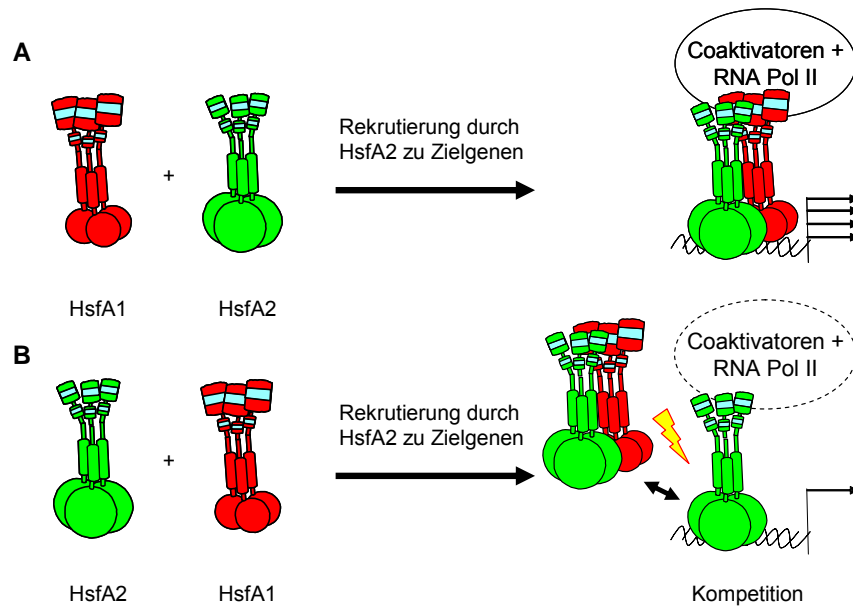
### **4.2.1 Regulatorischer Aspekt des HsfA2 Levels**

Interessanterweise akkumuliert HsfA2 in thermotoleranten Zellen von Tomate und *Arabidopsis* nach wiederholten Stresszyklen und wird zum dominanten Hsf. Hat der erhöhte HsfA2 Level Auswirkungen auf die synergistische Aktivierung? Die Titrationsanalysen geben Hinweise auf HsfA2 konzentrationsabhängige Wirkungen: Der Kurvenverlauf in den Gus Reporter Assays mit HsfA1 und HsfA2 ist davon abhängig, ob HsfA1 oder HsfA2 als dominierender Hsf mit steigenden Mengen des Co-Hsf transformiert wurde (Abb. 7). Ein steiler Anstieg im Kurvenverlauf der synergistischen Aktivierung wurde beobachtet, wenn HsfA1 als dominierender Faktor mit steigender Menge HsfA2 cotransformiert wird. Dies ähnelt der Situation des beginnenden Hitzestresses und zeigt, dass

möglicherweise HsfA1 von HsfA2 zu den Zielgenen rekrutiert wird. Im umgekehrten Fall könnten hohen Konzentrationen von HsfA2 dazu führen, dass Bindestellen am Zielpromoter bereits von homooligomeren HsfA2 besetzt sind und die Bindung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe zunächst behindert ist, aber in Folge der höheren DNA Bindungsaffinität der heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexe ein Austausch erfolgt (Abb. 25). Letzteres spiegelt die Situation in der Erholungsphase wieder, in der HsfA2 als dominierender Faktor vorliegt und die Hitzestressantwort runterreguliert werden muss. Die hauptsächlichen Regulationsmechanismen zur Attenuierung der Aktivität von HsfA2 bzw. der heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexe sind noch nicht hinreichend bekannt. Einzig der spezifische Repressor von HsfA2, Hsp17.4-CII, könnte eine Rolle bei der Regulation der HsfA2 Aktivität spielen (Port et al., 2004).

#### *4.2.2 Die Rolle von HsfA2 im Heterokomplex*

Die stressabhängige, kombinatorische Kontrolle der Hitzestressgenexpression durch heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe in Tomatenzellen lässt sich aufgrund der HsfA1 abhängigen Expression von HsfA2 im nativen System schwer analysieren. Mittels der Strategie des transienten RNAi Knockdowns von HsfA1 und HsfA2 in Wildtyp Tomatenprotoplasten konnte bereits ein Zusammenhang der HsfA1/HsfA2 abhängigen Expression von Hsp17-CI gezeigt werden (Mishra, Dissertation 2003). Dagegen bietet das heterologe Tabak-Expressionssystem die Möglichkeit, spezifische Effekte der funktionellen Interaktion zu analysiert, indem die Eigenschaften einzelner Hsfs und des heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexes getrennt untersucht und verglichen werden können. Wie bereits in den Titrationsexperimenten angedeutet wurde, könnte HsfA2 für die Promoter-spezifische Bindung und Aktivierung von HsfA2 Zielgenen im heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen verantwortlich sein (Abb. 25). Systematische Funktionsanalysen mit Mutanten der funktionellen Domänen (DBD, HR-A/B, CTAD) bestätigten die primäre Rolle der HsfA2 DBD, die für die hohe synergistische Aktivierung und effiziente HsfA1-vermittelte Kernretention im heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplex verantwortlich ist (Abb. 11A, Abb. 11C).



GUS Reporter Assay

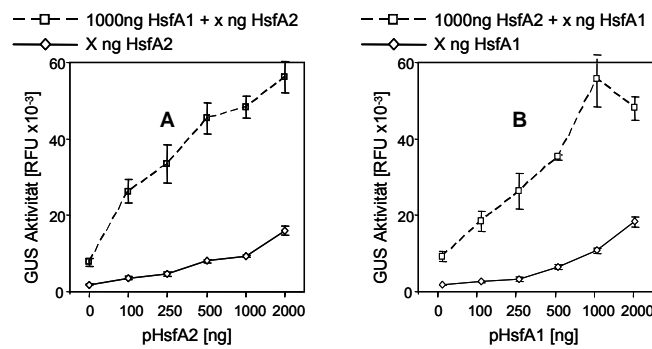


Abbildung 25: **Modell für die HsfA2 Level abhängige Regulation der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 im GUS Reporter Assay (aus Abb. 7.)**

Der Kurvenverlauf in Titrationsanalysen mit konstantem Hsf und steigenden Mengen Co-Hsf zeigt eine Steilheit, die anhängig ist vom dominierenden Hsf. HsfA1 induziert bereits bei geringen Mengen von HsfA2 eine hohe synergistische Aktivierung (A), während HsfA2 mit geringen Mengen von HsfA1 eine niedrigere synergistische Aktivierung induziert (B). Eine mögliche Erklärung ist eine HsfA2 spezifische Rekrutierung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe, die bei dominierenden Mengen von HsfA2 mit bereits im Promoterbereich der Zielgene gebundenen HsfA2 konkurrieren müssen.

#### 4.2.3 Die Rolle von HsfA1 im Heterokomplex

Im gut untersuchten Säugersystem sind die meisten Details der Hsf Regulation bekannt, dass der konstitutive Hsf1 sowohl durch die Bindung von Hsp70/Hsp90 in der Trimerisierung reprimiert wird als auch in der transkriptionellen Aktivierung durch die Maskierung der CTAD inaktiviert ist. Die Identifizierung deregulierter HsfA1 Formen und ein Test durch Coexpression mit HsfA2 zeigte eine synergistische Aktivierung durch beide Hsfs. Die Höhe der synergistischen Aktivierung ist mit dem Aktivitätslevel der Wildtyp HsfA1 und HsfA2 vergleichbar. Daher erscheint es plausibel, dass die Deregulation einen Teil der synergistische Aktivierung beinhaltet, der durch die Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe induziert wird.

#### 4.2.4 Eigenschaften heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe

**Korrelation zwischen Komplexstabilität und -aktivität:** Die Wechselwirkungen zwischen Hsfs werden von den Oligomerisierungsdomänen (HR-A/B Regionen) vermittelt, die zum einen für die Spezifität der Hsf-Hsf Interaktion und zum anderen für die Stabilität des Komplexes sorgen. In Interaktionsstudien mit funktionellen Mutanten stellte sich heraus, dass die Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 unabhängig von funktionierenden DNA Bindungsdomänen oder CTADs stattfindet (Abb. 11B). Aufgrund dessen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Komplexbildung weder durch Promoterbindungsstellen unterstützt wird, noch Coaktivatorkomplexe als Interaktionsrückgrat (Scaffold) benötigt werden. Obwohl die Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe mit der synergistische Aktivierung im Zusammenhang steht, ist die Interaktion nicht direkt notwendig für die transkriptionelle Aktivierung. Vielmehr ermöglicht die spezifische Interaktion die Bildung stabiler Komplexe, die aufgrund ihrer erhöhten DNA Bindungsaffinität länger im Zellkern verweilen (Kernretention) und folglich in der transkriptionellen Aktivierung effizienter wirken als die individuellen Hsfs alleine. Neben den ternären Komplex HsfA1/HsfB1/HAC1 (Bharti et al., 2004) existieren auch für HsfA1 und HsfA2 Hinweise, dass Coaktivatorkomplexe die Interaktion von HsfA1 und HsfA2 unterstützen. Diese Vermutung resultierte aus der Beobachtung, dass trotz fehlender oder

schwacher Interaktionen eine niedrige synergistische Aktivierung bei einigen HR-A/B Deletionskonstrukten ermittelt werden konnte (Abb. 11A, Abb. 13, Abb. 16). Allerdings sind die über Coaktivatorkomplexen vermittelte Interaktionen dagegen vermutlich sehr schwach, weshalb die HsfA1 vermittelte Kernretention dieser HsfA2 Mutanten deutlich reduziert ist.

**Erhöhte DNA Bindungseffizienz und reduzierter Kernexport:** Die genaue Betrachtung der Ergebnisse aus der HsfA1 vermittelten Kernretention von HsfA2 (Abb. 11C) führten zu einem Modell, in dem ein Zusammenhang zwischen transkriptioneller Aktivität und Kernlokalisierung des heterooligomeren HsfA1/HsfA2 besteht sowie die DNA Bindungsfähigkeit von HsfA2 für die HsfA1 vermittelte Kernretention entscheidend ist. Transkriptionell aktive HsfA1/HsfA2 Komplexe zeigen einen reduzierten Kernexport im Vergleich zu HsfA2 alleine, da die AHA Aktivatormotive im CTAD wahrscheinlich neben der NES als Erkennungssequenz für Exportin-1 dienen. Die doppelte Funktion der Aktivator-komplexe garantiert, dass nach der Transkriptionsaktivierung und Dissoziation von Coaktivatoren der Export des Komplexes aus dem Kern erfolgt.

**Bevorzugte Heterooligomerisierung:** Die interessante Beobachtung, dass HsfA1/HsfA2 Komplexe mit homologen HR-A/B Regionen aufgrund niedriger Interaktionsaffinität eine viel niedrigere Stabilität besitzen, führte zum Konzept der bevorzugten Heterooligomerisierung. Für HsfA4 und HsfA5 konnte das gleiche Phänomen in Interaktionsstudien im Hefe Zwei-Hybrid System und *in vitro* Pulldown Assays verifiziert werden (Baniwal et al., 2007). Die bemerkenswerte Eigenschaft der HR-A/B Region, die zum Großteil die Identität des Hsfs repräsentiert, spiegelt sich in der Spezifität wider, die sich mit einem Austausch der HR-A/B Region so weit ändern lässt, dass eine Übertragung der HsfA4/HsfA5 Spezifität sich in HsfA1 möglich ist. So ließ sich HsfA1 mit der HR-A/B Region von HsfA4b durch HsfA5 spezifisch reprimieren.

**Veränderte Komplexzusammensetzung:** Die besondere transkriptionelle Effizienz heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe deutet auf eine veränderte Komplexzusammensetzung hin, die durch unterschiedliche Rekrutierung von Coaktivatoren hervorgerufen werden kann. Um Hinweise einer Veränderten

Komplezzusammensetzung heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe zu überprüfen, wurde das DNA Bindungsverhalten von HsfA1 und HsfA2 sowie von beiden Hsfs zusammen analysiert. Auch die Komplexgrößen wurden mittels Gelfiltrationschromatographie ermittelt (Abb. 17, Abb. 21). Die Veränderungen der Coexpressionsproben mit HsfA1 und HsfA2 deuten tatsächlich auf qualitative Änderungen der heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen hin. In Coexpressionsanalysen mit AHA Mutanten von HsfA1 und HsfA2 konnten unterschiedlich starke inhibitorischen Effekte von jedem einzelnen der vier AHA Mutanten im HsfA1/HsfA2 Komplex gezeigt werden. Diese Unterschiede korrelierten mit Ergebnissen früherer in-vitro Pulldown Assays, die die Interaktion der AHA Motive mit Coaktivatorkomplexen behandelten (Döring, Dissertation 2002). Mutationen in den AHA2 Motiven (Initiation) hatten einen stärkeren Effekt zur Folge als Mutationen in den AHA1 Motiven (Chromatinremodeling, -modifizierung). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Rekrutierung von TFIID Komplexen vor SAGA und SWF/SNF Komplexen. Für den humanen Hsf1 wurde die Notwendigkeit einer geordneten Rekrutierung von Coaktivatoren für die effiziente Transkription von Hsp70 Genen beobachtet, die die Rekrutierung von Coaktivatorkomplexen zur Initiation und Chromatin-Remodeling voraussetzen (Brown et al., 1996, Brown et al., 1998, Corey et al., 2003). Heterooligomere Komplexe könnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Rekrutierung von Coaktivatorkomplexen eine konzertierte Rekrutierung bewirken, die ein Merkmal von transkriptionell hocheffizienten „Enhanceosomen“ darstellt.

### **4.3 Modell der synergistischen Aktivierung**

Die synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 beruht auf einer Kooperativität, die auf mehreren Ebenen stattfindet, so dass bereits eine niedrige Abundanz von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen transkriptionell wirksam ist.

#### **1. Ebene: Spezifische Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2**

Die spezifische Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 setzt voraus, dass HsfA1 und HsfA2 stabile heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe bilden.

#### **2. Ebene: Bevorzugte Heterooligomerisierung**

Aufgrund der bevorzugten Heterooligomerisierung kann die Bildung heterooligomerer Komplexe auch bei Überschuss von HsfA1 stattfinden, da die Interaktion nicht von der Konzentration beider Hsfs abhängig ist.

#### **3. Ebene: Kooperative Rekrutierung von Coaktivator-Komplexen**

Im Gegensatz zu homooligomeren Hsf Komplexen besitzen heterooligomere HsfA1/HsfA2 eine qualitativ unterschiedliche AHA Motive, die durch ihre differenzielle Affinität für Coaktivator-Komplexe eine kooperative Aktivierung verwirklichen.

#### **4. Ebene: Verlängerter Kernaufenthalt des HsfA1/HsfA2 Komplexes**

Als synergistisch aktivierende HsfA1/HsfA2 Komplex wird eine höhere DNA Bindungsaffinität hergestellt sowie der Kernexport verzögert.

In allen genannten Schritten zur synergistischen Aktivierung ist eine direkte Interaktion beider Hsfs entscheidend, so dass die Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2, obwohl nicht direkt beteiligt an der Aktivierung, eine zentrale Funktion transkriptionell effizienter HsfA1/HsfA2 Heterokomplexe darstellt.



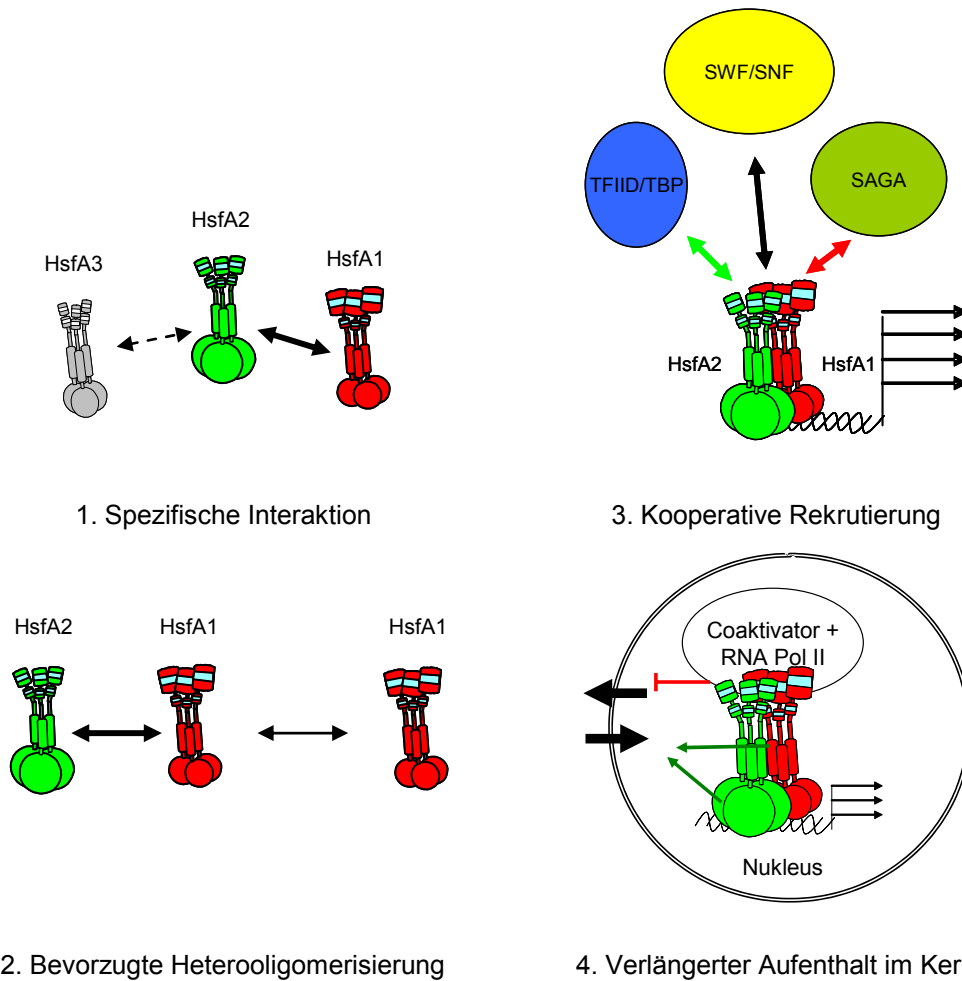


Abbildung 26: **Modell der synergistischen Aktivierung durch HsfA1/HsfA2 Komplexe**

Die synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 beruht auf Kooperativität in mehreren Ebenen. Über die spezifische Interaktion, eine bevorzugte Heterooligomerisierung, kooperative Rekrutierung von Koaktivatorkomplexen und verlängertem Aufenthalt im Kern wird die effiziente transkriptionelle Aktivierung durch heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe entwickelt.

#### **4.4 Weiterführende Arbeiten**

##### *4.4.1 Phylogenie-basierte Analyse des Hsf Netzwerkes*

Mit der Erkenntnis aus den funktionellen Analysen der HsfA1/HsfA2 Interaktion kann die Korrelation zwischen phylogenetischer Distanz und Interaktionsaffinität als Anhaltspunkt für weitere Analysen des Hsf Interaktionsnetzwerkes verwendet werden. Um die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtung zu verifizieren, müssten andere Klasse A Hsfs (z.B. Mitglieder der HsfA6 und HsfA7 Familie, die ebenfalls eine Hsf Subgruppe bilden) in Vergleich mit phylogenetisch nah und entferntem Klasse A Hsf verglichen werden, um ihre spezifischen Wechselwirkung zu bestätigen.

##### *4.4.2 Dynamik der Heterooligomerisierung*

Die Untersuchung der Dynamik von heterooligomeren Hsf-Hsf Komplexen trägt zum Verständnis der kombinatorischen Genregulation in der Hitzestressantwort bei. Mittels Bifluoreszenzkomplementation YFP-markierter Hsfs kann sowohl eine Kolo-kalisation als auch Interaktion in Lebendzellen beobachtet werden. Durch eine Untersuchung der HsfA1/HsfA2 Interaktion in Kombination mit Stressbehandlung in Hinblick auf die Regulation der synergistischen Aktivität, die durch eine Interaktion von HsfA2 mit Hsp17.4-CII moduliert werden könnte, kann möglicherweise die Dynamik der heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen untersucht werden.

##### *4.4.3 Aufreinigung von HsfA1/HsfA2 Heterokomplexen*

Der erfolgreiche *in-vitro* Nachweis der Hsf-Hsf Interaktion mit rekombinant exprimierten Hsf-Fusionsproteinen und Hefeextrakten mit heterolog exprimierten Hsfs ist ein idealer Ausgangspunkt für die Aufreinigung und biochemische Analysen heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe. Die präzise Bestimmung der Stöchiometrie von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen mit *in vitro* aufgereinigten Hsfs könnte Einblicke in strukturelle Details von HsfA1/HsfA2 Komplexen verschaffen, die einen Einfluss auf die Interaktion mit Coaktivator-

komplexen haben könnten. Zur Aufreinigung von heterooligomeren HsfA1/HsfA2 Komplexen müssten beide Hsfs jeweils mit einem unterschiedlichen Affinität-Tag markiert sein, so dass im ersten Schritt die Aufreinigung von heterooligomeren und homooligomeren Komplexen über den ersten Affinitäts-Tag erfolgt und anschließend nach Eluierung, im zweiten Aufreinigungsschritt, über den zweiten Affinitäts-Tag nur noch heterooligomere Hsf-Hsf Komplexe aufgereinigt werden. Vor allem sollten die Affinität-Tags die natürliche Oligomerisierung der rekombinanten Hsfs nicht beeinflussen, wie es z.B. beim GST Tag (Dimerisierung) der Fall sein kann. Durch Gelfiltrationsanalysen kann die Größe der aufgereinigten heterooligomeren Komplexe bestimmt werden. In EMSA kann die DNA Bindungsaffinität bzw. -kinetik bestimmt werden, die als Kontrolle für funktionelle Hsfs und Hsf-Komplexe dient.

#### *4.4.4 Interaktionskinetik mit Coaktivatoren*

Eine spannende Fragestellung ist die Effizienz homooligomerer und heterooligomerer Hsf-Hsf Komplexe in der Rekrutierung von Coaktivator-komplexen. Mit aufgereinigten, heterooligomeren Komplexen von HsfA1 und HsfA2 könnte eine Bestimmung von Interaktionskinetiken mit Coaktivator-komplexen TFIID, SAGA, SWF/SNF erfolgen, um die Hypothese der kooperativen Aktivierung bzw. konzertierten Rekrutierung genauer zu untersuchen.

#### *4.4.5 Identifizierung von unbekanntem Interaktionspartnern*

Immobilisierte HsfA1/A2 Komplexe könnten ebenfalls für Pulldown Analysen mit Pflanzenextrakten verwendet werden, die unterschiedlichen Stressbehandlungen unterzogen wurden, um unbekannte Proteinwechselwirkungen zu identifizieren, die spezifisch mit heterooligomeren HsfA1/A2 Komplexen assoziiert sind. Alternativ könnte man die heterologe Expression in Hefe und Coaufreinigung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe und assoziierter Proteine unter Kontroll- und Hitzestressbedingungen die Rekrutierungseffizienz *in-vivo* testen.

#### **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Anpassungsfähigkeit von Organismen an ihre Umwelt stellt hohe Anforderungen an die regulatorische Flexibilität von zellulären Mechanismen zur Abwehr und zum Schutz vor stressbedingten Schäden. Neben der funktionellen Diversität in komplexen Hsfs Netzwerken bietet die spezifische, funktionellen Interaktion eine Effizienz-gesteigerte Aktivierung der Hitzestressgenexpression. Unter der kombinatorischen Regulation werden zum größten Teil die entwicklungsbedingte, differenzielle Genexpressionsprogramme umgesetzt, die über Konzentrationsgradienten der Regulatoren oder zeitlich begrenzte Verfügbarkeit von Coaktivatoren gesteuert werden. Das Beispiel der über umfangreiche funktionelle Analysen beleuchteten spezifischen Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 zeigt, dass bei Analysen von Interaktionsnetzwerken neben der Interaktionsfähigkeit noch weitere Parameter berücksichtigt werden müssen, um die biologische Relevanz der gefundenen Protein-Protein Interaktion zu verifizieren.

#### 4.6 Zusammenfassung

Die Hitzestresstranskriptionsfaktoren HsfA1 und HsfA2 repräsentieren wichtige transkriptionelle Regulatoren in der Regulation der Hitzestressantwort von *Lycopersicon esculentum* (Tomate). Unter Stressbedingungen induziert HsfA1 die Expression von HsfA2 und bildet heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe, die im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von Hitzestressgenen stehen (Scharf et al., 1998b, Mishra et al., 2002, Port et al., 2004). Durch funktionelle Charakterisierungen der Wechselwirkung zwischen HsfA1 und HsfA2 werden neue Aspekte der spezifischen und synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 erläutert.

- Die Spezifität der funktionellen Interaktion zwischen HsfA1 und HsfA2 wird in Vergleich mit weiteren Klasse A Hsfs, HsfA3, HsfA4b und HsfA5 anhand von GUS Reporter Assays, Coimmunpräzitationsanalysen und der interaktionsvermittelten Kernretention von GFP-HsfA2 verdeutlicht. Trotz des Potenzials von HsfA2, multiple Wechselwirkungen einzugehen, ist die Spezifität zwischen HsfA1 und HsfA2 am höchsten. Für die Analyse der synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 werden 3HA-HsfA1 und 3HA-HsfA2 in unterschiedlichen Mengenverhältnissen coexprimiert. Sowohl am Hsp17.3B-CI::GUS Reporter als auch an der induzierte, endogene Tabak Hsp17-CI Expression kann der spezifische Effekt der synergistischen Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 demonstriert werden.
- Um die strukturellen Voraussetzungen der synergistischen Aktivierung zu definieren, werden Mutanten mit Defekten in der DNA Bindung, Oligomerisierung und Aktivierung in funktionellen Analysen der transkriptionellen Aktivität (GUS Reporter Assays, Induktion endogener Hsp17-CI Expression), Komplexbildung (Co-Immunpräzitation) und der HsfA1 vermittelte Kernretention von HsfA2 (Immunfluoreszenz) untersucht. Die synergistische Aktivierung erfordert die Bildung heterooligomerer HsfA1/HsfA2 Komplexe, die über eine Kombination ihrer C-terminalen Aktivierungsdomänen kooperativ aktivieren. Dagegen hat die DNA Bindung durch die DBDs beider Hsfs einen geringen Anteil an der synergistischen Aktivierung. Zur Verifizierung der funktionellen Unterschiede zwischen HsfA1 und HsfA2

werden HsfA1-HsfA2 Hybride durch Coexpression mit HsfA1 und HsfA2 Wildtypformen analysiert. Heterooligomere Komplexe aus Wildtyp und Hybrid-Hsfs zeigen ausschließlich eine synergistische Aktivierung, wenn die C-terminalen Aktivierungsdomänen von beiden Hsf Typen stammen, während heterooligomere HsfA1/HsfA2 Komplexe mit typgleichen C-Termini nicht synergistisch aktivieren. Weiterhin wird gezeigt, dass Wildtyp-Hybridkomplexe mit identischen HR-A/B Regionen in der synergistischen Aktivierung abgeschwächt sind.

- Die Bildungseigenschaften der DNA-Hsf Komplexe (DNP) von HsfA1 und HsfA2 werden in Hinblick auf qualitative Veränderungen unter Coexpressionsbedingungen betrachtet. Interessanterweise konnte die Bildung intermediärer DNPs sowie von Hsf-Komplexen mit intermediärer Größe in Gelfiltrationsanalysen als Indizien für qualitativ veränderte HsfA1/HsfA2 Komplexen nachgewiesen werden. Die funktionelle Analyse von HsfA1 C-terminalen Deletionsmutanten führt zur Identifizierung einer de-regulierten HsfA1 Mutante, die trotz de-regulierter Aktivität mit HsfA2 zur synergistische Aktivierung fähig ist.
- Zur Verifizierung der interaktionsvermittelten synergistischen Aktivierung wird die Oligomerisierung partiell deletierter HsfA2 HR-A/B Mutanten ermittelt. Da diese Mutanten intermediäre Oligomerisierungszustände zeigen, werden durch die systematische Deletionsmutation der HR-A/B Region von HsfA2 strukturellen Voraussetzungen für die synergistische Aktivierung durch HsfA1 und HsfA2 charakterisiert. Co-Immunpräzipitationsversuche belegen, dass die Integrität der HR-A/B Region für die Bildung stabiler HsfA1/HsfA2 Komplexe benötigt wird, jedoch eine transiente und spezifische Interaktion über die C-terminalen L2 und HR-B Regionen für die synergistische Aktivierung ausreicht.
- In der Charakterisierung der kooperativen, synergistischen Aktivierung durch beide CTADs werden Mutanten der vier vorhandenen AHA Motive von HsfA1 und HsfA2 durch Coexpression mit dem Wildtyp Hsf Partner getestet. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass jedes der AHA Motive unterschiedlich zur synergistischen Aktivierung beitragen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Ahn, S.G., Liu, P. C.C., Klyachko, K., Morimoto, R. I. und Thiele, D. J. (2001). The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity und responses to heat stress. *Genes Dev.* **15**: 2134-2145
- Ahn, S.G. und Thiele, D.J. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* **17** (4): 516-28
- Ali, A., Bharadwaj, S., O'Carroll, R. und Ovsenek, N. (1998). HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol.* **18** (9):4949-60
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., und Struhl, K. (eds.) (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley und Sons, Inc.
- Baler, R., Dahl, G. und Voellmy, R. (1993). Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol.* **13** (4): 2486-96
- Baniwal, S.K, Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover L., Port, M., Scharf, K.-D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D. und von Koskull-Döring P (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**:471–487
- Baniwal S.K., Chan K.Y., Scharf, K.-D. und Nover, L. (2007). Role of the heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *J. Biol. Chem.* **282** (6): 3605-3613
- Bärenz, F. (2006). Vergleichende Analyse von HsfA2 aus *Arabidopsis* und Tomate. Diplomarbeit im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Baler, R., Zou, J. und Voellmy, R. (1996). Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones.* **1** (1):33-9

- Becker, P.B. und Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodelling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 247-73
- Bharadwaj, S., Ali, A. und Ovsenek, N. (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol.* **19** (12):8033-41.
- Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Bublak, D. und Scharf, K.-D. (2000). Isolation und characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant J.* **22**: 355-365
- Bharti, K. und Nover, L. (2002) Heat stress-induced signalling. In D. Scheel und C. Wasternack (Herausgeber) Plant Signal Transduction: Frontiers in Molecular Biology. Oxford University Press, pp 74-115
- Bharti, K. (2003). Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with HAC1/CBP. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Bharti, K., von Koskull-Döring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschi-Körbitzer, A., Treuter, E. und 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**: 1521–1535
- Bienz, M. und Pelham, H.R. (1986). Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. *Cell* **45**(5):753-60
- Bonner, J.J., Ballou, C. und Fackenthal, D.L. (1994). Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor. *Mol Cell Biol.* **14**(1):501-8
- Boscheinen, O., Lyck, R., Queitsch, C., Treuter, E., Zimarino, V. und Scharf, K.-D. (1997). Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **255**: 322-31
- Brown, S.A., Imbalzano, A.N. und Kingston, R.E. (1996). Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev.* **10** (12):1479-90



- Brown, S.A., Weirich, C.S., Newton, E.M. und Kingston, R.E. (1998). Transcriptional activation domains stimulate initiation and elongation at different times and via different residues. *EMBO J.* **17** (11):3146-54.
- Calligaris, R. (2001). Protein interactions of heat stress transcription factors from *Lycopersicon peruvianum*. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Ceruso, M.A. und Weinstein, H. (2002). Structural mimicry of proline kinks: tertiary packing interactions support local structural distortions. *J Mol Biol.* **318** (5):1237-49
- Chan, K. Y. (2002). Charakterisierung der für die heterooligomere Hsf-Hsf Interaktion verantwortlichen Region im Hitzestresstranskriptionsfaktor A2 aus *Lycopersicon peruvianum*. Diplomarbeit im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Cicero, M.P., Hubl, S.T., Harrison, C.J., Littlefield, O., Hardy, J.A. und Nelson, H.C. (2001). The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Res.* **29** (8):1715-23
- Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, U., und Wu, C. (1990). Molecular cloning und expression of a heaxameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* **63**: 1085-1097
- Corey, L.L., Weirich, C.S., Benjamin, I.J. und Kingston, R.E. (2003). Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev.* **17** (11):1392-401
- Cotto, J.J., Kline, M. und Morimoto, R.I. (1996) Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem.* **271** (7):3355-8
- Czarnecka-Verner, E., Yuan, C.X., Scharf, K-D., Englich, G. und Gurley, W.B. (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol Biol.* **43** (4):459-71
- Czarnecka-Verner, E, Pan, S., Salem, T. und Gurley, W. B. (2004). Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Mol Biol.* **56**: 57–75
- Damberger, F.F., Pelton, J.G., Liu, C., Cho, H., Harrison, C.J., Nelson, H.C. und Wemmer, D.E. (1995) Refined solution structure and dynamics of the

- DNA-binding domain of the heat shock factor from *Kluyveromyces lactis*. *J Mol Biol.* **254** (4):704-19
- Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A., und Nover, L. (2000). Role of AHA motifs for the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 und HsfA2. *Plant Cell* **12**: 265-278
- Döring, P. (2002). Characterization of heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum* and *Arabidopsis thaliana* in their function as transcriptional activators. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Drees, B.L., Grotkopp, E.K. und Nelson, H.C. (1997). The GCN4 leucine zipper can functionally substitute for the heat shock transcription factor's trimerization domain. *J. Mol Biol.* **273** (1): 61-74
- Erkine, A.M., Magrogan, S.F., Sekinger, E.A. und Gross, D.S. (1999). Cooperative binding of heat shock factor to the yeast HSP82 promoter *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol.* **19** (3):1627-39
- Flick, K.E., Gonzalez, L. Jr, Harrison, C.J. und Nelson, H.C. (1994). Yeast heat shock transcription factor contains a flexible linker between the DNA binding and trimerization domains. Implications for DNA binding by trimeric proteins. *J Biol Chem.* **269** (17):12475-81
- Forreiter, C. und Nover, L. (1998). Heat stress-induced proteins and the concept of molecular chaperones. *J. Bioscience* **23**: 287-302
- Fu, S., Meeley, R. und Scanlon, M. J. (2002). *empty pericarp2* encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *Plant cell* **14**: 3119–3132
- Fu, S., Rogowsky, P., Nover, L. und Scanlon, M.,J. (2006) The maize heat shock factor-binding protein paralogs EMP2 and HSBP2 interact non-redundantly with specific heat shock factors. *Planta* **224**: 42-52
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harrison, C.J., Bohm, A.A., und Nelson, H.C.M. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* **263**: 224-227
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381** (6583):571-9

- Hartl F.U. und Hayer-Hartl M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295** (5561):1852-8
- Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., und Nover, L. (2001). The balance of nuclear import und export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol Cell Biol.* **21**: 1759-1768
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K. und Sarge, K.D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* **276** (43):40263-7.
- Hu, Y. und Mivechi, N.F. (2003). HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with HSP90 in vivo. *J Biol Chem.* **278** (19):17299-306
- Kim, D. und Ouyang, H., Li, G.C. (1995). Heat shock protein hsp70 accelerates the recovery of heat-shocked mammalian cells through its modulation of heat shock transcription factor HSF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92** (6):2126-30
- Kotak, S., Vierling, E., Baumlein, H. und von Koskull-Döring, P. (2007) A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *Plant Cell* **Jan 12**; [Epub ahead of print]
- Liu, P.C. und Thiele, D.J. (1999) Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J Biol Chem.* **274** (24):17219-25.
- Lohmann, C., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M. und Schöffl, F. (2004). Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics.* **271** (1):11-21
- Lyck, R., Harmening, U., Höfeld, I., Treuter, E., Scharf K.-D., und Nover, L. (1997). Intracellular distribution und identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**: 117-125
- Mishra, S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., und Scharf K.-D. (2002). In the complex family of heat stress transcription fac-

- tors HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.* **16**:1555-1565.
- Mishra, S. K. (2003). Tomato heat stress transcription factor HsfA1 as master regulator of thermotolerance. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- McKenzie, S.L. und Meselson, M. (1977). Translation *in vitro* of *Drosophila* heat-shock messages. *J Mol Biol.* **117** (1):279-83
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between family of heat shock factors, molecular chaperones, und negative regulators. *Genes Dev.* **12** (24): 3788-3796
- Nakai, A. und Morimoto, R.I. (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, Hsf3, suggest a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1983-1987
- Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto und R.I., 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** (1):469-81
- Nover, L. (1987). Expression of heat shock genes in homologous and heterologous systems. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 130-144
- Nover, L. und Scharf, K. D. (1997). Heat stress protein and transcription factors. *Cell mol. life sci.* **53**: 80-103
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., und Scharf, K.-D. (2001). *Arabidopsis* und the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chap.* **6**: 177-189
- Parsell, D.A. und Lindquist, S. (1993). The function of heat stress proteins in stress tolerance-degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**:437-496.
- Pelham, H.R.B. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp70* heat-shock gene. *Cell* **30**: 517-528
- Peteranderl, R., Nelson, H.C.M. (1992). Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry* **31**: 12272-12276
- Port, M., Tripp, J., Zielinski, D., Weber, C. und Heerklotz, D., Winkelhaus, S., Bublak, D. und Scharf, K.-D. (2004). Role of Hsp17.4-CII as coregulator

- and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* **135**: 1457–1470.
- Port, M. (2005). Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Interaktionspartnern für Vertreter der Hitzestresstranskriptionsfaktoren aus *Lycopersicon peruvianum* und *Arabidopsis thaliana*. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Rabindran, S.K., Giorgi G., Clos, J. und Wu, C. (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, Hsf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 6906-6910
- Rabindran S.K., Haroun R.I., Clos J., Wisniewski, J. und Wu C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259** (5092):230-4
- Reichel, C., Mathur. J, Eckes, P., Langenkemper K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. und Maas, C. (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- und dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 5888-5893
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.
- Rojas, A., Almoguera, C., Carranco, R., Scharf, K.-D. und Jordano, J. (2002). Selective activation of the developmentally regulated Ha hsp17.6 G1 promoter by heat stress transcription factors. *Plant Physiol.* **129** (3):1207-15
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V. und Glas, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* **20**: 1405-1428
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Sarge, K.D., Zimarino, V., Holm, K., Wu, C. und Morimoto, R.I. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* **5** (10):1902-11
- Sarge, K.D., Murphy, S.P. und Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisi-

- tion of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol.* **13** (3):1392-407
- Satyal, S.H., Chen, D., Fox, S.G., Kramer, J.M. und Morimoto, R.I. (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev.* **12** (13):1962-74
- Singh, B.K. (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**: 1111-1120
- Scharf, K.-D., Rose, S., Zott, W., Schöffl, F. und Nover, L. (1990). Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO J.* **9**: 4495-4501
- Scharf, K.-D., Höhfeld, I. und Nover, L. (1998a). Heat stress response und heat stress transcription factors. *J Biosci.* **23**: 313-329
- Scharf, K.-D., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E. und Nover, L. (1998b). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import und may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2240-2251
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G. Walch, D. und von Koskull-Döring, P. (2006) The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **60**: 759-772.
- Schuetz, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L., Tempst, P. und Kingston, R.E. (1991). Isolation of a cDNA for HSF2: Evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci. USA* **88**: 6911-6915.
- Schultheiss, J., Kunert, O., Gase, U., Scharf K.-D., Nover, L. und Rüterjans, H. (1996). Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. *Eur J Biochem* **236**: 911-921
- Shamovsky, I., Ivannikov, M., Kandel, E.S., Gershon, D. und Nudler, E. (2006). RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* **440** (7083):556-60
- Shi, Y., Mosser, D.D. und Morimoto, R.I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* **12** (5):654-66
- Shirasaki, R. und Pfaff, S.L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**: 251-81

- Sorger, P.K., Nelson, H.C. (1989). Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* **59** (5):807-13
- Tai, L.J., McFall, S.M., Huang, K., Demeler, B., Fox, S.G., Brubaker, K. und Radhakrishnan, I., Morimoto, R.I. (2002). Structure-function analysis of the heat shock factor-binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain. *J Biol Chem.* **277** (1):735-45
- Tessari, A., Salata E., Ferlin, A., Bartoloni, L., Slongo, M.L. und Foresta (2004). Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Mol. Human Reproduct.* **10** (4): 253-258
- Tissieres A, Mitchell H.K und Tracy U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* **84** (3):389-98
- Töpfer, R., Schell, J. und Steinbiss, H.H. (1988). Versatile cloning vectors for transient gene expression und direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8725
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K. und Scharf, K.-D. (1993). Promoter specificity und deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 113-125
- Vierling, E. und Kimpel, J.A. (1992). Plant responses to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol.* **3** (2):164-70
- Vuister, G. W., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C. und Bax, A. (1994). Solution struture of the DNA binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 605-614
- Wiederrecht, G., Seto, D. und Parker, C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* **54**: 841-853
- Westwood, J.T., Clos, J. und Wu, C. (1991). Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* **353** (6347):822-7
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **11**:441-69
- Xia, W. und Voellmy, R. (1997). Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem.* **272** (7):4094-102

- Xiong, Y., Liu, T., Tian, C., Sun, S., Li, J. und Chen, M. (2005). Transcription factors in rice: a genome wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol. Biol.* **59**, 191-203
- Yamanouchi, U., Yano, M., Lin, H., Ashikari, M. und Yamada, K. (2002) A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7530-7535.
- Zuo J., Baler R., Dahl G. und Voellmy R. (1993). Activation of the DNA binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol. Cell Biol.* 14 (11): 7557-7568
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., 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** (4):471-80



## 6 Anhang

Tabelle 1: Aminosäuresequenz der HsfA2 HR-A/B Mutanten (Abb. 13)

Die roten gefärbten Aminosäurereste stehen für Aminosäuresubstitutionen. Unterstreichungen markieren Klonierungsschnittstellen (VD = Sall, LK = AflII). Die Linker 2 (grün) und HR-B Regionen sind besonders hervorgehoben.

	----- HR-A -----	Linker 2	- HR-B --
	* * * * # * #	# * # * # * # *	
WT137-	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD-207
KC30	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> QQQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC35	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> ---QSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC36	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> -----NQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC37	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> -----EKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC38	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> -----RKQVD	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC31	<u>V</u> -----		<u>D</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
ET738	<u>V</u> -----		<u>D</u>
KC32	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVK <u>LK</u> -----	<u>RKQV</u> ----- <u>D</u>
KC33	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	----- <u>D</u>
KC34	<u>VD</u> -----	<u>LK</u> QQQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	----- <u>D</u>
KC 7	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVK <u>LK</u> -----	<u>RKQVD</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC 6	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVK <u>LK</u> -----	<u>EKIETQERKQV</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC 5	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVK <u>LK</u> -----	<u>NQIIAMGEKIETQERKQV</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC 4	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVK <u>LK</u> ---QSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC114	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQSTRNQII <u>AL</u> <u>LK</u> -----	<u>RKQVD</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC113	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQ <u>SL</u> <u>LK</u> -----	<u>RKQVD</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
KC112	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQ <u>SL</u> <u>LK</u> -----	<u>EKIETQERKQV</u> MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD-207
RC77	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQ <u>ARGA</u> QQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD
RC78	IEIGYYGMEEELERLKRDKNVLMT	IEIVKLRQQQ <u>ARGVGA</u> QQSTRNQIIAMGEKIETQERKQV	MMSFLAKIFSNPTFLQQYLD

Tabelle 2: Verzeichnis der verwendeten Konstrukte

Unter „Konstrukt“ sind die Bezeichnung der HsfA1 und HsfA2 Konstrukte aufgelistet, die in den Abbildungen der Arbeit angegeben sind. Die Bezeichnung „Plasmid“ meint die vollständige, laborinterne Konstruktamen und „Labor“ die Zuordnungsnummer in der Stammsammlung.

<u>Konstrukt</u>	<u>Plasmid</u>	<u>Labor</u>
GmHsp17.3B-GUS	pHsp17.3B-CI-GUS	ET717
3HA-HsfA1	pRT-3HA-LpHsfA1	KC101
HsfA1 wt	pRT-LpHsfA1.LS	ET206
HsfA1 ΔC491	pRT-LpHsfA1 ΔC491	ET321
HsfA1 ΔC468	pRT-LpHsfA1 ΔC468	ET421
HsfA1 ΔC412	pRT-LpHsfA1 ΔC412	ET324

HsfA1 $\Delta$ C394	pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C394	ET325
HsfA1 $\Delta$ C358	pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C358	ET326
HsfA1 $\Delta$ C251	pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C251	ET327
HsfA1 $\Delta$ 6/2	pRT-LpHsfA1 $\Delta$ 6/2	ET608
HsfA1 (D)	pRT-LpHsfA1 M5	KB265
HsfA1 (H)	pRT-LpHsfA1 $\Delta$ 71/8	KB129
HsfA1 (A)	pRT-LpHsfA1 7A	PD188
HsfA1 (1m)	pRT-LpHsfA1.2AHA1WLL>AAA	PD186
HsfA1 (2m)	pRT-LpHsfA1.2AHA2FWFL>AAAA	PD187
Hybrid a	pRT-LpHsfA1.7xA2.8	KB71
Hybrid b	pRT-LpHsfA1.8xA2.8	KB122
Hybrid c	pRT-LpHsfA2.7xA2.7	KB72
Hybrid d	pRT-LpHsfA2.8xA2.8	KB123
Hybrid e	pRT-LpHsfA1 (A2 HR-A/B)	KC103
Hybrid f	pRT-LpHsfA2 (A1 HR-A/B)	KC80
3HA-HsfA2	pRT-3HA-LpHsfA2	KC102
HsfA2 wt	pRT-LpHsfA2	ET345
HsfA2 (D)	pRT-LpHsfA2 M5	KC83
HsfA2 (H)	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/8	ET738
HsfA2 (A)	pRT-LpHsfA2.11.16B	PD104
HsfA2 (1m)	pRT-LpHsfA2.11S	ET697
HsfA2 (2m)	pRT-LpHsfA2.16B	PD106
HsfA2 $\Delta$ 139-164	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A	KC30
HsfA2 $\Delta$ 139-169	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-3	KC35
HsfA2 $\Delta$ 139-173	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-7	KC36
HsfA2 $\Delta$ 139-180	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-14	KC37
HsfA2 $\Delta$ 139-187	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2	KC31
HsfA2 $\Delta$ 139-211	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/8	ET738
HsfA2 $\Delta$ 139-164, 191-211	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A $\Delta$ HR-B	KC34
HsfA2 $\Delta$ 167-211	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 HR-B	KC32
HsfA2 $\Delta$ 192-211	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-B	KC33
HsfA2 $\Delta$ 167-187	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2	KC7
HsfA2 $\Delta$ 167-180	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-14	KC6
HsfA2 $\Delta$ 167-173	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-7	KC5
HsfA2 $\Delta$ 167-169	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-3	KC4
HsfA2 $\Delta$ 181-187	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 14/21	KC114
HsfA2 $\Delta$ 174-187	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/21	KC113
HsfA2 $\Delta$ 174-180	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/14	KC112
HsfA2 (AS 166+ARGA)	pRT-LpHsfA2 HR+4	RC78
HsfA2 (AS 166+ARGVGA)	pRT-LpHsfA2 HR+6	RC79

HsfA2 (A4b HR-A/B)	pRT-LpHsfA2 (A4b HR-A/B)	KC81
HsfA2 (B1 HR-A/B)	pRT-LpHsfA2 (B1 HR-A/B)	KC29
GFP-HsfA2	pRTdS-GFP-LpHsfA2	DH49
HsfA3	pRT-LpHsfA3 (M3)	SE7
HsfA4b	pRTdS-LeHsfA4b-3HA	SB111
HsfA5	pRTdS-3HA-LeHsfA5	SB135

Tabelle 3: **Klonierungsstrategien der KC Konstrukte**

Klonierung erfolgte unter Verwendung der angegebenen Restriktionsschnittstellen. Bei PCR amplifizierten Inserts sind Vorwärts-Primer (F), Revers Primer (R) und Template (Nr.) angegeben.

<u>Nr.</u>	<u>Konstrukt</u>	<u>Insert</u>	<u>Vektor</u>	<u>Schnittstellen</u>
KC101	pRT-3HA-LpHsfA1	PCR (F270, R2584, MH3)	DH57	XhoI, SacI
KC102	pRT-3HA-LpHsfA2	KC101	MH3	XhoI, SacI
KC83	pRT-LpHsfA2 M5	PCR (F1626, R565, ET345)	ET644	AvrII, NcoI
KC30	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A	PCR (F1390, R179, KC1)	ET738	Sall, XbaI
KC35	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-3	KC4	KC30	AflIII, XbaI
KC36	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-7	KC5	KC30	AflIII, XbaI
KC37	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2 N-14	KC6	KC30	AflIII, XbaI
KC31	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2	KC2	KC30	SalI, XbaI
KC34	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-A $\Delta$ HR-B	KC33	KC30	NcoI, XbaI
KC32	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 HR-B	KC33	KC7	Sall, XbaI
KC33	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ HR-B	ET720	KC2	Sall, XbaI
KC7	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2	PCR (F1058, R179, ET345)	KC1	AflIII, XbaI
KC6	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-14	PCR (F1057, R179, ET345)	KC1	AflIII, XbaI
KC5	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-7	PCR (F1056, R179, ET345)	KC1	AflIII, XbaI
KC4	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ L2 N-3	PCR (F1065, R179, ET345)	KC1	AflIII, XbaI
KC114	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 14/21	PCR (F270, R14, ET345)	KC7	XhoI, AflIII
KC113	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/21	PCR (F270, R1808, ET644)	KC7	XhoI, AflIII
KC112	pRT-LpHsfA2 $\Delta$ 7/14	KC113	KC6	XhoI, AflIII
KC81	pRT-LpHsfA2 (A4b HR-A/B)	PCR (F1642, R1644, SB111)	ET738	Sall
		XhoI, Sall (Insert)		
KC29	pRT-LpHsfA2 (B1HR-A/B)	PCR (H86, R179, ET715)	ET738	Sall

Primer    5' – 3' Sequenz

H86	CCGGGATCTGTCGACACTCCGGG
R14	CTCCTGTGTTTTCGATTTTTCTTAAGGGCAATG
R179	CACACATTATTCTGGAG
F270	GACGCACAATCCCACTATCC

R565 CTCTTGGAGTGATGAGGAG  
F1058 AAACACTTAAGAGGAAACAAGTCGACATG  
F1057 ATTGCCCTTAAGGAAAAAATCGAAACAC  
F1056 AGAGTCTTAAGAATCAGATCATTGCTATGGG  
F1065 GGCAGCTTAAGCAGAGTACGCGTAATCAGATC  
R1319 CCAATGTCGACGGCCGCACCAGATCCTTG  
F1320 GGACTCTAGAGGATCTCCGGCCGC  
F1390 CTTGCGTCGACCTTAAGCAGCAACAGCAGAGTA  
F1626 GTTGCCTAGGTTTTCAAGCACAGCAATTTTTCCAGTTTCATTGATCAGC  
F1627 CATTGCCATGGGAGAAAAAATCCTTAAGCAG  
F1628 GAGTTTCTTAGCAGTCGACTTCAGCAATCC  
F1629 GCAATCCAGTCGACCTCCAGCAGTACTTG  
F1630 GTCCTTAAGTTCAGACAGCAACAATCTGCTG  
F1631 GGCAGTATAGAGCAAAGACAGGTGACTTAC  
F1632 CTGGGCGGGTTCTTAAGATAGAGC  
F1638 GTTGGGGCTTGTCTCGAGGTTGGG  
F1640 TGTAGCTCCATTGGTCGACTCTGAGAGAC  
R1641 GTCTCTCAGAGTCGACCAATGGAGCTACA  
F1642 TGTAGCTCCATTGCTCGAGTCTGAGAGAC  
F1643 CTGCGGAGAATCTTAAGAAATTCAATGGGGAG  
R1644 CATCTGATTTGTCGACAGCGGAGCAG  
R1645 CTGCTCGCGCTGTCGACGAAATCAGATG  
R1806 GGATTGCTGAAGTCGACTGCTAAGAAACTC  
R1807 CAAGTACTGCTGGAGGTGACTGGATTGC  
R1808 GGCAATGATCTGATTCTTAAGACTCTGCTG  
F1810 CTAAGGACCTACTTCTAGGTACTTTAAGC  
F1840 GGAGGAGCTAGAAAGATTAATCGGG  
F1841 GTTAAACTTAACCAGCAACAGCAGAGTAC  
R1842 CATCATCTGCACTTGATTCTCTCTCTG  
R1843 CCCGCTTTAATATTTCTAGCTCCTCC  
R1845 GCAGCTTAAGCAGAGTACGCGTAATCAGATC  
F2029 AAACACTTAAGAGGAAACAAGTGCAGATG  
F2030 GTTCTTCTGGATCACTCGAGGAAGCAG  
F2031 GTTCTTCTGGATCAGTCGACGAAGCAG  
F2034 CTCGTGTTGTCGACATGAAGGAGC  
R2035 GCTCCTTCATGTCGACAACACGAG  
R2143 CATCATGTGCACTTGTGCGAGCTCC  
R2175 ACGTTGCTCATAGACAGGTGACTTGATTTCT  
F2226 CTATGGAAGGCCTGCACGAC  
R2227 GTCGTGCAGGCCTTCCATAG  
F2229 TCGCACTGAGGCCTGGCGCCGGCG

F2230 GGTGGAAGATTTCGTCGACTGATCAAG  
R2231 CTTGATCAGTCGACGAATCTTCCACC  
F2232 GATGATCCGTCGACGGATAAGATC  
R2233 GATCTTATCCGTCGACGGATCATC  
F2228 CGCCGGCGCCAGGCCTCAGTGCGA  
F2584 GTACCTGGAGCTCGTAATCTGGAAC

### Templates

DH57 pRT-dS-GFP-HsfA1  
MH3 pRT-3HA-HsfA2 (inaktiv)  
ET345 pRT-LpHsfA2 (Wildtyp)  
ET720 pRT-LpHsfA2.8  
KC1 pRT-LpHsfA2.72  
KC2 pRT-LpHsfA2.73

Tab. 3: **Komplette Plasmidliste**

No	Plasmid	Insert	Cloning procedure and documentation, dates
KC1	pRTHsfA2.72	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 167-351)	Ligation of XhoI/NcoI cut PCR mutagenesis fragment (Template pRTHsfA2 (ET345), Pr270, Pr1067) into pRTHsfA2 cut XhoI/NcoI (Jan-2002)
KC2	pRTHsfA2.73	Lp-HsfA2 (aa1-190, VD, 193-351)	Same as KC except use of Pr1066, Pr179 (Feb-2002)
KC3	pRTHsfA2.72.73	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 167-190, VD, 193-351)	Same as KC1 except use of Pr1066, Pr179 (Feb-2002)
KC4	pRTHsfA2.72 $\Delta$ 3 short: A2 dL2N-3	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 170-351)	Ligation of AflIII/XbaI cut PCR mutagenesis fragment (Template pRTHsfA2 (ET345), Pr1065, Pr179) into pRTHsfA2.72 (KC 01) cut AflIII/XbaI (Mar-2002)
KC5	pRTHsfA2.72 $\Delta$ 7 short: A2 dL2N-7	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 174-351)	Same as KC4 except use of Pr1056, Pr179 (Mar-2002)
KC6	pRTHsfA2.72 $\Delta$ 14 short: A2 dL2N-14	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 181-351)	Same as KC4 except use Pr1057, Pr179 (Mar-2002)
KC7	pRTHsfA2.72/73 $\Delta$ 21 short: A2 dL2N-21	Lp-HsfA2 (aa1-165, LK, 188-190, VD, 191-351)	Same as KC4 except use Pr1058, Pr179 (Mar-2002)
KC8	pRTHsfA2.72/73 L: AtHsfA6b short: A2 [L2:AtA6b]	Lp-HsfA2.72 (aa1-164, LK)xAtHsfA6b 21aa Linker 2 (aa208-232)xHsfA2.73 (VD, 194-351)	Ligation of AflIII/SalI cut PCR mutagenesis fragment template pRTAtHsfA6b CTD (AG6), Pr1059, Pr1060 ) into pRTHsfA2.72 (KC 03) cut AflIII/SalI (Mar-2002)

KC9	pRTHsfA2.72/73 L: AtHsfA7b short: A2 [L2:AtA7b]	Lp-HsfA2.72 (aa1-164, LK, AtHsfA7b 21aa Linker 2 (aa164- 188)xHsfA2.73 (VD, 194-351)	Same as KC8 except use of template pRTAtHsfA6b CTD (SZ28), Pr1061, Pr1062 (Mar-2002)
KC10	pRTHsfA2.72/73 L: AtHsfC1	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK)xAtHsfC1 7aa Linker 2 (aa153- 163)xHsfA2.73 (VD, 194-351)	Same as KC8 except use of template pRTAtHsfA6b CTD (SZ32), Pr1063, Pr1064 (Mar-2002)
KC11	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72Δ3	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72Δ3 (aa 1-164, LK, 170-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ3 (KC4) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC12	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72Δ7	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72Δ7 (aa 1-164, LK, 175-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ7 (KC5) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC13	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72Δ14	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72Δ14 (aa 1-164, LK, 182-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ14 (KC6) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC14	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72/73 Δ21	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72/73 Δ21 (aa 1-164, LK, 188-190, VD, 193-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73Δ21 (KC7) into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC15	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72/73 L: AtHsfA6b	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72 (aa1-164, LK)xAtHsfA6b 21 aa Linker 2 (aa208-232)xHsfA2.73 (VD, 193-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfA6b (KC8) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC16	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72/73 L: AtHsfA7b	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72 (aa1-164, LK)xAtHsfA7b 21 aa Linker 2 (aa164-188)xHsfA2.73 (VD, 193-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfA7b (KC9) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC17	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2.72/73 L: AtHsfC1	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2.72 (aa1-164, LK)xAtHsfC1 7aa Linker 2 (aa153-163)xHsfA2.73 (VD, 193- 351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfC1 (KC10) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC18	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2Δ7/8	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2Δ7/8 (aa 1-136, VD, 213-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfC1 (KC10) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC19	pRTd35S CAT-GFP- LpHsfA2 HR-21	CAT-GFP (aa 1-237)xHsfA2 HR-21 (aa 1-168, AR, 192-351)	Ligation of SacI/XbaI cut pRTLpHsfA2 HR-21 (RC77) into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI (Apr-2002)
KC20	pAD5-LpHsfA2.72Δ3	Lp-HsfA2.72Δ3 (aa1-164, LK, 170- 351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ3 (KC4) into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall (Apr- 2002)
KC21	pAD5-LpHsfA2.72Δ7	Lp-HsfA2.72Δ7 (aa1-165, LK, 174- 351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ7 (KC5) into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall (Apr- 2002)
KC22	pAD5- LpHsfA2.72Δ14	Lp-HsfA2.72Δ14 (aa1-164, LK, 181-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ14 (KC6) into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall (Apr- 2002)
KC23	pAD5-LpHsfA2.72/73 Δ21	Lp-HsfA2.72/73Δ21 (aa1-164, LK, 188-190, VD, aa193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73Δ21 (KC7) into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall (Apr-2002)

KC24	pAD5-LpHsfA2.72/73 L2: AtHsfA6b	Lp-HsfA2.72 (aa1-164, LK), xAtHsfA6b 21 aa Linker 2 (aa208-232)xHsfA2.73 (VD, 193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfA6b (KC8) into pRTAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall (Apr-2002)
KC25	pAD5-LpHsfA2.72/73 L2: AtHsfA7b	Lp-HsfA2.72 (aa1-164, LK, L)xAtHsfA7b 21 aa Linker 2 (aa164-188)xHsfA2.73 (VD, 193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfA7b (KC9) into pRTAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall (Apr-2002)
KC26	pAD5-LpHsfA2.72/73 L2: AtHsfC1	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK)xAtHsfC1 7aa Linker2 (aa153-163)xHsfA2.73 (VD, 193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2.72.73 L: AtHsfC1 (KC10) into pRTAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall (Apr-2002)
KC27	pAD5-LpHsfA2 $\Delta$ 7/8	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, 213-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut pRTLpHsfA2 $\Delta$ 7/8 (ET738) into pRTAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall (Apr-2002)
KC28	pRTLpHsfA2 C136A	Lp-HsfA2 (aa1-135, AVD, 140-351)	Ligation of Acc65I, Sall cut PCR mutagenesis fragment (Pr270, Pr1319, Template: pRTLpHsfA2wt (ET345)) in Acc65I, Sall cut pRTLpHsfA2.7 (ET711)
KC29	pRTLpHsfA2.7/8 [HR-A/B: B1.25.26] short: A2 HR:B1	Lp-HsfA2.7 (aa1-136, VD)x LpHsf-B1.25-26 (aa145-211)xHsfA2.8 (VD, 213-351)	Ligation of Sall cut PCR mutagenesis fragment (PrH86, Pr179, Template: pRTLpHsfB1.26 (ET715) in Sall cut pRTLpHsfA2 $\Delta$ 7/8 (ET738)
KC30	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, aa167-351)	Ligation of Sall, XbaI cut PCR mutagenesis fragment (Pr1390, Pr179, pRTLpHsfA2.72 (KC1)) into Sall, XbaI cut LpHsfA2.7 (ET711)
KC31	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, 193-351)	Ligation of AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2.72/73 $\Delta$ 21 (insert) (KC7) into AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector)
KC32	pRTLpHsfA2 $\Delta$ L2 HR-B	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 188-190, VD, 213-351)	Ligation of Sall, XbaI cut pRTLpHsfA2.8 (insert) (ET720) into Sall, XbaI cut pRTLpHsfA2.72/73 $\Delta$ 21 (vector) (KC7)
KC33	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-B	Lp-HsfA2 (aa1-191, VD, $\Delta$ 194-210, aa211-351)	Ligation of Sall, XbaI cut pRTLpHsfA2.73 (KC2) (insert) into Sall, XbaI cut pRTLpHsfA2.8 (ET720) (vector)
KC34	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A $\Delta$ HR-B	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 167-190, VD, 213-351)	Ligation of NcoI, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector) into NcoI, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-B (KC33) (insert)
KC35	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2N-3	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Subclone: Ligation of AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2.72 $\Delta$ 3 (KC4) (insert) into AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector)
KC36	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2N-7	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 174-351)	Subclone: Ligation of AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2.72 $\Delta$ 3 (KC5) (insert) into AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector)
KC37	pRTLpHsfA2 $\Delta$ HR-A L2N-14	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Subclone: Ligation of AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2.72 $\Delta$ 3 (KC6) (insert) into AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector)

KC38	pRTLpHsfA2 ΔHR-A L2N-21	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 188-190, VD, 193-351)	Subclone: Ligation of AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2.72Δ3 (KC7) (insert) into AflIII, XbaI cut pRTLpHsfA2 dHR-A (KC30) (vector)
KC39	pRTLpHsfA2 Δ L2C-7	Lp-HsfA2 (aa1-180, 188-190, VD, 193-351)	Ligation of a linker (hybridised oligos #1537, 1538) into NcoI, Sall cut pRTLpHsfA2.73
KC40	pRT3HA-LpHsfA1	3HA(1-33), VPxLp-HsfA1 (aa23-527)	Ligation of PCR fragment (Template pRT-3HA-LpHsfA2, Pr270, Pr2584) cut XhoI, SacI into pRTdS-GFP-HsfA1 cut XhoI, SacI
KC41	pAD5LpHsfA2.7 C136A	Lp-HsfA2 (aa1-135,AVD, 139-351)	Subclone: Ligation of XhoI, XbaI cut KC28 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC42	pAD5LpHsfA2.7/8 [HR-A/B: B1.25.26]	Lp-HsfA2.7 (aa1-136), VDxLpB1.25-26 (aa145-211), VdxLpHsfA2.8 (aa213-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC29 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC43	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, aa167-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC30 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC44	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, aa167-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC31 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC45	pAD5LpHsfA2 ΔL2 HR-B	Lp-HsfA2 (aa1-164, LK, 188-190, VD, 213-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC32 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC46	pAD5LpHsfA2 ΔHR-B	Lp-HsfA2 (aa1-192, Q193D, Δ194-210, aa211-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC33 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC47	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A ΔHR-B	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 167-190, VD, 213-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC34 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC48	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-3	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC35 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC49	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-7	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 174-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC36 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC50	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-14	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut KC37 into pAD5 cut Sall, AvrII
KC51	pRTdSGFP-LpHsfA2 MM>AA	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa193 MM>AA)	Ligation of SacI/XbaI cut RC72 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC52	pRTdSGFP-LpHsfA2 FL>AA	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa196 IF>AA)	Ligation of SacI/XbaI cut RC73 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC53	pRTdSGFP-LpHsfA2 IF>AA	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa196 IF>KK)	Ligation of SacI/XbaI cut RC74 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC54	pRTdSGFP-LpHsfA2 IF>KK	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa193 MM>AA)	Ligation of SacI/XbaI cut RC75 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC55	pRTdSGFP-LpHsfA2 HR+4	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-168, ARGGA, aa169-351)	Ligation of SacI/XbaI cut RC78 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC56	pRTdSGFP-LpHsfA2 HR+6	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-168, ARGVGA, aa169-351)	Ligation of SacI/XbaI cut RC79 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC57	pRTdSGFP-LpHsfA2 ΔHR-A L2N-3	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Ligation of SacI/XbaI cut KC35 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC58	pRTdSGFP-LpHsfA2 ΔHR-A L2N-7	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 174-351)	Ligation of SacI/XbaI cut KC36 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC59	pRTdSGFP-LpHsfA2 ΔHR-A L2N-14	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170-351)	Ligation of SacI/XbaI cut KC37 into pRTdS-GFPHsfA2 cut SacI/XbaI



KC60	pRTdSGFP-LpHsfA2 ΔHR-A L2N-21	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 188-190, VD, 193-351)	Ligation of SacI/XbaI cut KC38 into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC61	pRTdSGFP-LpHsfA2 ΔL2 C-7	CAT-GFP (aa 1-237)xLp-HsfA2 (aa1-180, 188-190, VD, 193-351)	Ligation of SacI/XbaI cut KC39 into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC62	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-3	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170- 351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC35 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC63	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-7	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 174- 351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC36 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC64	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-14	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 170- 351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC37 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC65	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A L2N-21	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 188- 190, VD, 193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC38 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC66	pAD5LpHsfA2 ΔL2 C-7	Lp-HsfA2 (aa1-180, 188-190, VD, 193-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC39 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC67	*Doubled construct*	-	-
KC68	pAD5LpHsfA2 ΔHR-A dHR-B	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, 167- 190, VD, 213-351)	Ligation of XhoI/XbaI cut KC34 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC69	pAD5LpHsfA2.7	Lp-HsfA2 IE137VD	Ligation of XhoI/XbaI cut ET711 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC70	pAD5LpHsfA2.72	Lp-HsfA2 R167K	Ligation of XhoI/XbaI cut KC1 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC71	pAD5LpHsfA2.73	Lp-HsfA2 Q191D	Ligation of XhoI/XbaI cut KC2 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC72	pAD5LpHsfA2.72.73	Lp-HsfA2 R167K, Q191D	Ligation of XhoI/XbaI cut KC3 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC73	pAD5LpHsfA2.8	Lp-HsfA2 L210V	Ligation of XhoI/XbaI cut ET720 into pRTAD5Δ cut AvrII, Sall
KC74	pRTdSGFP- LpHsfA2.72	Lp-HsfA2 R167K	Ligation of SacI/XbaI cut KC1 into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC75	pRTdSGFP- LpHsfA2.73	Lp-HsfA2 Q191D	Ligation of SacI/XbaI cut KC2 into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC76	pRTdSGFP- LpHsfA2.72.73	Lp-HsfA2 R167K, Q191D	Ligation of SacI/XbaI cut KC3 into pRTdS- GFPHsfA2 cut SacI/XbaI
KC77	pRTLpA2 (LpA1 L2 HR-B)	Lp-HsfA2 (aa1-165, LK)x A1 (aa171-238, VD)x A2 (aa212-351)	Ligation of AflII, Sall cut PCR fragment (tem- plate HsfA1.8xA2.8 (KB72), PrA1.72, Pr179) into AflII, Sall cut KC3
KC78	pRTLpA2 (LpA4b L2 HR-B)	Lp-HsfA2 aa1-165, LK, A4b aa153- 198, VD, A2 aa192-351	Ligation of AflII, Sall cut PCR fragment (tem- plate pRTLeHsfA4b-3HA (SB111), PrA1.72, Pr2143) into AflII, Sall cut KC3
KC79	pRTLpA2 (LeA5 L2 HR-B)	Lp-HsfA2 aa1-165, LK, A5 aa152- 193, VD, A2 aa212-351	Ligation of AflII, Sall cut PCR fragment (tem- plate pRT3HA-LeHsfA5, Pr1643, Pr2175) into AflII, Sall cut KC3
KC80	pRTLpA2 (LpA1 HR- A/B)	Lp-HsfA2 aa1-136, VE, A1 aa167- 238, VD, A2 aa212-351	Ligation of XhoI, Sall cut PCR fragment (tem- plate pRTLp-HsfA1, Pr1638, Pr645) into HsfA2Δ7/8 (ET738) cut Sall
KC81	pRTLpA2 (LeA4b HR-A/B)	Lp-HsfA2 aa1-136, VE, A4b aa127-198, VD, A2 aa212-351	Ligation of XhoI, Sall cut PCR fragment (tem- plate pRTLe-HsfA4b-3HA (SB111), Pr1642, Pr1645

KC82	pRTLpA2 (LeA5 HR-A/B)	Lp-HsfA2 aa1-136, VE, A5 aa126-193, VD, A2 aa212-351	Ligation of Sall cut PCR fragment (template pRT3HA-LeHsfA5 (SB135), Pr1111, Pr1645) into HsfA2 $\Delta$ 7/8 (ET738) cut Sall
KC83	pRTLpA2 M5	Lp-HsfA2 M5 (R85D)	Ligation of BclI, NcoI cut PCR (P1626, P565, ET644) into pRT-LpHsfA2 (ET345) cut BclI, NcoI
KC84	pRT3HA-LeA4b.7	*Frame shifted*	Failed strategy due to unknown Sall site
KC85	pRT3HA-LeA4b.8	*Frame shifted*	Failed strategy due to unknown Sall site
KC86	pRTLpA2.8xLeA4b.8	Not detectable	Ligation of PCR fragment (template pRTLeHsfA4b-3HA (SB111), Pr1644, Pr179) cut Sall, XbaI into pRTLp-HsfA2.8 (ET720)
KC87	pMBI1-LpA2 M2	Lp-HsfA2 M2 (KRR119QST)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA2 M2 (RL107) into pMBI1 cut AvrII, Sall
KC88	pMBI1-LpA2 M5	Lp-HsfA2 M5 (R85D)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA2 M5 (KC83) into pMBI1 cut AvrII, Sall
KC89	pMBI1-LpA2 $\Delta$ HR-A	Lp-HsfA2 (aa1-136, VD, LK, aa167-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA2 $\Delta$ HR-A (KC32) into pMBI1 cut AvrII, Sall
KC90	pMBI1-LpA2 $\Delta$ L2	Lp-HsfA2 (aa1-165, LK, 188-190, VD, 191-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA2 $\Delta$ L2 (KC7) into pMBI1 cut AvrII, Sall
KC91	pMBI1-LpA2 $\Delta$ HR-B	Lp-HsfA2 (aa1-191, VD, $\Delta$ 194-210, aa211-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA2 $\Delta$ HR-B (KC33) into pMBI1 cut AvrII, Sall
KC92	pAD5-LpA1 M5	Lp-HsfA1 M5 (R95D)	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA1 M5 (KB265) into pAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall
KC93	pAD5-LpA1 M5 $\Delta$ C394	Lp-HsfA1 $\Delta$ C394	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA1 $\Delta$ C394 (ET325) into pAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall
KC94	pAD5-LpA1 AHA hepta A	Lp-HsfA1 AHA 7 <sup>a</sup>	Ligation of XhoI, XbaI cut pRTLp-HsfA1 M5 (PD188) into pAD5 $\Delta$ cut AvrII, Sall
KC95	pRT3HA-LeA4b.7xLpA2.7	*Frame shifted*	Failed strategy due to unknown Sall site
KC96	pRTLpA2.7xLeA4b.7	Not detectable	Ligation of PCR fragment (template pRTLeHsfA4b-3HA (SB111), Pr1640, Pr179) cut Sall, XbaI into pRTLp-HsfA2.7 (ET711)
KC97	pRT3HA-LeA4b.8xLpA2.8	*Frame shifted*	Failed strategy due to unknown Sall site
KC98	pRTLpA2xA1 C-term. DBD L1xA2 CTD	LpA2 (aa1-74), PR, LpA1 (aa109-152), VD, LpA2 (aa139-351)	Cloning of AvrII, NcoI cut PCR amplified fragment of pRTLpA1.71xA2.7 (KB71) into AvrII, NcoI cut vector backbone pRTLpA2 (ET745)
KC99	pRTLpA2dHR-AxLpA1.72	Lp-HsfA2 (aa1-136), VDLK, Lp-HsfA1 (aa183-521)	Cloning of Afill, XbaI cut PCR fragment into Afill, XbaI cut pRTLpA2 dHR-A (KC30)
KC100	pRTLp-HsfA1 $\Delta$ HR-A	Lp-HsfA1 (aa1-152), VDLK, Lp-HsfA1 (aa183-521)	Cloning of Sall, XbaI cut fragment of pRTLpA2dHR-AxLpA1.72 into Sall, XbaI cut vector backbone pRTLpA1.71 (KB70)
KC101	pRT-3HA-HsfA1	3HA-Lp-HsfA1 (aa23-351)	Ligation of NcoI, SacI cut PCR fragment (Template pRT3HA-HsfA2 (MH3), Pr270, Pr2584) into NcoI, SacI cut pRTdSGFP-HsfA1
KC102	pRT-3HA-HsfA2	3HA-Lp-HsfA2 (aa1-351)	Ligation of NcoI, SacI cut pRT-3HA-HsfA1 (KC101) into NcoI, SacI cut 3HA-HsfA2 (MH3)

KC103	pRTLpA1 (A2 HR-A/B)	Lp-HsfA1 (aa1-166, x A2 aa137-210, VDx A1 aa240-521)	Ligation of XhoI, NcoI cut pRTLpA1.71xA2.7 (KB71) into XhoI, NcoI cut pRTLpA2.8xA1.8 (KB122)
KC104	pRTLpA2 (K152N)	Lp-HsfA2 (K152N)	1. Megaprimer PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr1840, PrH8), 2. Cloning PCR (template pRT-LpHsfA2, Megaprimer, P179), 3 Cloning via NcoI, XbaI into pRT-LpHsfA2
KC105	pRTLpA2 (R166N)	Lp-HsfA2 (R166N)	1. Megaprimer PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr1841, PrH8), 2. Cloning PCR (template pRT-LpHsfA2, Megaprimer, P179), 3 Cloning via NcoI, XbaI into pRT-LpHsfA2
KC106	pRTLpA2 (K189N)	Lp-HsfA2 (K189N)	1. Megaprimer PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr272, Pr1842), 2. Cloning PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Megaprimer), 3 Cloning via XhoI, NcoI into pRT-LpHsfA2
KC107	pRTLpA2 (K189P)	Lp-HsfA2 (K189P)	1. Megaprimer PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr272, Pr1843), 2. Cloning PCR (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Megaprimer), 3 Cloning via XhoI, NcoI into pRT-LpHsfA2
KC108	pRTLpA1xA2 N-term DBD fusion	Lp-HsfA1 (23-75, PR)xLpHsfA2 (aa74-351)	Ligation of XhoI, SphI cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA1, Pr270, RevPrA1 Spl) into pRT-LpHsfA2 SphI (RC11)
KC109	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 3/7)	Lp-HsfA2 (aa1-170, LK, aa174-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr1845) into XhoI, AflIII cut KC8
KC110	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 3/14)	Lp-HsfA2 (aa1-170, LK, aa181-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr1845) into XhoI, AflIII cut KC9
KC111	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 3/21)	Lp-HsfA2 (aa1-170, LK, aa189-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr1845) into XhoI, AflIII cut KC10
KC112	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 7/14)	Lp-HsfA2 (aa1-174, LK, aa181-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr1808) into XhoI, AflIII cut KC9
KC113	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 7/21)	Lp-HsfA2 (aa1-174, LK, aa189-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr1808) into XhoI, AflIII cut KC10
KC114	pRTLpA2 $\Delta$ L2 ( $\Delta$ 14/21)	Lp-HsfA2 (aa1-181, LK, aa189-351)	Ligation of XhoI, AflIII cut PCR fragment (template pRT-LpHsfA2, Pr270, RevPrA2d14) into XhoI, AflIII cut KC10
KC115	pADLpA1wt CTD (aa266-521)	Lp-HsfA1 (aa266-521)	Ligation of BamHI, XbaI cut pRT-LpHsfA1 (ET206) into BamHI, XbaI cut pAD-Gal4
KC116	pADLpA1 $\Delta$ C491 CTD (aa266-491)	Lp-HsfA1 (aa266-521)	Ligation of BamHI, XbaI cut pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C491 (ET321) into BamHI, XbaI cut pAD-Gal4
KC117	pADLpA1 $\Delta$ C394 CTD (aa266-394)	Lp-HsfA1 (aa266-394)	Ligation of BamHI, XbaI cut pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C394 (ET325) into BamHI, XbaI cut pAD-Gal4

KC118	pADLpA1 $\Delta$ 6/2 CTD (aa)	Lp-HsfA1 (aa266-319, VD, aa449-521)	Ligation of BamHI, XbaI cut pRT-LpHsfA1 $\Delta$ C394 (ET325) into BamHI, XbaI cut pAD-Gal4
KC119	pRTLpA2.72.3	Lp-HsfA2 (QQ168LK)	Ligation of XhoI, AflII cut KC109 into XhoI, AflII cut KC7
KC120	pRTLpA2.72.7	Lp-HsfA2 (TR172LK)	Ligation of XhoI, AflII cut KC112 into XhoI, AflII cut KC8
KC121	pRTLpA2.72.14	Lp-HsfA2 (MG179LK)	Ligation of XhoI, AflII cut KC114 into XhoI, AflII cut KC9
KC122	pRTLpA2.72.21	Lp-HsfA2 (QE186LK)	Ligation of XhoI, AflII cut PCR fragment (template pRT-Lp-HsfA2, Pr270, Pr2030) into XhoI, AflII cut KC10
KC123	pRTLpA2 DBD helix1 LpA1 exchange	Lp-HsfA2 (aa1-23, PY)xA1 (aa36-75, PR)xA2 (aa74-351)	Ligation of SphI, NcoI cut PCR fragment (template KC108, FwPrA1Spl, PrH8) into pRT-Lp-HsfA2 SphI (RC11)
KC124	pRTLpA2 [L2:LpA1]	Lp-HsfA2 (aa1-165, LK)x A1 (aa171-194, VD)x A2 (aa192-351)	Ligation of AflII, Sall cut PCR fragment (template HsfA1, PrA1.72, Pr2143) into AflII, Sall cut KC3
KC125	pRTLpA2 [L2:LeA4b]	Lp-HsfA2 (aa1-165, LK)xA1 (aa153-174, VD)xA2 (aa191-351)	Ligation of AflII, Sall cut PCR fragment (template HsfA4b, Pr1643, Pr2175) into AflII, Sall cut KC3
KC126	pRTLpA2 (HR:A1)	Lp-HsfA2 (aa1-136, VE)xA1 (aa167-238, VD)xA2 (aa212-351)	Ligation of XhoI, XbaI cut PCR fragment (template Lp-HsfA1.8xA2.8 (KB72), Pr1638, Pr179) into Sall, XbaI cut Lp-HsfA2.7 (ET711)
KC127 Bear1	pRTLpA1 (aa23-30), GL, LpA2 (aa25-351)	Lp-HsfA1 (aa23-30, GL)xA2 (aa25-351)	Triple Ligation of PCR fragments (1) cut XhoI, StuI (template pRT-LpHsfA1, Pr270, Pr2228), (2) cut StuI, XbaI (template pRT-LpHsfA2, Pr2226, Pr179) into pRT-LpHsfA2 cut XhoI, XbaI
KC128 Bear2	pRTLpA1 (aa23-51), ST, LpA2 (aa46-351)	Lp-HsfA1 (aa23-51, ST)xA2 (aa46-351)	Triple Ligation of PCR fragments (1) cut XhoI, Sall (template pRT-LpHsfA1, Pr270, Pr2232), (2) cut Sall, XbaI (template pRT-LpHsfA2, Pr2230, Pr179) into pRT-LpHsfA2 cut XhoI, XbaI
KC129 Bear3	pRTLpA2 (aa1-22), GL, LpA1 (aa33-51), ST, LpA2 (aa46-351)	Lp-HsfA2 (aa1-22, GL)xA1 (aa33-51, ST)xA2 (aa46-351)	Triple Ligation of PCR fragments (1) cut XhoI, StuI (template Lp-HsfA2, Pr270, 2227), (2) cut StuI, XbaI (template KC108, Pr2228, Pr179) into pRT-LpHsfA2 cut XhoI, XbaI
KC130 Bear4	pRTLpA2 (aa1-44), ST, LpA1 (aa54-79), PR, LpA2 (aa74-351)	Lp-HsfA2 (aa1-44, ST)xA1 (aa54-79, PR)xA2 (aa74-351)	Triple Ligation of PCR fragments (1) cut XhoI, Sall (template pRT-LpHsfA2, Pr270, Pr2230), (2) cut Sall, XbaI (template KC108, Pr2232, Pr179) into pRT-LpHsfA2 cut XhoI, XbaI

## 6.1 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Chan
Vorname	Kwan Yu
Geburtsdatum	12. Februar 1976
Geburtsort	Hongkong (China)
Geschlecht	männlich
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Anschrift	Schönbornstraße 29 D-63075 Offenbach am Main
Telefon	069-86007489
E-Mail	k.y.chan@web.de

### Bildungsweg

Grundschule	1982 - 1989 Mathildenschule, Offenbach/Main
Gymnasium	1989 - 1996 Leibniz Gymnasium, Offenbach/Main Abschluss: „Allgemeine Hochschulreife“, Gesamtnote: 2,4
Studium	1997 - 2002 Studium der Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Schwerpunkte: Genetik, Ökologie, Biochemie und Physiologie von Pflanzen Diplomarbeit: „Charakterisierung der für die hetero- oligomere Hsf-Hsf Interaktion verantwortlichen Region im Hitzestress transkriptionsfaktor A2 aus <i>Lycopersicon peruvianum</i> “ in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ unter Anleitung von Prof. Dr. Lutz Nover. Abschluss als Diplombiologe, Gesamtnote: 1,8
Promotionsstudium	2002 - 2007 Promotion an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ unter Anleitung von Prof. Dr. Lutz Nover

### Publikationen

Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.-D., Tripp J., Weber C., Zielinski D. und von Koskull-Döring P (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* 29:471–487

Baniwal S.K., Chan K.Y., Scharf, K.-D. und Nover, L. (2007). Role of the heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *J. Biol. Chem.* 282 (6): 3605-3613

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in erster Linie bei Professor Dr. Lutz Nover und Dr. Klaus-Dieter Scharf bedanken, die diese Arbeit betreut und ermöglicht haben und durch ihre kritischen Diskussionen und konstruktiven Anregungen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich vor allem Daniela Bublak und Gisela English für die großartige Unterstützung im Labor und die Vermittlung ihres wertvollen Laborwissens. Dr. Kapil Bharti, der bereits meine Diplomarbeit betreute, danke ich für die Unterstützung am Anfang meiner Promotion. Ohne die Inspiration und die gute Zusammenarbeit mit meinem Kollegen und Freund Dr. Sanjeev Kumar Baniwal wären viele interessante Ideen erst gar nicht entstanden, dafür möchte ich mich ganz besonders bei ihm bedanken.

Außerdem danke ich allen wunderbaren Mitarbeitern des ersten Labors: Dr. Shравan Kumar Mishra, Felix Bärenz, Dirk Zielinski, Dierk Freihen und Ellen Leich. Danken möchte ich auch der übrigen Arbeitsgruppe Sachin Kotak, Franziska Schramm, Dr. Christian Weber und den vielen Praktikumsstudenten, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und den wichtigen Erfahrungsaustausch während meiner Doktorandenzeit gesorgt haben.

Dr. Markus Fauth und Dr. Pascal von-Koskull Döring danke ich für die äußerst wertvolle Unterstützung in Computerfragen und konstruktiven sowie interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.

Meiner Lebensgefährtin Caroline Schaminet, die mich in den Höhen und Tiefen während dieses besonderen Abschnitts meines Lebens begleitet und mich orthographisch beim Verfassen der Arbeit unterstützt hat, danke ich von tiefstem Herzen. Auch Beatrix Habermann, die ebenfalls die Dissertation bearbeitet hat, möchte ich sehr herzlich danken.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation

„Funktionelle Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen HsfA1 und  
HsfA2 aus *Lycopersicon esculentum*“

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 19. April 2007