

**Komplementationsstudien der *cpd*-Mutante und  
Analyse der CPD-Interaktionspartner mittels reverser Genetik**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Marcel Lafos**

aus Frechen

Köln 2005

Berichterstatter: Prof. Dr. George Coupland  
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2006

*Et kütt, wie et kütt.*

(rheinische Redensart)

# I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	I
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	IV
	<b>Abstract / Kurz-Zusammenfassung</b> .....	VII
1.	<b>Einleitung</b> .....	1
	Zielsetzung .....	13
2.	<b>Material und Methoden</b> .....	14
2.1	<b>Material</b> .....	14
2.1.1	Chemikalien .....	14
2.1.2	Labor- und Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.3	Geräte und Zubehör .....	15
2.1.4	Antibiotika und Herbizide .....	15
2.1.5	Pflanzenhormone und Inhibitoren .....	16
2.1.6	Enzyme .....	16
2.1.6.1	Restriktionsendonucleasen .....	16
2.1.6.2	DNA-Polymerasen und reverse Transkriptasen .....	16
2.1.6.3	DNA-modifizierende Enzyme .....	16
2.1.6.4	Weitere Enzyme .....	17
2.1.7	Antikörper .....	17
2.1.7.1	Primärantikörper .....	17
2.1.7.2	Sekundärantikörper .....	17
2.1.7.3	Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper .....	17
2.1.8	Bakterienstämme .....	17
2.1.9	Pflanzenmaterial .....	18
2.1.10	Oligonucleotide .....	18
2.1.11	Plasmide .....	18
2.1.12	Lösungen, Medien und Puffer .....	19
2.1.12.1	Allgemeine Stammlösungen .....	19
2.1.12.2	Lösungen und Puffer zur Arbeit mit Nucleinsäuren und Proteinen .....	20
2.1.12.2.1	Lösungen und Puffer zur Restriktionsspaltung von DNA .....	20
2.1.12.2.2	Ligations-Puffer .....	21
2.1.12.2.3	Lösungen zur Phenolisierung .....	21
2.1.12.2.4	Lösungen zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	21
2.1.12.2.5	Lösungen zur DIG-Southern-Blot-Analyse .....	21
2.1.12.2.6	Lösungen für das alkalische Mini-Lysat .....	22
2.1.12.2.7	Lösungen zur Plasmid-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	22
2.1.12.2.8	Lösungen zur Schnellpräparation von Pflanzen-DNA zur PCR Analyse .....	22
2.1.12.2.9	Lösungen zur DNA Präparation mittels der CTAB-Methode .....	22
2.1.12.2.10	Lösungen zur Pflanzen-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	23
2.1.12.2.11	Lösungen zur Pflanzen-RNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	23
2.1.12.2.12	Lösungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	23
2.1.12.2.13	Puffer zur DNA- und Protein-Gelelektrophorese .....	23
2.1.12.2.14	Puffer zur Proteinreinigung .....	24
2.1.12.2.14.1	Puffer zur Präparation von pflanzlichen Proteinen .....	24
2.1.12.2.14.2	Puffer zur Präparation GST-markierter Proteine .....	24
2.1.12.2.14.3	Puffer zur Präparation HIS-tag-fusionierter Proteine .....	25
2.1.12.2.14.4	Puffer zur Präparation MBP-markierter Proteine .....	25

2.1.12.2.15	Lösungen zur Western-Blot-Analyse .....	25
2.1.12.3	Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit Bakterien .....	25
2.1.12.4	Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit <i>A. thaliana</i> -Pflanzen .....	26
2.1.13	Aufbau der Koncz-T-DNA-Population .....	28
2.2	<b>Methoden</b> .....	29
2.2.1	Arbeiten mit Nucleinsäure und Proteinen .....	29
2.2.1.1	Methoden zur Klonierung von DNA-Fragmenten .....	29
2.2.1.1.1	DNA-Sequenzierung .....	29
2.2.1.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	30
2.2.1.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.2.1.1.4	Präparation von DNA aus Agarosegelen .....	30
2.2.1.1.5	Phenol-Chlorophorm-Extraktion .....	30
2.2.1.1.6	DNA-Präzipitation mit Ethanol .....	30
2.2.1.1.7	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA .....	30
2.2.1.1.8	5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA .....	31
2.2.1.1.9	Vorbereitung von DNA-Fragmenten zur Klonierung .....	31
2.2.1.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	31
2.2.1.1.11	Allgemeine Klonierungsstrategien .....	31
2.2.1.2	DNA-Präparations-Methoden .....	32
2.2.1.2.1	Analytische Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. Coli</i> .....	32
2.2.1.2.2	Plasmid-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	32
2.2.1.2.3	Schnellpräparation von Pflanzen-DNA .....	32
2.2.1.2.4	DNA-Präparation mittels der CTAB-Methode .....	33
2.2.1.2.5	DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	33
2.2.1.2.6	RNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten .....	33
2.2.1.2.7	RNA-Präparation mit Hilfe des <i>Qiagen-RNeasy-Kits</i> .....	34
2.2.1.2.8	Herstellung von cDNA zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR .....	34
2.2.1.3	DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	34
2.2.1.3.1	Standard-PCR zur spezifischen DNA-Amplifikation .....	34
2.2.1.3.1.1	Thermocyclerprogramme .....	34
2.2.1.3.1.2	Reaktionsansätze .....	35
2.2.1.3.2	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zur Expressionsanalyse .....	35
2.2.1.3.3	Inverse PCR (iPCR) zur Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen .....	35
2.2.1.4	Genomische Southern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden .....	36
2.2.1.4.1	Restriktionsspaltung genomischer DNA .....	36
2.2.1.4.2	Gelelektrophorese .....	36
2.2.1.4.3	Immobilisierung der DNA auf Nylon-Membranen – <i>Southern-Transfer</i> .....	36
2.2.1.4.4	Sonden-Synthese .....	37
2.2.1.4.5	Hybridisierung der Filter mit DIG-markierten Sonden .....	37
2.2.1.4.6	Detektion mit einem DIG-spezifischen Antikörper, CSPD-Substrat und Röntgenfilm .....	37
2.2.1.5	Western-Blot-Analyse .....	37
2.2.1.5.1	Protein-Präparation aus Pflanzen .....	37
2.2.1.5.2	Protein-Präparation aus <i>E. coli</i> .....	38
2.2.1.5.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen – <i>SDS-PAGE</i> .....	38
2.2.1.5.4	Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen – <i>Western Blot</i> .....	38
2.2.1.5.5	Detektion von Membran-gebundenen Proteinen .....	38
2.2.2	Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	39
2.2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i> -Bakterien .....	39
2.2.2.2	Lagerung von <i>E. coli</i> -Bakterien .....	39
2.2.2.3	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	39
2.2.2.4	Transformation elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA .....	39
2.2.3	Arbeiten mit <i>A. tumefaciens</i> .....	40
2.2.3.1	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> -Bakterien .....	40
2.2.3.2	Lagerung von <i>A. tumefaciens</i> -Bakterien .....	40

2.2.3.3	Präparation kompetenter Zellen von <i>A. tumefaciens</i> .....	40
2.2.3.4	Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA .....	40
2.2.3.5	Plasmid-DNA-Präparation aus <i>A. tumefaciens</i> .....	40
2.2.4	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
2.2.4.1	Allgemeine Anzuchtbedingungen .....	41
2.2.4.1.1	Anzucht von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen auf Erde .....	41
2.2.4.1.2	Anzucht von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen <i>in vitro</i> .....	41
2.2.4.1.3	Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> -Samen .....	41
2.2.4.2	Pflanzentransformation mit Agrobakterien .....	41
2.2.4.2.1	Anzucht von <i>A. thaliana</i> zur Infiltration .....	41
2.2.4.2.2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> zur Infiltration .....	41
2.2.4.2.3	Transformation von <i>A. thaliana</i> mit <i>A. tumefaciens</i> .....	42
2.2.4.2.4	Samenernte von Pflanzen der T <sub>0</sub> -Generation und Selektion der transgenen Pflanzen in der T <sub>1</sub> -Generation .....	42
2.2.4.3	Kreuzungen von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen und Selektion von Doppelmutanten .....	42
2.2.4.3.1	Kreuzen von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen .....	42
2.2.4.3.2	Isolation von Doppelmutanten .....	43
2.2.4.4	Hormon- und Wachstums-Experimente mit <i>A. thaliana</i> -Pflanzen .....	43
2.2.4.4.1	Wachstumsexperimente mit <i>A. thaliana</i> -Keimlingen .....	43
2.2.4.4.2	Behandlung von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen mit <i>Brassinolid</i> und $\beta$ - <i>Östradiol</i> .....	43
2.2.4.5	Herstellung von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten aus Suspensionskulturen .....	44
2.2.4.6	$\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Färbung von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen .....	44
2.2.5	Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population .....	44
2.2.6	Confocale Laser-scanning-Mikroskopie .....	45
2.2.7	Elektronische Datenverarbeitung und bioinformatische Ressourcen .....	45
3.	<b>Ergebnisse</b> .....	47
3.1	Die <i>A. thaliana cpd</i> -Mutante .....	47
3.1.1	Phänotyp der <i>A. thaliana cpd</i> -Mutante .....	47
3.1.2	Komplementation der <i>A. thaliana cpd</i> -Mutante .....	50
3.1.2.1	Herstellung der Komplementationskonstrukte .....	51
3.1.2.1.1	Das konstitutive <i>CPD-GFP</i> -Expressionskonstrukt: „35S::CPD-GFP“ .....	52
3.1.2.1.2	Das nativ-Promotor <i>CPD-GFP</i> -Expressionskonstrukt: „nP::CPD-GFP“ .....	52
3.1.2.1.3	Das induzierbare <i>CPD-GFP</i> -Konstrukt: „iP::CPD-GFP“ .....	52
3.1.2.2	Isolierung und phänotypische Analyse von Transformanten der Komplementationskonstrukte .....	53
3.1.2.3	Biochemische Komplementation der <i>cpd</i> -Mutante durch exogene <i>Brassinolid</i> -Gabe .....	58
3.1.3	Lokalisation des CPD-Proteins aus <i>A. thaliana</i> .....	62
3.1.3.1	Zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins .....	62
3.1.3.1.1	Analyse der CPD-Lokalisation mittels GFP-Fluoreszenz .....	63
3.1.3.1.2	Analyse der CPD-Lokalisation mittels differentieller Zentrifugation und Western-Blot-Analyse .....	67
3.1.3.2	Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1-Proteins und des CPD-Proteins <i>in planta</i> .....	68
3.1.3.3	Lokalisation des CPD-Proteins <i>in planta</i> .....	72
3.1.4	Induzierbare Expression der CPD-GFP-Fusion .....	74
3.1.4.1	Kontrollexperimente zur Verwendung des durch $\beta$ - <i>Östradiol</i> induzierbaren Expressionssystems in <i>A. thaliana</i> .....	75
3.1.4.2	Induzierbare Expression der CPD-GFP-Fusion in der <i>cpd</i> -Mutante .....	79
3.2	Isolierung von <i>A. thaliana</i> -Nullmutanten für die CPD-Interaktionspartner aus den Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien .....	85
3.2.1	Die CPD-Interaktionspartner sind Mitglieder von Proteinfamilien in <i>A. thaliana</i> .....	85

3.2.2	Isolierung von T-DNA-Mutanten aus der Koncz- und der SALK-T-DNA-Population .....	88
3.2.2.1	Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population nach <i>iap</i> -, <i>obp</i> - und <i>mapk</i> -T-DNA-Mutanten. ....	88
3.2.2.1.1	Identifikation bestimmter T-DNA-Insertionen in der Koncz-T-DNA-Population .....	88
3.2.2.2	Hygromycin-Segregationsanalysen der identifizierten Koncz-T-DNA-Linien .....	90
3.2.2.3	Analyse und Identifikation der <i>iap</i> - und <i>obp</i> -SALK-T-DNA-Linien .....	92
3.2.2.4	Übersicht der identifizierten T-DNA-Insertionen .....	94
3.2.3	Verifizierung der isolierten T-DNA-Mutanten mittels Southern-Blot- und Expressions-Analysen .....	95
3.2.3.1	Genomische Southern-Blot-Analysen der identifizierten Koncz- und SALK-T-DNA-Linien .....	95
3.2.3.1.1	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>iap1-1</i> - und <i>iap1-2</i> -Mutante .....	97
3.2.3.1.2	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp1-1</i> -Mutante .....	99
3.2.3.1.3	Genomische Southern-Blot Analyse der <i>iap2-1</i> -Mutante .....	100
3.2.3.1.4	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp2-1</i> -Mutante .....	102
3.2.3.1.5	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>mapk1-1</i> -Mutante .....	103
3.2.3.1.6	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp3-1</i> -Mutante .....	105
3.2.3.2	Expressionsanalysen der isolierten T-DNA-Mutanten mittels RT-PCR .....	107
3.2.3.2.1	Analyse der <i>OBP1</i> -Expression in der <i>obp1-1</i> -Mutante mittels RT-PCR .....	107
3.2.3.2.2	Analyse der <i>IAP1</i> -Expression in der <i>iap1-1</i> -Mutante mittels RT-PCR .....	109
3.2.3.2.3	Analyse der <i>IAP2</i> -, <i>OBP2</i> - und <i>MAPK1</i> -Expression in der entsprechenden <i>iap2-1</i> -, <i>obp2-1</i> - bzw. <i>mapk1-1</i> -Mutante mittels RT-PCR .....	109
3.2.4	Generation von <i>obp</i> -Mutanten mittels konstitutiver und induzierbarer <i>dsRNAi</i> -Konstrukte .....	111
3.3	Phänotypische Analysen der homozygoten T-DNA-Linien .....	112
3.3.1	Phänotypen der homozygoten T-DNA-Mutanten .....	112
3.3.2	Hormonbehandlungen der homozygoten Mutanten .....	115
3.3.3	Expressionsanalyse der CPD-Interaktoren mittels Promotor-GUS-Fusionen .....	117
3.4	Kreuzungsexperimente mit den isolierten, homozygoten Mutanten und den nP::CPD-GFP-Linien .....	124
3.4.1	Kreuzungen der nP::CPD-GFP-Linien mit Mutanten der CPD-Interaktoren .....	124
3.4.2	Generation von Doppelmutanten der CPD-Interaktionspartner .....	127
4.	<b>Diskussion</b> .....	131
4.1	Die Komplementation der <i>cpd</i> -Mutante belegt die Funktionalität des CPD-GFP-Fusionsproteins .....	131
4.2	Die zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins und ihre Bedeutung für die Brassinosteroid-Biosynthese und Signaltransduktion .....	132
4.3	Die gewebespezifische Lokalisation des CPD-Proteins – CPD als Markerenzym für die <i>Brassinolid</i> -Biosynthese? .....	134
4.4	Das CPD-Protein ist auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene reguliert .....	135
4.5	<i>Brassinolid</i> wird kontinuierlich während der gesamten Pflanzenentwicklung als Wachstumssignal benötigt .....	136
4.6	Die Rolle und die Position des CPD-Proteins in der Brassinosteroid-Biosynthese und Signaltransduktion .....	137
4.7	Die lokale, genetische Komplementation der <i>cpd</i> -Mutante ermöglicht die Analyse des Steroidtransports <i>in planta</i> .....	140
4.8	Beurteilung der T-DNA-Populationen und der <i>Screening</i> -Methoden .....	142
4.9	Identifikation homozygoter Mutanten mittels Southern-Analysen .....	143

4.10	Sind alle T-DNA-Mutanten Nullmutanten? .....	143
4.11	Phänotypische Analyse der isolierten T-DNA-Mutanten .....	145
4.11.1	Die <i>iap2-1</i> -Mutante ist hypersensitiv gegenüber <i>Brassinolid</i> .....	145
4.11.2	Die OBP-Proteine aus <i>A. thaliana</i> zeigen überlappende Funktionen .....	147
4.12	Stellt die <i>dsRNAi</i> -Technologie eine Alternative zur T-DNA-Mutagenese dar? .....	148
4.13	Kreuzungsexperimente .....	148
4.14	Expressionsanalysen mittels Promotor:: <i>GUS</i> -Konstrukten .....	149
4.15	Der <i>IAP1</i> -Promotor wird positiv durch <i>Brassinolid</i> , negativ durch ABA reguliert .....	151
4.16	<b>Zusammenfassung</b> .....	152
4.17	<b>Ausblick</b> .....	154
5.	<b>Literatur</b> .....	155
6.	<b>Anhang</b> .....	169
6.1	Geräte und Zubehör .....	169
6.2	Vector-Karten .....	170
6.3	Oligonucleotide .....	174
6.4	Southern-Analyse von <i>PstI</i> -gesplattener DNA verschiedener SALK-T-DNA-Linien .....	179
6.5	Rohdaten des PCR- <i>Screenings</i> der Koncz T-DNA-Population .....	179
6.5.1	Ergebnis des <i>iap1-Screening</i> .....	180
6.5.2	Ergebnis des <i>iap2-Screening</i> .....	180
6.5.3	Ergebnis des <i>obp1-Screening</i> .....	180
6.5.4	Ergebnis des <i>obp2-Screening</i> .....	181
6.5.5	Ergebnis des <i>mapk1-Screening</i> .....	183
6.6	Ergebnis des Einzelpflanzen- <i>Screenings</i> der SALK-T-DNA-Linien .....	184
6.7	Grenz-Sequenzen der T-DNA-Insertionen .....	185
6.8	Reinigung des MBP-OBP1-HIS-Fusionsproteins .....	189

# Abbildungsverzeichnis

## Einleitung

Abb.1.1:	Strukturformeln des Pflanzenhormons <i>Brassinolid</i> und von Brassinosteroid-biosyntheseinhibitoren .....	3
Abb.1.2:	Vorhergesagtes Syntheschema der Brassinosteroidbiosynthese in <i>A. thaliana</i> .....	5

## Material und Methoden

Abb.2.1:	<i>Pooling</i> -Schema zur Herstellung der Superpools der Koncz-T-DNA-Population .....	28
Abb.2.2:	Zusammensetzung der Superpools der Koncz-T-DNA-Population .....	29
Abb.2.3:	Inhibition des Wurzelwachstums durch <i>Brassinolid</i> und <i>epiBrassinolid</i> .....	44

## Ergebnisse

Abb. 3.1:	Phänotyp der <i>A. thaliana cpd</i> -Mutante in unterschiedlichen Entwicklungsstadien .....	48
Abb. 3.2:	Vergleich des Rosettendurchmessers der <i>dwf4</i> -, der <i>cpd</i> - und der <i>bri1</i> -Mutante .....	48
Abb. 3.3:	Phänotypischer Vergleich der <i>cpd</i> -Mutante mit <i>det2</i> , <i>bri1-5</i> und <i>AOD4</i> .....	49
Abb. 3.4:	Phänotypen von Brassinosteroidsynthese- bzw. Signaltransduktionsmutanten im Licht, im Dunkeln sowie auf Hochsteroidmedium .....	49
Abb. 3.5:	GUS-Färbung der CPD::GUS-Linien .....	50
Abb. 3.6:	CPD-Komplementationskonstrukte .....	51
Abb. 3.7:	Phänotyp der mit dem nativ-Promotorkonstrukt komplementierten <i>cpd</i> -Mutante .....	54
Abb. 3.8:	Phänotypen einiger Primärtransformanten (T <sub>1</sub> ) des konstitutiven Komplementationskonstrukts „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ .....	55
Abb. 3.9:	Segregationsanalysen der komplementierten <i>cpd</i> -Linien in der T <sub>2</sub> -Generation .....	56
Abb. 3.10:	Segregationsanalysen der komplementierten <i>cpd</i> -Linien in der T <sub>3</sub> -Generation .....	57
Abb. 3.11:	Phänotyp der komplementierten <i>cpd</i> -Linie „nP::CPD-GFP 13-1“ in der T <sub>3</sub> -Generation .....	58
Abb. 3.12:	Biochemische Komplementation der <i>cpd</i> -Mutante durch exogene Gabe des Pflanzenhormons <i>Brassinolid</i> .....	59
Abb. 3.13:	Teilkomplementation der <i>cpd</i> -Mutante durch zeitlich begrenzte Gabe des Pflanzenhormons <i>Brassinolid</i> .....	60
Abb. 3.14:	Komplementation der <i>cpd</i> -Mutante durch die exogene Gabe des Pflanzenhormons <i>Brassinolid</i> .....	61
Abb. 3.15:	Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Protoplasten .....	63
Abb. 3.16:	Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Zellen der <i>A. thaliana</i> -Suspensionskultur .....	64
Abb. 3.17:	Phänotyp eines fünf Tage alten Keimlings der Linie „35S-K“ .....	65
Abb. 3.18:	Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Wurzelspitzenzellen junger <i>A. thaliana</i> -Keimlinge .....	66
Abb. 3.19:	Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins mittels differentieller Zentrifugation .....	68
Abb. 3.20:	Analyse der Lokalisation des BRI1-GFP-Fusionsproteins .....	69
Abb. 3.21:	Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1-GFP- und des CPD-GFP-Fusionsproteins <i>in planta</i> .....	70
Abb. 3.22:	Lokalisation einiger unabhängiger GFP-Fusionsproteine in <i>A. thaliana</i> -Keimlingen .....	71
Abb. 3.23:	<i>In planta</i> Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins .....	72

Abb. 3.24:	Struktureller Vergleich der Steroid-Hormone $\beta$ -Östradiol und <i>Brassinolid</i> .....	74
Abb. 3.25:	Testinduktion der, mit dem $\beta$ -Östradiol induzierbaren Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-kan“ transformierten <i>A. thaliana</i> -Suspensionskultur .....	75
Abb. 3.26:	Behandlung der Brassinosteroidbiosynthesemutanten <i>cpd</i> und <i>det2</i> mit den Steroiden $\beta$ -Östradiol und <i>Brassinolid</i> .....	76
Abb. 3.27:	Segregationsanalyse der, mit dem $\beta$ -Östradiol induzierbaren Konstrukt transformierten Wildtyp-Pflanzen .....	77
Abb. 3.28:	Induktion transgener Pflanzen auf $\beta$ -Östradiol-haltigen Agarplatten .....	78
Abb. 3.29:	Induktion transgener, in Flüssigkultur angezogener, Pflanzen mit $\beta$ -Östradiol .....	78
Abb. 3.30:	Segregationsanalyse der, mit dem $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Konstrukt transformierten <i>cpd</i> -Pflanzen .....	79
Abb. 3.31:	Komplementation der <i>A. thaliana cpd</i> -Mutante durch die, mit $\beta$ -Östradiol induzierte Expression der CPD-GFP-Fusion .....	80
Abb. 3.32:	Hypokotylvergleich der in Abbildung 3.32 gezeigten Pflanzen .....	81
Abb. 3.33:	Lokal begrenzte Induktion der Expression der <i>CPD-GFP</i> -Fusion durch Applikation einer $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpaste .....	82
Abb. 3.34:	Die lokal begrenzte Induktion des iP::GUS-Konstrukts belegt den <i>in planta</i> -Transport des $\beta$ -Östradiols .....	83
Abb. 3.35:	Homologie-Stammbäume der OBP- und IAP-Proteinfamilien aus <i>A. thaliana</i> .....	86
Abb. 3.36:	Sequenzvergleich der IAP-Ring-Domänen .....	86
Abb. 3.37:	Sequenzvergleich der <i>At</i> OBPs mit den homologen <i>Hs</i> OSHs .....	87
Abb. 3.38:	Identifikation einer T-DNA-Insertion im <i>IAP2</i> -Gen .....	89
Abb. 3.39:	Ergebnisse des PCR-Screenings der Koncz-T-DNA-Population .....	90
Abb. 3.40:	Analyse der Hygromycinsegregation der identifizierten Koncz-T-DNA Linien .....	91
Abb. 3.41:	Genotypisierung der Einzelpflanzen der SALK- <i>iap2</i> -, <i>obp4</i> - und <i>obp5</i> -Linien .....	93
Abb. 3.42:	Positionen der identifizierten T-DNA-Insertionen .....	94
Abb. 3.43:	Struktur der Koncz- und SALK-T-DNAs .....	96
Abb. 3.44:	Struktur des genomischen <i>IAP1</i> -Locus .....	97
Abb. 3.45:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>iap1-1</i> - und <i>iap1-2</i> -Mutante .....	98
Abb. 3.46:	Struktur des genomischen <i>OBP1</i> -Locus .....	99
Abb. 3.47:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp1-1</i> - bzw. <i>obp1-2</i> Mutante .....	100
Abb. 3.48:	Struktur des genomischen <i>IAP2</i> -Locus .....	101
Abb. 3.49:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>iap2-1</i> -Mutante .....	101
Abb. 3.50:	Struktur des genomischen <i>OBP2</i> -Locus .....	102
Abb. 3.51:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp2-1</i> -Mutante .....	103
Abb. 3.52:	Struktur des genomischen <i>MAPK1</i> -Locus .....	104
Abb. 3.53:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>mapk1-1</i> -Mutante .....	104
Abb. 3.54:	Struktur des genomischen <i>OBP3</i> -Locus .....	105
Abb. 3.55:	Genomische Southern-Blot-Analyse der <i>obp3-1</i> -Mutante .....	106
Abb. 3.56:	RT-PCR-Analyse der <i>obp1-1</i> - und <i>iap1-1</i> -Mutante .....	108
Abb. 3.57:	RT-PCR Analyse der <i>iap2-1</i> -, <i>obp2-1</i> - und <i>mapk1-1</i> Mutante .....	110
Abb. 3.58:	Übersicht der <i>dsRNAi</i> -Konstrukte .....	111
Abb. 3.59:	Phänotypischer Vergleich der isolierten, homozygoten T-DNA-Mutanten .....	112
Abb. 3.60:	Phänotypischer Vergleich adulter Pflanzen der isolierten T-DNA-Mutanten .....	113
Abb. 3.61:	Gesamthöhe der analysierten T-DNA-Linien .....	113
Abb. 3.62:	Vergleich der Wurzel- und Hypokotyllängen der homozygoten T-DNA-Mutanten .....	114
Abb.3.63:	Vergleich der relativen Wurzellängen der CPD- und DWF4-Überexpressionslinien mit der <i>iap2-1</i> -Mutante .....	115
Abb. 3.64:	Inhibition des Wurzelwachstums auf Hochsteroidmedium .....	116
Abb. 3.65:	Segregationsanalyse der Promotor::GUS-Fusionen .....	117
Abb. 3.66:	GUS-Färbung der <i>OBP</i> ::GUS-Linien 186 und 91 .....	118
Abb. 3.67:	Expressionsanalyse der <i>IAP1</i> -, <i>IAP2</i> - und <i>MAPK1</i> -Gene mittels Promotor::GUS-Fusionen .....	119
Abb. 3.68:	GUS-Färbung älterer Pflanzen der <i>IAP1</i> -, <i>IAP2</i> - und <i>OBP1</i> -Promotor::GUS-Linien .....	120

Abb. 3.69:	Analyse der <i>IAP1</i> -Expression nach Hormonbehandlung mittels der Promotor:: <i>GUS</i> -Fusion .....	121
Abb. 3.70:	Analyse der ABA- und BL-Interaktion bei der Regulation der <i>IAP1</i> -Expression .....	122
Abb. 3.71:	Analyse der <i>IAP2</i> - und <i>MAPK1</i> -Expression nach Hormonbehandlung mittels der Promotor:: <i>GUS</i> -Fusionen .....	123
Abb. 3.72:	Analyse der nP:: <i>CPD</i> - <i>GFP</i> -Transformanden .....	125
Abb. 3.73:	Erwartete Segregationen in der F <sub>3</sub> -Generation .....	126
Abb. 3.74:	Segregationsanalysen der <i>iap1-1</i> - bzw. <i>iap2-1</i> -Kreuzung mit der <i>cpd/nP</i> :: <i>CPD</i> - <i>GFP</i> -Linie, nP94 .....	127
Abb. 3.75:	Kreuzungen der isolierten T-DNA-Mutanten .....	128
Abb. 3.76:	PCR-Analyse von F <sub>2</sub> -Einzelpflanzen aus den Kreuzungen der <i>iap</i> - und <i>obp</i> -T-DNA-Mutanten .....	129
Abb. 3.77:	PCR-Analyse von F <sub>3</sub> -Einzelpflanzen aus den Kreuzungen der <i>iap</i> - und <i>obp</i> -T-DNA-Mutanten .....	129
Abb. 3.78:	Bestätigung der Doppelmutanten mittels RT-PCR .....	130

## Anhang

Abb. 6.2.1:	Herstellung des Vektors pER8(XVE)-kan .....	174
Abb. 6.4.1:	Genomische Southern-Analyse nach <i>Pst</i> I-Restriktionsspaltung.....	179
Abb. 6.5.1:	Identifikation einer T-DNA-Insertion im <i>OBP1</i> -Gen .....	181
Abb. 6.5.2:	Identifikation einer T-DNA-Insertion im <i>OBP2</i> -Gen .....	182
Abb. 6.5.3:	Identifikation einer T-DNA-Insertion im <i>MAPK</i> -Gen .....	184
Abb. 6.6.1:	PCR-Analyse der SALK-Einzelpflanzen .....	185
Abb. 6.8.1:	Reinigung des MBP-OBP1-HIS-Fusionsproteins aus <i>E. coli</i> .....	189

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	Abszisionsäure
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ACC	1-Amino-1-Carboxy-Cyclopropan
AMP	Adenosin-5'-Mono-Phosphat
AS	Aminosäure(n)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-Tri-Phosphat
ATPase	Adenosin-Tri-Phosphatase
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BASTA	Herbizid (Glufosinat)
BastaR	BASTA-Resistenzmarker
BL	<i>Brassinolid</i>
bp	Basenpaare
BR	Brassinosteroid
BRZ	<i>Brassinazol</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Bq	Becquerel
C	Cytosin
C°	Grad Celsius
ca.	circa
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (Blumenkohl Mosaikvirus)
<i>COL</i>	<i>Columbia</i> ( <i>A. thaliana</i> -Ökotyp)
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
CsCl	Cäsiumchlorid
CTP	Cytidin-5'-Tri-Phosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
2,4-D	2,4-Di-Chlor-Phenoxy-Essigsäure
ddNTP	di-desoxy-ribo-Nucleosid-Tri-Phosphat
dd	de-ionisiert
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DEPC	Di-Ethyl-Pyro-Carbonat
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
DNA	Desoxy-Ribo-Nucleinsäure
Dnase	Desoxy-Ribo-Nuclease
dNTP	desoxy-ribo-Nucleosid-Tri-Phosphat
dsDNA	doppelstängige DNA
DTT	Di-Thio-Threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
F <sub>x</sub>	Filialgeneration (x)
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GS	Glutathion-Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde(n)
HIS	HIS-tag, Histidin-Epitope
hyg	Hygromycin (Antibiotikum)
hygR	Hygromycin-Resistenzmarker
IAA	Indol-3-Essigsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Iso-Propyl-Thio-Galaktosid
JA	Methyl-Jasmonat
kan	Kanamycin
kanR	Kanamycin-Resistenzmarker
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
LacZ	$\beta$ -Glucosidasegen aus <i>E. coli</i>
m	milli
M	molar
MBP	Maltose-bindendes Protein
MES	4-Morpholino-Ethan-Sulfonsäure
MW	Molekulargewicht
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	micromolar
$\mu$ m	Micrometer
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
N	beliebige Base (A, C, G, T, U)
nm	Nanometer
nt	Nucleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit (T-Test)
p.a.	pro analysi
PAGE	<i>poly acrylamid gel electrophoresis</i>
POD	Peroxidase
pBS	pBluescript-Vektor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
<i>pfu</i>	<i>plaque forming units</i>
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pp	Poly-Propylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolyprrolidon
RACE	" <i>rapid amplification of cDNA ends</i> "

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp	single plant / Einzelpflanze
SSC	<i>standard saline citrate</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSDNA	Heringssperm DNA (salmonsperm DNA)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat (40 mM); EDTA (1 mM)
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
TE	Tris-HCl (10 mM); EDTA (1 mM)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris-(Hydroxy-Methyl)-Amino-Methan
u	<i>units</i> , Enzymeinheit, 1 u = Enzymmenge die bei 25°C unter optimalen Bedingungen 1 µmol Substrat/min. umsetzt
Ub	Ubiquitin
UDP	Uridin-Di-Phosphat
ü.N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
<i>WS</i>	<i>Wassilewskija (A. thaliana-Ökotyp)</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indonyl-β-D-Glucuronid
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren (AS):

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

## A b s t r a c t

Conditional complementation of the *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) mutant could clarify the indispensable role of brassinosteroids in plant development. Complementation of *cpd* demonstrated that a CPD-GFP protein fusion was functional and complementation was observed when the fusion construct was placed under the control of the endogenous *CPD* promoter or the constitutive CaMV-35S promoter. The resultant transgenic plants were used for cellular and tissue specific localization of the CPD protein. The CPD protein was localized to the ER-membrane, as determined by detection of CPD-GFP fusion protein fluorescence and confirmed by western blot analysis after differential centrifugation of cellular extracts. Biochemical complementation assays demonstrated that brassinosteroids are continuously needed throughout plant development. Furthermore, it could be demonstrated that *in planta* steroid transport occurs using a  $\beta$ -estradiole inducible expression system. This was achieved in the *cpd* background using a  $\beta$ -estradiole inducible CPD-GFP complementation construct and confirmed using an independent  $\beta$ -estradiole inducible GUS reporter construct in wildtype plants. The study of the  $\beta$ -estradiole-inducible construct revealed a non-homogenous distribution of  $\beta$ -estradiole *in planta* after the local application of a  $\beta$ -estradiole-containing lanolin paste. Local complementation of *cpd* leads to simultaneous growth stimulation in the entire plant, suggesting transport of *brassinosteroids* or a transducer signal. Several putative CPD interaction partners, including the OBP (OXYSTEROL BINDING PROTEIN) and the IAP (RING-finger E3 Ligase) proteins were characterized. Genetic analysis of the IAP partners led to the identification of an *iap2-1* knockout mutant, which carries a T-DNA insertion in the coding region of the gene. The mutant displays increased root growth on control medium, which is comparable to the phenotype of CPD-overexpressor lines. The *iap2-1* mutant is hypersensitive to *brassinolide* when placed on high-steroid medium. This suggests that endogenous steroid levels are altered or modified signal transduction occurs. These results are in agreement with the postulated function of IAP proteins in controlling the stability of CPD. It remains to be resolved whether IAP2 is involved in direct regulation of CPD or other components of brassinosteroid signal transduction pathway. The reverse-genetic analysis of five OBP genes did not lead to a typical steroid deficient phenotype. Analysis of the OBP gene family indicates functional redundancy, similar to that observed for the homologous yeast OSH proteins. The analysis of double mutants of the CPD interaction partners will yield a better picture of their function.

## K u r z - Z u s a m m e n f a s s u n g

Anhand von Komplementationstudien der *cpd*-Mutante konnte die Funktionalität eines CPD-GFP-Fusionsproteins *in planta* demonstriert werden. Die Komplementation erfolgte unter Kontrolle des endogenen *CPD*-Promotors und unter Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promotors. Die transgenen Pflanzen wurden zur zellulären und gewebespezifischen Lokalisation des CPD-Proteins verwendet. Die Lokalisation des CPD-Proteins an der ER-Membran konnte sowohl über die Detektion der GFP-Fluoreszenz des generierten CPD-Fusionsproteins als auch mit einer Westen-Blot-Analyse eines differentiell zentrifugierten Zellextrakts bestätigt werden. Konditionale Komplementationstudien der *cpd*-Mutante verdeutlichen die wichtige Rolle von Brassinosteroiden bei der Pflanzenentwicklung. Durch konditionale, biochemische Komplementationen wurde demonstriert, daß Brassinosteroide kontinuierlich während der Pflanzenentwicklung benötigt werden. Durch die konditionale genetische Komplementation der *cpd*-Mutante mit einem  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Komplementationskonstrukt und der Verwendung eines unabhängigen, induzierbaren GUS-Reporterkonstruktes war es möglich einen Steroidtransport *in planta* nachzuweisen. Anhand des induziebaren GUS-Konstruktes wurde die inhomogene  $\beta$ -Östradiol-Verteilung nach der lokal begrenzten Applikation mit  $\beta$ -Östradiol-haltiger Lanolinpaste gezeigt. Verschiedene Studien belegen den Transport des  $\beta$ -Östradiols. Die entsprechende lokale Komplementation der *cpd*-Mutante hat eine ganzheitliche Reaktion der Pflanze gezeigt, was einen Transport des Syntheseendprodukts *Brassinolid* oder eines nachgeschalteten Signals belegt. Die Analyse der CPD-Interaktionspartner über reverse Genetik hat zur Identifikation der *iap2-1*-Mutante geführt, die eine T-DNA-Insertion in einem, für ein Ringfingerprotein-codierendes Gen trägt. Die Mutante weist einen vergleichbaren Phänotyp wie *CPD*-Überexpressionslinien auf, die auf Kontrollmedium ein verstärktes Wurzelwachstum entwickeln. Die *iap2-1*-Mutante zeigt auf Hochsteroidmedium eine hypersensitive Reaktion gegenüber *Brassinolid*, was auf einen veränderten, endogenen Steroidgehalt oder eine modulierte Signaltransduktion hindeutet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der postulierten Funktion des IAP2-Ringfingerproteins, das als E3-Ubiquitin-Ligase an der Regulation der CPD-Proteinstabilität beteiligt sein kann. Es bleibt aber offen, ob IAP2 an der direkten Regulation des CPD-Proteins oder einer anderen Komponente der Brassinosteroidsignaltransduktion beteiligt ist. Die Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten in fünf OBP-Genen hat nicht zur Identifikation eines Steroidphänotyps geführt. Damit zeichnet sich eine redundante Funktionalität innerhalb der OBP-Proteinfamilie aus *A. thaliana* ab, wie sie z. B. bei den homologen OSH-Proteinen in Hefe beobachtet wurde ab. Analysen von Doppel- und Mehrfachmutanten der CPD-Interaktionspartner und insbesondere der *obp*-Mutanten werden ein genaueres Bild der IAP und OBP-Funktion geben.

# 1. Einleitung

Die Identifikation verschiedener *A. thaliana*-Zwergmutanten stellt eine Basis für die Beschreibung des Pflanzen-Hormones *Brassinolid* dar. Vor zehn Jahren wurden zwei Mutanten, „*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*“ (*cpd*, Szerkeres *et al.*, 1996) und „*brassinosteroid insensitive1*“ (*bril*, Clouse *et al.*, 1996), beschrieben, die einen außergewöhnlichen Zwergphänotyp aufweisen. Beide repräsentieren zwei Klassen von Brassinosteroidmutanten. Die *cpd*-Mutante weist eine Defekt in der Brassinosteroidbiosynthese auf, *bril* in der Brassinosteroidsignaltransduktion. Es stellt sich zum einen heraus, daß die *bril*-Mutante, wie auch der Wildtyp auf die Pflanzen-Hormone Auxin (AUX), Cytokinin (CYT), Ethylen (ETH), Abszissinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA) reagiert. Sie ist zum andern gegenüber *Brassinolid*, dem Endprodukt der Brassinosteroidbiosynthese *in planta*, insensitiv. Daher wurde das BRI1-Protein als Brassinosteroidrezeptor beschrieben (Clouse *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist die *cpd*-Mutante sensitiv gegenüber *Brassinolid*, sie reagiert auf die exogene Applikation des Steroidhormons mit gesteigertem Streckenwachstum.

Bei der *A. thaliana cpd*-Mutante handelt es sich um eine T-DNA-Mutante, die wegen ihres Phänotyps, dem Zwergwuchs und der konstitutiven Photomorphogenese im Dunkeln entdeckt wurde. Die T-DNA-Insertion (pPCV5013Hyg) im *CPD*-Gen führt zur Nullmutation. Das *CPD*-Gen codiert für ein Protein der Cytochrom-P450-Familie, dem CYP90A1. Dabei handelt es sich um eine C23-Steroidhydroxylase, die im Rahmen der Brassinosteroidbiosynthese die Umwandlung von *Cathasteron* (CT) in *Teasteron* (TE) katalysiert. Dies wurde durch Fütterungsexperimente mit verschiedenen *Brassinolid*-Synthesestufen eindeutig belegt. Dabei konnte die *cpd*-Mutante erst mit *Teasteron* (TE) und späteren Intermediaten sowie dem Endprodukt, *Brassinolid*, biochemisch komplementiert werden (Szerkeres *et al.*, 1996).

Nach der *cpd*-Mutante wurde eine Vielzahl weiterer Brassinosteroidbiosynthesemutanten isoliert: *dwf4* (Azpiroz *et al.*, 1998; Choe *et al.*, 1998), *cbb1/dim/dwfl* (Feldmann und Marks, 1987; Feldmann *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1995; Kauschmann *et al.*, 1996; Klahre *et al.*, 1998; Choe *et al.*, 1999), *dwf7/ste1* (Choe *et al.*, 1998), *det2/dwf6* (Chory *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; Noguchi *et al.*, 1999), *dwf5* (Choe *et al.*, 2000). Die genannten Mutanten zeigen einen deutlichen Zwergphänotyp, der in der Ausprägung variiert, aber in allen Fällen zu verkürzten Organen führt. Die *cpd*-Mutante hat von den Biosynthesemutanten den stärksten Phänotyp, der die größte Ähnlichkeit zu dem der Rezeptormutante *bril* aufweist. Dieser Phänotyp wird hauptsächlich durch eine verminderte Zell-Elongation verursacht, die an mikroskopischen Schnitten von Sprossen, Hypokotylen und Blättern beobachtet werden kann (Szerkeres *et al.*, 1996; Kauschmann *et al.*, 1996; Azpiroz *et al.*, 1998). Die Wirkung der verminderten Zell-Elongation wird aber nicht nur an der reduzierten Gesamthöhe deutlich, sondern auch an der verkürzten Blattlänge, dem geringeren Durchmesser der Samen und den verkürzten Antheren.

Letzteres wirkt sich besonders auf die Selbstbestäubung und die dadurch verringerte Samenproduktion aus, was aber nicht zur Sterilität führt (Choe *et al.*, 1999). Ein weiterer phänotypischer Aspekt der Brassinosteroidsynthesemutanten ist die stark dunkelgrüne Färbung im Vergleich zum Wildtyp. Auch dieser Effekt ist auf die verminderte Zell-Elongation zurückzuführen, da anhand der *dim/dwf1*-Mutante gezeigt wurde, daß die gleiche Anzahl von Chloroplasten pro Zelle vorliegen und auch das Verhältnis von Chlorophyll a zu b dem des Wildtyps entspricht (Takahashi *et al.*, 1995). Damit erklärt sich die dunklere Färbung der Zwergpflanzen aus einer höheren Chlorophyll-Dichte, die sich ergibt, wenn in kleineren, nicht elongierten Zellen die gleiche Anzahl ausdifferenzierter Chloroplasten vorliegt.

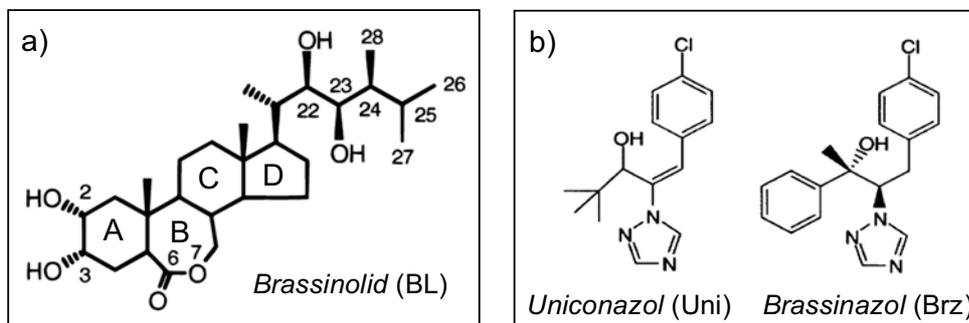
Die Brassinosteroidbiosynthesemutanten zeigen auch phänotypische Aspekte, die nicht auf eine verminderte Zell-Elongation zurückzuführen sind und weitere Einflüsse der Brassinosteroide auf die Pflanzenentwicklung deutlich machen. Bei im Dunkeln angezogenen Pflanzen findet die Ausdifferenzierung der Chloroplasten nicht statt. Unter Lichtabschluß zeigen Wildtyp-Pflanzen eine verkürzte Wurzel und eine verstärkte Elongation des Hypokotyls, das einen Hypokotylhaken mit geschlossenen Kotyledonen bildet. Die undifferenzierten Chloroplasten werden als Etioplasten, der gesamte Prozess als Etiolierung bezeichnet. Im Gegensatz dazu haben Brassinosteroidmutanten wie *dwf4*, *cpd* oder *bri1* einen deutlich abweichenden Phänotyp. Bei der Anzucht im Dunkeln weisen sie einen vergleichbaren Phänotyp wie im Licht gewachsene Pflanzen auf. Es tritt zwar eine Elongation des Hypokotyls auf, jedoch kein geschlossener Hypokotylhaken, die Kotyledonen sind gespreizt. Man spricht von De-Etiolierung oder konstitutiver Photomorphogenese. Entsprechend wurden die, aufgrund dieses Phänotyps, gefundenen Mutanten als „*de-etiolation*“ (*det2*) oder „*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*“ (*cpd*) benannt.

Darüber hinaus beeinflussen Brassinosteroide noch weitere Prozesse der Pflanzenentwicklung. Die *dim/dwf1*-Mutante zeigt z. B. eine um wenige Tage verzögerte Entwicklung (Takahashi *et al.*, 1995), was einen Einfluss von Brassinosteroiden auf Prozesse, die das Einsetzen der Seneszenz auslösen wahrscheinlich macht (Clouse und Sasse, 1998). Der Einfluss von Brassinosteroiden auf die Reifung der Tomaten-Fruchtwand (Perikarp) wurde von Vardhini *et al.* (2002) berichtet. Es konnte auch eine Auswirkung auf andere morphologische Aspekte gezeigt werden. Sprosse der *dwf7*-Mutante weisen eine veränderte Anzahl und Anordnung der Leitbündel auf (Choe *et al.*, 1999). Eine positive Wirkung von Brassinosteroiden auf die Ausdifferenzierung von Tracheen-Gliedern des Wasserleitgewebes (Xylem) konnte in Mesophylzellen von *Zinnia elegans* beobachtet werden (Yamamoto *et al.*, 2001). Als weiteres Beispiel ist die Hypersensitivität der *det2*- und der *bri1*-Mutante gegenüber ABA bei der Keimung zu nennen. Daraus kann auf eine Beteiligung von Brassinosteroiden an der Durchbrechung der Samenruhe geschlossen werden (Steber und McCourt, 2001).

Generell zeigen die beobachteten Effekte bei den Biosynthesemutanten, daß Brassinosteroide an der Regulation der Pflanzenentwicklung beteiligt sind, dabei das Pflanzenwachstum weitestgehend durch die positive Wirkung auf die Zell-Elongation beeinflussen. Dies wird durch eine Beobachtung noch deutlicher nämlich, daß exogen appliziertes *Brassinolid* einerseits zur Inhibition des Wurzelwachstums, andererseits zu einer Streckung des Hypokotyls führt. Dabei fällt auf, daß der

Effekt auf das Wurzelwachstum konzentrationsabhängig ist, bei hoher Brassinosteroidkonzentration ( $10^{-7}\text{M}$ ) erfolgt eine Inhibition des Wurzelwachstums auf eine Wurzellänge von ca. 50 %, bei der Applikation geringster Mengen ( $10^{-14}\text{M}$ ) zeigen sogar Wildtyppflanzen eine Zunahme der Wurzellänge auf ca. 160% (Clouse *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001). Die gegensinnige Reaktion verschiedener Organe – wie der Wurzel oder des Hypokotyls – auf das gleiche Hormonsignal verdeutlicht, in welcher Weise ein Hormon Einfluss auf die Pflanzenentwicklung nehmen kann.

Neben der Analyse von Biosynthesemutanten und deren Komplementation durch exogene Steroidapplikation kann die Rolle von Brassinosteroiden in der Pflanzenentwicklung auch durch die Behandlung mit Syntheseinhibitoren (Abb.1.1) nachvollzogen werden (Asami *et al.*, 2003). Verschiedene Studien haben spezifische Inhibitoren z. B. *Triazol*-Derivate wie *Brassinazol* (Brz) oder *Uniconazol* (Uni) beschrieben, die die Aktivität von CYP-P450-Steroidhydroxylasen wie DWF4 und CPD inhibieren (Sekimata *et al.*, 2001). Der betroffene Schritt der Synthese konnte erneut durch die exogene Applikation von Syntheseintermediaten in Kombination mit dem Inhibitor eingegrenzt werden (Asami und Yoshida, 1999). Darüber hinaus war es möglich, die direkte Bindung von *Brassinazol* und anderen *Triazol*-Derivaten an das DWF4-Protein *in vitro* zu zeigen (Asami *et al.*, 2001, 2003). *A. thaliana*-Pflanzen, die mit *Brassinazol* oder verwandten *Triazol*-Derivaten behandelt wurden, weisen typische Brassinosteroidphänotypen auf. Das *Brassinazol* bewirkt eine Inhibition des Wurzel- und des Hypokotylwachstums, wie es bei den Biosynthesemutanten beobachtet wird (Min *et al.*, 1998; Sekimata *et al.*, 2002). Wird aber parallel dazu *Brassinolid* appliziert, fällt der Effekt des *Brassinazol* deutlich geringer aus (Sekimata *et al.*, 2001). Vergleichbare Effekte wurden auch bei der Verwendung von *Spirolacton* (Spi), einem spezifischen Inhibitor der humanen 17- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD), beobachtet (Asami *et al.*, 2004). Die Studien mit BL-Syntheseinhibitoren haben nicht nur den Effekt der Brassinosteroide auf die Zell-Elongation betätigt, sondern auch den Phänotyp der im Dunkeln angezogenen Brassinosteroidmutanten und damit die De-Etiolierung, wie sie bei *cpd* oder *dwf4* beobachtet wurde (Sekimata *et al.*, 2001; Asami *et al.*, 2004). Auch die Beteiligung von Brassinosteroiden an der Regulation bei der Bildung und Ausdifferenzierung des sekundären Xylems konnte in *Lepidium sativum* gezeigt werden (Nagata *et al.*, 2001)



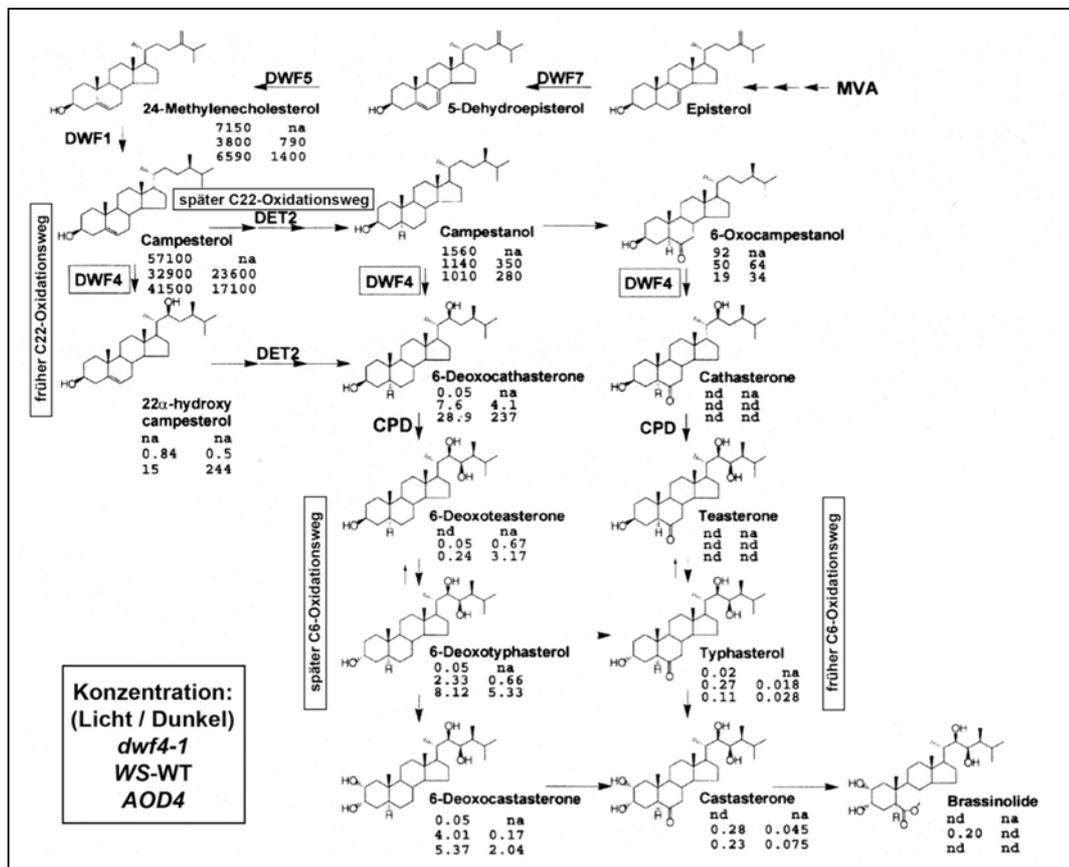
**Abb.1.1:** Strukturformeln des Pflanzenhormons *Brassinolid* und von *Brassinosteroid*-biosyntheseinhibitoren. In **a**) ist die Strukturformel von *Brassinolid* (BL), abgebildet. Die Positionen der funktionalen Gruppen sind anhand der Nummerierung der Kohlenstoffatome des Steroid-Grundgerüsts (1 – 28) angegeben, die vier Ringe werden als A, B, C, D bezeichnet. Die Strukturformeln zweier *Triazol*-Derivate, die eine inhibierende Wirkung auf verschiedene Biosyntheseenzymen der Cytochrom-P450-Familie aufweisen sind in **b**) zu sehen. Bild a) wurde nach Back *et al.* (2000), Bild b) nach Sekimata *et al.* (2001) verändert.

Anhand der isolierten Biosynthesemutanten war es möglich, ein Syntheschema (Abb1.2) der Brassinosteroidbiosynthese aufzustellen. Auf die Position der Mutanten innerhalb der Biosynthese konnte durch biochemische Komplementationsexperimente geschlossen werden. Anhand der Analyse, mit welchen Intermediaten eine Komplementation der isolierten Biosynthesemutante auftrat, war es möglich den betroffenen Schritt der Synthese einzugrenzen, in einigen Fällen auch genau zu identifizieren (Szerkeres *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1998). Die Sequenzanalyse der betroffenen Gene in den Biosynthesemutanten hat eindeutige Homologien zwischen den Brassinosteroid-spezifischen Enzymen aus *A. thaliana* und bekannten Steroidsyntheseenzymen aus anderen Organismen, wie *S. cerevisiae* und *H. sapiens*, aufgezeigt. Die *A. thaliana*-Proteine DWF1 (C24-Oxidoreduktase), DWF5 (C7-Reduktase), DWF7 (C5-Desaturase), CPD (C23-Steroidhydroxylase) und DWF4 (C22-Steroidhydroxylase) weisen – entsprechend ihrer Proteinfunktion – konservierte Histidin-Cluster (Desaturasen), Flavin-Adenin-Dinucleotid-(FAD)-Bindedomänen (Oxidoreduktasen) oder Häm-Bindedomänen bei den Vertretern der Cytochrom-P450-Familie, auf (Szerkeres *et al.*, 1996, Choe *et al.*, 1998, 1999a, 1999b, 2000). Den direkten Beleg dafür, daß ein Enzym aus *A. thaliana* eine Reaktion der Steroidbiosynthese katalysiert, haben heterologe Komplementationsstudien gegeben (Li *et al.*, 1997). Durch die heterologe Komplementation der *A. thaliana det2*-Mutante mit einer humanen 5 $\alpha$ -Steroidreduktase in Kombination mit der Beobachtung, daß das pflanzliche Enzym bei der heterologen Expression in humanem Gewebe tierische Steroide reduzieren konnte, ist der Nachweis erbracht, daß pflanzliche Enzyme die gleiche Funktion ausüben können.

In Ergänzung zu den biochemischen Komplementationsexperimenten wurde der Brassinosteroidgehalt verschiedener Mutanten mittels Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie bestimmt. Diese Analysen haben weitestgehend die zuvor bestimmten Positionen der Syntheseenzyme in der Biosynthese bestätigt. Entsprechend den Erwartungen wurden in den Biosynthesemutanten akkumulierende Syntheseintermediate gefunden. Der Ablauf der Synthese hat sich aber nicht als lineare Synthesekette bestätigt. Es gibt parallele Synthesewege, die zum gleichen Endprodukt *Castasteron* (CS) bzw. *Brassinolid* (BL) führen. Je nachdem, in welcher Reihenfolge einzelne, enzymatische Reaktionen stattfinden, spricht man vom frühen oder späten C22- bzw. C6-Oxidationsweg (Choi *et al.*, 1997; Fujioka *et al.*, 2002). Im gezeigten Syntheschema sind diese Parallelwege zu sehen, stellvertretend sind auch die ermittelten Konzentrationen einiger Intermediate angegeben. In der ausgewählten Studie ist der Steroidgehalt des Wildtyps mit dem zweier Brassinosteroidmutanten, einer Biosynthesemutante *dwf4* und einer *DWF4*-Überexpressionslinie (*AOD4*) verglichen worden. Die Analyse von Choe *et al.* (2001) konnte bestätigen, daß in der Biosynthesemutante Vorstufen des betroffenen Schritts akkumulieren, deren Konzentration in der Überexpressionslinie verringert sind. Das Syntheschema zeigt auch, daß für einige Syntheseschritte – insbesondere für die späten Schritte, die zum Endprodukt führen – noch keine Mutanten identifiziert wurden.

Die Analysen des Steroidgehaltes haben aber auch überraschende Ergebnisse geliefert. So konnten neben den erwarteten Syntheseintermediaten auch neue Intermediate identifiziert werden. In der *dwf5*- und der *dwf7*-Mutante wurde *7-Dehydro-Campestanol* detektiert, das im Wildtyp nicht

nachweisbar ist (Choe *et al.* 1999, 2000). Die Bedeutung solcher alternativen Intermediate und Endprodukte wird noch erforscht. Da aber verschiedene Brassinosteroidmutanten eine unterschiedlich starke Ausprägung des Zwergphänotyps zeigen, ist eine Bioaktivität solcher Intermediate anzunehmen. Erste Ergebnisse dieser Art berichten Hong *et al.* (2005), die eine Reismutante „*br-deficient dwarf2*“ (*brd2*) identifiziert haben, die wiederum ein alternatives Endprodukt *Dolichosteron* (DC) akkumuliert. *Dolichosteron* besitzt eine hohe, strukturelle Ähnlichkeit zu *Castasteron* (CS), der direkten Vorstufe von *Brassinolid* (BL).



**Abb.1.2:** Vorhergesagtes Syntheschema der Brassinosteroidbiosynthese in *A. thaliana*. Die Abbildung zeigt das postulierte Syntheschema der Brassinosteroidbiosynthese in *A. thaliana*, ausgehend von Mevalonat (MVA) über Episterol und verschiedenen Intermediate hin zum Endprodukt *Brassinolid* (BL). Das Schema zeigt unterschiedliche parallele Synthesewege, die mit frühem bzw. spätem C22- bzw. C6-Oxidationsweg bezeichnet werden. Darüber hinaus sind für einige der Umwandlungsreaktionen die Namen der katalysierenden Enzyme (DWF7, DWF5, DWF1, DET2, DWF4 und CPD) angegeben. Die Enzymnamen beziehen sich auf die beschriebenen *A. thaliana*-Nullmutanten (*dwf7*, *dwf5*, *dwf1*, *det2*, *dwf4* und *cpd*). Für einige Intermediate und das Endprodukt, *Brassinolid*, sind die gemessenen Konzentrationen in der *A. thaliana dwf4-1*-Mutante, der *DWF4*-Überexpressionslinie (*AOD4*) und des *WS*-Wildtyps im Licht und im Dunkeln angegeben. Die Konzentrationen sind in ng / g (Frischgewicht) angegeben. Die Abbildung wurde nach Choe *et al.* (2001) verändert.

Die bisher beschriebenen Steroidmutanten haben alle sehr deutliche Zwergphänotypen gezeigt, die identifizierten Proteinfunktionen werden jeweils von nur einem Gen codiert. Für einige der späteren Syntheseschritte konnten Mutanten identifiziert werden, die aber nur sehr schwache Zwergphänotypen aufweisen, da für einige dieser Syntheseschritte Isoenzyme vorliegen. Die Enzyme CYP85A1 und

CYP85A2 katalysieren beide die Umsetzung von *6-Deoxo-Castasteron* zu *Castasteron*. Jedoch war es nur möglich, für CYP85A2 die finale Umwandlung die Baeyer-Villiger Oxidation von *Castasteron* zu *Brassinolid* zu belegen (Kim *et al.* 2005). Die überlappende Funktion der Proteine wird mit der Analyse der *cyp85a1*- und *cyp85a2*-Mutante deutlich. Beide haben, im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Brassinosteroidmutanten, einen sehr schwachen Zwergphänotypen, die Doppelmutante *cyp85a1/cyp85a2* zeigt jedoch einen sehr deutlichen Zwergphänotyp. Da der Effekt beider Mutationen additiv ist, belegt dies, daß beide codierten Proteine eine gemeinsame Funktion ausüben.

In Tomate liegt eine vergleichbare Situation vor, es wurden auch zwei Enzyme, CYP85A1 und CYP85A3, identifiziert. Für diese Enzyme wurden Unterschiede in der gewebespezifischen Verteilung festgestellt: CYP85A3 tritt ausschließlich in Tomatenfrüchten, nicht in vegetativen Geweben auf (Nomura *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnten in *A. thaliana* noch zwei weitere Enzyme CYP90C1/ROTUNDIFOLIA3 und CYP90D1 beschrieben werden, die an der Brassinosteroidbiosynthese beteiligt sind (Kim *et al.*, 1998, 1999). CYP90C1/ROT3 katalysiert die Umwandlung von *Typhasterol* zu *Castasteron*, die genaue Reaktion die von CYP90D1 katalysiert wird ist nicht bekannt (Kim *et al.*, 2005). Auch Mutanten diesen beiden Enzyme weisen keine deutliche Größenreduktion auf. In Analogie zu der zuvor beschriebenen *cyp85a1/cyp85a2*-Doppelmutante weist auch die *cyp90c1/cyp90d1*-Doppelmutante einen deutlichen Zwergphänotyp auf. CYP90D1 gehört zu einer *A. thaliana*-Proteinfamilie die aus drei CYP90D-Proteinen besteht. Die überlappende Funktionalität der CYP85A-, CYP90C- und CYP90D-Proteine hat die Analysen sehr erschwert und erklärt natürlich, warum diese Mutanten erst relativ spät identifiziert wurden. Es zeigt sich ein grundsätzliches Bild, nach dem die letzten Syntheseschritte von vielen redundanten Enzymen katalysiert werden. Zum einen ermöglicht dies – wie am Beispiel der gewebespezifischen Expression des CYP85A3-Proteins in Tomate beschrieben – eine lokale und variable Regulation der Steroidverteilung. Zum anderen erschwert es die Analytik dieser Prozesse, ohne die Analyse von Mehrfachmutanten kann die Funktionalität dieser Proteine nicht erforscht werden.

Wie das Beispiel der CYP85A-Proteine zeigt, ist das Vorkommen von Brassinosteroiden und die Analyse von Mutanten nicht auf die Modellpflanze *A. thaliana* beschränkt. *Brassinolid* und verschiedene Syntheseintermediate konnten auch in anderen Pflanzenspezies identifiziert werden (Mandava, 1988; Park *et al.*, 1989). Die Wirkung des Hormons konnte ebenso an Tomatenkeimlingen beobachtet werden (Bishop *et al.*, 1999). Der meist genutzte *bioassay* zur Ermittlung der biologischen Aktivität von Steroiden beruht auf der Reaktion von Reis-Pflanzen auf die Steroidgabe (Wada *et al.*, 1981; Mandava, 1988; Fujioka *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2003). Dabei wird der Krümmungswinkel zwischen Spross und Lamina gemessen. Die Änderung dieses Winkels gilt als Maß für die Bioaktivität des applizierten Steroids. Grundsätzlich konnten auch in anderen Pflanzenspezies Brassinosteroidmutanten isoliert werden (Li und Chory, 1999). Es war möglich verschiedene putative Brassinosteroidsynthesemutanten die auch Zwergphänotypen aufweisen und sensitiv gegenüber der Applikation von Brassinolid reagieren zu isolieren. In Reis wurden die Mutanten *d2*, *d11*, *brd1* und *brd2* (Hong *et al.*, 2002, 2003, 2005; Tanabe *et al.*, 2005), in Tomate *dumpy*, *dwarf* und *cyp85a1* (Bishop *et al.*, 1996, 1999; Koka *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2001;

Nomura *et al.*, 2005) und in Erbse die Mutante *lkb* (Nomura *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005) beschrieben. Des Weiteren konnten in verschiedenen Spezies Brassinosteroid-insensitive Pflanzen identifiziert werden, die Mutationen in BRI1 orthologen Genen aufweisen. In Erbse wurde die *lka*-Mutante (Nomura *et al.*, 1997, 2003), in Reis die *d61*-Mutante (Yamamuro *et al.*, 2000), in Tomate die *curl3*-Mutante (Koka *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2002) und in Baumwolle die *Ghbin2*-Signaltransduktionsmutante (Sun *et al.*, 2004) beschrieben.

Die Analyse der Brassinosteroidmutanten hat wesentlich zum Verständnis der Wirkung des pflanzlichen Steroidhormons *Brassinolid* beigetragen. Der phänotypische Vergleich der Biosynthesemutanten mit dem Wildtyp hat gezeigt, welchen Einfluss Brassinosteroide auf die Pflanzenentwicklung nehmen. Da diese Mutanten durch die exogene Applikation von *Brassinolid* komplementiert werden, haben sie es ermöglicht, die Verbindung zwischen dem Steroidsignal und den beobachteten Effekten auf die Entwicklung zu belegen. Da die Komplementation zum Wildtypphänotyp auch durch die Behandlung mit Synthesestufen des *Brassinolids* möglich war, konnte so der Zusammenhang zwischen der Biosynthese und dem Steroidsignal hergestellt werden. In gleicher Weise hat auch die Identifikation der Rezeptormutante *bril* zur Analyse der Brassinosteroidwirkung und der Signaltransduktion beigetragen. Die *A. thaliana* *bril*-Mutante ist insensitiv gegenüber Brassinosteroiden, was dem erwarteten Phänotyp einer Rezeptormutante entspricht, die nicht zur Signalweiterleitung fähig ist.

Das BRI1-Protein gehört zu der pflanzenspezifischen Familie der membrangebundenen „serine/ threonine-leucin rich repeat“- (S/T-LLR)-Rezeptorkinasen in *A. thaliana* (Shiu und Bleecker, 2001). BRI1 besitzt eine extrazelluläre aus mindestens 24 LLR-Wiederholungen bestehende Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasedomäne. Die Lokalisation an der Plasmamembran konnte durch die Analyse einer translationalen Fusion mit einem GFP-Reporterprotein in Wildtyppflanzen belegt werden (Friedrichsen *et al.*, 2000).

Der Phänotyp und die Identität der *bril*-Mutante wurde mit der Identifikation diverser, unabhängiger Allele belegt, die über ungerichtete Mutagenesen – sowohl über T-DNA-Mutagenese (Feldmann *et al.*, 1989, 1991, 1992, 1995; Koncz *et al.*, 1989, 1992, 2002; Azpiroz *et al.*, 1997) als auch über chemische Mutagenese mittels Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) (Anderson, 1995; Hoffmann, 1980) – generiert wurden (Li und Chory, 1997; Noguchi *et al.*, 1999; Friedrichsen *et al.*, 2000; Vert *et al.*, 2005). Es konnten Punktmutationen in verschiedenen funktionalen Domänen des BRI1-Proteins isoliert werden. Da sowohl Mutationen in der extrazellulären LLR-Domäne als auch in der intrazellulären Kinase-Domäne den gleichen Phänotyp zeigen, wird so das Zusammenwirken der funktionalen Domänen bei der Erfüllung der Proteinfunktion deutlich. In der extrazellulären Domäne wurde eine Region zwischen den LLR-Wiederholungen 20 und 21 identifiziert, die sogenannte „Insel-Domäne“ (*island domain*), die besonders wichtig für die Proteinfunktion ist. In diesem Bereich wurden viele verschiedene Punktmutationen entdeckt, die Nullphänotypen und auch intermediäre Phänotypen auslösen. In der Kinase-Domäne sind Mutationen in den klassischen Subdomänen – wie der ATP-Bindungsstelle oder der Aktivierungsdomäne (*activation loop*) – identifiziert worden, die die Proteinfunktion aufheben. Die Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne (*activation loop*) einer

Kinase ist für die Aktivierung unbedingt nötig, dies konnte auch für BRI1 gezeigt werden (Oh *et al.*, 2000).

Die verschiedenen Allele haben zur Identifikation unterschiedlich starker *bri1*-Allele geführt, die sich deutlich in der Ausprägung des Phänotyps unterscheiden (Noguchi *et al.*, 1999). Dabei hat die Analyse des Brassinosteroidgehalts dieser Mutanten ergeben, daß in der Rezeptormutante *bri1* die Brassinosteroidsynthese bis zum Endprodukt abläuft, das dann akkumuliert. Dies belegt, daß die *bri1*-Mutante die endogenen Steroide nicht perzeptieren kann. Der intermediäre Phänotyp der schwachen *bri1-5*-Mutante und die partielle Insensitivität gegenüber exogen appliziertem *Brassinolid* (Choe *et al.*, 2003) belegen, daß dieses Allel zu einer verminderten Brassinosteroidperzeption fähig ist. Dies korreliert mit einem intermediären Steroidgehalt zwischen dem des Wildtyps und den *bri1*-Nullmutanten (Noguchi *et al.*, 1999).

Da die extrazelluläre Domäne des BRI1-Proteins, an der Perzeption des Brassinosteroidsignals beteiligt ist, konnte durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden: Mit der Analyse chimärer Rezeptorproteine, bestehend aus der extrazellulären Domäne und der Transmembrandomäne von *AtBRI1* sowie der intrazellulären Kinasedomäne der *OsXA21*-Rezeptorkinase, konnte eindeutig demonstriert werden, daß die *Brassinolid*-Signaltransduktion über die extrazelluläre Domäne des BRI1-Proteins verläuft (He *et al.*, 2000). Bei Xa21 handelt es sich um eine LLR-Rezeptorkinase aus Reis (*Oryzae sativa*), die an der pathogenbedingten Signaltransduktion beteiligt ist. Dabei induziert die aktivierte Xa21-Rezeptorkinase eine Signaltransduktion, die in verschiedenen, zellulären Reaktionen – vor allem aber einer leicht detektierbaren Veränderung der Genexpression – resultiert. Durch die Expression der chimären Rezeptorkinasen in einer Reiszelllinie konnte die pathogenbedingte Signaltransduktion durch die exogene Applikation von *Brassinolid* ausgelöst werden. Dies belegt, daß in der chimären Rezeptorkinase die intramolekulare Signalweiterleitung von der durch *Brassinolid* aktivierten, extrazellulären Domäne zu der intrazellulären Kinasedomäne stattfindet. Darüber hinaus wurden Kontrollexperimente mit chimären Rezeptorkinasen durchgeführt, die die aus *A. thaliana*-Mutanten bekannten Punktmutationen der extrazellulären Domäne tragen, die zum *bri1*-Nullphänotyp führen. In diesen Experimenten unterblieb die Induktion der Signaltransduktion. Da diese Experimente die Beteiligung der extrazellulären Domäne des BRI1-Proteins an der Signaltransduktion belegen, nicht aber die Bindung des Steroidhormons, wurden weitere Studien durchgeführt. Der Umstand, daß diese Experimente in pflanzlichen (*Oryzae sativa*) und nicht in tierischen Zellen durchgeführt wurden, die einen mit *A. thaliana* vergleichbaren Brassinosteroid-metabolismus und eine entsprechende Signaltransduktion aufweisen, macht die Existenz weiterer Komponenten des *Brassinolid*-Rezeptorkomplexes in diesem Testsystem sehr wahrscheinlich. Dies wird anhand der gefundenen Brassinosteroidmutanten in Reis sehr deutlich (Hong *et al.*, 2002, 2003, 2005; Tanabe *et al.*, 2005).

Aus diesem Grund wurden direkte Bindungsexperimente mit dem BRI1-Protein und Brassinosteroiden durchgeführt. Einen Schritt in diese Richtung haben Wang *et al.* (2001) mit ihren Arbeiten getan. Es konnte demonstriert werden, daß die Brassinosteroid-bindende Aktivität an der Plasmamembran mit dem BRI1-Protein co-immunopräzipitiert. Diese Bindung ist von einer funktionalen, extrazellulären

Domäne des BRI1-Proteins abhängig, da Experimente mit mutanten BRI1-Proteinen eine verminderte Bindung aufweisen.

Die direkte Bindung zwischen einem BRI1-GFP-Fusionsprotein bzw. rekombinanten BRI1-Fragmenten der extrazellulären Domäne im Bereich der LLRs 20 und 21 konnte erst durch die Verwendung eines biotinmarkierten Photoaffinitäts-Castasteron-Derivates (BPCS) gezeigt werden (Kinoshita *et al.*, 2005). Bei diesem Experiment wurde die Bindung zwischen dem Steroid und dem BRI1-Protein durch eine UV-Lichtbestrahlung der photoaktiven Gruppe des Castasteron-Derivates (BPCS) fixiert und damit über eine Western-Blot-Analyse detektierbar gemacht (Hatanaka *et al.*, 2000). Dies führte zu der Folgerung, daß BRI1 die Hauptkomponente des Brassinosteroid-Rezeptorkomplexes darstellt.

Ausgehend von der Brassinosteroid-Perzeption findet eine Signaltransduktion statt, die die Umsetzung des Steroidsignals in die Wachstumsreaktion der Pflanze bewirkt. Ergebnis dieser Signaltransduktion ist unter physiologischen Bedingungen der Phänotyp des Wildtyps, unter Versuchsbedingungen die am Wildtyp beobachteten Steroideffekte wie z. B. die Inhibition des Wurzelwachstums. Die Steroidbiosynthese- und Signaltransduktionsmutanten zeigen die Auswirkungen, wenn das Steroidsignal fehlt oder nicht perzeptiert werden kann.

Nach der Beschreibung der *bril*-Rezeptormutante wurde noch eine Reihe weiterer Mutanten identifiziert, die vergleichbare Phänotypen aufweisen und an der Brassinosteroidsignaltransduktion beteiligt sind. Im Gegensatz zu den rezessiven Nullmutation (*loss-of-function*) bei *bril* handelt es sich bei der identifizierten „*br-insensitive2 (bin2) / dwf12 / ultracurvata1 (ucul)*“-Mutante um ein semidominantes Allel (Li *et al.*, 2001; Choe *et al.*, 2002; Perez-Perez *et al.*, 2002). Die Semidominanz wird dadurch deutlich, daß auch heterozygote *bin2*-Pflanzen eine Größenreduktion zeigen. Der Phänotyp der heterozygoten Pflanzen ist intermediär zu dem des Wildtyps und dem der homozygoten *bin2*-Mutante, die einen extremen Zwergphänotyp aufweist. Die *bin2*-Mutante ist auch gegenüber *Brassinolid* insensitiv, vergleichbar wie *bril*. Das *BIN2*-Gen codiert für eine S/T-Kinase der GSK3/SHAGGY-ähnlichen-Kinasefamilie aus *A. thaliana* (Li und Nam, 2002; Dornelas *et al.*, 1997). Detaillierte Analysen von *BIN2*-Überexpressions- und Co-Suppressions-Linien im Hintergrund von schwachen *bril*-Allelen haben aufgezeigt, daß *BIN2* ein Negativ-Regulator der BRI1-abhängigen Brassinosteroidsignaltransduktion ist. Eine verminderte *BIN2*-Expression aufgrund von Co-Suppression durch ein 35S::*BIN2*-Expressionskonstrukt, hat zur Komplementation eines schwachen *bril*-Alleles geführt. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Überexpression von *BIN2* eine Verstärkung des *bril*-Phänotyps. Als Gegenspieler der GSK3-ähnlichen Kinase *BIN2* wurde die kernlokalisierte S/T-Protein-Phosphatase *BSU1* beschrieben. Eine entsprechende *BSU1*-Überexpressionslinie, „*bril-suppressor1*“ (*bsu1-1D*), konnte durch *activation-tagging* als dominanter Suppressor des *bril-5*-Phänotyps identifiziert werden (Mora-Garcia *et al.*, 2004).

Die beschriebenen Analysen, die zur Identifikation weiterer Signaltransduktionsmutanten geführt haben, machen deutlich, daß diese Mutanten nur mit Hilfe der schwachen *bril*-Allele, wie z. B. *bril-5*, identifizierbar waren. Schwache Allele, die einen intermediären Zwergphänotyp, eine partielle Insensitivität gegenüber *Brassinolid* bzw. eine verminderte Signaltransduktion zeigen, ermöglichten es

einen *Suppressor-Screen* durchzuführen. Das ist möglich, weil im Hintergrund dieser Mutante eine weitere phänotypische Veränderung, durch die Mutation einer anderen Komponente der Signaltransduktion, detektierbar ist. Dabei besteht die Möglichkeit sowohl eine Suppressor-Mutation zu isolieren, die zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führt, als auch eine Mutation die den partiellen Phänotyp verstärkt und wieder zum Nullphänotyp führt.

Eine weitere Möglichkeit neue Komponenten der Signaltransduktion zu isolieren, stellen Protein-Protein-Interaktionsstudien dar. Dabei hat sich ein Hefe-Testsystem bewährt, das es ermöglicht, die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen über einen Reportersystem zu messen. Dabei finden Reportersysteme Anwendung, die im Fall einer Protein-Protein-Interaktion der Testproteine zu einer transkriptionellen Aktivierung des Reportergens führen. Auch bei der Brassinosteroid-signaltransduktion konnten über Protein-Protein-Interaktionsstudien weitere Signal-Faktoren isoliert werden: Über eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurden zwei Transkriptionsfaktoren, BZR1 und BES1, als Interaktionspartner von BIN2 identifiziert. In weiteren Analysen haben sich diese Transkriptionsfaktoren als BIN2-Substrate, mit konservierten GSK3-Phosphorylierungsstellen, erwiesen (Zhao *et al.*, 2002). Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch BIN2 und BSU reguliert. Die phosphorylierte Form beider Transkriptionsfaktoren wird vermutlich Proteasom-abhängig degradiert. Die dephosphorylierten Proteine liegen hauptsächlich stabilisiert im Zellkern vor (He *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005). Für beide Transkriptionsfaktoren wurden zuvor in unterschiedlichen *Screens* Mutanten isoliert: Die „*brassinazole-resistant 1-ID*“-(*bzr1-ID*)-Mutante konnte in einer Population von ca. 200.000 EMS-Mutanten (M<sub>2</sub>) als Brassinazol-resistente Pflanze identifiziert werden, die eine dominante Mutation im *BZR1*-Gen trägt (Wang *et al.*, 2002). Diese Mutation führt zu einer erhöhten Proteininstabilität von BZR1 und damit zu einer Suppression von schwachen *bri1*-Allelen. BZR1 ermöglicht außerdem eine verstärkte *feedback*-Regulation der Brassinosteroidbiosynthese. Die zweite Mutante wurde in einem *bri1-Suppressor-Screen* gefunden und als „*bri1-EMS-suppressor1*“-(*bes1*) benannt (Yin *et al.*, 2002). Die *bes1*-Mutante zeigt eine konstitutive BR-Signaltransduktion, die zur phänotypischen Komplementation der *bri1*-Mutante führt.

Detaillierte Analysen der BZR1- und BES1-Proteine, der entsprechenden Mutanten und Überexpressionslinien haben unterschiedliche Funktionen dieser beiden Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Brassinosteroid-regulierten Genen ergeben. Dabei stellte sich BZR1 als Transkriptions-Repressor heraus, der spezifisch die *feedback*-regulierten Gene von Brassinosteroid-biosyntheseenzymen kontrolliert (He *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist BES1 in Kombination mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie z. B. BIM1 an der Transkriptionskontrolle brassinosteroid-induzierter Gene beteiligt (Yin *et al.*, 2005). Für beide Transkriptionsfaktoren, BZR1 und BES1, konnte eine DNA-Bindung und die Bindung unterschiedlicher *consensus*-Sequenzen gezeigt werden. Mit der unterschiedlichen Wirkung auf die Transkription – als Repressor oder Aktivator – regulieren sie verschiedene Ziel-Genklassen. Neben den negativ regulierten Genen der Brassinosteroid-biosynthese (Mathur *et al.*, 1998; Bancos *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2005) wurden verschiedene, andere Gene identifiziert, deren Transkription durch Brassinosteroide induziert wird. Die Gene der

Transkriptionsfaktoren „BR-ENHANCED-EXPRESSION“ (BEE1, BEE2, BEE3) und Gene von Zellwand-modifizierenden Enzymen wie Xyloglucan-Endotransferasen (XETs) und Expansinen wurden als „frühe“ brassinosteroidinduzierte Gene (*early-response-genes*) beschrieben (Xu *et al.*, 1996; Klahre, *et al.*, 1998; Kauschmann *et al.*, 1996; Friedrichsen *et al.*, 2002; Müssig *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Damit führt die Brassinosteroid-Perzeption über verschiedene Transkriptionsfaktoren zu einer Signaltransduktion, die die Transkription Brassinosteroid-regulierter Gene kontrolliert. Daraus ergibt sich eine Signaltransduktionskette, in der ein Brassinosteroidsignal die Rezeptorkinase BRI1 aktiviert und die Aktivität einer GSK3-Kinase (BIN2) durch Phosphorylierung negativ steuert (Nemhauser und Chory, 2004). Die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren ist direkt durch die gegensätzliche Regulation der BIN2-Kinase und der BSU1-Proteinphosphatase reguliert. Da BIN2 ein Negativ-Regulator ist, der die Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung inaktiviert, findet ohne das Brassinosteroidsignal keine Regulation der BR-Gene statt. Erst durch das BR-Signal wird die konstitutive Signaltransduktion von BIN2 durch BRI1 unterdrückt und die beschriebenen Transkriptionsfaktoren werden stabilisiert und aktiviert.

Diese Modellvorstellung der Brassinosteroidsignaltransduktion wird durch weitere Komponenten ergänzt, die zusätzliche Regulationsebenen und eine Vernetzung mit anderen Prozessen ermöglichen. Die Aktivität des BRI1-Proteins ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zur Aktivierung muss BRI1 autophosphoryliert sein (Wang *et al.*, 2005). Auch agiert BRI nicht als Einzelprotein, es wurde ein Co-Rezeptor, „BRI-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1“ (BAK1), beschrieben, der an der Regulation des BRI1-Proteins beteiligt ist (Nam, *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Eine *bak1*-Nullmutante wurde als intermediäre Zwergpflanze (*semidwarf*) isoliert, eine Überexpression führt zur Komplementation schwacher *bri1*-Allele. Die direkte Interaktion zwischen BRI1 und BAK1 konnte durch Co-Lokalisation, Co-Immunopräzipitation und FRET-Experimente belegt werden. Die Beobachtung von Russinova *et al.* (2004), wonach BRI1-BAK1-Heterodimere in intrazellulären Vesikeln auftreten, bieten weitere Ebenen der Rezeptorregulation. Darüber hinaus wurden weitere Faktoren wie z. B. zwei putative cytosolische BRI1-Substrate TTL und TRIP beschrieben deren Überexpression bzw. Nullmutation auch zu Zwergphänotypen führen (Nam und Li, 2004; Ehsan *et al.*, 2005). Die Funktionen dieser Proteine innerhalb der BR-Signaltransduktion sind unbekannt. Es zeichnen sich aber vielfältige Modulations-Möglichkeiten ab. Neben BRI1 wurden drei homologe Rezeptorkinasen als „BRI1-LIKE RECEPTOR KINASE“ (BRL1, BRL2, BRL3) beschrieben, die auch Brassinosteroide mit unterschiedlicher Spezifität binden können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß durch eine Überexpression der BRL1- und BRL3-Rezeptorkinase und durch Expression unter Kontrolle des *BRI1*-Promotors eine *bri1*-Mutante komplementiert wird (Zhou *et al.*, 2004; Cano-Delgado *et al.*, 2004). Dies zeigt, daß die BRI1-ähnlichen Rezeptorkinasen (BRL1, BRL3) in der Lage sind eine Funktion in Steroidrezeptorkomplexen zu übernehmen. Die physiologische Bedeutung dieser Rezeptorkinasen und die Interaktion mit BRI1 sind noch unerforscht. Als weitere Regulationsebene der Signaltransduktion wurden Steroid-modifizierende Enzyme beschrieben, die eine Inaktivierung der Brassinosteroide bewirken. Es konnte verschiedene Proteine der Cytochrom-

P450-Familie (CYP72B1, CYP72C1) identifiziert werden, die durch weitere Hydroxylierung der Seitenkette an Position C25 eine inaktivierende Wirkung ausüben (Neff *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde die Glykosylierung an Position C23 durch eine Glykosyltransferase gezeigt (Poppenberger *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, konnten einige der gefundenen Komponenten noch nicht in das Modell der Brassinosteroidsignaltransduktion integriert werden. Ungeklärt ist auch, wie die BL-Signaltransduktion in die Gesamtregulation der Pflanzenentwicklung integriert ist, wann und wo in der Pflanze das Steroidsignal generiert wird und ob und wie dieses Signal verteilt wird.

Die Betrachtung der Biosynthesemutanten haben gezeigt, welchen Einfluss Brassinosteroide auf die Pflanzenentwicklung haben. Der besonders starke Phänotyp der *cpd*-Mutante, der dem der Rezeptormutante sehr ähnelt, deutet darauf hin, daß die *cpd*-Mutante an einem limitierenden Schritt der Biosynthese betroffen ist. Auch eine Funktion in der Signaltransduktion kann nicht ausgeschlossen werden. Analysen der *CPD*-Transkription in frühen Entwicklungsstadien, wenige Tage nach der Keimung, haben eine spezifische Regulation der CPD-Expression aufgezeigt (Mathur *et al.*, 1998). Das weist ebenfalls auf eine regulatorische Funktion hin. Die Überexpression eines Epitop-markierten CPD-Proteins in Wildtyppflanzen hat eine besondere Instabilität des CPD-Proteins gezeigt. Darüber hinaus wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudie mit dem CPD-Protein durchgeführt. Daraus resultieren verschiedene putative Protein-Protein-Interaktionspartner aus *A. thaliana*, die Homologien zu konservierten Proteinen aus anderen Spezies aufweisen. Es wurde eine Kinase identifiziert, die eine Homologie zu MAP-Kinasen und nicht näher beschriebenen WNK-Protein-Kinasen in *A. thaliana* (Nakamichi *et al.*, 2002) zeigt. Außerdem konnten interagierende Proteine isoliert werden, die Homologien zu tierischen „OXYSTEROL BINDING PROTEIN“ (OSBP) und zu „INHIBITOR OF APOPTOSIS“ (IAP)-Ringfingerproteinen aufweisen. Die *A. thaliana*-Proteine wurden entsprechend als OBPs bzw. IAPs benannt.

Oxysterol-bindende Proteine wurden zuerst im Menschen als „OXYSTEROL BINDING PROTEINS“ (OSBPs) identifiziert, dann in Hefe als „OXYSTEROL BINDING PROTEIN HOMOLOGUES“ (OSBs) beschrieben. Die Hefe OSBs sind an der Cholesterol-Homeostase und an Prozessen wie z. B. dem Vesikel-Transport beteiligt (Olkkonen *et al.*, 2004; Letho *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001). Mit Oxysterolen werden Cholesterolderivate bezeichnet, die an der Seitenkette hydroxyliert sind. Sie können im tierischen System als Vorstufen von Gallensäuren fungieren, aber auch an Signalprozessen beteiligt sein, die sich z. B. auf die transkriptionelle Regulation auswirken (Russell, 2000).

„INHIBITOR OF APOPTOSIS“-Proteine wurden aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf den programmierten Zelltod beschrieben. Dabei entfalten sie ihre Wirkung, in dem sie aktivierte Caspasen, Effektoren des Zelltods, inhibieren. Es stellte sich heraus, daß die Effekte der IAP-Proteine auf ihrer Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase beruhen, die die Proteinstabilität eines Substrates reguliert (Verhagen *et al.*, 2001; Hay, 2000; Li *et al.*, 2000). E3-Ligasen sind durch die Ubiquitinierung ihrer Substrate aktiv an der Regulation der Proteasom-abhängigen Proteindegradation beteiligt (Pickart, 2001a, 2001b; Vierstra, 2003).

## Zielsetzung der Arbeit

Hauptziele dieser Arbeit sind die Durchführung von Komplementationstudien der *cpd*-Mutante und die Identifikation und Isolation von T-DNA-Mutanten der für die CPD-Interaktionspartner codierenden Gene. Mit konditionalen und genetischen Komplementationsexperimenten kann ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt und in welchem Gewebe während der Pflanzenentwicklung die Brassinosteroidbiosynthese stattfindet und das Steroidsignal benötigt wird. Zu diesem Zweck soll die *cpd*-Mutante mit verschiedenen CPD-GFP-Fusionskonstrukten komplementiert werden. In diesem Zusammenhang muß dann überprüft werden, ob mit einem induzierbaren Expressionskonstrukt eine konditionale genetische Komplementation durchführbar ist. Zur Beurteilung, ob und in welchem Ausmaß ein  $\beta$ -Östradiol-induzierbares Expressionssystem *in planta* – speziell in Brassinosteroidbiosynthesemutanten – einsetzbar ist, müssen entsprechende Kontrollexperimente erarbeitet werden.

Da Cytochrom-P450-Enzyme wie CPD durch eine *feedback*-Regulation des Synthese-Endproduktes *Brassinolid* auf transkriptioneller Ebene reguliert sind, erscheint eine Analyse der transkriptionellen Regulation der CPD-Interaktionspartner als sehr vielversprechend. Zu diesem Zweck sollen Promotor::GUS-Fusions-Konstrukte hergestellt und analysiert werden. Diese Konstrukte geben Auskunft über die räumliche Verteilung der Expression. Außerdem ermöglichen sie die einfache Analyse der Regulation der Transkription durch veränderte Anzuchtbedingungen oder Hormonbehandlungen.

Im Vorfeld wurden in Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien Interaktionspartner des CPD-Proteins aus *A. thaliana* identifiziert. Die Sequenzinformation aus der vollständigen Sequenzierung des *A. thaliana*-Genoms ermöglichen jetzt eine Beurteilung, ob die Gene dieser Interaktionspartner einzeln oder als Mitglieder von Genfamilien vorkommen und welches Ausmaß diese Genfamilien haben. Damit die Mutanten-Analyse eine funktionale Beurteilung der Interaktionspartner erlaubt, sollen möglichst für alle Interaktionspartner und für die nächsten Homologen, T-DNA-Mutanten isoliert werden. Diese Mutanten bilden dann die Basis für eine ausführliche, genetische Analyse der Interaktionspartner und ihrer Genfamilien. Um dieses Ziel zu erreichen, soll die SALK-T-DNA-Population auf Insertionsmutanten für die identifizierten Genen hin analysiert werden. Parallel wird die Koncz-T-DNA-Population fertiggestellt. Diese Population beinhaltet dann ca. 100.000 unabhängige T-DNA-Mutanten.

Wenn für alle Interaktionspartner Insertionsmutanten isoliert werden können, wird die phänotypische Analyse dieser Mutanten zeigen, ob eine Nullmutation in einzelnen Interaktionspartnern zu einem *cpd*-Phänotyp führt oder eine andere Auswirkung auf die Pflanzenentwicklung hat. Darüber hinaus kann die Analyse aufzeigen, ob es sich bei den Interaktionspartnern um Regulatoren des CPD-Proteins und damit der Brassinosteroidbiosynthese handelt oder ob sie eine neue Verbindung zwischen der Brassinosteroidbiosynthese und anderen physiologischen Prozessen wie z. B. der Signaltransduktion bilden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die allgemeinen Laborchemikalien und organischen Lösungsmittel im analytischen Reinheitsgrad wurden von den folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg, D), BioRad (München, D), Biozym (Hameln, D), Difco (USA), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), J.T. Baker (USA, NL), Merck (Darmstadt, D), Pharmacia (Freiburg, D), Riedel-de-Haen (Hannover, D), Roche (Mannheim, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D). Alle verwendeten Lösungen, Medien und Puffer wurden mit Millipore-Wasser angesetzt.

#### 2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

3MM Gel-Blotting Papier (GB002)	Schleicher & Schuell
6er Multiplatten (667-185)	Cellstar, Greiner bio-one
12er Multiplatten (665-102)	Cellstar, Greiner bio-one
Agarose, SeaKem LE Agarose	Biozym (840.004)
Amylose Resin (E8021S)	New England Biolabs
Biotin-14dCTP (#19518-018)	Invitrogen
Calciumhypochlorid (Samensterilisation)	Riedel de Haen (12116)
Cäsiumchlorid (#02452)	Biomol
Coomassie Brilliant Blue R-250	Biorad
Dialyseschläuche	
Visking dialysis tubing 8/32, Ø 6 mm	Serva (#44104)
Visking dialysis tubing 20/32, Ø 16 mm	Serva (#44110)
DNA-Größenmarker:	
1 KB ladder	Invitrogen
Lambda <i>Hind</i> III bzw. <i>Pst</i> I geschnitten	Eigenproduktion
Desoxyribonucleotide (dNTPs)	Roth und Invitrogen
ECL (Peroxidase-Detektionslösungen)	Amersham Pharmacia Biotech
Entsorgungsbeutel	PlastiBrand (759705)
Einweg-Küvetten, 1,5 ml, halbmikro	PlastiBrand (759015)
Einweg-Pipetten, 5 ml; 10 ml; 25 ml	Costar (Steripette)
Elektroporationsküvetten, 2 mm	EQUIBIO (ECU-102 (gelb))
Eppendorf-Pistill ( <i>Destroy-Stick</i> )	Biozym #710399
Filter:	
Dialyse-Filter	Millipore (VSWP02500)
Faltenfilter, Ø 240 mm	Schleicher und Schuell
Filtereinheit, 0,2 µm (Peristaltikpumpe)	Millipore (SVGSB 1010)
Miracloth (#475855)	Calbiochem
Sterilfilter, 0,2 µm (Spritzenaufsatz)	Sartorius (minisart)
Glutathione-Sepharose 4B (17075601)	Amersham Biosciences
Kanülen, Sterican (rot)	
1,20 x 40 mm 8C/SB	Braun
Latexhandschuhe, Semperguard M	Semperit Technische Produkte GmbH
Membranen	
Hybond N+ Membran	Amersham Pharmacia Biotech
Nylonmembran (N+)	Roche
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell
PVDF-Membran (Imobilon-P)	Millipore
Milchpulver	Heirler
Microfuge Tubes (polyallomer)	Beckman
3/8 x 1,5 in / 9,5 x 38 mm #357448	
NiNTA-Agarose	Qiagen (#1018244)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR Dig Probe Synthesis KIT	Roche (1636090)

PCR-Platten Thermofast96 (AB-0600) und Verschluss-Film (AB-0558)	Abgene Abgene
Petrischalen	Greiner
Pflanzensalze: Murshige and Skoog basal salt mixture (M5524)	Sigma
pGemT Vector System 1 (#A3600)	Promega
Phytoagar (P1003.5000)	Duchefa Biochemie
Pipettenspitzen (gelb, blau, weiß)	Greiner
PonceauS-Lösung (#33427)	Serva
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) für Pflanzenextrakte (P9599) für Bakterienextrakte (P8465)	Sigma Sigma
Protein-Größenmarker (1610373)	BioRad
QIAquick PCR Purification KIT	Qiagen (#28104)
Quick seal centrifuge tubes (polyallomer) 1 x 3,5 in / 25 x 89 mm (VTi 65) #342412 0,5 x 2 in / 13 x 51 mm (VTi 50) #342414 0,5 x 2 in / 13 x 51 mm (SS 55) #326819	Beckman
Reaktionsgefäße: 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße: 12 ml	Falcon
Reaktionsgefäße: 15 ml	Falcon / Greiner
Reaktionsgefäße: 50 ml	Falcon / Greiner
RNeasy Plant Mini KIT	Qiagen (#74904)
Rotiphoresegel 40 % 29:1 Acrylamide : Bisacrylamide	Roth (A5A15.1)
Röntgenfilme Hyperfilm MP (RPN1678K8) X-OMAT (XAR-5)	Amersham Pharmacia Biotech Kodak
Sacharose (Pflanzenmedien)	Sigma (S5390 - 5Kg)
Säulen (5 ml)	Qiagen (#1018597)
Schlauchfolie (PE)	VWR International
Spermidine (S2501)	Sigma
Wägebapier MN226	Machery&Nagel
X-Gluc (50340)	Biomol
Zentrifugenbecher, 250, 1000 ml	Beckman

### 2.1.3 Geräte und Zubehör

Ein Verzeichnis der verwendeten Geräte und des Zubehörs ist im Anhang aufgelistet.

### 2.1.4 Antibiotika und Herbizide

Antibiotika wurden von Sigma bzw. Duchefa, das Herbizid Glufosinate (Basta) von Riedel de Haen (45520) bezogen. HygromycinB zur Selektion transgener *A. thaliana* Pflanzen wurde von ROCHE (843555) bezogen. Zur Verwendung in Sterilkultur sind sie steril filtriert und bei -20°C gelagert worden.

<u>Antibiotikum:</u>	<u>Stammlösung:</u>	<u>Arbeitskonzentration / Organismus:</u>
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	[100 mg/l] <i>E. coli</i>
Glufosinat (Basta)	10 mg/ml in Wasser	[10 mg/l] <i>A. thaliana</i>
Carbenicillin	50 mg/ml in Wasser	[100 mg/l] <i>E. coli, A. tumefaciens</i>
Cefotaxime	200 mg/ml in Wasser	[200 mg/l] <i>A. tumefaciens</i>
Gentamycin	50 mg/ml in Wasser	[25 mg/l] <i>A. tumefaciens</i>
HygromycinB	15 mg/ml in Wasser	[15 mg/l] <i>A. thaliana</i>
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	[25-50 mg/l] <i>E. coli, A. tumefaciens</i>
Rifampicin	25 mg/ml in DMSO	[100 mg/l] <i>A. tumefaciens</i>
Spectinomycin	50 mg/ml in Wasser	[50 mg/l] <i>A. thaliana</i>
Tetracyclin	5 mg/ml in Ethanol	[15 mg/l] <i>E. coli</i>
Tricarillin	150 mg/ml in Wasser	[300 mg/l] <i>A. tumefaciens</i>

Basta-Lösung zum Sprühen von *A. thaliana* Pflanzen auf Erde:  
250 mg/l Basta; 0,1% Tween20

### 2.1.5 Pflanzenhormone und Inhibitoren

Pflanzenhormone und Inhibitoren wurden von Duchefa bzw. Sigma bezogen.

<u>Hormon / Inhibitor:</u>	<u>Stammlösung:</u>
Abszisinsäure (ABA); Sigma	100 mM in Methanol [10 µM]
Auxin (AUX); Duchefa	
2,4D (2,4-Dichlorophenoxyessigsäure)	2 mg/ml in Wasser (KOH; pH 7,0 HCl)
IAA (Indole-3-Essigsäure)	4 mg/ml in Wasser (KOH; pH 5,8 HCl)
NAA (a-Naphtalin-Essigsäure)	22,8 mM in Wasser (KOH; pH 7-8 HCl)
Auxin-Inhibitor; Duchefa oder Sigma	
1-Naphthylphthalamic-Säure (NPA)	20 mM in DMSO
Steroide und Brassinosteroide (BRs); Sigma, CIOTECH RESEARCH INC. (Canada)	
<i>Brassinolid</i> (BL)	2 mM / 2mg/ml in Ethanol
<i>Epi-Brassinolid</i> (eBL)	2 mM / 2mg/ml in Ethanol
<i>Homo-Brassinolid</i> (hBL)	2 mM / 2mg/ml in Ethanol
β-Östradiol	100 nM in DMSO
Cytokinin (CYT); Duchefa	
6-Benzylaminopurin (6-BAP)	1 mg/l in Wasser (pH 7,0)
Isopentenyl-Adenosin-Ribosid (IPAR)	2 mg/l in Wasser (pH 5,8)
Gibberellinsäure (GA); Duchefa	
GA3	100 mM in Ethanol bzw. DMSF
Salicylsäure (SA); Duchefa	1M in Ethanol
Lanolin; Sigma	
Zur Herstellung der Lanolinpasten wurde das Lanolin auf 50°C bis 60°C erwärmt, mit Tween20 und Steroiden versetzt und durch Vortexen gemischt.	

### 2.1.6 Enzyme

#### 2.1.6.1 Restriktionsendonucleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden hauptsächlich von New England BioLabs (NEB) bezogen, wenige Ausnahmen kamen von Boehringer bzw. Roche oder GIBCO BRL bzw. Invitrogen. Für die Restriktionsansätze sind in der Regel die selbst Hergestellten 10x Puffer (L; M; H) verwendet worden, ansonsten wurde auf die entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffer (10x) des Herstellers zurück gegriffen. Alle weiteren Enzyme wurden entsprechend der Protokolle der Hersteller und in den mitgelieferten Puffern verwendet.

#### 2.1.6.2 DNA-Polymerasen und reverse Transkriptasen

DNA-Polymerase I	New England BioLabs (NEB)
T4 DNA-Polymerase	New England BioLabs (NEB)
Vent DNA-Polymerase	New England BioLabs (NEB)
LaTaq	TaKaRa
Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
SuperScript II RT-Polymerase	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Roche

#### 2.1.6.3 DNA-modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs (NEB)
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs (NEB)

T4 Polynucleotid-Kinase New England BioLabs (NEB)

#### 2.1.6.4 Weitere Enzyme

Benzonase	Merk (1.01694.0001)
Deoxyribonuclease 1 (DNase)	Sigma (DN-25)
RNase freie DNase	Qiagen (79254)
RibonucleaseA (RNaseA)	Serva (34388)
Factor Xa Protease (P8010S)	New England BioLabs (NEB)
Factor Xa Protease (F-9302)	Sigma
Lysozyme	Sigma (L6876)
Pectinase / Macerozyme R10	Serva (28302)
Zellulase „Onozuka R10“	Serva (16419)

#### 2.1.7 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden von den angegebenen Firmen in der angegebenen Verdünnung [] eingesetzt.

##### 2.1.7.1 Primärantikörper

Anti DIG (monoclonal; Maus)	[1:10.000]	Roche (#1333062)
Anti DIG (FAB; AP; Schaf)	[1:10.000]	Roche (#1093274)
Anti GFP (monoclonal; Maus)	[1:5.000]	Roche (#1814460)
Anti GST (polyclonal; Kaninchen)	[1:5.000]	SantaCruz (GST (Z-5); #SC-459)
Anti HIS (monoclonal; Maus)	[1:500]	Roche (#1922416)
Anti MBP (monoclonal; Kaninchen)	[1:10.000]	New England BioLabs (#E8032S)

##### 2.1.7.2 Sekundärantikörper

Ziege Anti-Maus IgG (POD)	[1:10.000]	Pierce (#31430)
Ziege Anti-Kaninchen IgG (HPR)	[1:10.000]	BioRad (#170-6515)
Kaninchen Anti-Schaf IgG (HPR)	[1:10.000]	Pierce (#31480)

##### 2.1.7.3 Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper

AlexaFluor 680 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes (#A21076)
AlexaFluor 680 Kaninchen Anti-Maus IgG	Molecular Probes (#A21065)
AlexaFluor 680 Esel Anti-Schaf IgG	Molecular Probes (#A-21102)
IRDye 800 Kaninchen Anti-Schaf IgG	Rockland Inc. (613-432-028)
IRDye 800 Kaninchen Anti-Maus IgG	Rockland Inc. (610-432-020)
IRDye 800 Esel Anti-Kaninchen IgG	Rockland Inc. (611-732-127)

#### 2.1.8 Bakterienstämme

Zur Verfügung standen Kulturen der *Escherichia coli* Stämme DH5<sup>-</sup>, DH10B, SURE und BL21 sowie der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101.

##### E. coli:

**DH5<sup>-</sup>** : *endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 ΔlacU169*

**DH10B:** *F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG*  
Aufgrund einer Mutation in der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens wird eine -Komplementation mit der aminoterminalen Hälfte des *E. coli lacZ*-Gens aus entsprechenden Vektoren (pUC-Derivaten) ermöglicht.

**SURE:** *e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F<sup>'</sup>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>*

**BL21 (DE3) pLysS:** *F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS<sup>-</sup> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]<sup>a</sup>*

**A. tumefaciens:**

**GV3101 (pMP90):** *C58C1, rif, pMP90 (pTiC58ΔT-DNA), Gm<sup>r</sup>*  
(Koncz und Schell, 1986)

**GV3101 (pMP90RK):** *C58C1, rif, pMP90 (pTiC58ΔT-DNA), Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>*  
(Koncz und Schell, 1986)

**2.1.9 Pflanzenmaterial**

*A. thaliana* Wildtyp Samen der Ecotypen *Col* WT und *WS* WT wurden von Csaba Koncz bzw. Burkhard Schulz zur Verfügung gestellt.

Koncz-T-DNA-Linien:

pPCV6NF: #101 (*iap1*), #5.451 (*obp2*), #17.076 (*obp1*), #55.760 (*mapk*), #65.800 (*iap2*)

*A. thaliana* T-DNA-Linien der Koncz-T-DNA-Population (Rios G. *et al.* 2002) wurden von Csaba Koncz zur Verfügung gestellt.

SALK-T-DNA-Linien:

N040837 (*obp3*), N501916 (*bri1*), N509263 (*cpd*), N515099 (*iap1*), N520761 (*dwf4*), N530489 (*obp1*), N533864 (*iap1*), N541648 (*bri1*), N568577 (*obp4*), N610343 (*obp5*), N632547 (*obp4*), N636932 (*iap2*), N649179 (*iap2*)

*A. thaliana* T-DNA-Linien der SALK-T-DNA-Population (Alonso J.M. *et al.* 2003) wurden über das Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC (<http://arabidopsis.info/>), bezogen.

Die *A. thaliana cpd*-Mutante (Szekeres *et al.*, 1996) hat Csaba Koncz zur Verfügung gestellt.

Die *A. thaliana* Mutanten *dwf4* (Choe *et al.* 1998), *det2* (Li *et al.* 1996), *bri1-5* (Noguchi *et al.* 1999), *ADO4* (Choe *et al.* 2001) wurden freundlicherweise von Burkhard Schulz zur Verfügung gestellt.

Die mit dem Konstrukt, *bri::BRI-GFP* (Friedrichsen DM *et al.*, 2000; Nam K.H. *et al.*, 2002), komplementierte *A. thaliana bri1*-Mutante (Clouse SD. *et al.*, 1996) wurde freundlicherweise von Joanne Chory zur Verfügung gestellt.

**2.1.10 Oligonucleotide**

Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten bzw. verwendeten Oligonucleotide wurde von Metabion (Martinsried, D), einige Ausnahmen von MWG bzw. Invitrogen bezogen. Alle Oligonucleotide sind in dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert worden.

Bestimmte Oligonucleotide wurden zur Sequenzierung einiger Konstrukte von der Service-Einheit ADIS des Max Planck Instituts für Züchtungsforschung Köln zur Verfügung gestellt.

Eine Liste der verwendeten Oligonucleotide befindet sich im Anhang.

**2.1.11 Plasmide**

pGEMT; (Promega)

Der Vektor pGEMT kam zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten zum Einsatz.

pBlueScript; (Stratagene)

Der Vektor pBlueScript wurde zur Subklonierung und Klonierung von PCR-Fragmenten sowie zur Sequenzierung verwendet.

pRT101; (Töpfer *et al.*, 1993; Töpfer *et al.*, 1987)

Der Vektor pRT101 besitzt eine Kasette, bestehend aus 35S-Promotor und nos-Terminator, die zur *in planta* Proteinexpression verwendet wurde.

pGREEN I und pGREEN II; (Hellens R.P. *et al.*, 2000; <http://www.pgreen.ac.uk/>)

Die verwendeten Derivate der pGreen-Vektoren besitzen Kanamycin- bzw. Basta-Resistenzmarker zur Selektion in Pflanzen. Sie wurden zur *in planta* Proteinexpression eingesetzt.

pPCV812 GUS; (Koncz *et al.*, 1994)

Der Vektor pPCV812GUS besitzt einen Hygromycin-Resistenzmarker zur Selektion *in planta*. Er wurde zur Generation von Promotor-GUS-Fusionen verwendet.

pGEX 5-2; (Amersham Pharmacia Biotech)

Der Vektor pGEX 5-2 wurde zur Proteinexpression in *E. coli* bzw. zur Proteinaufreinigung verwendet.

pMAL-c2X; (New England Biolabs)

Der Vektor pMAL-c2X wurde zur Proteinexpression in *E. coli* bzw. zur Proteinaufreinigung verwendet.

pPCV6NFHyg; (Koncz *et al.*, 1989; Koncz *et al.*, 1994; Rios G. *et al.*, 2002)

Konstrukt der Koncz-T-DNA-Population

pMENCHU, pPILY, pLOLA, pGIGI; (Ferrando A. *et al.*, 2000; Ferrando A. *et al.*, 2001)

Die Vektoren wurden zur *in planta* Expression von Epitop-markierten Proteinen verwendet.

pER8(XVE); (Zuo J. *et al.*, 2000)

Der Vektor pER8 besitzt einen Hygromycin-Resistenzmarker zur Selektion in Pflanzen. Der Vektor wurde zur konditionalen, durch  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Expression von Proteinen *in planta* eingesetzt.

pCAT-GFP; (Guido Jach)

Den Klon pCAT-GFP hat freundlicherweise Guido Jach zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um ein pRT101-Derivat, das eine GFP-cDNA trägt. Dieser Klon wurde bei der PCR-Amplifikation der GFP-cDNA als Matrize benutzt.

pJawohl-1(NPT); (Bekir Ulker)

Der Vektor pJawohl-1 besitzt zwei durch ein Intron getrennte *multiple cloning sites* und wurde zur Herstellung eines RNAi-Konstruktes verwendet.

pPAM-PAT(7064), pPAM-NPT(7066) ; (Bekir Ulker)

Die Vektoren pPAM-PAT und pPAM-NPT besitzen einen Basta bzw. Kanamycin-Resistenzmarker zur Selektion transgener Pflanzen. Beide Vektoren wurden zur konstitutiven Expression von GFP-Fusionen in Pflanzen eingesetzt.

pER8(XVE)-kan; (Diese Arbeit, 2003)

Der Hygromycin-Resistenzmarker des Vektor pER8(XVE) wurde durch einen Kanamycin-Resistenzmarker ausgetauscht. Der Vektor wurde zur konditionalen, durch  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Expression von Proteinen *in planta* eingesetzt. (Vektorkarte siehe Anhang)

## 2.1.12 Lösungen, Medien und Puffer

### 2.1.12.1 Allgemeine Stammlösungen

0,5 M EDTA-Stammlösung: EDTA 186,1 g/l

186,1 g EDTA wurde in 800 ml dH<sub>2</sub>O unter Rühren und der Zugabe von NaOH gelöst, dabei der pH-Wert auf pH 8 eingestellt. Die fertige Lösung wurde autoklaviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: EtBr 10 mg/l

Hepes-Puffer: 1M N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure) pH 7,0

5 M Natriumchlorid-Stammlösung: NaCl 292,2 g/l

10 M Natronlauge-Stammlösung: NaOH 400 g/l  
80g Natriumhydroxid-Plätzchen wurden unter Rühren, auf Eis in ca. 150 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, nach Erkalten der Lösung wurde das Volumen auf 200ml aufgefüllt und in einer PE Flasche gelagert.

Natriumacetat-Stammlösung: 3M NaCOOH pH 6,0  
408,3 g Natriumacetat wurden in 800 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, der pH-Wert ist mit Eisessig auf pH 5,2 oder mit verd. Essigsäure auf pH 6,8 eingestellt worden. Das Volumen wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt, die fertige Lösung autoklaviert.

*Phosphate-buffered Saline* (1x): NaCl 140 mM  
KCl 2,7 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM

*Phosphate-buffered Saline* (PBS) wurde in der Regel als Zehnfach-Stammlösung (10x) angesetzt, dazu sind 80 g Natriumchlorid, 2 g Kaliumchlorid, 14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat und 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat in 800 ml dH<sub>2</sub>O gelöst worden, der pH-Wert ist mit Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt und das Volumen auf 1 L aufgefüllt worden. Die fertige Lösung wurde autoklaviert.

Tris-Puffer: 1 M Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan - HCl pH 7; pH 7,5; pH 8  
121,1 g Tris wurden in 800 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, der pH Wert mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf pH7; pH 7,5 bzw. pH8 eingestellt, das Volumen auf 1 L aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde autoklaviert.

*Tris-buffered Saline* (1x): NaCl 140 mM  
KCl 2,7 mM  
Tris 2,5 mM

*Tris-buffered Saline* (TBS) wurde in der Regel als Zehnfach-Stammlösung (10x) angesetzt, dazu sind 80 g Natriumchlorid, 2 g Kaliumchlorid und 30 g Tris in 800 ml dH<sub>2</sub>O gelöst worden, der pH-Wert ist mit Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt und das Volumen auf 1 L aufgefüllt worden. Die fertige Lösung wurde autoklaviert.

20 % SDS: 200 g Dodecylsulfat Natriumsalz (Natriumlaurylsulfat) wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O bei 68°C gelöst, das Volumen auf 1 L aufgefüllt.

20 x SSC (pH 7,0): NaCl 3,0 M  
NaCitrat 0,3 M

20 x SSPE (pH 7,4): NaCl 3,0 M  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 0,2 M  
EDTA 0,02 M

### 2.1.12.2 Lösungen und Puffer zur Arbeit mit Nucleinsäuren und Proteinen

#### 2.1.12.2.1 Lösungen und Puffer zur Restriktionsspaltung von DNA

Restriktions-Puffer:

10x Niedrigsalz-Puffer (L) Tris-HCl pH 8,0 60 mM  
MgCl<sub>2</sub> 60 mM  
β-Mercaptoethanol 60 mM

10x Medium-Puffer (M) Tris-HCl pH 8,0 60 mM  
MgCl<sub>2</sub> 60 mM  
β-Mercaptoethanol 60 mM  
NaCl 750 mM

10x Hochsalz-Puffer (H)	Tris-HCl pH 8,0	60 mM
	MgCl <sub>2</sub>	60 mM
	β-Mercaptoethanol	60 mM
	NaCl	1,5 M
Spermidine Stammlösung:	Spermidine	100 mM
Spermidine wurde in 10 mM Tris-HCl (pH 8) gelöst.		

#### 2.1.12.2.2 Ligations-Puffer

Ligations-Puffer zur Ligation von glatten (*blunt*) DNA-Enden:

<u>10x Ligations-Puffer „blunt“:</u>	Tris-HCl pH 7,5	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	ATP	10 mM
	DTT	10 mM

Ligations-Puffer zur Ligation von überhängenden (*sticky*) DNA-Enden:

<u>10x Ligations-Puffer „sticky“:</u>	Tris-HCl pH 7,5	250 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	ATP	5 mM
	DTT	100 mM

Zur Herstellung der Zehnfachpuffer sind entsprechende Mengen der 1M Tris-HCl (pH 7,5)-, der 1M MgCl<sub>2</sub>- und der 1M DTT- sowie der 100 mM ATP-Stammlösungen gemischt, das Volumen entsprechend mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die fertigen Puffer wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.1.12.2.3 Lösungen zur Phenolisierung

Phenol/Chloroform-Lösung (PCI):	Isoamylalkohol	2 % (v/v)
	Chloroform	48 % (v/v)
	Tris-gesättigtes Phenol (pH8,0)	50 % (v/v)
Chloroform-Lösung (CI):	Isoamylalkohol	4 % (v/v)
	Chloroform	96 % (v/v)

#### 2.1.12.2.4 Lösungen zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Eluationspuffer: 1x TAE / 15 % Polyethylenglycol (PEG)

Der Eluationspuffer wurde immer frisch hergestellt, dazu wurden 1,5 g PEG 6.000 (Serva) in ca. 7 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Nachdem 200 µl des Elektrophoresepuffers TAE zugegeben worden sind, wurde das Volumen auf 10 ml aufgefüllt.

#### 2.1.12.2.5 Lösungen zur DIG-Southern-Blot-Analyse

DigEasyHyb	(ROCHE #1603558)
CSPD	(ROCHE #1655884)
Blocking Reagent	(ROCHE #1096176)
Transferpuffer	10x SSC oder 10 xSSPE
Depurinierungslösung:	0,25 N HCl bzw. 1 % HCl (v/v)
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	3 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 7)
Waschpuffer A:	2x SSC
Waschpuffer B:	2x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer C:	0,1x SSC; 0,1 % SDS
Maleinsäurepuffer (P1)	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl (pH7,5)
10x Blockpuffer	10 % Blocking Reagent (w/v) in Maleinsäurepuffer (P1)
Blocklösung	1x Blockpuffer in Maleinsäurepuffer (P1)
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer (P1); 0,3 % Tween20 (v/v)

Detektionspuffer (P3)	100 mM Tris, 100 mM NaCl (pH 9,5)
CSPD Arbeitslösung	CSPD Stammlösung 1:100 in Detektionspuffer (P3)
Strip-Puffer	0,2 M NaOH; 0,1 % SDS

**2.1.12.2.6 Lösungen für das alkalische Mini-Lysat**

10x TE-Puffer:	Tris-HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
Lösung 1:	NaOH	0,2 M
	SDS	1,0 % (w/v)
Lösung 2:	5 M KCOOH	60 ml / 100 ml
	Eisessig	11,5 ml / 100 ml
	H <sub>2</sub> O	28,5 ml / 100 ml
Tris/RNase-Lösung (TR):	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	RNase	100 µg/ml

**2.1.12.2.7 Lösungen zur Plasmid-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten**

Lösung 1:	Glucose	50 mM
	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
Lösung 2:	NaOH	0,2 M
	SDS	1,0 % (v/v)
Lösung 3:	5 M Kaliumacetat	60,0 ml / 100 ml
	Eisessig	11,5 ml / 100 ml
	dH <sub>2</sub> O	28,5 ml / 100 ml

**2.1.12.2.8 Lösungen zur Schnellpräparation von Pflanzen-DNA zur PCR Analyse**

Edwards-Puffer:	Tris-HCl (pH7,5)	200 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA	25 mM
	SDS	0,5 %

**2.1.12.2.9 Lösungen zur DNA Präparation mittels der CTAB-Methode**

<u>2x CTAB-Puffer</u>	CTAB	2 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
	EDTA (pH 8,0)	20 mM
	NaCl	1,4 M
	PVP	1 % (w/v)
<u>10x CTAB-Puffer</u>	CTAB	10 % (w/v)
	NaCl	0,7 M
<u>CTAB-Präzipitationspuffer:</u>	CTAB	1 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
<u>TE-Hochsalz-Puffer:</u>	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	NaCl	1 M

Cetyl-Methyl-Ammonium-Bromid (CTAB) und Polyvinylpyrrolidone (PVP) wurden jeweils in H<sub>2</sub>O gelöst, die übrigen Bestandteile durch Verdünnung der entsprechenden Stammlösungen zugegeben. Die fertige Lösungen wurde autoklaviert.

**2.1.12.2.10 Lösungen zur Pflanzen-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten**

DNA-Extraktionspuffer:	Tris-HCl (pH8,0)	100 mM
	Natriumchlorid	500 mM
	EDTA (pH8,0)	50 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM

Der Extraktionspuffer wurde ohne β-Mercaptoethanol angesetzt und autoklaviert, erst unmittelbar vor der Verwendung wurden 666 µl/l (v/v) β-Mercaptoethanol zugegeben.

5 M Kaliumacetat:	Kaliumacetat	490 g/l
Eisessig	115 ml/l	

Tris-Hochsalz-EDTA (THE):	Tris-HCl (pH8,0)	50 mM
	EDTA (pH8)	20 mM

Blank-Lösung 100 g CsCl + 100 ml TE

Isoamylalkohol (20xSSC gesättigt)

Der Isoamylalkohol wurde mit gleichem Volumen 20x SSC gemischt, nach Bildung von zwei Phasen wurde die obere alkoholische Phase verwendet.

TE-Dialyse-Puffer:	Tris-HCl (pH8,0)	10 mM
	EDTA (pH8,0)	1 mM

**2.1.12.2.11 Lösungen zur Pflanzen-RNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten**

GTC Puffer:	GTC	4,0 M
	Natriumcitrat (pH 7,0)	25 mM
	N-Laurylsarkosin	0,5 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	0,1 M

CsCl-Lösung:	Cäsiumchlorid (CsCl)	5,7 M
	Tris-HCl (pH8,0)	50 mM
	EDTA (pH8,0)	5,0 mM
	Natriumacetat	5,0 mM

**2.1.12.2.12 Lösungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

In der Regel wurden die 10xPCR-Puffer und 10xdNTPs der Polymerase-Hersteller verwendet. Wenn diese nicht verfügbar waren wurden folgende Lösungen eingesetzt:

10x PCR Puffer:	Tris-HCl (pH 8,4)	200 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	25 mM

10 x dNTP-Mix:	dATP	2,5 mM
	dCTP	2,5 mM
	dGTP	2,5 mM
	dTTP	2,5 mM

Die dNTPs wurden von Roth bezogen und in dH<sub>2</sub>O gemischt. Aliquods der 10x Stammlösungen des PCR Puffers und des dNTP-Mix wurden bei -20°C gelagert. Bei der Verwendung von vent-DNA-Polymerase wurde dem 10xPCR-Puffer Triton-X-100 bis zur Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt.

**2.1.12.2.13 Puffer zur DNA- und Protein-Gelelektrophorese**

Als Gel- und Laufpuffer für DNA-Gele wurde in der Regel 1x TAE verwendet. Zur Herstellung von Protein-Gele wurde Tris-HCl (pH 6,8)- und Tris-HCl (pH8,8)-Puffer, als Laufpuffer 1x SDS-Page-Puffer eingesetzt.

50x TAE:	Tris	242 g/l
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8	100 ml

Tris, Eisessig und EDTA wurden in dH<sub>2</sub>O gemischt, das Volumen auf 1 L aufgefüllt, der fertige Puffer autoklaviert.

DNA-Probenpuffer (10x):	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerol	30 % (v/v)
	Tris	50 mM

SDS-Page-Puffer (10 x)	Tris	30,18 g/l
	Glycin	144,13 g/l
	SDS	10,0 g/l

SDS-Probenpuffer (2x):	Tris-HCl	100 mM
	SDS	4,0 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glycerol	20 % (v/v)
	DTT / $\beta$ -Mercaptoethanol	200 mM

Der SDS-Probenpuffer kann ohne DTT bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert werden. Praktischerweise kann DTT bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch vor dem Gebrauch aus einer 1M bzw. 14 M Stammlösung zugegeben werden.

1,5 M Tris-HCl pH8,8 (Trenngel)

1M Tris-HCl pH 6,8 (Sammelgel)

APS-Lösung	Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v)
------------	-------------------------	------------

Die 10 %ige APS-Lösung wurde in der Regel frisch, 100 mg/ml in dH<sub>2</sub>O angesetzt.

Coomassie-Färbelösung:	Brilliant Blue R-250	1 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	45 % (v/v)

Entfärbelösung:	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

#### 2.1.12.2.14 Puffer zur Proteinreinigung

##### 2.1.12.2.14.1 Puffer zur Präparation von pflanzlichen Proteinen

Extraktionspuffer:	Saccharose	300 mM
	Tris-HCl pH7.5	50 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	PMSF	0,5 mM
	PIC (Sigma)	1:100
	(Triton-X-100)	1 %

##### 2.1.12.2.14.2 Puffer zur Präparation GST-markierter Proteine

<u>Lysis-Puffer:</u>	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	100 mM

Dem Lysis Puffer wurde bakterieller Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC, Sigma) 1:1.000 (v/v) verdünnt zugegeben.

<u>Wasch-Puffer:</u>	1xPBS (bak.PIC, Sigma)
----------------------	------------------------

<u>Eluations-Puffer:</u>	Glutathion	15 mM
	Tris-HCl (pH8,0)	50 mM

Die Puffer wurden immer frisch angesetzt; 0,09219 g reduziertes Glutathion wurde in 1 ml 1M Tris-HCl pH 8,0 gelöst, das Volumen mit dH<sub>2</sub>O auf 20 ml aufgefüllt.

#### 2.1.12.2.14.3 Puffer zur Präparation HIS-tag-fusionierter Proteine

<u>Lysis-Puffer:</u>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol (pH 8,0 NaOH)	10 mM

<u>Wasch-Puffer:</u>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol (pH 8,0 NaOH)	20 mM

<u>Eluations-Puffer:</u>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol (pH 8,0 NaOH)	250 mM

#### 2.1.12.2.14.4 Puffer zur Präparation MBP-markierter Proteine

<u>Lysis- / Wasch-Puffer:</u>	Tris-HCl (pH7,4)	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM

<u>Eluations-Puffer:</u>	Tris-HCl (pH7,4)	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Maltose	10 mM

#### 2.1.12.2.15 Lösungen zur Western-Blot-Analyse

<u>Transferpuffer (10x)</u>	Tris	60 g/l
	Borsäure	30 g/l
<u>Block-Lösung (TBST)</u>	Milchpulver	5 % (w/v)
	10x TBS	10 %
	Tween20	0,05 % (v/v)

#### 2.1.12.3 Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit Bakterien

Grundsätzlich wurden *E. coli* Bakterien mit LB-Medium und *A. tumefaciens* mit YEB-Medium kultiviert. Bei der Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde zur Regeneration SOB- bzw. SOC-Medium verwendet. Zur Anzucht von *A. tumefaciens* zur DNA-Präparation ist LB-Medium verwendet worden.

<u>LB-Medium (pH 7,0):</u>	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

Abhängig von der gewählten Selektion wurden Antibiotika 1:1000 verdünnt zugegeben.

LB-Platten: Zu 1 L des LB-Flüssigmediums wurden 15 g Agar hinzugegeben und autoklaviert, Antibiotika abhängig von der gewählten Selektion 1:1000 verdünnt zugegeben.

Lösungen zur Blau-Weiß-Selektion von Bakterien:

X-Gal-Stammlösung: 2 % (w/v) X-Gal, in DMSO gelöst, bei -20°C gelagert.  
 Von der X-Gal-Stammlösung wurden 100 µl pro Agarplatte ausgestrichen.

IPTG-Stammlösung: 100 mM IPTG, in ddH<sub>2</sub>O gelöst, bei -20°C gelagert.  
 Von der IPTG-Stammlösung wurden 20 µl pro Agarplatte ausgestrichen. Bei der Herstellung größerer Mengen Selektionsplatten wurden jeweils 500 µl der X-Gal bzw. IPTG-Stammlösung zu 500 ml LB-Agar Medium gegeben.

SOB-Medium:	Bacto-Trypton	20 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5,5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM

Das Medium wurde autoklaviert, anschließend sind entsprechende Mengen einer steril filtrierten Magnesiumchlorid bzw. Magnesiumsulfat Stammlösung zugegeben worden.

SOC-Medium: SOB-Medium wurde mit 0,4 % (w/v) Glucose versetzt und steril filtriert.

YEB-Medium (pH7,4):	Fleischextrakt	5 g/l
	Hefeextrakt	1 g/l
	Pepton	1 g/l
	Saccharose	5 g/l

YEB-Platten: Zu 1 L des YEB-Flüssigmediums wurden 15 g Agar hinzugegeben und autoklaviert. Antibiotika wurden abhängig von der gewählten Selektion 1:1000 verdünnt zugegeben

#### 2.1.12.4 Allgemeine Medien und Puffer zur Arbeit mit *A. thaliana*-Pflanzen

##### B5 Vitamine (250x) Stammlösung:

Nicotinsäure	1 g/l
Pyridoxin	1 g/l
Thiamine	10 g/l
myo-Inositol	100 g/l

##### MS-Medium für die *A. thaliana* Zell-Suspensions-Kultur:

Suspensions-Medium (SM):	MS Salze (Sigma)	4,3 g/l
	B5 Vitamine (250x)	4,0 ml/l
	Saccharose	30 g/l
	2,4D	1,0 mg/l
	pH 5,8 (KOH)	

##### MS-Agar Medium zur Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen in Sterilkultur:

1/2 MS Salze (Sigma)	2,15 g/l
Saccharose	5,0 g/l
pH 5,8 (KOH)	
Phyto-Agar (Duchefa)	8,0 g/l (w/v)

##### MSAR-Germination-Medium: (Koncz *et al.*, 1994)

Macro-Lösung	25 ml/l
Micro-Lösung	1,0 ml/l
Fe-EDTA-Lösung	5,0 ml/l
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	5,8 ml/l
KI-Lösung	4,4 ml/l
Saccharose	5,0 g/l
pH 5,8 (KOH)	
Agar	8,0 g/l (w/v)

**MSAR-Stammlösungen: (Die Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert.)**

<u>1. Macro</u>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20 g/l
	KNO <sub>3</sub>	40 g/l
	MgSO <sub>4</sub>	7,4 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 g/l
	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,0 g/l
<u>2. Micro</u>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 g/l
	MnSO <sub>4</sub>	16,9 g/l
	ZnSO <sub>4</sub>	8,6 g/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25 g/l
	CuSO <sub>4</sub>	0,025 g/l
	CoCl <sub>2</sub>	0,025 g/l
	<u>3. Fe-EDTA</u>	FeSO <sub>4</sub>
Na <sub>2</sub> EDTA		7,46 g/l
Das Eisensulfat wurde durch leichtes Erwärmen gelöst, dann das EDTA zugegeben.		
<u>4. CaCl<sub>2</sub></u>	CaCl <sub>2</sub>	75 g/l
<u>5. KI</u>	KI	0,375 g/l

**Medium zur Infiltration von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens***

Infiltrationsmedium (IM):	MS Salze (Sigma)	2,15 g/l
	B5 Vitamine (250x)	4,0 ml
	Saccharose	50 g/l
	BAP	0,044 µM (v/v)
	Silwet L 77	0,5 % (v/v)

Das Infiltrationsmedium wurde immer frisch vor dem Gebrauch angesetzt und nicht autoklaviert. Die MS-Salze wurden mit der Saccharose unter Rühren in 800 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, 4 ml der B5-Vitamin-Stammlösung (250x) und 10 µl/L der BAP-Stammlösung (1 mg/ml) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 5,8 eingestellt, das Volumen mit dH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt. Das Silwet L 77 (0,05 % (v/v)) wurde dem Infiltrationsmedium erst unmittelbar vor der Infiltration, nachdem das das Bakterien-Pellet gelöst war, zugegeben.

**Lösungen für die GUS-Färbung von *A. thaliana* Pflanzen**

GUS-Färbelösung (1L):	X-GLUC (in 2 ml DMSO gelöst)	1,0 g/l (w/v)
	TritonX-100	0,1 % (v/v)
	Phosphatpuffer [pH 7.0]	0,1 M
	Kalium-Hexacyanoferrate (II) Trihydrat	5,0 mM
	Kalium-Hexacyanoferrate (III)	5,0 mM

Kalium-Hexacyanoferrate (II) Trihydrat Stammlösung [100 mM]:  
Kalium-Hexacyanoferrate (II) Trihydrat 2,11 g / 50 ml

Kalium-Hexacyanoferrate (III) Stammlösung [100 mM]:  
Kalium-Hexacyanoferrate (III) 1,65 g / 50 ml

Der fertige Färbungspuffer wurde frisch eingesetzt oder bei – 20°C gelagert.

**Puffer zur Herstellung von Protoplasten:**

S-Puffer:	0,28 M Saccharose	96 g/l
	pH 5,5 (KOH)	
GM-Puffer:	0,34 M Glucose	30,5 g/l
	0,34 M Manitol	30,5 g/l
	pH 5,5 (KOH)	

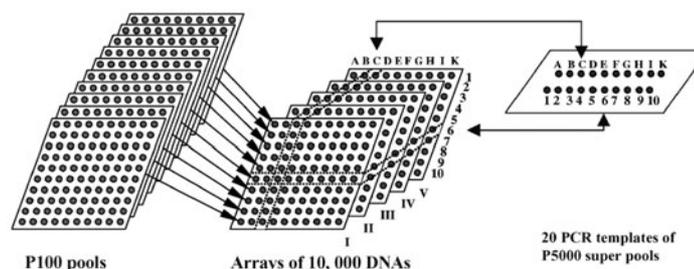
Enzymgemisch: Zellulase 1 % (w/v)  
 Macerozyme 0,2 % (w/v)  
 in 0,34 M GM-Puffer

Hypochlorid-Lösung: Calcium-Hypochlorid 5 % (w/v)  
 Triton-X-100 0,1 % (v/v)

Für die Herstellung der Calcium-Hypochloridlösung, zur Oberflächensterilisation von *A. thaliana* Samen, wurden 10 g Calcium-Hypochlorid und 200 µl Triton-X-100 in 200 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Abtrennung des ungelösten Hypochlorids wurde die Lösung dekantiert. Die gesättigte Lösung wurde in 50 ml Aliquots bei 4°C gelagert.

### 2.1.13 Aufbau der Koncz-T-DNA-Population

Die Koncz-T-DNA-Insertionsmutanten-Population (Rios G. *et al.*, 2002) besteht aus ca. 98.700 *A. thaliana* Einzellinien. Zur Herstellung der Population wurden *A. thaliana* Wildtyppflanzen des Ökotyps *Columbia* mit dem Vektor pPCV6NFhyg (Koncz *et al.*, 1989) transformiert. Ca. 100.000 Primärtransformanten (T<sub>1</sub>) wurden in Sterilkultur auf Agarplatten mit Hygromycin selektiert und auf Erde pikiert. Samen dieser Pflanzen wurden abgeerntet, getrocknet und in einem Kühlraum bei -20°C gelagert. Wird bei der PCR-Analyse der Koncz-Population eine Einzellinie identifiziert, die eine gewünschte T-DNA-Insertion trägt, stehen so die direkten Nachfahren (T<sub>2</sub>) der Primärtransformanten (T<sub>1</sub>) als Pflanzenmaterial zur Verfügung. Die gewünschte T-DNA segregiert in dieser T<sub>2</sub>-Population, homozygote Pflanzen müssen isoliert werden. Vor der Samenernte wurden einige Rosettenblätter der Einzelpflanzen (T<sub>1</sub>) abgetrennt und zur DNA-Präparation verwendet. Die Blätter von 100 verschiedenen Einzelpflanzen wurden zu einem Hunderterpool vereinigt und zur DNA-Präparation eingesetzt. Demnach besteht die Population aus 900 verschiedenen DNA-Hunderterpools, die in einem zweidimensionalen Schema zu Superpools vereinigt wurden. Insgesamt sind 20 Nummernpools und 20 Buchstabenpools generiert worden. Aufgrund des zweidimensionalen Poolings taucht jeder Hunderterpool in genau zwei Superpools, einem Nummernpool und einem Buchstabenpool auf. Das genaue Vorgehen und das Pooling-Schema ist in Abb.2.1 gezeigt, die genaue Zusammensetzung der einzelnen Superpools ist den Tabellen in Abb.2.2 zu entnehmen.



**Abb.2.1: Pooling-Schema zur Herstellung der Superpools der Koncz-T-DNA-Population.** Die Abbildung zeigt grobschematisch, wie bei der Herstellung der Superpools vorgegangen wurde. Die Koncz-T-DNA-Population besteht aus 90.000 Einzellinien. Je 100 Einzelpflanzen sind in einem Hunderterpool vertreten. Die 10x10 Arrays links repräsentieren je einen Hunderterpool. Zur Herstellung der Superpools wurden die 900 Hunderterpools in 9 Arrays (I, II, III, ... IIX, IX) aus je 10x10 Hunderterpools angeordnet. Zur Herstellung der Superpools wurden für den ersten Teil der Population die Arrays I bis IV verwendet, für den zweiten Teil der Population die Arrays V bis IX. Die Reihen und Spalten der Arrays sind mit Nummern (1 bis 10 bzw. 11 bis 20) bzw. Buchstaben (A bis J bzw. K bis T) beschriftet worden. Zur Herstellung eines Nummernpools wurden die korrespondierenden Reihen, bestehend aus je 10 Hunderterpools der 4 bzw. 5 Arrays, gemischt. Analog dazu wurden für einen Buchstabenpool die korrespondierenden Spalten der 4 bzw. 5 Arrays gemischt. Demnach besteht ein Superpool aus 40 bzw. 50 Hunderterpools und repräsentiert so 4.000 bzw. 5.000 Einzellinien. Aus dem zweidimensionalen Pooling-Schema geht hervor, daß jeder Nummernpool und jeder Buchstabenpool in genau einen Hunderterpool pro Array, also insgesamt in 4 bzw. 5 Hunderterpools übereinstimmen. Mit anderen Worten: jeder Hunderterpool ist in genau einem Nummernpool und in genau einem Buchstabenpool vertreten. (Rios *et al.*, 2002)

Ein Superpool besteht aus 40 bzw. 50 Hunderterpools oder 4.000 bzw. 5.000 Einzellinien. Die Population wurde zum Pooling in zwei Teile geteilt, der erste Teil besteht aus den Nummernpools „1“ bis „10“ und den Buchstabenpools „A“ bis „J“. Der zweite Teil der Population besteht aus den Nummernpools „11“ bis „20“ und den Buchstabenpools „K“ bis „T“. Die Superpools des ersten Teils bestehen aus jeweils 40 Hunderter Pools, insgesamt 40.000 Einzellinien. Die Superpools des zweiten Teils der Population umfassen jeweils 50 Hunderterpools, insgesamt 50.000 Einzellinien. Aufgrund des zweidimensionalen Poolings können mittels PCR und den 40 Superpools als Matrize 90.000 Einzellinien mit 160 PCR-Reaktionen durchmustert werden. Aliquots der Superpool-DNAs werden in zwei 96er-Mikrotiterplatten gelagert und stehen so zur Analyse mittels PCR zur Verfügung. Wie eine PCR-Analyse der Population durchgeführt wird, ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>A</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	<b>K</b>	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110		501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210		601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310		701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
<b>B</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	<b>L</b>	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120		901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
	211	212	-----	214	215	216	217	218	219	220		411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320		511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
<b>C</b>	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	<b>M</b>	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130		711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230		811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330		911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
<b>D</b>	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	<b>N</b>	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140		521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240		621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340		721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
<b>E</b>	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	<b>O</b>	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150		431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250		531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350		631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
<b>F</b>	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	<b>P</b>	731	732	733	734	735	736	737	738	739	-----
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160		-----	832	833	834	835	836	837	838	839	840
	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260		441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360		541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
<b>G</b>	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	<b>Q</b>	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170		741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270		841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370		451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
<b>H</b>	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	<b>R</b>	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180		651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280		751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380		851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
<b>I</b>	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	<b>S</b>	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190		561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290		661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390		761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
<b>J</b>	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	<b>T</b>	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870
	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200		471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300		571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
	391	392	393	394	395	396	397	398	-----	-----		671	672	-----	674	675	676	677	678	679	680

**Abb.2.2: Zusammensetzung der Superpools der Konz-T-DNA-Population.** Die Konz-Population besteht aus zwei Teilen. Die linke Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Superpools des ersten Teils, die rechte Tabelle die Zusammensetzung der Superpools der zweiten Populationshälfte. Der erste Teil besteht aus den Nummernpools 1 bis 10 und den Buchstabenpools A bis J, der zweite Teil aus den Nummernpools 11 bis 20 und den Buchstabenpools K bis T. Jeder Superpool umfasst 40 bzw. 50 Hunderterpools, jeder Nummernpool und jeder Buchstabenpool stimmen aber in nur 4 bzw. 5 Hunderterpools überein (Abb.2.1). Die Tabellen geben jeweils an, in Reihen bzw. Spalten, welche Hunderterpools in einem Superpools vertreten sind. Die Superpools „6“ und „C“ z.B. beinhalten beide die Hunderterpools 26; 126; 226 und 326.

**2.2 Methoden**

**2.2.1 Arbeiten mit Nucleinsäure und Proteinen**  
**2.2.1.1 Methoden zur Klonierung von DNA-Fragmenten**  
**2.2.1.1.1 DNA-Sequenzierung**

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Service-Einheit ADIS des Max Planck Institutes für Züchtungsforschung, Köln, durchgeführt. ADIS verwendet folgendes Equipment: Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) Abi Prism 377, 3100 und 3730 Sequencers unter Verwendung von „BigDye-terminator v3.1 chemistry“, Fertigreagentien wurden von Applied Biosystems bezogen.

#### 2.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch photometrische Bestimmung der Lichtabsorption einer wässrigen DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde deren Konzentration bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,0 einer Konzentration von etwa 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Bestimmung der Reinheit der Lösung diente der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm. Werte, die signifikant unterhalb 2,0 liegen, deuten auf eine starke Verunreinigung mit Proteinen hin.

Der Größenmarker der Firma GIBCO BRL bzw. Invitrogen wurde so verdünnt eingesetzt, daß die 1,6 kb-Bande eine Konzentration von 10 ng DNA hatte. Durch einen Vergleich der Intensitäten zwischen verschiedenen DNA-Fragmenten und der Berücksichtigung des aufgetragenen Volumens konnte eine ungefähre Mengenabschätzung vorgenommen werden.

#### 2.2.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Horizontale Gele wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Dabei wurde 0,8 % bis 1,2 % (w/v) Agarose in 1xTAE-Lösung durch Erhitzen gelöst. Nach Zugabe einer Ethidiumbromid-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  wurde die handwarme Agarose in eine Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Das erstarrte Gel ist dann in eine Elektrophoresekammer gesetzt und bevor die Kämme entfernt wurden mit 1xTAE überschichtet worden. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt und bei einer konstanten Spannung von 80 V bis 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das gleichzeitige Auftragen des 1 kb-Größenstandards machte die Abschätzung der aufgetragenen DNA-Menge möglich. Die DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht von 320 nm Wellenlänge sichtbar gemacht, es regte das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz an. Die Gele wurden photographisch dokumentiert.

#### 2.2.1.1.4 Präparation von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und aus Agarosegelen gereinigt. Zu Isolation wurde unterhalb des zu reinigenden Fragments mit einem Skalpell eine Tasche in das Agarosegel geschnitten. Diese wurde mit der PEG-Lösung (15% PEG; 1xTAE) aufgefüllt. Dann mußte die Elektrophorese für 2 bis 4 Minuten bei ca. 200 V fortgeführt werden, bis das Fragment vollständig in die PEG-Lösung gewandert war. Das PEG-DNA-Gemisch konnte aus der Tasche pipetiert werden. Die DNA wurde danach mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.1.1.5) und einer Ethanol-fällung (2.2.1.1.6) gereinigt. Das PEG bildet bei der Phenolisierung eine weiße Interphase, die DNA kann mit der wässrigen Oberphase abgetrennt werden.

#### 2.2.1.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um DNA von Proteinen zu reinigen, wurde die Probe mit einem gleichen Volumen PCI-Lösung extrahiert und bei Raumtemperatur mit 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Proteine sammeln sich in der Interphase zwischen der phenolischen und der wässrigen Phase, die DNA bleibt in der wässrigen Phase gelöst. Anschließend wurde die wässrige Oberphase – möglichst, ohne die Interphase zu beschädigen – abgenommen und mit einem gleichen Volumen CI-Lösung gemischt. Nach erneuter Zentrifugation, diesmal bei 11.000 rpm, ist ebenfalls die Oberphase abgenommen worden, die DNA wurde dann durch eine Ethanol-Präzipitation (2.2.1.1.6) isoliert.

#### 2.2.1.1.6 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Zur Fällung von DNA wurde die wässrige DNA-Lösung mit zweieinhalb Volumina 100 %igen Ethanol und einem Zehntel 3 M Natriumacetat (pH 6,0) vermischt. Bei der Präzipitation von Plasmid-DNA wurde für mindestens 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Genomische DNA wurde mehrere Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Eiswasser oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Plasmid-DNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge, genomische DNA durch 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm in einer Beckman-Bodenzentrifuge sedimentiert. Die Sedimente sind jeweils ein bis zwei mal mit  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten 70 %igen Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur für ca. 30 min getrocknet und in einem angemessenen Volumen 10 mM Tris (pH 8) oder destilliertem Wasser aufgenommen worden. Die Lagerung der DNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.1.1.7 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

0,1  $\mu\text{g}$  bis 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  bis 50  $\mu\text{l}$  behandelt. Als Puffer dienten die selbst hergestellten, unter 2.1.12.2.2 beschriebenen Puffer. Die Ansätze wurden mit

bis zu 5 U eines Enzyms versetzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37°C für 1 h bis 3 h inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme durch eine Inkubation bei 68°C für ca. 20 min. Bei Restriktionsspaltungen mit Enzymen, die nicht durch Hitze inaktivierbar sind, mußte eine PCI-Extraktion durchgeführt werden. Dies war der Fall, wenn die gespaltenen DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte bestimmt waren. Bei analytischen Restriktionsspaltungen wurde dann auf diese Prozedur verzichtet.

#### **2.2.1.1.8 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Bei der Ligation von Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, besteht die Gefahr einer Rezirkularisierung der Vektormoleküle. Zur Ligation benötigt die Ligase eine Phosphatgruppe an dem 5'-Ende der zu ligierenden DNA. Durch eine Dephosphorylierung dieser DNA, bei der die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestinal Phosphatase, CIP) abgespalten wird, kann eine Rezirkularisierung verhindert werden. Die Dephosphorylierung der linearisierten Vektor-DNA wurde mit dem entsprechenden Reaktionspuffer der Phosphatase in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers, ist eine Unit des Enzyms und dH<sub>2</sub>O eingesetzt worden. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Dann folgte die Reinigung der dephosphorylierten Vektor-DNA durch eine PCI-Extraktion. Mit Hilfe der beschriebenen Dephosphorylierung kann die sonst hohe Religationsrate linearisierter Plasmide stark vermindert werden.

#### **2.2.1.1.9 Vorbereitung von DNA-Fragmenten zur Klonierung**

Der Klonierungsvektor wurde an den für die Klonierung vorgesehenen Restriktionsschnittstellen im Polylinker oder anderen Bereichen der Fusionsgene gespalten, der linearisierte Vektor dephosphoryliert. Die DNA aus der das zu inserierende Fragment gewonnen werden sollte, wurde in der Regel mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wie der Vektor. Das gewünschte Fragment wurde über Gelelektrophorese aufgereinigt. Bei der Klonierung von PCR-Fragmenten sind diese Fragmente ebenfalls mit Restriktionsenzymen behandelt und aus Agarosegelen isoliert sowie durch eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung gereinigt worden.

Um ein DNA-Fragment mit überhängenden Enden (*sticky ends*) in einen Vektor mit glatten DNA-Enden zu ligieren wurden die überhängenden Enden des Fragments mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt oder entfernt. Dazu wurde das gereinigte Fragment für 15 bis 30 Minuten bei 37°C mit T4-DNA-Polymerase und dNTPs bzw. ohne dNTPs inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente erneut durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.

#### **2.2.1.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für eine möglichst hohe Ligationsrate wurden die beiden zu ligierenden DNA-Fragmente so gemischt, daß das zu inserierende Fragment im Verhältnis zum Vektor im Überschuß vorlag. Die Ligation wurde in einem möglichst geringem Volumen 10 µl bis 20 µl durchgeführt. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit überstehenden Enden wurden 2 U der T4-Ligase eingesetzt, der Ansatz wurde über Nacht in einem Wasserbad bei 15°C oder in einem Kühlschrank bei 8°C bis 10°C inkubiert. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten ohne überstehende Enden sind 4 U der T4-DNA-Ligase und 2U der T4-RNA-Ligase eingesetzt worden. Bei dieser sogenannten „*blunt end ligation*“ wurde der Ansatz zwei Stunden bei Raumtemperatur, dann über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Um die Ligationseffizienz zu bestimmen, ist immer ein Ligationsansatz mit dem zu inserierenden Fragment und einer ohne dieses angefertigt worden. Beide Ansätze wurden in gleicher Weise transformiert. Das Kolonieverhältnis zwischen beiden Ansätzen gibt Auskunft über die Ligationseffizienz. Durch die beschriebene Dephosphorylierung kann die Religation des Vektors nahezu verhindert werden. Dies wird durch besonders hohe Ligationseffizienzen deutlich.

#### **2.2.1.1.11 Allgemeine Klonierungsstrategien**

PCR-Fragmente, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, sind in der Regel mit käuflich erhältlichen “Kits“ kloniert worden. Die PCR-Fragmente wurden in die Vektoren pGEMT (Promega) oder pCR2.1 (Invitrogen) ligiert.

PCR-Fragmente, die mit der Vent-DNA-Polymerase amplifiziert wurden, wurden in den mit *EcoRV* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pBlueSkript (Stratagene) ligiert.

Alle verwendeten Plasmide erlaubten eine Blau-Weiß-Selektion. Die erhaltenen, positiven Klone wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen mit vektorspezifischen Oligonucleotiden bestätigt.

Zur Erstellung von Komplementationskonstrukten wurden in der Regel PCR-Reaktionen mit cDNA als Matrize durchgeführt. Dabei sind Primer verwendet worden, die spezifische Restriktionsschnittstellen z.B. für *Bam*HI und *Xba*I enthalten. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in den entsprechend vorbehandelten Vektor pRT101 ligiert. Dieser Vektor besitzt eine "multiple cloning side", die von einem 35S-Promotor und einem Poly-Adenylierungs-Signal eingerahmt wird. Die gesamte Kassette, bestehend aus dem 35S-Promotor, dem klonierten cDNA-Fragment und dem Poly-Adenylierungs-Signal, kann mit den Enzymen *Hind*III, *Pst*I oder *Pae*I (*Sph*I) ausgeschnitten werden. Diese Kassette wurde in einen Pflanzentransformationsvektor z.B. in den Vektor pGreen ligiert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* erstellt und in *A. tumefaciens* transformiert. Beim Pflanzentransformationsvektor pGreen handelt es sich um ein Zwei-Vektoren-System. Das pGreen-Plasmid ist relativ klein, zur Pflanzentransformation wird deshalb ein sogenanntes Helferplasmid, pJIC, benötigt, das die Virulenzgene trägt.

### 2.2.1.2 DNA-Präparations-Methoden

#### 2.2.1.2.1 Analytische Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Zur Überprüfung der Plasmide von größeren Anzahlen an *E. coli* Kulturen wurde die alkalische Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Es wurden jeweils 1,5 ml einer Übernachtskultur, eine Minute bei 12.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge), abzentrifugiert und in 100 µl 10xTE resuspendiert. Im Anschluß wurden 200 µl Mini-Lösung1 (0,2 M NaOH / 1% SDS) zugegeben und die Mixtur mehrfach invertiert. Um einen zu starken Aufschluss zu vermeiden, wurden direkt 150 µl Mini-Lösung2 (3M KCOOH) zugegeben und invertiert. Zur Trennung der DNA-Lösung von Zellrückständen ist die Lösung für 15 Minuten bei 12.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat gefällt. Das Sediment wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl TR (10 mM TrisHCl pH8,0; RNase) aufgenommen. Durch 30 minütige Inkubation bei 37°C wurde die RNA vollständig abgebaut. Zur Sequenzierung wurde die DNA einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung unterzogen.

#### 2.2.1.2.2 Plasmid-DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten

Zur Plasmid-DNA Gewinnung im präparativen Maßstab wurde die CsCl-Gradienten-basierende Methode angewandt. Ein Liter einer *E. coli*-Übernachtskultur ist ca. 20 Minuten mit 3.600 rpm bei 4°C zentrifugiert worden. Das Pellet wurde in 30 ml Lösung 1 (50 mM Glucose / 25 mM Tri-HCl (pH8,0) / 1 mM EDTA + 50mg/l Lysozym) resuspendiert und ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden nacheinander 60 ml von Lösung 2 (0,2 M NaOH / 1 % SDS) und 45 ml von Lösung 3 (3M KCOOH) zugegeben und gemischt. Anschließend folgte die zwei Stündige Inkubation auf Eis. Danach folgte eine 20 minütige Zentrifugation mit 12.000 rpm (GSA-Rotor) bei 4°C. Der Überstand wurde in einem frischen Zentrifugationsbecher mit 80 ml Isopropanol gemischt und bei -20°C über Nacht gefällt. Nach erneuter 20 minütiger Zentrifugation mit 12.000 rpm (GSA-Rotor) bei 4°C wurde das Pellet in 23,3 ml THE gelöst. Danach sind 24g CsCl zugegeben und gelöst worden. Dann wurden 600 µl der EtBr-Lösung (10mg/ml) zugegeben, das Gemisch in *quick-seal*-Zentrifugengefäße gegeben. Diese wurden mit *blank*-Lösung aufgefüllt, austariert und verschweißt. Die Ultrazentrifugation erfolgte über Nacht mit 45.000 rpm (VTi50) bei 20°C. Die in UV-Licht-sichtbare DNA-Bande wurde mit Spritze und Kanüle abgenommen und in ein frisches *quick-seal*-Zentrifugengefäß gegeben. Die zweite Ultrazentrifugation dauerte vier bis acht Stunden und erfolgte mit 58.000 rpm (VTi65) bei 20°C. Danach wurde die sichtbare DNA-Bande erneut abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch Ausschütteln mit 20xSSC-gesättigtem Isoamylalkohol entfernt. Das Cäsiumchlorid ist durch dreifache Dialyse gegen je fünf Liter TE-Dialyse-Puffer entfernt worden.

#### 2.2.1.2.3 Schnellpräparation von Pflanzen-DNA

In Anlehnung an die Edwards-Methode (Edwards *et al.*, 1991) konnten ca. 100 mg Blattmaterial in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) aufgearbeitet werden. Das Material wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit einem Eppendorf-Pistill (Biozym #710399) oder einer „blauen“ Einwegpipettenspitze (Greiner) kurz gemörsert und in ca. 500 µl Extraktionspuffer (Edwards-Puffer) gelöst. Bis alle Proben gemörsert sind, kann das bereits zerkleinerte Material auf Eis gelagert werden. Nach einer 20- bis 45-minütigen Inkubation in einem 65°C heißen Wasserbad folgte eine Chloroform-

Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung. Das DNA-Pellet wurde in 10 mM TrisHCl pH8,0 gelöst. Die enthaltene RNA konnte durch eine RNase-Behandlung abgebaut werden.

#### 2.2.1.2.4 DNA-Präparation mittels der CTAB-Methode

Zur DNA-Präparation aus einer beliebigen Menge Pflanzenmaterials wurde eine CTAB-Methode in Anlehnung an Rogers S.O. und Bendich A.J. (Plant Molecular Biology 5, 69-76, 1985) bzw. Rios *et al.* (2002) verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gemörsert. In der Regel wurden 100 mg bis 500 mg Blattmaterial eingesetzt. Das gemörserte Material wurde in 500 µl 2xCTAB-Puffer aufgenommen und ca. 30 min in einem 68°C heißen Wasserbad inkubiert. Dannach wurden die Proben kurz auf Eis gelagert und 400 µl Chloroform zugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurden 700 µl der Oberphase abgenommen und mit 70 µl des 10xCTAB-Puffers und 400 µl Chloroform gemischt. Nach einer erneuten fünf minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm wurden 600 µl der Oberphase mit 600 µl CTAB-Präzipitationspuffer gemischt. Es folgte wieder eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 300 µl Hochsalz-TE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 600 µl Ethanol gefällt. Dazu sind die Proben über Nacht bei -20°C inkubiert, danach bei 12.000 rpm zentrifugiert worden. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris pH8,0 gelöst. Die enthaltene RNA konnte durch eine RNase-Behandlung abgebaut werden

#### 2.2.1.2.5 DNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten

Zur Isolation höchst reiner DNA wurde die CsCl-Gradienten-Methode angewandt. Das Pflanzenmaterial wurde dazu in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zwischen zehn und fünfzig Gramm Pflanzenmaterial wurden in einem Waring Blendor mit Trockeneis zerkleinert. Der erhaltene Puder kam in 250 ml-Zentrifugenbecher und wurde in der Regel über Nacht bei -80°C gelagert. Das Material wurde vorsichtig in 120 ml Extraktionspuffer suspendiert. Nach der Zugabe von 8 ml 20 %igem SDS sind die Proben in einem Wasserbad bei 65°C für ca. 30 Minuten inkubiert worden. Dann wurde je 40 ml des 5M Kaliumacetats zugegeben und für 30 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei ca. 10.000 g in einer Ultrazentrifuge (GSA-Rotor). Die Überstände wurden durch Miracloth-Filterpapier in frische Zentrifugenbecher überführt. Nach Zugabe von 80 ml Isopropanol folgte eine Inkubation bei -20°C über Nacht. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10.000 g in einer Ultrazentrifuge (GSA-Rotor) wurde das Pellet kurz getrocknet und dann in 23,3 ml THE gelöst. Es wurden 24 g CsCl zugegeben und gelöst. Mit einer 5 ml-Gilsonspitze wurde die Lösung in „quick-seal“-Zentrifugengefäße (BECKMAN) überführt. Nach der Zugabe eines Milliliters EtBr-Lösung (10mg/ml) wurden die Gefäße mit *blank*-Lösung aufgefüllt und austariert, dann verschweißt. Es folgt eine Ultrazentrifugation (VTi50-Rotor) über Nacht bei 45.000 rpm und 20°C. Die im UV-Licht sichtbare DNA-Bande wurde mit Spritze und Kanüle abgenommen und in ein frisches Zentrifugengefäß gegeben. Erneut wurde EtBr- und *blank*-Lösung zugegeben und austariert. Nach Verschluss der Gefäße wurde für ca. vier bis acht Stunden bei 55.000 rpm (VTi65) und 20°C zentrifugiert. Die DNA konnte unter UV-Licht mit Spritze und Kanüle wieder abgenommen und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Das Etidiumbromid konnte durch Ausschütteln mit 20xSSC-gesättigtem Isoamylalkohol entfernt. Das Cäsiumchlorid ist durch dreifache Dialyse gegen je fünf Liter TE-Dialyse-Puffer entfernt worden.

#### 2.2.1.2.6 RNA-Präparation mittels CsCl-Gradienten

Zur RNA-Präparation ist das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gemörsert worden. Pro Gramm Pflanzenmaterial sind 4 ml des GTC-Extraktionspuffers eingesetzt worden. Je zwei Gramm des zermörserten Pflanzenmaterials wurden mit 8 ml Extraktionspuffer in einem 14 ml Falcon-Röhrchen gemischt. Nach Zugabe von 80 µl β-Mercaptoethanols wurden die Röhrchen ca. zwei Stunden bei 4°C gerollert (GFL3025). Darauf folgte eine 20 minütige Zentrifugation mit 4.000 g bei 4°C in einer Heraeus-Bodenzentrifuge. Der Überstand ist in offene Polyallomer-Zentrifugenröhrchen überführt worden, in denen 1,2 ml des 5,7 M CsCl vorgelegt waren. Die Ultrazentrifugation ist über Nacht mit 160.000g (SW55) bei 20°C durchgeführt worden. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment leicht getrocknet. Die Zentrifugenröhrchen sind mit einem heißen Skalpell ca. 1 cm oberhalb des Bodens abgetrennt worden. Das RNA-Pellet konnte in 3x100µl dH<sub>2</sub>O gelöst und in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Danach wurde für ca. zehn Minuten bei 55°C inkubiert und kurz – ca. eine Minute bei 13.000 rpm – zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgte nach Zugabe von 0,05 Volumen 1 M Essigsäure, 0,05 Volumen 5 M NaCl

und 2 Volumen 100 %igem Ethanol bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die RNA wurde anschließend durch eine Zentrifugation mit 13.000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  sedimentiert, das Pellet einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in 100  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst. Qualität und Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch und mittels eines Agarose-Testgels bestimmt.

#### 2.2.1.2.7 RNA-Präparation mit Hilfe des *Qiagen-RNeasy-Kits*

Zur Präparation von kleinen RNA-Mengen z.B. zur Herstellung von cDNA zur RT-PCR-Analyse wurde das *RNeasy-Kit* von Qiagen verwendet. Die Präparation wurde entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Optional wurde eine Inkubation mit RNAse freier DNase durchgeführt.

#### 2.2.1.2.8 Herstellung von cDNA zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Hauptsächlich wurde cDNA für Expressionsanalysen mittels RT-PCR hergestellt. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen isoliert. Für RT-PCR-Analysen wurde die RNA durch eine Inkubation mit DNase von DNA gereinigt. Die cDNA-Synthese ist mit der Super Script II Reversen-Transkriptase von Invitrogen durchgeführt worden. Dazu kamen 1  $\mu\text{g}$  bis 2  $\mu\text{g}$  der Gesamt-RNA mit 1  $\mu\text{l}$  Oligo-dT-Primer und 5  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix in einem Volumen von 13  $\mu\text{l}$  für zehn Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  in den Inkubator. Dies geschah in einem Thermo-Block einer PCR-Maschine. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert. Dann wurden jeweils 4  $\mu\text{l}$  des Super Script 5x Puffers, 2  $\mu\text{l}$  DTT und 1  $\mu\text{l}$  Reverse-Transkriptase zugegeben. Der gesamte Ansatz (20 $\mu\text{l}$ ) wurde dann in einer PCR Maschine eine Stunde lang bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert, dann durch eine zehnmütige Inkubation bei  $70^{\circ}\text{C}$  inaktiviert und auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die erhaltene cDNA wurde in eine RT-PCR-Reaktion – typischerweise mit 1  $\mu\text{l}$  pro 50  $\mu\text{l}$  Reaktion als Matrize – eingesetzt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.3 DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

##### 2.2.1.3.1 Standard-PCR zur spezifischen DNA-Amplifikation

Die PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, DNA-Fragmente *in vitro* zu kopieren. Dabei wird der gleiche Synthese-Mechanismus wie bei der *in vivo* DNA-Replikation verwendet. In einer PCR-Reaktion werden mit Hilfe von flankierenden Oligonukleotiden (Primer), einer hitzestabilen DNA-Polymerase und eines speziellen, programmierbaren Heizblocks (Thermocycler) DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert. Die Trennung der DNA-Stränge (Denaturierung) erfolgte dabei durch die Erhitzung auf  $95^{\circ}\text{C}$ . Bei einer speziellen Temperatur, die von der Zusammensetzung der Primersequenz abhängig ist, können diese Oligonukleotide an ihre spezifischen Bindungsstellen der Matrizen-DNA hybridisieren (Annealing). Abschließend erfolgt die Synthese der Zielsequenzen durch Verlängerung dieser Doppelstrang-DNA (Elongation) mit Hilfe der hitzestabilen Polymerase bei  $68^{\circ}\text{C}$  bzw.  $72^{\circ}\text{C}$ . Diese Prozedur wird 25-40 mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenzen kommt.

##### 2.2.1.3.1.1 Thermocyclerprogramme

Es wurden verschiedene Thermocyclerprogramme verwendet, die im Prinzip bis auf leichte Modifikationen dem folgenden Standard-PCR-Programm entsprachen. Je nach Anwendung muß die Annealing- und die Elongationszeit variiert werden.

<u>Schritt:</u>	<u>Temperatur / Dauer:</u>
Denaturierung	$95^{\circ}\text{C}$ , 5 min
35x Denaturierung	$95^{\circ}\text{C}$ , 1 min
Annealing	$58^{\circ}\text{C}$ , 1 min
Elongation	$72^{\circ}\text{C}$ , 1 min bis 2,5 min
End-Elongation	$72^{\circ}\text{C}$ , 8 min

Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes gewählt. Dabei geht man davon aus, daß die Polymerase ca. 1 kb bis 1,5 kb pro min synthetisiert. Als Annealing-Temperatur wurde standardmäßig  $58^{\circ}\text{C}$  gewählt, da meistens Primer mit einem GC-Gehalt von 50 % und einer Länge von 18 bp bis 28 bp eingesetzt wurden. Für die meisten Taq-Polymerasen ist eine Elongationstemperatur von  $72^{\circ}\text{C}$  optimal, für die TaKaRa-Taq-Polymerase wurden  $68^{\circ}\text{C}$  gewählt.

### 2.2.1.3.1.2 Reaktionsansätze

Die PCR-Reaktionen waren wie folgt zusammengesetzt: (50 µl Reaktionsvolumen)

- 5 µl 10x Puffer
- 5 µl dNTP Mix (je 2,5 mM dCTP, dATP, dTTP und dGTP)
- 1,5 µl *Sense*-Primer (10nM)
- 1,5 µl *Antisense*-Primer (10nM)
- 1 µl Matrizen-DNA (1µg/ml)
- 36 µl dH<sub>2</sub>O-Taq-Polymerase-Gemisch

Die Matrizen-DNA wurde stets so verdünnt, daß 1 µl pro PCR-Reaktion (50µl) eingesetzt werden konnte. Die Taq-Polymerase wurde als hochkonzentrierte Stocklösung bei -20°C gelagert. Für mehrere PCR-Ansätze ist immer ein sogenannter „*Mastermix*“ angesetzt worden. Dabei wurden zuerst alle Komponenten gemischt, die für alle Ansätze gemeinsam verwendet wurden – 10xPuffer, dNTPs, dH<sub>2</sub>O und die Taq-Polymerase. Pro Reaktion wurden, entsprechend der Herstellerangaben, zwischen einer und fünf Units der Taq-Polymerase eingesetzt. Das fertige Reaktionsgemisch wurde dann auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt, die Matrizen-DNAs und die Primer einzeln zugegeben.

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde Taq-Polymerase verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Generation von Expressionskonstrukten kamen spezielle Polymerasen zum Einsatz, die eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, eine sogenannte „*proofreading*“-Aktivität, besitzen. Diese Enzyme ermöglichen die fehlerfreie Amplifikation von 1.000 bp bis 2.000 bp.

Für die „*Screening-PCRs*“, bei denen DNA-Gemische von vielen Einzelpflanzen oder bei den Analysen vieler Einzelpflanzen, bei denen die DNAs mit der Edwards-Schnellpräparationsmethode hergestellt wurden, ist TaKaRa-Taq-Polymerase verwendet worden. Die TaKaRa-Taq-Polymerase ermöglicht die Amplifikation kleinster DNA-Mengen und auch verunreinigter DNA.

### 2.2.1.3.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zur Expressionsanalyse

Zur RT-PCR ist wie zuvor beschrieben Gesamt-RNA (2.2.1.2.5, 2.2.1.2.6) hergestellt und zur cDNA-Synthese (2.2.1.2.8) eingesetzt worden. Die cDNA diente als Matrize in einer Standard-PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Da mittels der RT-PCR die Expression von Genen analysiert wurde, sind genspezifische Primer-Paare gewählt worden, die mindestens ein Intron überspannen, damit der Größenunterschied zwischen einem Amplifikat genomischer DNA und cDNA sichtbar ist. Des Weiteren wurden die Primer so gewählt, daß möglichst Amplifikate der Größe 1 kb entstehen. Die PCR ist in 35 Zyklen, einer *Annealing*-Temperatur von 58°C und einer Elongationszeit von 2,5 Minuten durchgeführt worden. Die Amplifikate sind elektrophoretisch aufgetrennt worden, die Größe wurde analysiert.

### 2.2.1.3.3 Inverse PCR (iPCR) zur Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen

Mit iPCR und anschließender Sequenzierung der Amplifikate wurden z.B. bei T-DNA-Insertionen die Sequenzen der unbekannt, flankierenden genomischen DNA ermittelt (Triglia *et al.*, 1988). Dazu wurden Oligonucleotide verwendet, die spezifisch mit T-DNA-*border*-Bereichen oder mit den Resistenzmarkern der T-DNAs z.B. der Basta- oder der Kanamycin-Sequenz hybridisieren können. Die Oligonucleotide wurden so gewählt, daß sie voneinander weg weisen und nur dann ein Amplifikat ergeben, wenn die flankierenden Sequenzen einen Ringschluß bilden.

Genomische DNA der zu analysierenden Linien wurde wie zur Southern-Analyse beschrieben mit einer Restriktionsendonuclease gespalten, dann phenolisiert und in eine Ligation eingesetzt. Die Ligation wurde im Kühlschrank bei ca. 4°C über Nacht in einem großen Volumen (500 µl) durchgeführt. Mit dem hohen Volumen wird die Selbstligation der Enden eines Restriktionsfragmentes gegenüber der Ligation zweier Fragmente begünstigt. Anschließend wurde eine Standard-PCR mit Taq-Polymerase und den beschriebenen iPCR-Primern mit 1 µl des Ligationsansatzes als Matrize durchgeführt. Als PCR-Programm ist ein Standard-Programm mit 35 Zyklen, einer *Annealing*-Temperatur von 58°C und einer Elongationszeit von 2,5 Minuten ausgeführt worden.

Um die iPCR-Analyse zu vereinfachen, wurde die zu analysierende DNA zuvor einer Southern-Analyse unterzogen. Dazu wurden Standard-Enzyme, wie *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *BglII*, *XbaI* und *PstI* verwendet, die die T-DNA möglichst nah an den Enden spalten. Als Hybridisierungsprobe dienten die T-DNA-*border*-Bereiche, die auch von den iPCR-Primern abgedeckt werden. Die

Southern-Analyse zeigt die Größen der für die iPCR zu erwartenden Amplifikate an. Aufgrund der Southern-Analyse konnten Restriktionsenzyme gewählt werden, die möglichst kleine PCR-Fragmente im Bereich zwischen 2 kb bis 5 kb ergeben. In schwierigen Fällen wurde die Elongationszeit auf drei bis acht Minuten verlängert, außerdem wurde TaKaRa-Taq-Polymerase anstelle von Standard-Taq-Polymerase verwendet. Die erhaltenen PCR-Fragmente sind mit T-DNA- bzw. Basta- oder Kanamycin-spezifischen Oligonucleotiden sequenziert worden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „blast“ (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>) mit den BAC-Sequenzen des *A. thaliana* Genoms verglichen. Die Lokalisation der identifizierten BAC-Klone im *A. thaliana* Genom konnte mit dem Programm „Chromosome Map Tool“ (<http://www.arabidopsis.org/>) ermittelt werden.

#### 2.2.1.4 Genomische Southern-Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden

Die Southern-Blot-Analysen genomischer Pflanzen-DNA wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Zur Detektion sind DIG-markierte DNA-Sonden und DIG-spezifische Antikörper verwendet worden. Die verwendeten Antikörper waren Alkaline-Phosphatase-gekoppelt und konnten somit mit dem CSPD-Substrat und Röntgenfilm detektiert werden. Die Herstellung der Sonden, die Hybridisierung und die Detektion der Sonden wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers (ROCHE), der DIG-markierten Nucleotide, der DIG-spezifischen Antikörper und des CSPD-Substrats durchgeführt. Zur einfacheren Auswertung der Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen wurde immer auch Wildtyp-DNA mit aufgetragen, so daß immer ein Größenvergleich zwischen den Restriktionsfragmenten des Wildtyps und der analysierten T-DNA-Mutanten möglich ist. Darüber hinaus wurde die Sequenz der zu analysierten Loci aus der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erhalten und mit dem Programm „mapsort“ aus dem GCG-Programm-Paket der Genetics Computer Group, Inc. (GCG) analysiert. Anhand dieser Analyse konnten die Größen der zu erwartenden Restriktionsfragmente vorhergesagt werden.

##### 2.2.1.4.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA

Zur Restriktionsspaltung genomischer Pflanzen-DNA wurden in der Regel 2 µg bis 10 µg über CsCl-Gradienten gereinigte DNA eingesetzt. Diese Menge konnte in einem Volumen von 50 µl bis 100 µl gespalten werden. Dabei wurden die selbst hergestellten Puffer (2.1.12.2.1) verwendet, dem Restriktionsansatz wurde Spermidine der Endkonzentration 2 mM zugesetzt. In geeigneter Konzentration zwischen 0,5 mM und 10 mM hilft Spermidine eine Restriktionsspaltung zu optimieren (M.D. Topal *et al.*, 1991; D.R. Morris *et al.*, 1987). Die Restriktionsspaltung erfolgte in zwei Schritten bei 37°C unter Verwendung von 20 U bis 25 U des Restriktionsenzym. In der Regel wurde eine Spaltung über Nacht mit der Hälfte des Restriktionsenzym durchgeführt. Nach Zugabe weiteren Enzym wurde für einige Stunden (4 h bis 8 h) weiter gespalten. Die Qualität der Restriktionsspaltung wurde durch ein Testgel mit einem Zehntel des Ansatzes überprüft. Wenn das Volumen der Restriktionsspaltung die Kapazität der Geltaschen übertraf, wurde diese vor der elektrophoretischen Auftrennung durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt und in einem kleineren Volumen aufgenommen.

##### 2.2.1.4.2 Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurden große, 0,8 %ige TAE-Gele (18 cm x 22 cm) mit breiten Taschen (5 mm) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht (16 h) bei ca. 25 Volt.

##### 2.2.1.4.3 Immobilisierung der DNA auf Nylon-Membranen – Southern-Transfer

Für den Nucleinsäure-Transfer wurde ein neutraler Transfer-Puffer, 10xSSC oder 10xSSPE, verwendet. Er erfolgte über Nacht. Als Membran wurde eine positiv-geladene Nylonmembran (ROCHE) verwendet. Das Gel wurde zuvor photographiert und mit verschiedenen Lösungen inkubiert. Zuerst wurde es ca. zehn Minuten, bis zur Verfärbung des Blaumarkers, in 0,2 N Salzsäure (HCl) gelagert, dann mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen. Darauf folgten jeweils zwei zwanzigminütige Inkubationen in Denaturierungs- bzw. Neutralisierungs-Lösung, zwischen denen das Gel mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen wurde. Unmittelbar vor dem Transfer wurde die Membran mit dH<sub>2</sub>O angefeuchtet und ca. 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz (2 Minuten) mit Waschpuffer A (2xSSC) gewaschen, anschließend auf 3MM-Papier getrocknet und dann in einem UV-Crosslinker (120 mJ) behandelt. Die Membrane wurden bei Raumtemperatur gelagert oder direkt in eine Prähybridisierung eingesetzt.

#### 2.2.1.4.4 Sonden-Synthese

Die Sonden wurden mittels PCR hergestellt. Dabei ist ein Gemisch aus DIG-markierten und unmarkierten Nucleotiden verwendet worden. Als Matrize dienten Plasmide (pGEMT), die PCR-Fragmente wurden zur Mengen- und Größenkontrolle mit einem Agarose-Testgel analysiert. Durch den Einbau DIG-markierter Nucleotide erhalten die PCR-Fragmente ein anderes Laufverhalten, sie erscheinen größer im Agarosegel. Zur Mengenabschätzung wurde eine definierte Menge eines Lambda-Markers geladen. Für die Hybridisierung wurden 25 µg der DIG-markierten PCR-Fragmente pro Milliliter Hybridisierungs-Lösung verwendet.

#### 2.2.1.4.5 Hybridisierung der Filter mit DIG-markierten Sonden

Die erhaltenen Filter wurden 30 bis 60 Minuten bei 42°C mit der Prähybridisierungslösung inkubiert. Die DIG-markierten Sonden wurden in einem kochenden Wasserbad ca. zehn Minuten lang denaturiert, dann kurz auf Eis gelagert und zur Hybridisierungslösung gegeben. Zur Prähybridisierung wurden 20 ml, zur Hybridisierung 3,5 ml DigEasyHyb-Lösung (ROCHE) pro 100 cm<sup>2</sup> der Membran eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16 h) ebenfalls im Wasserbad bei 42°C. Für alle Hybridisierungsschritte wurden die Membrane in PE-Folien eingeschweißt. Alle Waschschriffe wurden in offenen Plastikschaalen durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Sonden zurück in 15ml-Falcon-Röhrchen gegeben und bei -20°C gelagert. Die Filter wurden zweimal fünf Minuten lang bei Raumtemperatur in 200 ml Waschluffer B (2xSSC/0,1%SDS) gewaschen. Dann zweimal 15 Minuten bei 68°C mit 200 ml Waschluffer C (0,1xSSC/0,1%SDS) gewaschen.

#### 2.2.1.4.6 Detektion mit einem DIG-spezifischen Antikörper, CSPD-Substrat und Röntgenfilm

Unmittelbar nach dem letzten Waschluffschritt wurden die Membranen fünf Minuten in Waschluffer (200ml) inkubiert. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation in Blocklösung (100 ml / 100 cm<sup>2</sup>). Der DIG-spezifische, Alkaline-Phosphatase-gekoppelte Antikörper wurde 1:10.000 in Blocklösung verdünnt. Für die 30-minütige Hybridisierung bei Raumtemperatur wurden 20 ml der mit dem DIG-spezifischen Antikörper versetzten Blocklösung pro 100 cm<sup>2</sup> der Membrane verwendet. Nach der Hybridisierung wurde der Antikörper bei 4°C gelagert, die Membran wurde zweimal für 15 Minuten mit 100 ml / 100 cm<sup>2</sup> Waschluffer D (Maleinsäurepuffer/0,3%Tween20) gewaschen. Anschließend wurde der Filter fünf Minuten lang in Detektionspuffer (20 ml / 100 cm<sup>2</sup>) equilibriert. Ein Milliliter der CSPD-Arbeitslösung wurde pro 100 cm<sup>2</sup> auf die Membran gegeben. Nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die CSPD-Lösung abgetropft, die Membran in Folie gepackt und 10 min bei 37°C inkubiert. Dann folgte die 15- bis 30-minütige Exposition der Membran mit einem Röntgenfilm bei Raumtemperatur.

Zur mehrmaligen Hybridisierung einer Membran mit verschiedenen DIG-markierten Sonden wurde die Membran nach der Entwicklung des Röntgenfilms mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und zweimal für 15 Minuten bei 42°C mit 100 ml bis 200 ml Strip-Lösung gewaschen. Dann wurde ca. fünf Minuten lang mit Waschluffer A (2xSSC) behandelt und bei 4°C gelagert oder direkt in eine erneute Prähybridisierung eingesetzt.

#### 2.2.1.5 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wurden Proteine in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die immobilisierten Proteine wurden in zwei Schritten mit verschiedenen Antikörpern detektiert. Die Antikörper konnten durch Chemielumineszenz und Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

##### 2.2.1.5.1 Protein-Präparation aus Pflanzen

Es wurden Proteine aus *A. thaliana* Pflanzen oder Suspensionskulturen gereinigt. Die Suspensionskulturen wurden über Miracloth-Filterpapier gegeben, um das Suspensionsmedium abzutrennen, dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert. Für analytische Präparationen wurde ein Milliliter einer Kultur abgenommen, bei 11.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Sediment wurde tiefgefroren, dann in Extraktionspuffer aufgenommen und gemörsert. Bei der Analyse von Pflanzenmaterial wurde dies geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert oder direkt gemörsert, anschließend in Extraktionspuffer aufgenommen. Nachdem das Material in Extraktionspuffer aufgenommen war, wurde für Proben in gleicher Weise

verfahren. Durch eine Zentrifugation bei 1.000 g wurden alle nicht aufgebrochenen Zellen abgetrennt. Der Überstand konnte – mit Probenpuffer gemischt – direkt elektrophoretisch aufgetrennt werden oder durch weitere Zentrifugationsschritte fraktioniert werden. Je nach Größe der Ausgangsmenge konnte die erste 1.000 g-Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge und 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder mit einer Hereaus-Bodenzentrifuge und 14 ml- oder 50 ml-Falcon-Röhrchen durchgeführt werden. Zur weiteren Fraktionierung wurde mit 11.000 g zentrifugiert. Dazu sind Beckman-Zentrifugen-Röhrchen und eine Sorval-Zentrifuge mit SS34-Rotor verwendet worden. Durch die Zentrifugation mit 1.000 g konnten Zelltrümmer, nicht aufgebrochene Zellen und Zellkerne mit dem Sediment abgetrennt werden. Bei einer weiteren Zentrifugation mit 10.000 g werden Zellorganellen wie Mitochondrien und Chloroplasten sedimentiert. Um cytosolische Proteine von Membran-gebundenen Proteinen zu trennen, wurde eine erneute Zentrifugation mit 100.000 g durchgeführt. Dazu wurde eine Beckman-Ultrazentrifuge mit SS55-Rotor verwendet. Die Membran-Pellets sind mit Detergens-haltigem Extraktionspuffer (Triton-X-100) aufgenommen worden, die 1.000 g und 11.000 g Pellets in Extraktionspuffer gelöst. Aliquots aller Fraktionen wurden mit 5xProbenpuffer gemischt, zehn Minuten in einem Heizblock bei 95°C denaturiert und bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert.

#### **2.2.1.5.2 Protein-Präparation aus *E. coli***

Übernachtskulturen wurden bei 10.000 g in einer Tischzentrifuge in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen sedimentiert. Große präparative Ansätzen sind in 1L-Beckmann-Zentrifugenbechern bei 3.600 rpm in einer Beckman-J-6B-Zentrifuge mit JS4,0-Rotor sedimentiert worden. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert oder in Extraktionspuffer aufgenommen und auf Eis gelöst. Dann folgte die Zentrifugation der Proben mit 10.000 g. Dies geschah in einer Tischzentrifuge oder in einer Sorval-Bodenzentrifuge (SS34) bei 4°C. Die Überstände wurden abgenommen, die Sedimente in Extraktionspuffer oder direkt in Probenpuffer gelöst. Lösliche Proteine befinden sich im Überstand. Aliquots wurden mit 5xProbenpuffer gemischt, zehn Minuten in einem Heizblock bei 95°C denaturiert und bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert.

#### **2.2.1.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen – SDS-PAGE**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde nach Laemmli (1979) durchgeführt. Es wurde ein Gel-System (10 cm x 8 cm) von Biorad verwendet. In der Regel wurden 10 %ige Polyacrylamidgele, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden, eingesetzt. Ein 40 %ige Stocklösung aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1 wurde zur Gelpräparation verwendet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit Butanol überschichtet. Dann wurde das Butanol abgegossen, das Trenngel mit einem ca. 2 cm langen Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Doppelkammer (Biorad) mit 40 mA für ca. 1,5 Stunden. Die Proteine konnten mit einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.1.5.4 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen – Western Blot**

Nach der Elektrophorese wurden die Sammelgele abgetrennt, die Trenngele für ca. zehn Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde parallel kurz mit Methanol benetzt, dann nacheinander für jeweils ca. fünf Minuten in dH<sub>2</sub>O und Transferpuffer gelagert. Zum Transfer ist das Gel auf zwei angefeuchtete Stücke 3MM-Papier gelegt worden, darauf die Membran und zwei weitere Lagen 3MM-Papier. Zum Transfer wurde eine Elektro-Blot-Apparatur von Biorad verwendet. Der Blot wurde so orientiert, daß das Gel zur negativ geladenen Anode, die Membran zur positiv geladenen Kathode ausgerichtet war. Die wegen des SDS negativ geladenen Proteine wandern aus dem Gel zur Membran in Richtung der Kathode. Der Transfer wurde bei 20 bis 25 V durchgeführt, er dauerte mindestens 1,5 Stunden bis zu 16 Stunden über Nacht. Nach dem Transfer wurden die Membrane zur Detektion direkt mit Milchpulver geblockt oder zur späteren Verwendung getrocknet. Die Proteine konnten mit einer Ponceau-Lösung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran kurz in Ponceau-Lösung inkubiert, dann mehrfach mit dH<sub>2</sub>O entfärbt. Anschließend wurde die Membran getrocknet oder hybridisiert.

#### **2.2.1.5.5 Detektion von Membran-gebundenen Proteinen**

Zur Detektion Membran-gebundener Proteine wurden grundsätzlich zwei Antikörper verwendet. Der erste, primäre Antikörper ist spezifisch für das zu detektierende Protein. Der zweite, sekundäre Antikörper erkennt spezifisch den Primär-Antikörper, er ist in der Regel mit Peroxidase (POD) oder Alkaline-Phosphatase (AP) gekoppelt. Die Sekundärantikörper wurden mittels Chemielumineszenz und Röntgenfilm detektiert. Dazu wurde im Falle der Peroxidase-gekoppelten Antikörper das ECL-

Substrat (Amersham), im Fall der Alkaline-Phosphatase-gekoppelten Antikörper das CSPD-Substrat (Roche) entsprechend der Herstellervorgaben verwendet.

Nach dem Transfer wurde die Membran ca. eine Stunde mit 5% Milchpulver, in TBST gelöst, geblockt. Dann wurde sie mit dem primären Antikörper für ca. eine Stunde inkubiert, danach die Membran zweimal mit TBST (0,05% Tween20) gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper dauerte anschließend auch eine Stunde. Die Membran wurde dann abgetropft und zwischen zwei Folien mit den zuvor beschriebenen Substraten inkubiert. Die Exposition mit Röntgenfilm dauert zwischen zwei und 20 Minuten.

## **2.2.2 Arbeiten mit *E. coli***

### **2.2.2.1 Anzucht von *E. coli*-Bakterien**

Zellen der unter 2.1.8 beschriebenen *E. coli*-Stämme sind aus Glycerin-Stammkulturen in einer angemessenen Verdünnung auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C inkubiert worden. Sie konnten anschließend zwei bis drei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Für Übernachtskulturen transformierter Bakterien wurden 3 ml bis 5 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Zur Anzucht von größeren Kulturen transformierter Bakterien wurden 250 ml bis 1L Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde erneut über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### **2.2.2.2 Lagerung von *E. coli*-Bakterien**

Um Bakterienstämme oder transformierte Bakterien langfristig lagern zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu sind 1000 µl einer Übernachtskultur mit 600 µl Glycerin (86 %) versetzt worden. Daraus ergibt sich eine Endkonzentration von ca. 32 % Glycerin. Die Kultur wurde durch mehrfaches Invertieren gemischt und nach ca. einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

### **2.2.2.3 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Bakterien**

Als Startkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des kompetent zu machenden Bakteriums angeimpft und über Nacht inkubiert. Es folgte die Verdünnung dieser Startkultur mit 300 ml LB-Medium und eine erneute Inkubation über Nacht bei 25°C. Die optische Dichte wurde von einer 1:10 Verdünnung bestimmt. Zu 500 ml LB-Medium wurden ca. 20 ml der Übernachtskultur gegeben, so dass die optische Dichte ca. 0,01 bis 0,05 entsprach. Dann wurde die Kultur in einem 1L-Erlenmeyerkolben für einige Stunden bei 22°C bis 25°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von ca. 0,3 bis 0,4 inkubiert. Danach erfolgte eine Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 3.600 rpm (Beckman J6-B, Rotor: JS 4,0) und einer Temperatur von 4°C sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden drei Mal mit eiskaltem 1mM HEPES-Puffer (pH 7,0) gewaschen, wobei die Waschschrte in einem kleineren Volumen in 250ml-Beckman-Zentrifugenbechern durchgeführt wurden. Der letzte Waschschrte ist in 50ml-Falcon-Röhrchen mit 1mM HEPES-Puffer (pH 7,0) dem 10% Glycerin zugesetzt waren durchgeführt worden. Zum Schluß wurde das Zellsediment in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens mit 1mM HEPES (pH 7,0) / 10% Glycerin resuspendiert und anschließend in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt, die in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert wurden.

### **2.2.2.4 Transformation elektro-kompetenter *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA**

Ein 50 µl-Aliquot gefrorener Bakterienzellen (2.2.2.3) wurden bei 4°C (Eiswasser) aufgetaut und in Elektropurationsküvetten umgefüllt. Die Zellen wurden mit 1 bis 2,5 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl einer Plasmid-DNA-Lösung versetzt. Die DNA wurde dann mit einem Elektroporator (Biorad) in die *E. coli*-Zellen übertragen. Nach Zugabe von 0,8 ml SOC-Flüssigmedium (Raumtemperatur) wurde die Zellsuspension in 15 ml Falcons (17 x 100 mm) überführt und bei 37°C im Wärmeschrank für 45 min bis 60 min unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden 20 µl, 200 µl und der Rest des Transformationsansatzes auf jeweils einer LB-Platte mit den entsprechenden selektionierenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.3 Arbeiten mit *A. tumefaciens***

#### **2.2.3.1 Anzucht von *A. tumefaciens*-Bakterien**

Zellen des unter 2.1.8 beschriebenen Stammes von *Agrobacterium tumefaciens* wurden aus Langzeitkulturen in einer angemessenen Verdünnung auf YEB-Agarplatten (die Rifampicin, Gentamycin und ein weiteres entsprechendes Antibiotikum enthielten) ausplattiert und bei 28°C über zwei Tage inkubiert. Die Platten konnten anschließend ein bis zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Für Kulturen transformierter Bakterien wurden 5 ml YEB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 28°C für zwei Tage geschüttelt. Zur Anzucht von größeren Kulturen transformierter Bakterien wurden 250 ml mit einer Zweitagekultur angeimpft und für zwei bis drei Tage bei 28°C geschüttelt.

#### **2.2.3.2 Lagerung von *A. tumefaciens*-Bakterien**

Um Bakterienstämme oder transformierte Bakterien langfristig lagern zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu sind 1000 µl einer Übernachtskultur mit 600 µl Glycerin (86 %) versetzt worden. Daraus ergibt sich eine Endkonzentration von ca. 32 % Glycerin. Die Kultur wurde durch mehrfaches Invertieren gemischt und nach ca. einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

#### **2.2.3.3 Präparation kompetenter Zellen von *A. tumefaciens***

Die Präparation von kompetenten *A. tumefaciens* Zellen wurde nach Höfgen und Willmitzer (1988) durchgeführt. Eine Kolonie des kompetent zu machenden Stammes wurde in 20 ml Flüssig YEB-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Im Fall des Stammes GV3101(pMP90) ist dem Medium Gentamycin zugesetzt worden. Wenn ein Stamm kompetent gemacht wurde, der schon ein weiteres Plasmid trug, wie z.B. das Plasmid pJIC (*tet*), ist zusätzlich noch Tetracyclin zugegeben worden. Die 20 ml Übernachtskultur wurde in 200 ml LB-Medium überführt und solange weiter inkubiert, bis sie eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von ca. 0,8 erreicht hatte. Dies dauerte 8 bis 10 Stunden. Die 200 ml Flüssigkultur ist auf vier vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und bei 2500g und 4°C abzentrifugiert worden. Die entstehenden Sedimente wurden einmal mit vorgekühltem TE gewaschen und anschließend in jeweils 10 ml YEB-Medium resuspendiert und in Aliquots zu 250 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

#### **2.2.3.4 Transformation kompetenter *A. tumefaciens*-Bakterien mit Plasmid-DNA**

Die Transformation erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll von Höfgen und Wilmitzer (1988). Ein 250 µl Aliquot der gefrorenen, kompetenten Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut und mit  $\leq 10$  µl eines Ligationsansatzes oder 2-5 µl einer Plasmid-DNA-Lösung versetzt, gemischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach fünfminütigem Kälteschock in flüssigem Stickstoff sind die Zellen für fünf Minuten auf 37°C erhitzt worden. Danach kamen 0,8 ml YEB-Flüssigmedium hinzu und die Zellsuspension wurde bei 28°C für 3 bis 4 Stunden unter Schütteln inkubiert. Anschließend ist der gesamte Transformationsansatz auf einer YEB-Platte mit den entsprechenden selektionierenden Antibiotika ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 28°C inkubiert worden.

#### **2.2.3.5 Plasmid-DNA-Präparation aus *A. tumefaciens***

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurden die gleichen Lösungen wie zur Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli* verwendet. Das Präparationsprotokoll wurde wie folgt abgeändert: Eine Einzelkolonie von *A. tumefaciens* ist über Nacht in 5 ml bis 20 ml LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika unter Schütteln bei 28°C inkubiert worden. Diese Kulturlösung wurde anschließend in 15 ml Falcons überführt und durch Zentrifugation sedimentiert. Das erhaltene Sediment ist in 500 µl TE aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Nach Zugabe von 1 ml Mini-Lösung I folgte eine weitere zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nachdem 150 µl alkalisches Phenol (250 µl Phenol + 15 µl 1 M NaOH) zugegeben war, wurde vorsichtig gemischt und 750 µl Mini-Lösung II zugefügt. Nach erneutem Mischen wurde 5 min bis 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 5.500 g wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand kam in ein frisches Gefäß. Die DNA wurde durch eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung extrahiert bzw. gefällt. Sie wurde anschließend in ca. 100 µl TE/RNase resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Um eventuelle DNase-Kontaminationen zu inaktivieren, kann der Ansatz zuvor 20 min bei 68°C inkubiert werden.

In der Regel wurden 2 µl bis 20 µl der Präparation für eine Restriktionsspaltung und anschließender Southern-Analyse oder einer PCR-Analyse eingesetzt.

## 2.2.4 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.4.1 Allgemeine Anzuchtbedingungen

#### 2.2.4.1.1 Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen auf Erde

Die Aussaat von *A. thaliana* erfolgte mit einer Dichte von bis zu zehn Samen pro cm<sup>2</sup> direkt auf die oberste Schicht des Bodens. Um die Samenruhe zu brechen und die Keimung zu synchronisieren, wurde das Saatgut vor der Aussaat für mindestens vier Tage bei 4°C stratifiziert. Nach ca. zwei Wochen befanden sich die Keimlinge im Vierblatt-Stadium und wurden pikiert. Die Bewässerung sollte sich nach dem Bedarf der Pflanzen richten. In der ersten Woche darf die Kultur daher nur von unten angestaut werden, um die jungen Keimlinge nicht zu zerstören. Die Kultur wird in dieser Woche mit einer Kunststoffhaube abgedeckt. Für Experimente, die keine speziellen physiologischen Bedingungen erfordern, zeigen die folgenden Kulturbedingungen optimale Ergebnisse:

Kulturbedingungen im Gewächshaus:

Photoperiode	8h, Photonenflußdichte 450 µEm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> (mit Zusatzbeleuchtung)
Temperatur	20-24°C Tag, 18-20°C Nacht
relative Luftfeuchte	60-70%

Die Kulturbedingungen im Gewächshaus sind großen Schwankungen unterworfen. Insbesondere hohe Temperaturen im Sommer machen Experimente schwer reproduzierbar, da *A. thaliana* temperatursensitiv reagiert.

#### 2.2.4.1.2 Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen *in vitro*

In der Regel werden *A. thaliana* Keimlinge *in vitro* auf Agarplatten angezogen. Dazu werden *A. thaliana* Samen oberflächensterilisiert (2.2.4.1.3) und auf Agarplatten ausgelegt und ausgekeimt. *A. thaliana* Pflanzen können mehrere Wochen auf Agarmedium in Petrischalen und Glassgefäßen angezogen werden. In der Regel werden sie jedoch nur zwei bis drei Wochen *in vitro* kultiviert, das ist für die Selektion mit Antibiotika oder zur Hormonbehandlungen ausreichend. Nach dieser Zeit werden sie dann auf Erde pikiert und bis zur Samenernte weiter kultiviert.

*A. thaliana* kann zu verschiedenen Zwecken auch in Flüssigkultur angezogen werden. Die Anzucht in Flüssigkultur mit MS-Medium ist hervorragend zur Gewinnung von Pflanzenmaterial zur DNA-Präparation und zur Selektion transgener Pflanzen, z.B. mit dem Antibiotikum Kanamycin, geeignet.

#### 2.2.4.1.3 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

Zur Oberflächensterilisation wurden *A. thaliana* Samen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit ca. dem zehnfachen Volumen einer 5 %igen Calcium-Hypochlorid-Lösung gemischt und 1 bis 15 Minuten geschüttelt. Dann wurden die Samen kurz sedimentiert, die Lösung abpipetiert. In gleicher Weise sind die Samen dann einmal mit 80 %igem Ethanol und dreimal mit MS-Medium gewaschen worden. Zur Synchronisation konnten die Samen über Nacht im Dunkeln mit MS-Medium überschichtet gelagert oder direkt auf Agar-Platten ausgelegt werden.

## 2.2.4.2 Pflanzentransformation mit Agrobakterien

### 2.2.4.2.1 Anzucht von *A. thaliana* zur Infiltration

Samen vom *A. thaliana* Wildtyp oder den entsprechenden T-DNA-Mutanten wurden auf Erde ausgelegt und im Gewächshaus angezogen. Nach 10 Tagen wurden je 5-10 Keimlinge in Töpfe (10 cm Durchmesser) vereinzelt. Damit die Pflanzen kräftige Rosetten bilden, wurden sie 2-3 Wochen unter Kurztagsbedingungen in der Klimakammer angezogen. Die ersten Infloreszenzen wurden abgeschnitten, nachdem sie 10 cm Länge beim Wildtyp oder 2 cm bis 3 cm bei den *cpd*-Mutanten erreicht hatten, um die Bildung von nachfolgenden Infloreszenzen zu fördern. Etwa eine Woche später hatten die Pflanzen viele junge Infloreszenzen entwickelt und konnten zur Transformation eingesetzt werden. Zwei Tage vor der Transformation wurde die Erde vorsichtig, mit einer Spritzflasche, von oben befeuchtet und leicht angedrückt.

### 2.2.4.2.2 Anzucht von *A. tumefaciens* zur Infiltration

Eine Kolonie von *A. tumefaciens* wurde vom Anzuchtmedium der Platte in 500 ml LB-Flüssigmedium übertragen und zwei Tage bei 28°C in einem 1L-Erlenmyerkolben geschüttelt. Zuvor wurden dem

Medium die entsprechenden Antibiotika sowohl zur Selektion des Agrobakterienstammes (GV3101: Rifampicin / Gentamycin) als auch der gewünschten Plasmide (pPCV: Carbenicilin / Kanamycin; pGreen: Kanamycin; pJIC, Tetracyclin) zugegeben. Nach zwei Tagen konnten die Zellen durch Zentrifugation bei 2500 g (4000 rpm in einer J-6B-Beckman Zentrifuge mit JS4,0-Rotor) für 15 min sedimentiert werden. Das Medium wurde verworfen. In Infiltrationsmedium wurden die Zellen resuspendiert, so daß die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,8 erreichte. In der Regel hatten die Bakterien nach zwei Tagen Wachstum eine OD<sub>600</sub> von 1 bis 1,2 erreicht.

#### 2.2.4.2.3 Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* wurde nach der Blüten-Tauch-Methode („floral-dip“) durchgeführt (Clough, 1998; Desfeux, 2000; Bechtold, 2000). Die Agrobakterien wurden wie beschrieben angezogen und in Infiltrationsmedium aufgenommen (2.2.4.2.2). Unmittelbar vor der Infiltration wurde die Bakterienkultur im Verhältnis 1:2.000 (z.B. 200 µl auf 400 ml) mit Silwet L-77 versetzt und gut gemischt. Etwa 100 ml bis 150 ml dieser Infiltrationslösung kamen in eine kleine Plastikschaale (12,5 x 12,5 x 2,5 cm) oder ein flaches Becherglas. Die zu infiltrierenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurden kopfüber mit den Blüten unter leichten Auf und Ab-Bewegungen für ca. 10 s bis 30 s, in die Infiltrationslösung getaucht. Anschließend wurden die Töpfe waagrecht auf den Tisch gelegt, damit die Pflanzen abtrocknen konnten. Dies ist unbedingt zu beachten, da die Pflanzen sonst zu feucht bleiben und sich Schimmel bildet. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen unter einer Haube für zwei bis drei Tage kultiviert. In dieser Zeit darf die Temperatur nicht über die zum Wachstum von *A. tumefaciens* optimalen Temperatur von 28°C steigen. Nach dieser Zeit sind die Pflanzen bis zur Samenbildung im Gewächshaus weiter gepflegt worden.

Mit dieser Transformationsmethode konnten ähnlich gute Ergebnisse wie mit der herkömmlichen Vacuuminfiltrationstechnik erzielt werden. Zur Erreichung einer höchstmöglichen Transformationsrate z.B. bei der Transformation der *cpd*-Mutante, die schlechter als der Wildtyp transformierbar ist, wurden beide Methoden kombiniert.

#### 2.2.4.2.4 Samenernte von Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation und Selektion der transgenen Pflanzen in der T<sub>1</sub>-Generation

Bis zu zehn Pflanzen eines Topfes wurden zum Zeitpunkt des Abreifens der ersten Schoten gemeinsam in einer Tüte zum Sammeln der Samen eingehüllt. Die so eingetüteten Pflanzen wurden ein bis zwei Wochen weiter gepflegt, anschließend zwei Wochen im Gewächshaus getrocknet. Die gut getrockneten Samen konnten für eine Selektion mit BASTA direkt auf Erde ausgesät werden. Die Aussaat erfolgte nach Pools getrennt in großen Pflanzschalen. In den meisten Fällen wurde nur die Hälfte der Samen eines Pools ausgesät. Das erste Sprühen der Keimlinge mit BASTA-Lösung erfolgte, wenn die Keimblätter voll entwickelt waren. Die Keimlinge wurden in den darauf folgenden sechs Tagen noch ein bis zwei mal mit BASTA gesprüht. BASTA-sensitive Keimlinge blieben noch im Keimblattstadium aus und entwickelten sich nicht weiter. Resistente Keimlinge wurden bis zur Samenreife wachsen gelassen und die Samen anschließend von einzelnen Pflanzen abgeerntet.

Alternativ konnte die BASTA-Selektion wie die Hygromycin- oder die Kanamycin-Selektion auch auf Agarplatten durchgeführt werden. Dazu wurden *A. thaliana* Pflanzen ca. zwei Wochen unter Antibiotika-Selektion auf Agarplatten angezogen. Als resistente von sensitiven Keimlingen unterscheidbar waren, konnte die Segregation ausgezählt werden. Resistente Pflanzen wurden auf Erde pikiert und bis zur Samenernte weiter kultiviert

#### 2.2.4.3 Kreuzungen von *A. thaliana*-Pflanzen und Selektion von Doppelmutanten

##### 2.2.4.3.1 Kreuzen von *A. thaliana*-Pflanzen

Um *A. thaliana* Pflanzen zu kreuzen, wurden Blütenknospen vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet, die Kelch- (Sepalen), Kron- (Petalen) und Staubblätter (Stamen) entfernt. Der Pollen der einen Pflanze wurde durch Auftupfen auf die freigelegten Stigmata der Stempel (Karpelle) einer anderen Pflanze übertragen. Bis zur Samenbildung wurden die Pflanzen weiter kultiviert, die reifen Schoten der bestäubten Blüten dann einzeln abgeerntet. In der Regel sind reziproke Kreuzungen durchgeführt worden. Jeweils drei Blüten einer Pflanze wurden dabei bestäubt. Die Samen sind jeweils von Einzelpflanzen abgeerntet und getrennt ausgesät worden. Die erhaltenen Pflanzen der Folgegenerationen wurden ebenfalls einzeln abgeerntet und als unabhängige Linien weiter kultiviert.

#### 2.2.4.3.2 Isolation von Doppelmutanten

Um Doppelmutanten zu isolieren, wurden die Ausgangsmutanten, wie zuvor beschrieben, gekreuzt. Bei nicht gekoppelten Loci sind ein Sechzehntel der Pflanzen in der zweiten Filialgeneration ( $F_2$ ), entsprechend den Mendelschen Regeln Doppelmutanten. Wenn die Mutationen sichtbare Phänotypen hervorrufen, können die Doppelmutanten anhand des Phänotyps identifiziert werden. Hilfreich sind diesbezüglich die Segregationsanalysen der Resistenzmarker bei T-DNA-Mutanten. Sollte dies nicht möglich sein, können sie durch PCR-Reaktion mit entsprechenden Oligonucleotiden für die Mutanten-Allele identifiziert werden.

Charakterisierte Doppelmutanten oder Mutanten, die heterozygot für eine Mutation und homozygot für die andere Mutation sind, werden als einzelne Linien weiter kultiviert. Ausgehend von diesem Samenmaterial treten in der  $F_3$ -Generation mindestens zu einem Viertel Doppelmutanten auf. Auf diese Weise kann eine große Anzahl an Doppelmutanten isoliert werden.

#### 2.2.4.4 Hormon- und Wachstums-Experimente mit *A. thaliana*-Pflanzen

Für Hormon- und Wachstums-Experimente wurden *A. thaliana*-Pflanzen auf Agarplatten angezogen. Dazu sind dem Plattenmedium die entsprechenden Hormone zugesetzt worden. Alternativ konnten Keimlinge auch kurzfristig für wenige Tage in Flüssigmedium, dem ebenfalls Hormone zugegeben wurden, kultiviert werden.

In der Regel wurden die Pflanzen auf MS-Medium angezogen und wenige Tage nach der Keimung auf hormonhaltigem Medium – zum Vergleich auf Kontrollmedien – übertragen. Die Hormonwirkung wurde durch den Vergleich des Wachstums auf den verschiedenen Medien beurteilt. Für weiterführende physiologische Studien sind auch adulte, auf Erde angezogene Pflanzen durch Besprühen mit Hormonen bzw. Steroiden behandelt worden.

##### 2.2.4.4.1 Wachstumsexperimente mit *A. thaliana*-Keimlingen

Zur Durchführung von Wachstumsexperimenten, z.B. zur Analyse von Hormonwirkungen oder der Analyse von Mutanten, wurden *A. thaliana* Samen oberflächensterilisiert und auf MS-Agar-Platten ausgelegt und ausgekeimt. Nach wenigen Tagen sind die Keimlinge auf mit Hormonen versetzte Agarplatten sowie auf Kontrollplatten pikiert worden. Zur Analyse von Wurzel- und Hypokotylwachstum wurden die Platten senkrecht gestellt, damit die Wurzeln entlang der Plattenoberfläche wachsen konnten. In der Regel sind die Pflanzen nach vier bis sieben Tagen vermessen worden. Dazu wurden die Agarplatten auf einen Flachbett-Scanner gestellt und abgelichtet. Die Wurzel- und Hypokotyllängen konnten dann mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop vermessen werden. Zur phänotypischen Dokumentation sind die Pflanzen direkt auf den Agarplatten liegend fotografiert worden. Zur Kontrolle wurden bei allen Ablichtungen Millimeterskalen mit abgebildet.

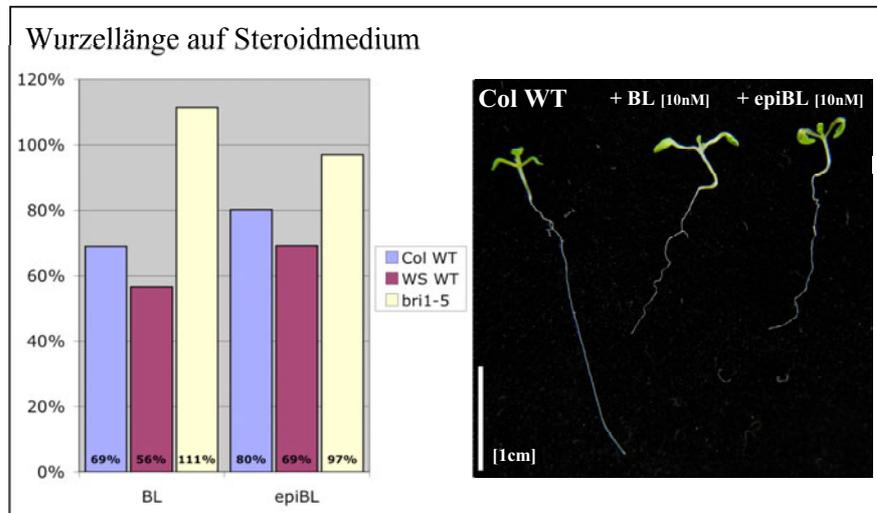
##### 2.2.4.4.2 Behandlung von *A. thaliana*-Pflanzen mit *Brassinolid* und $\beta$ -Östradiol

Um die Reaktion auf exogenes *Brassinolid* (BL) zu prüfen, wurden *A. thaliana* Keimlinge mit *Brassinolid*-Lösung (0,1  $\mu$ M) besprüht oder auf *Brassinolid*-haltigen Agarplatten angezogen. Das *Brassinolid* war in 100 % Ethanol gelöst worden. Zur Behandlung von *A. thaliana* Pflanzen wurde die 2mM-*Brassinolid*-Stammlösung in MS- bzw. MS-Agar-Medium oder in Wasser verdünnt. Dem Medium wurde zuvor das Detergens Tween20 mit einer Endkonzentration von 0,1% zugesetzt.

Neben den mit *Brassinolid* behandelten Pflanzen wurden zur Kontrolle auch immer unbehandelte Pflanzen analysiert. Als Maß für die Reaktion auf das zugegebene Brassinosteroid wurde das Streckungswachstum beider Gruppen gemessen und verglichen. Als weitere Kontrolle wurden auch *dwf4*- und *bri1*- bzw. *bri1-5*-Pflanzen mit *Brassinolid* behandelt. Von diesen Mutanten ist bekannt, wie sie auf die exogene *Brassinolid*-Gabe reagieren (Choe S. *et al.*, 1998; Clouse S.D. *et al.*, 1996).

In gleicher Weise wurde bei der Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol vorgegangen. Das  $\beta$ -Östradiol ist jedoch in DMSO gelöst worden. Neben der geschilderten, ganzheitlichen Behandlung von Pflanzen durch Besprühen oder die Anzucht auf mit Steroiden versetzten Medien wurden auch lokal begrenzte Behandlungen mittels Lanolinpasten durchgeführt. Dazu wurde Lanolin auf 50°C bis 55°C erwärmt und mit dem entsprechenden Steroid sowie Tween20 gemischt. Die Lanolinpasten sind kurzfristig bei Raumtemperatur langfristig bei -20°C gelagert worden. Im Rahmen der durchgeführten Hormonexperimente wurde auch die Bioaktivität von *Brassinolid* und *epiBrassinolid* verglichen.

Dabei stellte sich heraus, daß *epiBrassinolid* bei gleicher Konzentration deutlich schwächere Reaktionen als *Brassinolid* hervorruft.



**Abb.2.3:** Inhibition des Wurzelwachstums durch *Brassinolid* (BL) und *epiBrassinolid* (epiBL). Die Abbildung zeigt die Inhibition des Wurzelwachstums durch *Brassinolid* (BL) und *epiBrassinolid* (epiBL) bei der Anzucht auf steroidhaltigen Agarplatten an ca. zwei Wochen alten Keimlingen. Dabei weist epiBL bei gleicher Konzentration eine geringere Bioaktivität als BL auf.

#### 2.2.4.5 Herstellung von *A. thaliana*-Protoplasten aus Suspensionskulturen

Protoplasten sind durch den Abverbau der Zellwände mit Zellulase und Pectinase aus Zellen der *A. thaliana* Suspensionskultur isoliert worden. Durch den Wechsel von Medien verschiedener Dichte konnten zellwandlose Protoplasten von anderen Zellen getrennt werden.

Zellen einer *A. thaliana* Suspensionskultur sind durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 1.000 g in 50 ml-Falcon-Röhrchen und einer Heraeus-Bodenzentrifuge geerntet worden. Die sedimentierten Zellen wurden in 25 ml der Enzymlösung resuspendiert. Nach Zugabe von 25 ml 0,34 M GM-Lösung kam das Gemisch in eine große Petrischale und wurde im Dunkeln für 4 bis 8 Stunden bei Raumtemperatur und ca. 50 rpm „geschüttelt“. Anschließend folgte wieder eine fünfminütige Zentrifugation bei 1.500 rpm. Das Sediment wurde einmal mit 25 ml 0,34M GM-Lösung gewaschen anschließend in 0,28 M S-Lösung aufgenommen und in ein 14 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurde mit S-Lösung bis ca. 10 ml aufgefüllt und für fünf Minuten mit 800 g zentrifugiert. Die Protoplasten sammeln sich an der Oberfläche und können vorsichtig mit einer abgeschnittenen, blauen Pipettenspitze abgenommen werden. Die Qualität der Protoplasten ist mikroskopisch überprüft worden. Die Quantität konnte mit einem Hemocytometer ausgezählt werden.

#### 2.2.4.6 $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Färbung von *A. thaliana*-Pflanzen

Die GUS-Färbung von *A. thaliana* Pflanzen wurde nach Jefferson (1987) durchgeführt. Zur histochemischen Färbung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität ist das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Glucuronid (X-GLUC) verwendet worden. Das Pflanzenmaterial wurde mit der X-Gluc-Färbelösung überschichtet und für wenige Minuten einem Vakuum ausgesetzt. Dann folgte für wenige Stunden (2h, 4h, 8 h) oder über Nacht (16 h) die Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde mehrfach für einige Stunden mit 70 %igem Ethanol entfärbt. Bis zur mikroskopischen Analyse sind die Pflanzen weiter in Ethanol gelagert worden.

#### 2.2.5 Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population

Zur Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Insertionsmutanten-Population wurden drei aufeinander folgende PCR-Analysen, ein Primärscreen (Superpools), ein Sekundärscreen (Hunderterpools) und ein Tertiärscreen (hundert Einzellinien-DNAs) durchgeführt. Im Primärscreen wurden zwei Superpools, ein Nummern- und ein Buchstabenpool mit gleichem Amplifikationsmuster identifiziert. Daraus ergaben sich vier bzw. fünf Hunderterpools (Abb.2.2). Im Sekundärscreen wurde ein Hunderterpool

identifiziert, dessen hundert Einzellinien in der dritten PCR-Runde analysiert wurden. Das Ergebnis dieser PCR-Screens war eine Einzellinie, die die gesuchte T-DNA-Insertion trug. Mit der Sequenzierung der PCR-Fragmente konnte die Identität der T-DNA-Insertion und die genaue Position der T-DNA festgestellt werden. Für die Screening-PCRs wurde ein Paar genspezifischer Primer verwendet, die zwischen 28 bp und 33 bp lang waren und mindestens 13 G/C-Paare besaßen. Die genspezifischen Primer wurden in der Regel so positioniert, daß ein Primer ca. 500 bp vor dem ATG, der andere 500 bp hinter dem STOP-Codon hybridisierte. Des weiteren wurden zwei T-DNA-spezifische Primer (Fish1, Fish2) eingesetzt. Daraus ergaben sich vier Primerkombinationen:

- P1 = „left border“-spezifischer Primer (FISH1) + genspezifischer *sense*-Primer
- P2 = „right border“-spezifischer Primer (FISH2) + genspezifischer *sense*-Primer
- P3 = „left border“-spezifischer Primer (FISH1) + genspezifischer *antisense*-Primer
- P4 = „right border“-spezifischer Primer (FISH2) + genspezifischer *antisense*-Primer

Für den Primärscreen ergaben sich mit vier Primerkombinationen (P1 bis P4) und 40 Superpools (1 bis 20 bzw. A-T) 160 PCR-Reaktionen pro analysiertem Gen. Die PCR-Reaktionen wurden mit TaKaRa-Taq-Polymerase und einem Zwei-Schritt-PCR-Programm mit einer einminütigen Denaturierung bei 94°C und einem achtminütigem Annealing/Elongations-Schritt bei 68°C durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer EtBr-Färbung und UV-Licht sichtbar gemacht.

PCR Ansätze:	Primärscreen	(46xMastermix)	(x1)
	10xPuffer	46,0 µl	1,0 µl
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	37,0 µl	0,8 µl
	dNTP (2.5 mM each)	37,0 µl	0,8 µl
	T-DNA-Primer (100 µM)	1,2 µl	0,027 µl
	Gene-Primer (100 µM)	2,4 µl	0,052 µl
	dH <sub>2</sub> O	151,0 µl	3,3 µl
	LA TaKaRa-Taq (5 u/µl)	2,0 µl	0,044 µl
	(je 4 µl Matrizen-DNA pro Reaktion)		6,0 µl

In der zweiten und dritten PCR-Runde wurde nur noch die Primerkombination verwendet, mit der die positiven Superpools identifiziert wurde. Dementsprechend ergaben sich kleinere Mastermixe. Nach der Identifikation eines Hunderterpools wurden die DNAs der hundert Einzellinien ebenfalls zweidimensional gepoolt. Daraus resultierten für den Tertiärscreen 20 PCR-Reaktionen (1 bis 10 und A bis J) zur Analyse von hundert Einzel-DNAs.

### 2.2.6 Confocale Laser-scanning-Mikroskopie

Confocale Laser-scanning-Mikroskopie wurde mit einem Zeiss LSM 510 META durchgeführt. Zur Anregung der GFP-Fluoreszenz ist die 488 nm Linie eines Argon-Lasers benutzt worden, zur Detektion der GFP-Fluoreszenz diente ein 500-530 nm Emissionsfilter. Mit Hilfe eines 545 nm HeNe-Lasers wurden simultan mit den Fluoreszenzbildern Transmissionsbilder (mit Hilfe eines Transmissionsdetektors) aufgenommen. Die Autofluoreszenz von Chlorophyll wurde mit dem META-Detektor bei 650-720 nm detektiert.

Software zur Steuerung und Bildgeneration des Laser-Confocal-Mikroskops: Zur Bedienung des Confocal-Mikroskops wurde die Software (LSM-510 META) des Herstellers Zeiss, verwendet. Für die spätere Bildbearbeitung wurde die Software LSM-5-Image-Browser von Zeiss und Adobe Photoshop eingesetzt.

### 2.2.7 Elektronische Datenverarbeitung und bioinformatische Ressourcen

Geldokumentationssystem:

Für die Aufnahme von Gelphotos und die weitere elektronische Datenverarbeitung wurde die Software, Kodak 1D 3,6.5 K2, des Kodak-Geldokumentationssystems EDAS 290 verwendet.

Kamera und Software zur Bildgeneration an Mikroskop und Binokular:

Software: Diskus Ver. 4,30,102  
 Kamera: JVC KY-F70B (C-mount)

Allgemeine Bildbearbeitung:

Computer: Apple Macintosh Computer (MacOS 9 bzw. MacOS X)  
 Windows PCs (Windows NT bzw. XP Professional)  
 Software: Adobe Photoshop 4 (MacOS 9); 6 (Windows); CS (MacOS X)  
 Scanner: Agfa SnapScan 1236 S / HP Scanner 5400 C  
 Digitalkamera: Canon A80 (4 Mega-Pixel) mit Canon LA-DC52D Nahlinenadapter  
 Nahlinse: Hama 76752 (+10 Dioptrien, Ø 52 mm, vergütet)

Bioinformatische Ressourcen:

Sequenzanalysen wurden hauptsächlich mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1997) am NCBI oder bei TAIR durchgeführt. Sequenzdaten wurden aus GENE BANK, Literatur aus PUBMED bezogen. Das GCG-Programm-Paket der „Genetics Computer Group, Inc.“ (GCG) wurde auf UNIX-basierenden Computern eingesetzt. Es wurden folgende Internet-Ressourcen verwendet:

National Center for Biotechnology Information (NCBI):	<a href="http://www.ncbi.nih.nlm.gov/">http://www.ncbi.nih.nlm.gov/</a>
The Arabidopsis Information Resource (TAIR):	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>
The Institute for Genomic Research (TIGR):	<a href="http://www.tigr.org/">http://www.tigr.org/</a>
Expert Protein Analysis System (ExpASY):	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
European Molecular Biology Laboratory (EMBL):	<a href="http://www.embl-heidelberg.de/">http://www.embl-heidelberg.de/</a>
The SALK Institute Genomic Analysis Laboratory:	<a href="http://signal.salk.edu/">http://signal.salk.edu/</a>
RIKEN	<a href="http://rarge.gsc.riken.go.jp/">http://rarge.gsc.riken.go.jp/</a>
Genevestigator (ETH Zürich)	<a href="http://www.genevestigator.ethz.ch">www.genevestigator.ethz.ch</a>

Statistische Auswertung:

Für statistische Auswertungen, wie z. B. bei der Ermittlung der Wurzellängen mehrerer Keimlinge wurde zur Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung das Computer-Programm Excel (Microsoft Office 98, Mac OS 9 bzw. Office 2004, Mac OS X) verwendet. Darüber hinaus wurden auch Statistik-Funktionen, wie die T-TEST- und die CHI-TEST-Funktion von Excel, verwendet. Der T-TEST gibt die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) an mit der die Mittelwerte zweier Messreihen übereinstimmen, der CHI-TEST gibt die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) an, mit der die beobachteten Messwerte mit den erwarteten übereinstimmen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die *A. thaliana cpd*-Mutante

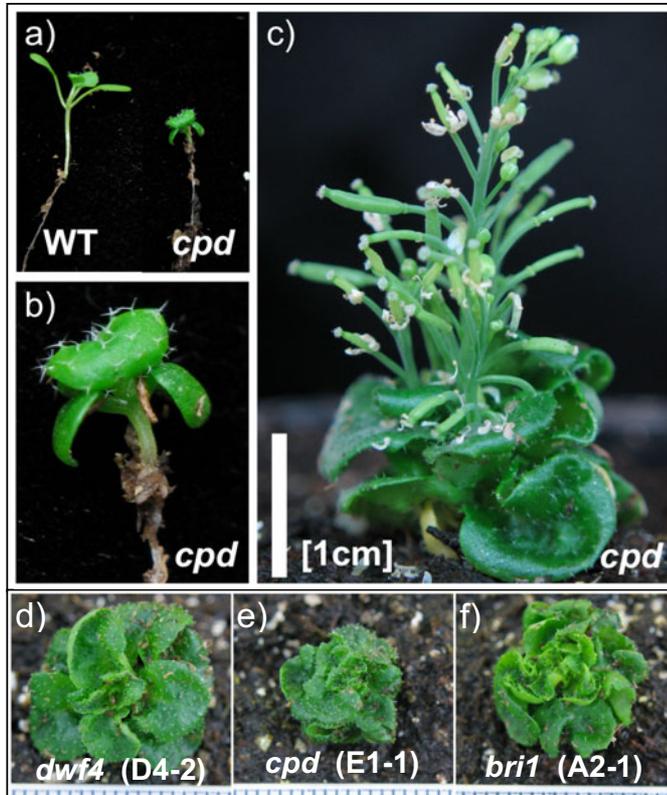
Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Komplementationsstudien anhand der *cpd*-Mutante aus *A. thaliana* (Szekeres *et al.*, 1996) durchgeführt. Die *cpd*-Mutante wurde sowohl genetisch, durch die Transformation mit verschiedenen CPD-Expressionskonstrukten, (3.1.2.1; Abb.3.6) als auch biochemisch durch exogene Applikation des Pflanzenhormons *Brassinolid* komplementiert (3.1.2.2). Die Komplementation der *cpd*-Mutante diente verschiedener Zwecke: Anhand der phänotypischen Komplementation der *cpd*-Mutante hin zum Wildtyp kann die Funktionalität des verwendeten CPD-GFP-Fusionsproteins überprüft und demonstriert werden (Abb.3.11). Unter Verwendung der Komplementationskonstrukte in Suspensionskulturen, Protoplasten oder in transgenen Wildtyp-pflanzen und der *cpd*-Nullmutante konnte die zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins ermittelt werden. Die zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins gibt darüber Auskunft, wo in der Zelle die Steroidbiosynthese stattfindet und wo das CPD-Protein mit anderen Proteinen interagieren kann (3.1.3). Mittels der mit dem CPD-Promotorkonstrukt komplementierten *cpd*-Mutante kann die gewebespezifische Lokalisation und auch die temporäre Verteilung des CPD-Proteins *in planta* analysiert werden (3.1.3.3).

Mit dem durch  $\beta$ -Östradiol induzierbaren Expressionssystem ist eine konditionale Komplementation der *cpd*-Mutante auf genetischem Weg möglich. Die erfolgte Induktion kann anhand der GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenz zeigt wo durch die Expression des CPD-GFP-Fusionsproteins die Steroidbiosynthese wiederhergestellt wird. Diese Technologie ermöglicht es, interessanten Fragestellungen z.B. nach dem Steroidtransport oder der Analyse brassinosteroid-abhängiger Entwicklungsprozesse *in planta* nachzugehen. Das entsprechende Vorgehen und die vorbereitenden Kontrollexperimente sind in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Die hergestellten CPD-Expressionskonstrukte (Abb.3.6) unterscheiden sich in erster Line in den verwendeten Promotoren, die die Expression des Transgens regulieren. Die Herstellung dieser Konstrukte (3.1.2.1), die Isolation und die Analyse von Transformanten (3.1.2.2) werden im Folgenden beschrieben. Zuvor soll eine kurze phänotypische Beschreibung der *cpd*-Mutante zeigen, auf welche phänotypischen Aspekte bei der Analyse der komplementierten *cpd*-Linien geachtet werden muss.

##### 3.1.1 Phänotyp der *A. thaliana cpd*-Mutante

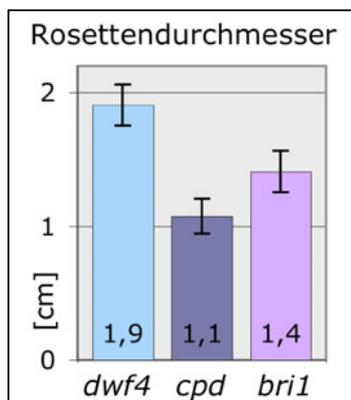
Die genaue Kenntnis des *cpd*-Phänotyps ist Grundlage für die Beurteilung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Phänotypen von Mutanten der CPD-Interaktionspartner sowie der genetisch und biochemisch komplementierten *cpd*-Mutanten. Der Zwergwuchs kann anhand weniger Parameter umrissen werden. In frühen Entwicklungsstadien fällt deutlich das verminderte Streckenwachstum des

Hypokotyls und der Blattstiele auf. Dies ist in Abbildung 3.1 a) im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Auch die Blattflächen sind deutlich verkleinert und unregelmäßig gewölbt. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird der Zwergwuchs am drastisch kleineren Rosettendurchmesser und der ebenso deutlich verminderten Gesamthöhe sichtbar.



**Abb. 3.1: Phänotyp der *A. thaliana cpd*-Mutante in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.** Die Abbildung zeigt einen phänotypischen Vergleich von ca. zehn Tage alten, auf Erde gewachsenen Keimlingen der *cpd*-Mutante und des *Columbia*-Wildtyps (a) sowie eine Vergrößerung des *cpd*-Keimlings (b). In Bild c) ist eine adulte, ca. fünf Wochen alte, unter Langtagbedingungen angezogene *cpd*-Pflanze zu sehen. Die unteren Bilder zeigen die Phänotypen der *dwf4*- (d), der *cpd*- (e) und der *bri1*-Mutante (f) im Vergleich. Die Pflanzen wurden aus den segregierenden SALK-T-DNA-Linien N520761 (D4-2), N509263 (E1-1) und N501916 (A2-1) isoliert. Die Pflanzen wurden ca. acht Wochen im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen angezogen, an den Bildunterseiten sind Millimeterskalen gezeigt.

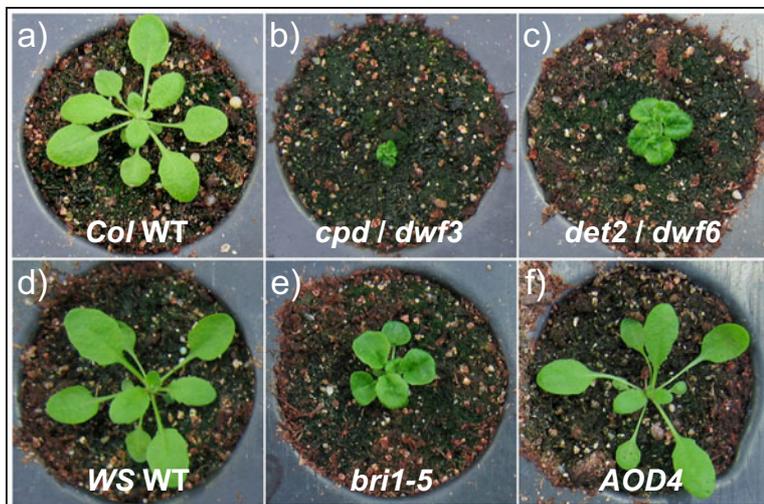
Im Vergleich zu anderen Brassinosteroidbiosynthese- bzw. Signaltransduktionsmutanten wird deutlich, daß die *cpd*-Mutante sogar etwas kleiner als die Rezeptormutante *bri1* (Clouse *et al.*, 1996) ist. Die Abbildungen 3.1 (d-f) und Abb.3.2 zeigen einen Vergleich der Rosettengrößen der Synthesemutanten *dwf4* (Choe *et al.*, 1998) und *cpd* mit der Brassinosteroidrezeptormutante *bri1*.



**Abb. 3.2: Vergleich des Rosettendurchmessers der *dwf4*-, der *cpd*- und der *bri1*-Mutante.** Pflanzen der *dwf4*- (N520761; D4-2), der *cpd*- (N509263; E1-1) und der *bri1*-Linie (N501916; A2-1) wurden ca. acht Wochen im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen angezogen, danach die Rosetten ausgemessen. Pro Linie wurden 24 Einzelpflanzen vermessen. Die Phänotypen der Mutanten sind in Abb.3.1 gezeigt. Für die *dwf4*-Mutante konnte ein Wert von  $1,9 \pm 0,1$  cm, für die *cpd*-Mutante von  $1,1 \pm 0,1$  cm und für die *bri1*-Mutante ein Wert von  $1,4 \pm 0,2$  cm ermittelt werden. Damit ist die *cpd*-Mutante (79%) signifikant kleiner als die *bri1*-Mutante (100%). Die *dwf4*-Mutante (136%) ist deutlich größer. Ein zweiseitiger T-Test zeigt, daß sich die Messwerte für die Rosettendurchmesser signifikant unterscheiden ( $p < 0,0001$ ).

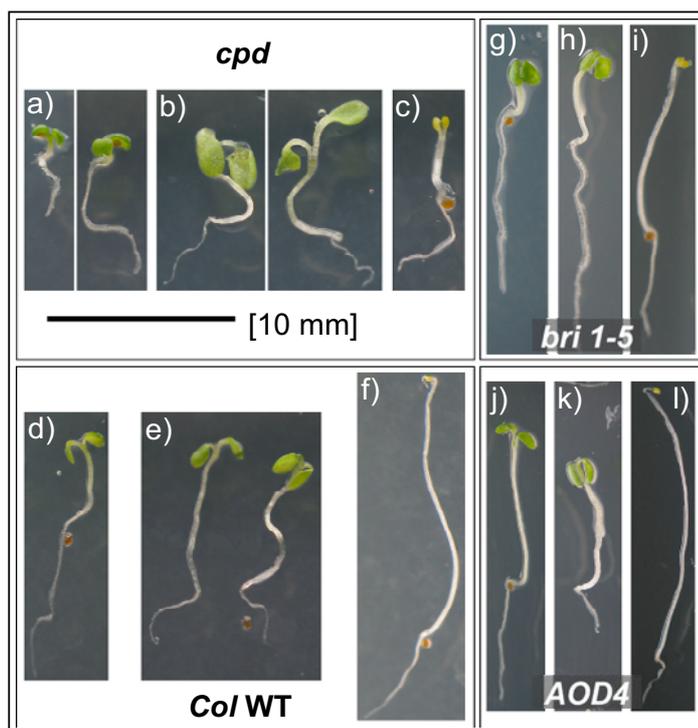
Ein entsprechender Vergleich der Rosettengrößen der *cpd*-Mutante mit der „frühen“ Steroidsynthesemutante *det2/dwf6* (Fujioka *et al.*, 1997) bzw. dem schwachen *bri1-5*-Allel (Noguchi *et al.*, 2000) macht deutlich, daß sich die Phänotypen der „späten“ Steroidsynthesemutanten und der

Rezeptormutante stark unterscheiden (Abb.3.3). Eine *DWF4*-Überexpressionslinie *AOD4* (Choe *et al.*, 1998), die einen erhöhten Durchsatz der Brassinosteroidbiosynthese hat, zeigt nur geringfügige phänotypische Abweichungen vom Wildtyp, sie weist eine verstärkte Streckung des Hypokotyls und der Blattstiele auf (Choe *et al.*, 2001).



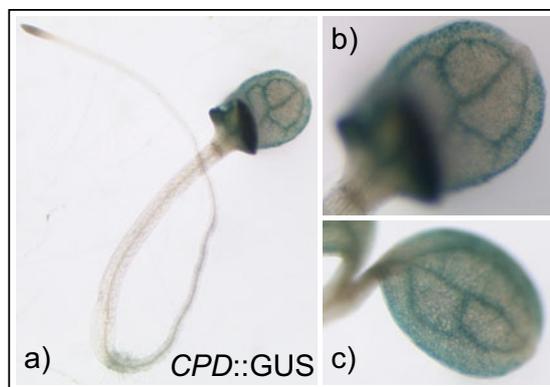
**Abb. 3.3: Phänotypischer Vergleich der *cpd*-Mutante mit *det2*, *bri1-5* und *AOD4*.** Die Abbildung zeigt den Phänotypen der *cpd*-Mutante (b) im Vergleich zu anderen Brassinosteroidsynthese- bzw. Signaltransduktionsmutanten, *det2* (c) bzw. *bri1-5* (e) und die *DWF4*-Überexpressionslinie *AOD4* (f) sowie die korrespondierenden Wildtypen *Columbia* (a) und *Wassilewskija* (d). Die Pflanzen wurden drei Wochen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen.

Ein weiterer deutlicher Aspekt des *cpd*-Phänotyps ist die lichtunabhängige Photomorphogenese im Dunkeln. Dunkelkeimlinge der *cpd*-Mutante zeigen zwar – wie der Wildtyp auch – eine Streckung des Hypokotyls, jedoch keinen geschlossenen Hypokotylhaken, die Kotyledonen sind nach oben gespreizt. Diesen Aspekt des Phänotyps zeigen auch andere Steroidmutanten wie *dwf4*, *bri1* und auch *bri1-5*. In Abbildung 3.4 sind die Licht- und Dunkelphänotypen der *cpd*- und *bri1-5*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp und zur *DWF4*-Überexpressionslinie, *AOD4*, gezeigt.



**Abb. 3.4: Phänotypen von Brassinosteroidsynthese- bzw. Signaltransduktionsmutanten im Licht, im Dunkeln sowie auf Hochsteroidmedium.** Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Phänotypen der *cpd*- (a, b, c), der *bri1-5*-Mutante (g, h, i), der *DWF4*-Überexpressionslinie *AOD4* (j, k, l) sowie des *Columbia*-Wildtyps (d, e, f) unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Pflanzen wurden in Sterilkultur auf Agarplatten im Licht (a, b, d, e, g, h, j, k) bzw. im Dunkeln (c, f, i, l) ausgekeimt, die Lichtkeimlinge nach zwei Tagen auf Kontrollplatten (a, d, g, j) pikiert bzw. auf Platten, die mit *Brassinolid* (b, e, h, k) der Endkonzentration 0,1  $\mu$ M versetzt waren. Die Bilder zeigen sieben Tage alte Pflanzen, alle Bilder sind im gleichen Maßstab, der Größenmarker entspricht 1 cm.

In Abbildung 3.4 ist darüber hinaus auch die Reaktion auf die exogene Gabe des Brassinosteroids *Brassinolid* (BL) zu sehen. Die Wachstumsreaktion auf die exogene Applikation des *Brassinolids* ist komplex, oberirdische Organe wie das Hypokotyl reagieren gegensätzlich zur Wurzel. Sowohl die *cpd*- und die *bri1-5*-Mutante als auch der Wildtyp zeigen eine Streckung des Hypokotyls, das Wurzelwachstum wird jedoch inhibiert. Ursprünglich wurde die *bri1*-Mutante als Brassinosteroid insensitiv beschrieben, weil sie keine Inhibition des Wurzelwachstums auf Hochsteroidmedium aufweist. Das schwache Allel *bri1-5* zeigt eine geringere Inhibition des Wurzelwachstums. Genaue Werte sind im Rahmen der phänotypischen Analysen der isolierten T-DNA-Mutanten in Kapitel 3.3.2 aufgeführt. Die *DWF4*-Überexpressionslinie bleibt außer der erhöhten Hypokotyllänge im Licht und im Dunkeln unverändert, nur bei der Steroidbehandlung zeigt sie eine Inhibition des Wurzel- und Hypokotylwachstums.



**Abb. 3.5: GUS-Färbung der CPD::GUS-Linien.** Die Abbildung zeigt eine GUS-Färbung der von Mathur J. *et al.* (1998) beschriebenen *CPD::GUS*-Linien. In Bild **a**) ist eine Übersichtsaufnahme eines vier Tage alten, im Licht angezogenen Keimlings zu sehen. Die Bilder **b**) und **c**) zeigen Detailaufnahmen der Kotyledonen. Die GUS-Färbung wurde über Nacht für ca. 16 h durchgeführt.

Die Transkription des *CPD*-Gens wurde ausführlich von Mathur J. *et al.* (1998) analysiert. Das *CPD*-Gen ist generell schwach exprimiert. Die *CPD*-Promotor::*GUS*-Fusion zeigt die stärksten Signale im Dunkeln, bei Anzucht im Licht, am 8. Tag nach der Keimung. Bei der Analyse verschiedener *Promotor*::*GUS*-Konstrukte wurden die von Mathur J. *et al.* beschriebenen *CPD*::*GUS*-Linien als Kontrolle verwendet. Da *CPD* sehr schwach exprimiert, ist mußte die GUS-Färbung über Nacht durchgeführt werden (Abb.3.5).

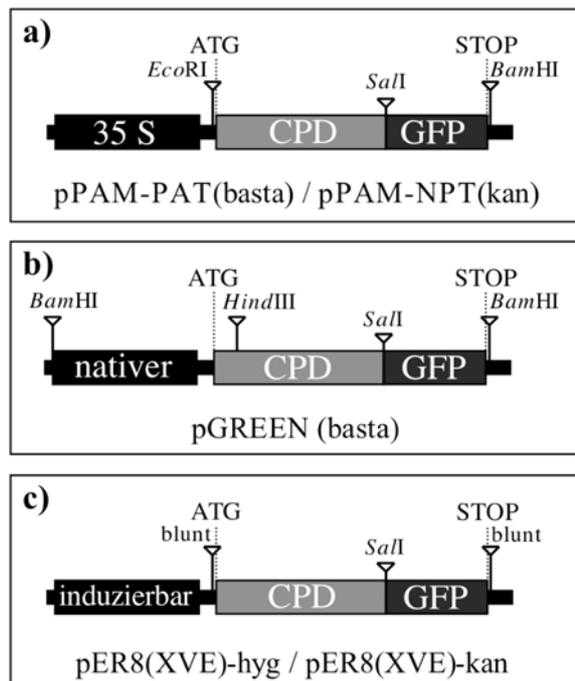
### 3.1.2 Komplementation der *A. thaliana cpd*-Mutante

Für die Komplementationsstudien anhand der *cpd*-Mutante wurden die verschiedenen in Abb.3.6 gezeigten Konstrukte in *A. tumefaciens* transformiert werden (2.2.3). Nach Selektion wurden die entsprechenden *A. tumefaciens* Kulturen zur Pflanzentransformation (2.2.4.2) eingesetzt. Für diese Experimente wurden homozygote *cpd*-Pflanzen (Szekeres M. *et al.*, 1996) auf Erde angezogen und vor der Transformation durch *A. tumefaciens* mehrfach mit dem Pflanzenhormon *Brassinolid* behandelt (2.2.4.4), um die Samenausbeute zu erhöhen. Darüber hinaus konnten auch heterozygote Pflanzen, der im Rahmen dieser Arbeit isolierten SALK-Linie N509263, die ebenfalls eine T-DNA-Insertion im *CPD*-Gen trägt, für Transformationsexperimente verwendet werden. Im

Folgendes wird die Herstellung der Komplementationskonstrukte (3.1.2.1) sowie die Isolierung von homozygoten Transformanten (3.1.2.2) beschrieben.

### 3.1.2.1 Herstellung der Komplementationskonstrukte

Zur Generation der Komplementationskonstrukte ist zuerst eine translationale Genfusion zwischen der *CPD*- und der *GFP*-cDNA generiert worden, die als Ausgangskonstrukt für alle weiteren Komplementationskonstrukte diente.



**Abb. 3.6: CPD-Komplementationskonstrukte.** In der Abbildung sind die verschiedenen CPD-GFP-Fusionskonstrukte zu sehen, die zur Komplementation der *A. thaliana cpd*-Mutante generiert wurden. Es wurde ein Konstrukt kloniert, das zur Expression der CPD-GFP Fusion unter Kontrolle des 35 S Promotors (a), des nativen *CPD* Promotors (b) und eines durch  $\beta$ -Östradiol induzierbaren Promotors (c) führt. Zur Generation der Konstrukte wurden verschiedene Pflanzentransformationsvektoren verwendet, die unterschiedliche Resistenzmarker zur Selektion transgener Pflanzen tragen. Es kamen der Vektor pPAM-NPT mit Kanamycin-Resistenzmarker (kan), ein Derivat des pGREEN mit Glufosinat-Resistenzmarker (basta) und der Vektor pER8(XVE) mit Hygromycin-Resistenzmarker (hyg) zum Einsatz. Das pER8(XVE) Derivat mit Kanamycin-Resistenzmarker (kan) wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert (Anhang 6.4).

Zur Generation der translationalen *CPD-GFP*-Fusion wurde die gesamte *CPD*-cDNA ohne STOP-Codon, die *GFP*-cDNA vom ATG- bis zum STOP-Codon amplifiziert. Für die Amplifikationen konnten Oligonucleotide verwendet werden, die es ermöglichen, beide Amplifikate über eine *SalI*-Spaltstelle so zu fusionieren, daß beide Leseraster ineinander übergehen. Beide cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert, die erhaltenen Fragmente in den Vektor pGEMT kloniert und sequenziert. Für alle PCR Amplifikationen wurden Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (Vent-DNA-Polymerase) verwendet. Die Sequenzierungen ergaben einen fehlerfreien *CPD*-Klon „pGEM-A2“ sowie einen fehlerfreien *GFP*-Klon „pGEM-D1“.

Zur Amplifikation der *CPD*-cDNA konnte DNA eines bereits existierenden pBS-*CPD*-Klons, den freundlicherweise Zsuzsa Koncz zur Verfügung gestellt hat, als Matrize eingesetzt werden. Für die Amplifikation der *GFP*-cDNA konnte DNA eines pRT-*GFP*-Klons, der freundlicherweise von Guido Jach zur Verfügung gestellt wurde, als Matrize eingesetzt werden. Zur Amplifikation der *CPD*-cDNA sind die Oligonucleotide ML03 und ML04 verwendet worden (Anhang 6.3). Mit dem Oligonucleotid ML03 wird vor dem ATG-Codon der *CPD*-cDNA eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuclease *EcoRI* eingefügt, mit dem Oligonucleotid ML04 kann die *CPD*-cDNA ohne das STOP-Codon

amplifiziert werden. Des Weiteren beinhaltet das Oligonucleotid ML04 eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuclease *SaI*I. Zur Amplifikation der *GFP*-cDNA wurden die Oligonucleotide ML07 und ML08 eingesetzt (Anhang 6.3). Das Oligonucleotid ML07 fügt eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuclease *SaI*I vor dem ATG-Codon der *GFP*-cDNA ein, das Oligonucleotid ML08 eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuclease *Bam*HI hinter dem STOP-Codon der *GFP*-cDNA. Die Oligonucleotide ML04 und ML07 sind für den Fall, daß beide Amplifikate mit der Restriktionsendonuclease *SaI*I gespalten und anschließend durch eine Ligationsreaktion fusioniert werden, so generiert worden, daß eine translationale Fusion der cDNAs entsteht. Dabei wird hinter der letzten Aminosäure des CPD-Proteins (T) und dem Start-Methionin (M) des GFP-Proteins ein kurzer, vier Aminosäure langer Peptid-*linker* der Sequenz „ASTS“ eingefügt. DNA der beschriebenen pGEMT-Klone „A2“ und „D1“ wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI und *SaI*I bzw. *SaI*I und *Bam*HI gespalten. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, aus den Agarosegelen isoliert und zusammen mit einem mit *Eco*RI und *Bam*HI gespaltenen, dephosphorylierten und gleichermaßen gereinigten Vektor pRT101 in eine Ligationsreaktion eingesetzt. Die Identität der daraus erhaltenen C-terminalen *CPD-GFP*-Fusion ist durch eine Restriktionsanalyse und einer Sequenzierung überprüft worden. Dabei wurde speziell der generierte Übergang der beiden cDNAs analysiert und sichergestellt, daß es sich um eine translationale Fusion handelt, die zur Expression des *CPD-GFP*-Fusionsproteins führt.

#### 3.1.2.1.1 Das konstitutive *CPD-GFP*-Expressionskonstrukt: „35S::CPD-GFP“

Zur Generation des Komplementationskonstrukts, das zur Expression des *CPD-GFP*-Fusionsproteins unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors verwendet wurde, kamen die binären Pflanzentransformationsvektoren pPAM-PAT (7064) und pPAM-NPT (7066) zum Einsatz. Beide Vektoren besitzen einen minimalen 35S-Promotor mit zweifacher *Enhancer*-Region. Der Vektor pPAM-PAT hat einen Basta-Resistenzmarker, der Vektor PAM-NPT einen Kanamycin-Resistenzmarker zur Selektion transgener Pflanzen. DNA beider Vektoren und DNA des zuvor beschriebenen Ausgangsklons „pRT-CG2“ wurden mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI und *Bam*HI gespalten, die Vektorfragmente bzw. das *CPD-GFP*-Fragment elektrophoretisch aufgetrennt und aus den Agarosegelen isoliert. Die Vektorfragmente wurden nach erfolgter Dephosphorylierung in eine Ligationsreaktion mit dem *CPD-GFP*-Fragment eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* transformiert, positive Klone mittels Restriktionsanalysen identifiziert.

#### 3.1.2.1.2 Das nativ-Promotor *CPD-GFP*-Expressionskonstrukt: „nP::CPD-GFP“

Zur Expression des *CPD-GFP*-Fusionsproteins unter der Kontrolle des „nativen“, endogenen *CPD*-Promotors wurde ein Derivat des Pflanzentransformationsvektors pGREEN verwendet, das einen Basta-Marker zur Selektion transgener Pflanzen trägt. Zur Herstellung des Konstrukts wurde ebenfalls der beschriebene Ausgangsklon der *CPD-GFP*-cDNA-Fusion „pRT-CG2“ verwendet sowie ein pBS-Klon („203“), der ein genomisches DNA-Fragment trägt, das den Promotorbereich und einen

Teil der codierenden Sequenz des *CPD*-Gens abdeckt. Der pBS-Klon „203“ wurde freundlicherweise von Miklos Szekeres zur Verfügung gestellt.

Die *CPD*-cDNA wird genau einmal von der Restriktionsendonuclease *Hind*III an der Position 292 bp gespalten. Das genomische *Bam*HI-*Hind*III Fragment des Klons „203“ deckt den Promotorbereich von ca. -1000 bp bis zum ATG-Codon des *CPD*-Gens sowie den codierenden Bereich bis zur *Hind*III Spaltstelle im ersten Exon des *CPD*-Gens ab. DNA des Klons wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Bam*HI und *Hind*III gespalten, das erhaltene „Promotorfragment“ aus einem Agarosegel isoliert. Durch eine Restriktionsspaltung des Klons „pRT-CG2“ mit den Restriktionsendonucleasen *Hind*III und *Bam*HI konnte das *CPD-GFP*-Fragment isoliert werden. Die erhaltenen Fragmente sind in den Vektor pGREEN ligiert worden, der zuvor mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI gespalten, dephosphoryliert und gereinigt wurde. Bei dieser Ligation wurde das Promotorfragment mit dem *CPD-GFP*-cDNA Fragment über die *Hind*III Spaltstelle fusioniert. Die Wiederherstellung des Leserasters konnte durch Sequenzierung des fertigen Konstrukts sichergestellt werden.

#### **3.1.2.1.3 Das induzierbare *CPD-GFP*-Konstrukt: „iP::CPD-GFP“**

Wie bereits zur Generation des 35S-Konstrukts beschrieben, wurde das *CPD-GFP*-Fragment durch Restriktionsspaltung des Ausgangsklons „pRT-CG2“ mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI und *Bam*HI gewonnen. Das erhaltene Fragment wurde gereinigt, die überstehenden DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Nach der Spaltung des Vektors pER8(XVE) mit der Restriktionsendonuclease *Xho*I wurden die überstehenden DNA-Enden ebenfalls mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und anschließend dephosphoryliert. Der gereinigte Vektor wurde mit dem *CPD-GFP*-Fragment ligiert, die Ligationsansätze in *E. coli* transformiert. Da es sich hierbei aufgrund der Ligation „glatter“ DNA-Enden um eine ungerichtete Klonierung handelt, konnten Klone beider möglichen Orientierungen des *CPD-GFP*-Fragments, in Bezug auf den Vektor, erhalten werden. Die Klone wurden mittels einer Restriktionsanalyse mit der Restriktionsendonuclease *Sal*I unterschieden. Klone beider Orientierungen konnten aufgrund dieser Analyse eindeutig identifiziert werden.

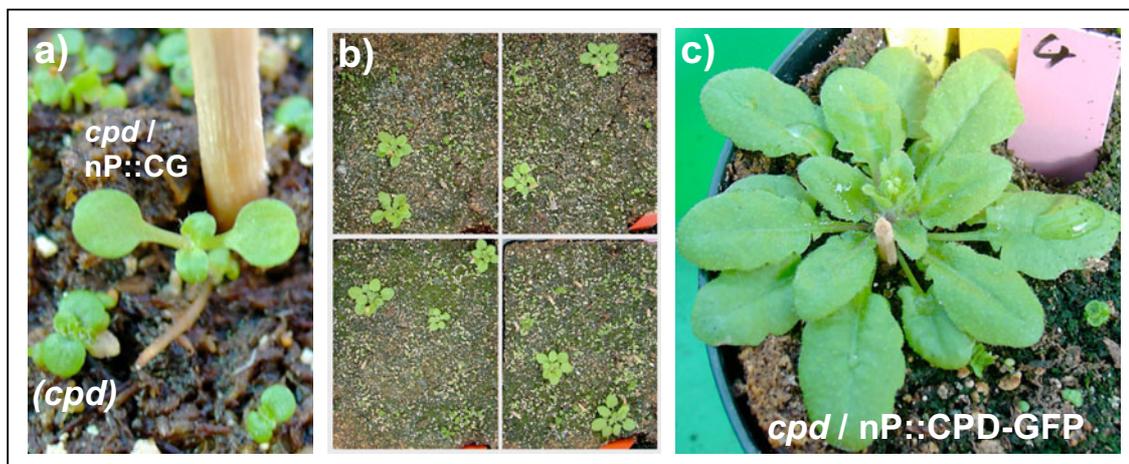
Der Original-Klon des Vektors pER8(XVE), den freundlicherweise Nam-Hai Chua zur Verfügung gestellt hat, besitzt einen Hygromycin-Marker zur Selektion transgener Pflanzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hygromycin-Marker durch einen Kanamycin-Marker ersetzt (6.4). Parallel wurde das induzierbare *CPD-GFP* Konstrukt wie beschrieben mit den Vektoren „pER8(XVE)-hyg“ und „pER8(XVE)-kan“ generiert. Es wurden positiven Klone beider Vektoren identifiziert, die das Insert in „sense“- bzw. in „antisense“-Orientierung tragen.

#### **3.1.2.2 Isolierung und phänotypische Analyse von Transformanden der Komplementationskonstrukte**

Zur Transformation mittels *A. tumefaciens* wurde die *cpd*-Mutante (Szekeres M. *et al.*, 1996) auf Erde angezogen. Nach ca. zehn Tagen, solange dauert es bis der Phänotyp der *cpd*-Pflanzen eindeutig von dem gleich alter Kontrollpflanzen des *Columbia*-Wildtyps unterscheidbar ist, wurden je ca. zehn

*cpd*-Pflanzen ( $T_0$ ) in zur Transformation geeignete Töpfe pikiert. Bis zur Transformation mittels *A. tumefaciens* (2.2.4.2) wurden die Pflanzen mit dem Pflanzenhormon *Brassinolid* ( $0,1 \mu\text{M}$ ) behandelt (2.2.4.4), was zu einer deutlichen Größenzunahme und erhöhter Samenausbeute führte. Je sechs Töpfe sind mit dem nativ-Promotorkonstrukt „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ bzw. den konstitutiven 35S-Promotorkonstrukten „35S::CPD-GFP (pPAM-PAT)“ und „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ transformiert worden. Die Pflanzen eines Topfes wurden als Pool abgeerntet und getrocknet.

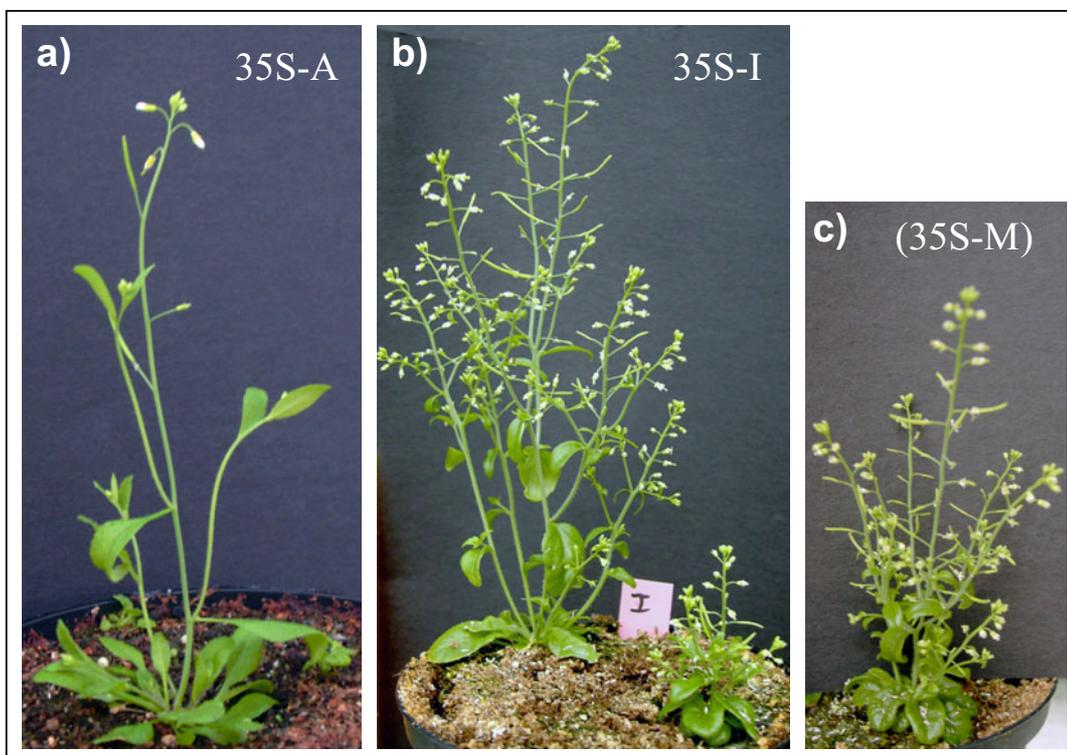
Samen, der mit den Vektoren pGREEN und pPAM-PAT transformierten Pflanzen ( $T_0$ ), wurden auf Erde ausgelegt. Diese Vektoren ermöglichen die Selektion transgener Pflanzen ( $T_1$ ) mit dem Herbizid Glufosinat (BASTA). Wenige Tage nach der Keimung wurden die Pflanzen ( $T_1$ ) durch Besprühen mit dem Herbizid BASTA selektiert. Dabei stellten sich alle Pflanzen, die aus den Transformationen des Konstrukts „35S::CPD-GFP (pPAM-PAT)“ hervorgingen, als bastasensitiv heraus. Für das „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ Konstrukt konnten 16 bastaresistente Pflanzen ( $T_1$ ) identifiziert werden, die aufgrund des wiederhergestellten Wildtyp-Phänotyps (Abb.3.7) sehr deutlich von den nicht transformierten sensitiven Pflanzen, die den charakteristischen *cpd*-Phänotyp zeigten, unterscheidbar waren. Die komplementierten  $T_1$ -Pflanzen wurden durchnummeriert (nP01 bis nP16) und einzeln abgeerntet. Die Pflanze nP15 hat so wenige Samen produziert, daß die gesamte Linie für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt wurde.



**Abb. 3.7:** Phänotyp der mit dem nativ-Promotorkonstrukt komplementierten *cpd*-Mutante. Das Bild a) zeigt eine ca. eine Woche alte  $T_1$ -Pflanze (Mitte), die mit dem Konstrukt „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ komplementiert wurde. Sie ist schon in diesem frühen Entwicklungsstadium phänotypisch eindeutig von den nicht transformierten Pflanzen, die den charakteristischen *cpd*-Phänotyp aufweisen, zu unterscheiden. Bild b) zeigt eine Übersicht über vier  $T_1$ -Pools, bei denen nach ca. drei Wochen deutlich neun komplementierte Pflanzen zu erkennen sind. Die Pflanzen wurden in größere Töpfe pikiert und weiter durch Besprühen mit dem Herbizid BASTA selektiert, dann abgeerntet. In Bild c) ist eine Vergrößerung der  $T_1$ -Pflanze „nP04“ zu sehen. Als Maßstab dienen ca. 2 mm dicke Holzstäbe.

Samen der  $T_0$ -Pflanzen die mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ transformiert wurden, sind oberflächensterilisiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten in Sterilkultur angezogen worden. Die kanamycinresistenten Transformanten konnten ebenfalls deutlich von den kanamycinsensitiven

Pflanzen unterschieden werden. Ca. 60 T<sub>1</sub>-Pflanzen wurden auf Erde pikiert, von denen 16 deutlich den Wildtyp-Phänotyp aufwiesen. Die übrigen Pflanzen zeigten diverse intermediäre Phänotypen, die unterschiedlich starke Ausprägungen des *cpd*-Phänotyps darstellen. Diese Pflanzen waren deutlich größer als die *cpd*-Mutante jedoch deutlich kleiner als der Wildtyp. Die 16 Pflanzen, die deutlich zum Wildtyp komplementiert waren, wurden ebenfalls durchnummeriert (35S-A bis 35S-P) und einzeln abgeerntet. Einige der Pflanzen mit Intermediärphänotyp wurden auch einzeln abgeerntet und in der nächsten Generation phänotypisch analysiert. Die Intermediärphänotypen blieben auch in der nächsten Generation unverändert. Diese Linien wurden darüber hinaus nicht weiter bearbeitet. Im Gegensatz dazu wurden die zum Wildtyp-Phänotyp komplementierten Pflanzen beider Transformationen weiteren Analysen unterzogen.



**Abb. 3.8:** Phänotypen einiger Primärtransformanden (T<sub>1</sub>) des konstitutiven Komplementationskonstrukts „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“. Die Bilder zeigen T<sub>1</sub>-Pflanzen, die aus den Transformationen der *cpd*-Mutante mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ hervorgegangen sind. Die Pflanzen wurden mit Kanamycin in Sterilkultur selektiert, dann auf Erde pikiert. Auf den Bildern a) und b) sind die zum Wildtyp-Phänotyp komplementierten Primärtransformanden „35S-A“ und „35S-I“ zu sehen. Das mittlere Bild (b) zeigt zwei Transformanden wobei nur die linke Pflanze (35S-I) den komplementierten Phänotyp aufweist. Die rechte Pflanze in Bild b) und die Pflanze auf Bild c) zeigen die unterschiedlichen Ausprägungen des beschriebenen Intermediärphänotyps. Alle gezeigten Pflanzen wurden abgeerntet, nur die Segregation der Linien „35S-A“ und „35S-I“ bestimmt.

Zur Genotypisierung der T<sub>1</sub>-Pflanzen wurde die Segregation des *cpd*-Phänotyps in der T<sub>2</sub>-Generation ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen der Abbildung 3.9 gezeigt. Im Falle einer einzigen T-DNA-Insertion des entsprechenden Komplementationskonstrukts ist das Auftreten des Wildtyp-Phänotyps im Verhältnis 3:1 zum *cpd*-Phänotyp zu erwarten. Im Falle mehrerer Insertionen treten

entsprechend weniger *cpd*-Pflanzen auf. Für beide Konstrukte können einige heterozygote T<sub>1</sub>-Linien identifiziert werden, die nahezu exakt 3:1 segregieren. Zur besseren Beurteilung ist in den Tabellen der Abbildung 3.9 die Gesamtzahl der gezählten T<sub>2</sub>-Pflanzen sowie das exakte Viertel genau dieser Anzahl gezeigt.

T1 (sp)	T2 Segregation		ratio WT/ <i>cpd</i>	total	$\chi^2$ (3:1)	T1 (sp)	T2 Segregation		ratio WT/ <i>cpd</i>	total	$\chi^2$ (3:1)
	WT	<i>cpd</i>					WT	<i>cpd</i>			
nP01	28	8	3,5	36	0,70	35S-A	40	11	3,6	51	0,57
nP02	32	12	2,7	44	0,73	35S-B	31	9	3,4	40	0,72
nP03	87	18	4,8	105	0,06	35S-H	33	9	3,7	42	0,59
nP04	70	12	5,8	82	0,03	35S-M	-	-	-	-	-
nP05	30	1	30,0	31	0,01	35S-C	45	21	2,1	66	0,20
nP06	15	3	5,0	18	0,41	35S-D	30	5	6,0	35	0,14
nP07	47	6	7,8	53	0,02	35S-E	65	14	4,6	79	0,14
nP08	33	10	3,3	43	0,79	35S-F	33	9	3,7	42	0,59
nP09	56	15	3,7	71	0,45	35S-G	69	14	4,9	83	0,09
nP10	49	2	24,5	51	0,00	35S-P	-	-	-	-	-
nP11	23	5	4,6	28	0,38	35S-i	33	3	11,0	36	0,02
nP16	80	13	6,2	93	0,01	35S-K	47	18	2,6	65	0,62
nP12	70	14	5,0	84	0,08	35S-L	-	-	-	-	-
nP13	38	10	3,8	48	0,50	35S-O	-	-	-	-	-
nP14	80	5	16,0	85	0,00	35S-J	29	19	1,5	48	0,02
						35S-N	-	-	-	-	-

**Abb. 3.9: Segregationsanalysen der komplementierten *cpd*-Linien in der T<sub>2</sub>-Generation.** Die Tabellen zeigen die Ergebnisse der Segregationsanalysen der mit dem „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ Konstrukt transformierten T<sub>1</sub>-Linien „nP01“ bis „nP16“ (**links**) und der mit dem „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“-Konstrukt transformierten T<sub>1</sub>-Linien „35S-A“ bis „35S-P“ (**rechts**). Samen der genannten T<sub>1</sub>-Einzelpflanzen wurden sterilisiert und auf Agarplatten ausgelegt. In der T<sub>2</sub>-Generation wurde die Anzahl der Pflanzen mit WT- und *cpd*-Phänotyp ermittelt. Die Tabellen zeigen die gezählten Phänotypen, das Segregationsverhältnis von Wildtyp- (WT) zu *cpd*-Phänotyp, die gesamte Anzahl gezählter Pflanzen pro Linie (total) und die Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Segregation einer 3:1 Segregation entspricht. 3:1 segregierende Linien sind gelb markiert.

Für das Konstrukt „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ zeigen die Linien nP01; nP02; nP08 und nP13, mit einer Abweichung von ein bis zwei Pflanzen vom erwarteten Viertel mit *cpd*-Phänotyp, eine Segregation von Wildtyp zu *cpd* in der Relation 3:1. Die Linie nP14 weist eine Segregation von 16:1 auf, was dem Verhältnis von 15:1 bei zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen sehr Nahe kommt. Es werden fünf *cpd*-Pflanzen gezählt, rein rechnerisch wurden „5,3“ erwartet. Für das Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ werden in entsprechender Weise die Linien 35S-A; 35S-B; 35S-F; 35S-H und 35S-K als heterozygote Linien mit einer Segregation Wildtyp zu *cpd* von 3:1 identifiziert. Um homozygote Transformanden zu isolieren, wurden aus den segregierenden T<sub>2</sub>-Pflanzen einige Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp ausgewählt, die in Bezug auf die T-DNA-Insertion wegen der Komplementation homo- oder heterozygot sein konnten. Das Auftreten des *cpd*-Phänotyps in der T<sub>3</sub>-Generation wurde protokolliert, (Daten nicht gezeigt). Dazu wurden einige der nP02; nP08 nP09 und nP13 Linien auf Erde ausgelegt. In der T<sub>3</sub>-Generation konnte wie zu erwarten war, entweder keine Segregation - also nur Wildtyp-Phänotypen, was auf eine homozygote T<sub>2</sub>-Pflanze schließen

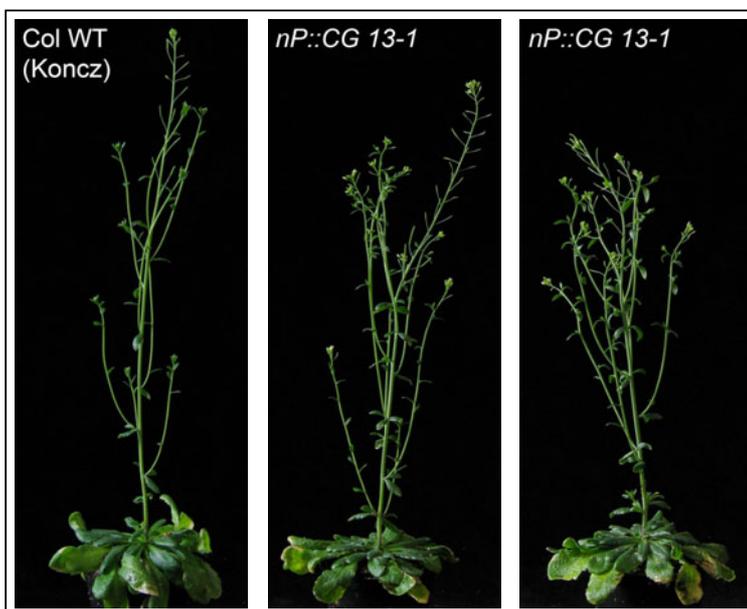
lässt - oder eine erneute Segregation des Wildtyp- zum *cpd*-Phänotyp von 3:1 festgestellt werden. Auf diese Weise konnten diverse homozygote Transformanden identifiziert werden.

T2 ( <b>hyg</b> )	T3 Segregation		ratio	total	$\chi^2$ (3:1)	T2 <b>basta</b>	Segregation		ratio	total	$\chi^2$ (3:1)
	WT	<i>cpd</i>	WT/ <i>cpd</i>				R	S	R/S		
nP02-1	281	101	2,8	382	0,52	nP02-1	391	123	3,2	514	0,58
nP02-2	100 % WT		-	-	-	nP02-2	100 % WT		-	-	-
nP02-3	393	108	3,6	501	0,08	nP02-3	462	138	3,3	600	0,26
nP02-5	100 % WT		-	-	-	nP02-5	100 % WT		-	-	-
nP08-1	100 % WT		-	-	-	nP08-1	100 % WT		-	-	-
nP08-2	185	60	3,1	245	0,85	nP08-2	164	63	2,6	227	0,34
nP08-3	172	60	2,9	232	0,76	nP08-3	136	40	3,4	176	0,49
nP08-4	100 % WT		-	-	-	nP08-4	100 % WT		-	-	-
np09-1	70	21	3,3	91	0,67	np09-1	55	20	2,8	75	0,74
nP09-2	77	27	2,9	104	0,82	nP09-2	73	23	3,2	96	0,81
nP09-4	100 % WT		-	-	-	nP09-4	100 % WT		-	-	-
nP09-7	100 % WT		-	-	-	nP09-7	100 % WT		-	-	-
np13-1	100 % WT		-	-	-	np13-1	100 % WT		-	-	-
np13-2	100 % WT		-	-	-	np13-2	100 % WT		-	-	-
np13-4	73	24	3,0	97	0,95	np13-4	88	26	3,4	114	0,59
nP13-5	210	60	3,5	270	0,29	nP13-5	160	52	3,1	212	0,87

**Abb. 3.10: Segregationsanalysen der komplementierten *cpd*-Linien in der T<sub>3</sub>-Generation.** Die Tabellen zeigen die Ergebnisse der Segregationsanalysen einiger ausgesuchter T<sub>2</sub>-Einzelpflanzen, in der T<sub>3</sub>-Generation. Samen der genannten Einzelpflanzen wurden sterilisiert und auf Agarplatten ausgelegt, die mit Hygromycin (**links**) bzw. BASTA (**rechts**) versetzt waren. Alle Pflanzen waren hygromycinresistent. Die Hygromycin-Platten wurden zur Erhebung der Segregation des *cpd*-Phänotyps verwendet. Es konnte die Anzahl der Pflanzen mit Wildtyp- (WT) und *cpd*-Phänotyp bzw. die Anzahl basta-resistenter (R) und sensibler (S) Pflanzen ermittelt werden. Die Tabellen zeigen die gezählten Phänotypen (WT; *cpd*; R; S), das Segregationsverhältnis (WT:*cpd* bzw. R:S), die gesamte Anzahl gezählter Pflanzen pro Linie (total) und die Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Segregation einer 3:1 Segregation entspricht. Einige der ausgesuchten Linien weisen keinerlei Segregation auf, alle Pflanzen zeigten den Wildtyp-Phänotyp (100% WT) bzw. es waren alle Pflanzen basta-resistent (100% R). Diese Linien sind sowohl für die *cpd*-T-DNA als auch für die T-DNA des Komplementationskonstrukts „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ homozygot.

Für einige Linien wurde die genaue Segregation in der T<sub>3</sub>-Generation in Sterilkultur festgestellt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen der Abbildung 3.10 dargestellt. Um die genaue Identität der Pflanzen zu belegen, wurde jeweils die Hygromycin-, die BASTA- und die WT:*cpd*-Segregation erhoben. Weil als Ausgangsmaterial der Transformationen *cpd*-Mutanten dienten, sollten auch alle Nachfahren hygromycinresistent sein. Die *cpd*-Mutante trägt eine T-DNA-Insertion mit Hygromycin-Resistenzmarker im *CPD*-Gen. Alle Linien zeigten keine Hygromycin-Segregation, alle Pflanzen waren hygromycinresistent, was ihre Identität als homozygote *cpd*-Mutanten belegt. Die Segregation des morphologischen *cpd*-Phänotyps (WT : *cpd*) wurde anhand der Pflanzen ermittelt, die auf den mit Hygromycin versetzten Agarplatten angezogen wurden. Auf den mit dem Herbizid BASTA versetzten Agarplatten erscheinen *cpd*-Pflanzen als bastasensitiv, was eine Analyse der phänotypischen Segregation unmöglich macht. Anhand der BASTA-Segregation kann auf den Genotyp bezüglich der komplementierenden T-DNA geschlossen werden. Von den heterozygoten T<sub>1</sub>-Linien nP02; nP08; nP09 und nP13 wurden jeweils vier T<sub>2</sub>-Linien in der T<sub>3</sub>-Generation genauer analysiert. Je zwei Linien

wurden ausgewählt, die in der vorigen Analyse der auf Erde angezogenen Keimlinge keine Segregation bzw. eine 3:1 Segregation aufwiesen. Tabelle 3.10 zeigt, daß die Linien nP02-2; nP02-5; nP08-1; nP08-4; nP09-4; nP09-7; nP13-1 und nP13-2 100% hygromycin- und bastaresistent sind und kein segregierender *cpd*-Phänotyp auftritt. Die Resistenz gegenüber beiden Substanzen belegt die Identität der T<sub>2</sub>-Pflanzen als homozygote *cpd*-Pflanzen, die auch in Bezug auf das Komplementationskonstrukt homozygot sind. Die übrigen Linien nP02-1; nP02-3; nP08-2; nP08-3; nP09-1; nP09-2; nP13-4 und nP13-5 zeigen jeweils eine 3:1 Segregation des BASTA-Resistenzmarkers (R:S) und des *cpd*-Phänotyps (WT:*cpd*). Damit können die entsprechenden T<sub>2</sub>-Pflanzen auch als homozygote *cpd*-Mutanten identifiziert werden, die für das Komplementationskonstrukt jedoch heterozygot sind.



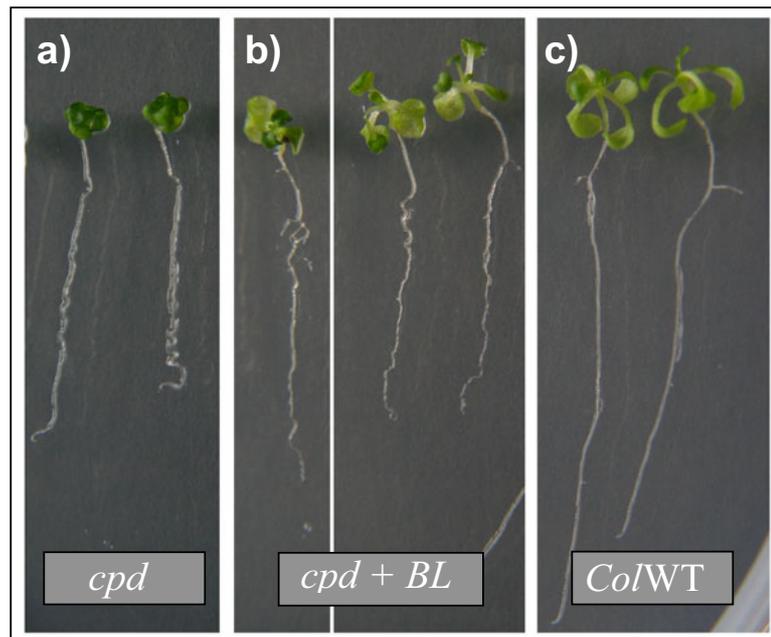
**Abb. 3.11: Phänotyp der komplementierten *cpd*-Linie „nP::CPD-GFP 13-1“ in der T<sub>3</sub>-Generation.** Die Bilder zeigen eine Kontrollpflanze des *Columbia*-Wildtyps (links) sowie zwei Einzelpflanzen der Linie „nP::CPD-GFP 13-1“ (Mitte; rechts) in der T<sub>3</sub>-Generation. Die gleich alten Pflanzen wurden im Gewächshaus ca. 60 Tage unter Kurztagsbedingungen angezogen. Sie sind phänotypisch nicht zu unterscheiden.

In Abbildung 3.11 ist der Phänotyp zweier Einzelpflanzen der Linie nP13-1 dargestellt. Die gezeigten *cpd*-Mutanten sind aufgrund des Komplementationskonstrukts „nP::CPD-GFP (pGREEN)“ vollständig zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert. Es ist keine phänotypische Unterscheidung zum gezeigten *Columbia*-Wildtyp möglich. Pflanzen dieser und der anderen, in Abbildung 3.10 charakterisierten Linien, wurden für die weiteren Analysen, z.B. der Proteinlokalisierung *in planta* (3.1.3.3) und zu Kreuzungsexperimenten (3.4.1) verwendet.

### 3.1.2.3 Biochemische Komplementation der *cpd*-Mutante durch exogene *Brassinolid*-Gabe

Neben der genetischen Komplementation der *cpd*-Mutante wurde auch eine konditionale Komplementation durchgeführt. Durch die exogene Gabe des Pflanzenhormons *Brassinolid* konnte die *cpd*-Nullmutante fast vollständig zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden. Zur genauen Studie des Steroidbedarfs wurden verschiedene konditionale Komplementationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden *cpd*-Nullmutanten unterschiedlich lange und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit dem Hormon behandelt.

Für alle hier beschriebenen Experimente ist die *cpd*-Mutante zuerst in Sterilkultur auf MS-Agarplatten ohne Hormonzusatz angezogen und nach ca. einer Woche auf Kontrollplatten oder mit *Brassinolid* versetzten Agarplatten pikiert worden. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil dann der Phänotyp der *cpd*-Mutante eindeutig von dem des *Columbia*-Wildtyps unterschieden werden kann und so die Identität der *cpd*-Mutante immer gewährleistet ist. Eine Woche alte Keimlinge der *cpd*-Mutante können durch eine kurze Inkubation von ca. zwei bis drei Tagen auf 0,1  $\mu$ M brassinolidhaltigen Agarplatten zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden.



**Abb. 3.12: Biochemische Komplementation der *cpd*-Mutante durch exogene Gabe des Pflanzenhormons *Brassinolid*.** Die Abbildung zeigt zwei unbehandelte *cpd*-Pflanzen (a) sowie zwei ebenfalls unbehandelte Kontrollpflanzen (c) des *Columbia*-Wildtyps. Die drei mittleren Pflanzen (b) sind *cpd*-Nullmutanten, die durch die Gabe von *Brassinolid* (BL) zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert wurden. Alle gezeigten Pflanzen sind in Sterilkultur auf Agarplatten für ca. zwei Wochen angezogen worden. Die *cpd*-Pflanzen wurden wie die Kontrollpflanzen zuerst auf MS Platten ausgelegt. Nach ca. einer Woche, als die *cpd*-Mutanten phänotypisch eindeutig vom Wildtyp unterscheidbar waren, sind die Pflanzen auf Kontrollplatten (a; c) bzw. auf Platten (b) die mit 0,1  $\mu$ M *Brassinolid* versetzt waren, pikiert worden. Die mittleren drei Pflanzen sind drei Tage auf brassinolidhaltigen Platten gelagert, dann photographiert und gemeinsam mit den Kontrollpflanzen auf Erde pikiert worden.

In Abb.3.12 b) sind drei entsprechend behandelte *cpd*-Mutanten im Vergleich zu den unbehandelten *cpd*- (a) und Wildtyp-Kontrollpflanzen (c) gezeigt. Die beiden linken Pflanzen (b) gleichen dem Wildtyp zwar morphologisch, sie sind jedoch etwas kleiner. Die Linke der drei behandelten *cpd*-Pflanzen (b) weist eine schwächere Reaktion auf, nur das linke Keimblatt zeigt eine deutliche Reaktion. Das rechte Blatt ist noch deutlich kleiner und dunkler. Die Pflanzen wurden vor dem Photographieren auf andere Platten pikiert. Auf der Steroidplatte hatte das rechte, kleinere Blatt keinen Kontakt mit der Plattenoberfläche. Zum einen kann dies die schwächere Reaktion erklären, zum anderen zeigt diese Pflanze aber auch eine langsamere Entwicklung. Sie hat erst das erste Paar echter Blätter gebildet, wohingegen alle anderen Pflanzen bereits das zweite Paar ausgebildet haben. Im

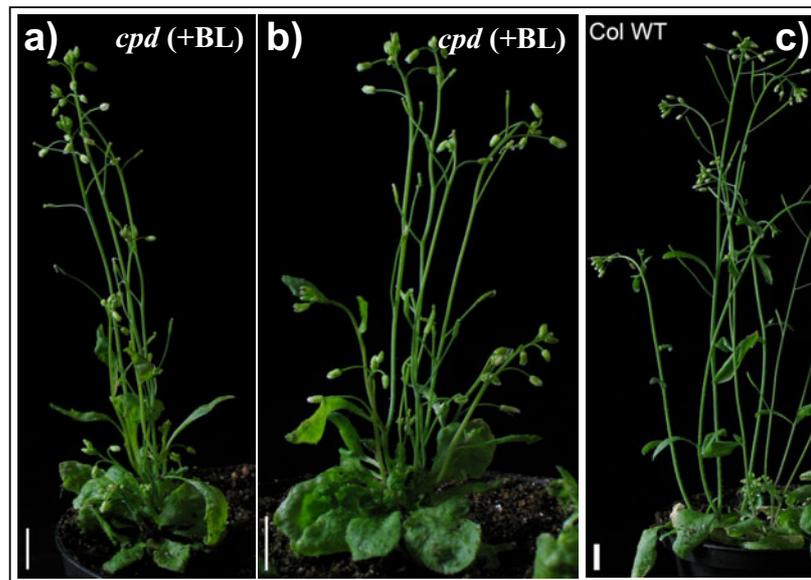
Vergleich zu den *cpd*-Kontrollpflanzen (a) zeigen die behandelten *cpd*-Pflanzen (b) aber eindeutig ein stärkeres Streckenwachstum im Hypokotyl und den Blattstielen (*Petiolen*), auch die Blattflächen (*Lamina*) sind vergrößert. Des weiteren erscheinen die hormonbehandelten *cpd*-Pflanzen (b) nicht mehr so dunkelgrün wie die unbehandelten *cpd*-Pflanzen (a). Die Wurzeln sind nach der Behandlung jedoch unwesentlich länger und damit deutlich kürzer als die des Wildtyps. Die fehlende Komplementation des Wurzelwachstums ist nicht verwunderlich, weil Kontrollexperimente mit Wildtyp-Pflanzen zeigen, daß die Wurzel - anders als das Hypokotyl - auf hohe exogene Steroidkonzentrationen nicht mit erhöhter Zellstreckung sondern mit Inhibition des Wachstums reagiert. Trotzdem zeigt die *cpd*-Mutante eine eindeutige Reaktion auf die relativ kurze Behandlung mit *Brassinolid*, dies wird bei der Betrachtung der weiteren Experimente noch deutlicher. Im Folgenden werden zwei weitere Experimente beschrieben, die mit entsprechend behandelten *cpd*-Keimlingen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.13 und 3.14 festgehalten.



**Abb. 3.13:** Teilkomplementation der *cpd*-Mutante durch zeitlich begrenzte Gabe des Pflanzenhormons *Brassinolid*. Die Abbildung zeigt vier mit dem Hormon *Brassinolid* (BL) behandelte *cpd*-Pflanzen (a; b; d; e) im Vergleich zur unbehandelten *cpd*-Kontrollpflanze (c). Die Pflanzen wurden, wie zuvor beschrieben, in Sterilkultur ausgekeimt und drei Tage auf Agarplatten kultiviert, die mit 0,1  $\mu\text{M}$  *Brassinolid* versetzt waren. Danach wurden sie auf Erde pikiert und ohne weitere Hormonbehandlung angezogen. Die Abb.3.12 zeigt, daß die *cpd*-Pflanzen durch die kurze Gabe des Hormons fast vollständig zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert sind. Die Bilder dieser Abbildung belegen, daß so behandelte *cpd*-Pflanzen ohne weitere Behandlung mit *Brassinolid* wieder den charakteristischen *cpd*-Phänotyp aufweisen. Nur einige der jungen Blätter zeigen eine Teilkomplementation, alle neu angelegten Blätter den mutierten *cpd*-Phänotyp. Die Größenmarker in Bild a) und c) entsprechen der Länge 1 cm.

*Cpd*-Keimlinge wurden, wie bereits beschrieben, ca. eine Woche lang in Sterilkultur angezogen, dann auf brassinolidhaltigen Agarplatten zwei bis drei Tage lang kultiviert und dann auf Erde pikiert. Im ersten Experiment sind die *cpd*-Keimlinge ohne weitere Hormonbehandlung auf Erde weiter kultiviert worden. Im zweiten Experiment folgte die kontinuierliche Weiterbehandlung mit *Brassinolid*. Dazu wurden die *cpd*-Pflanzen alle zwei bis drei Tage mit einer 0,1  $\mu\text{M}$  *Brassinolid*-Lösung besprüht, bis die gesamten, oberirdischen Pflanzenteile benetzt waren. Ohne weitere Hormonbehandlung zeigen alle

neu angelegten Blätter wieder den mutierten *cpd*-Phänotyp. In Abbildung 3.13 sind einige temporär mit *Brassinolid* behandelte *cpd*-Pflanzen (a; b; d; e) im Vergleich zu einer gänzlich unbehandelten *cpd*-Pflanze (c) gezeigt. Die nach der Steroidgabe gebildeten und alle folgenden Rosettenblätter zeigen die für die *cpd*-Mutante typische Morphologie. Lediglich die ersten, durch die kurze Steroidgabe vergrößerten Blätter, bleiben im Vergleich zu den unbehandelten Blättern größer und weniger gekrümmt. Besonders die Blattstiele zeigen eine deutliche Zunahme des Streckenwachstums durch die Steroidgabe. Ohne weitere Steroide stellen diese Blätter jedoch das Wachstum ein. Dies wird durch das dritte Experiment bestätigt, in dem die auf Erde pikierten *cpd*-Pflanzen weiter mit *Brassinolid* behandelt wurden.



**Abb. 3.14: Komplementation der *cpd*-Mutante durch die exogene Gabe des Pflanzenhormons *Brassinolid*.** Die Abbildung zeigt zwei *cpd*-Nullmutanten (a; b), die durch die exogene Gabe des Pflanzenhormons komplementiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten, gleich alten Wildtyppflanzen (c). Die *cpd*-Pflanzen wurden, wie zuvor beschrieben, zuerst in Sterilkultur angezogen, drei Tage auf brassinolidhaltigen Agarplatten gelagert, dann auf Erde pikiert. Im Gegensatz zum zuvor beschriebenen Experiment wurden die hier gezeigten *cpd*-Pflanzen noch zwei weitere Wochen behandelt. Die Pflanzen wurden kontinuierlich alle zwei bis drei Tage mit  $0,1 \mu\text{M}$  *Brassinolid* besprüht. Die Bilder zeigen, daß die *cpd*-Mutanten fast vollständig zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert wurden. Morphologisch gesehen, ähneln sie sehr stark dem Wildtyp, nur in der Gesamtgröße bleiben sie deutlich kleiner als die Kontrollpflanzen. Die gezeigten Größenmarker entsprechen je 1 cm.

Die kontinuierliche Versorgung mit *Brassinolid* führte zu einer anhaltenden Komplementation, was in der deutlich zu erkennenden Steigerung des Streckenwachstums der Blätter und Sprosse sowie der Blattflächenvergrößerung sichtbar wird. In Abbildung 3.14 sind zwei *cpd*-Nullmutanten gezeigt, die wegen der anhaltenden *Brassinolid*-Behandlung morphologisch nicht mehr stark vom Wildtyp unterscheidbar sind. Bei der Betrachtung der Abbildung 3.14 ist ein Augenmerk auf die Größenmarker zu richten. Die gezeigten *cpd*-Mutanten erreichen nur ca. 45 % bis 65 % der Gesamthöhe des Wildtyps. Die *cpd*-Pflanzen in Abbildung 3.14 haben eine Gesamthöhe von ca. 12 cm (a) und 9 cm (b), die Kontrollpflanzen erreichen eine Gesamthöhe von ca. 19 cm (c). Die vorgestellten

konditionalen, chemischen Komplementationstudien konnten allerdings nicht mit genug Einzelpflanzen durchgeführt werden, um die beobachteten Komplementationseffekte wie z.B. die auftretende Streckung des Hypokotyls und der Blattstiele oder die Gesamthöhe zu quantifizieren. Die Experimente wurden jedoch mehrfach wiederholt, wobei die gezeigten Ergebnisse qualitativ reproduziert werden konnten. In den durchgeführten Experimenten haben alle *cpd*-Pflanzen zu allen getesteten Entwicklungszeitpunkten auf die exogene Steroidgabe mit erhöhtem Streckungswachstum reagiert. Eine hundertprozentige Komplementation der *cpd*-Mutante hin zum Wildtyp-Phänotyp war durch die alleinige Applikation des Hormons *Brassinolid* nicht möglich. In diesen Experimenten wurde die Applikation durch besprühen der oberirdischen Organe durchgeführt, damit ist eine Versorgung der Wurzel nicht gewährleistet.

Ältere, auf Erde angezogene, *cpd*-Pflanzen wurden z.B. bei den Komplementationstudien mit dem induzierbaren CPD-GFP-Konstrukt (Abb.3.26) oder vor der Transformation mit den Komplementationskonstrukten (3.1.2.2) in späten Entwicklungsstadien erstmals mit *Brassinolid* behandelt. Dabei wurde deutlich, daß auch solche Pflanzen mit Streckungswachstum auf die Steroidgabe reagieren. Allerdings wird das dann nur noch durch das erhöhte Streckungswachstum der Sprosse sichtbar. Rosettenblätter zeigen in späten Entwicklungsstadien kaum noch Streckungswachstum, das durch die Steroidgabe verstärkt werden könnte.

### 3.1.3 Lokalisation des CPD-Proteins aus *A. thaliana*

Die Lokalisation des CPD-Proteins wurde indirekt durch die Lokalisation eines CPD-GFP-Fusionsproteins gezeigt. Die Funktionalität des CPD-GFP-Fusionsproteins konnte anhand der phänotypischen Komplementation der *A. thaliana cpd*-Mutante, die in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wird, belegt werden.

Das CPD-Protein wurde in verschiedenen Zelltypen, in Zellen der *A. thaliana* Suspensionskultur, in Protoplasten und in transgenen Pflanzen unter Verwendung der verschiedenen in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebenen Expressionskonstrukte lokalisiert. Des weiteren wurde die zelluläre und gewebespezifische Lokalisation des BRI1-Proteins analysiert. Das BRI1-Protein wurde ebenfalls durch die Detektion eines GFP-Fusionsproteins lokalisiert. Die komplementierte „*bri1 / BRI1::BRI1-GFP*“-Linie wurde freundlicherweise von Joanne Chory zur Verfügung gestellt. Abschnitt 3.1.3.2 behandelt den Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1- und des CPD-Proteins. Darüber hinaus wurde auch die gewebespezifische Lokalisation des CPD-Proteins analysiert (3.1.3.3). Dazu diente das nativ-Promotorkonstrukt „*nP::CPD-GFP (pGREEN-basta)*“ im *background* der komplementierten *cpd*-Nullmutante.

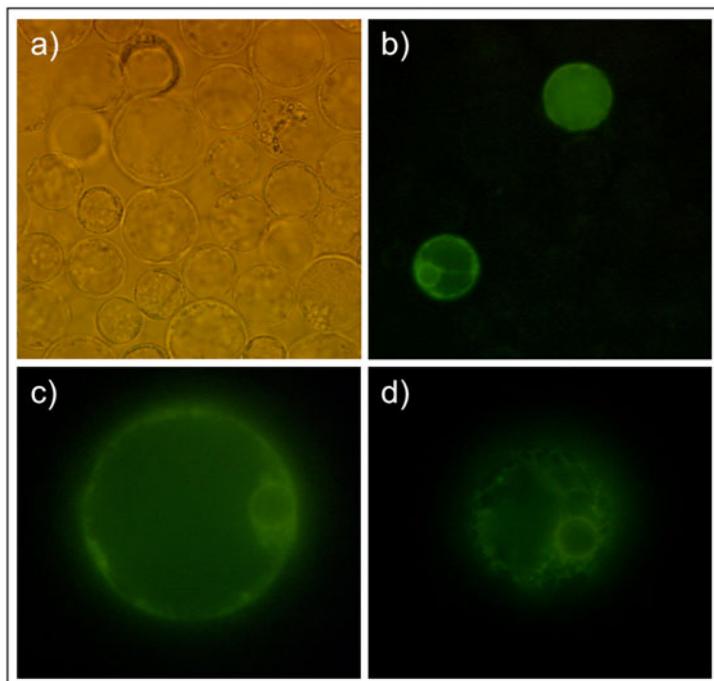
#### 3.1.3.1 Zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins

Zur Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-Proteins wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: zum einen die Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins durch die direkte Detektion der

GFP-Fluoreszenz mittels Licht- und confocaler Laser-scanning-Mikroskopie, zum anderen mittels einer Western-Blot-Analyse mit einem GFP-spezifischen Antikörper. Dabei wurde die Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in den verschiedenen Zellfraktionen, eines durch differentielle Zentrifugation aufgetrennten Proteinextraktes, gezeigt. Beide Methoden zusammen ergeben ein genaues Bild der zellulären CPD-Lokalisation.

### 3.1.3.1.1 Analyse der CPD-Lokalisation mittels GFP-Fluoreszenz

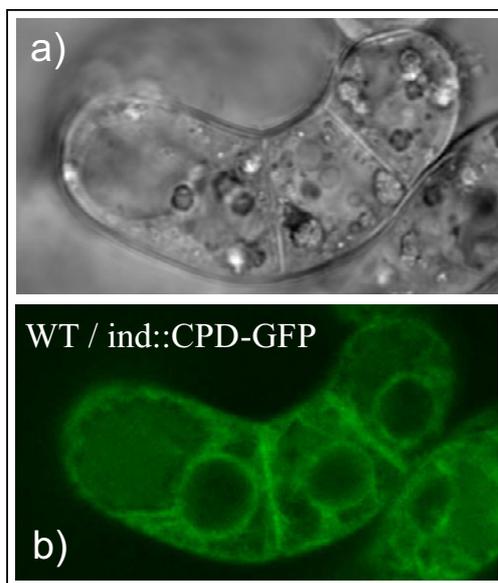
Wie bereits erwähnt, wurde das CPD-GFP-Fusionsprotein in verschiedenen Zelltypen unter der Verwendung der unterschiedlichen Expressionskonstrukte lokalisiert. Die Detektion erfolgte mit einem Lichtmikroskop und entsprechenden GFP-Filtern sowie mit einem Laser-Confocal-Mikroskop mit Transmissions- und Fluoreszenzdetektor. Das analysierte Pflanzenmaterial wurde ohne Fixierung, direkt auf Objektträgern, mit Wasser überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt, mikroskopiert. Die Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins wurde lichtmikroskopisch in Protoplasten festgestellt. Diese konnten aus einer, mit dem konstitutiven CPD-GFP-Expressionskonstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ transformierten *A. thaliana* Suspensionskultur gewonnen werden. Die Protoplasten wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.5 beschrieben, durch einen Abverdau der Zellwände mit den Enzymen Zellulase und Pectinase aus der Suspensionskultur gewonnen. Es hatte sich als vorteilhafter herausgestellt, die GFP-Fluoreszenz in Protoplasten anstatt in den filamentös wachsenden Zellen der Suspensionskultur zu analysieren, weil auf diese Weise einfacher Aufnahmen von Einzellzellen möglich sind. Dies führt zu deutlich besseren Bildern der GFP-Fluoreszenz.



**Abb. 3.15: Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Protoplasten.** Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Lichtmikroskop in Protoplasten detektiert, die aus einer transgenen *A. thaliana*-Suspensionskultur gewonnen wurden. Die Bilder a) und b) zeigen eine Übersichtsaufnahme der isolierten Protoplasten, in Bild a) ist ein Durchlichtbild, in Bild b) die GFP-Fluoreszenz zu sehen. Die Bilder c) und d) sind Vergrößerungen zweier Einzellzellen. Die Ausgangs-suspensionskultur war mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ transformiert.

In Abbildung 3.15 ist die beobachtete Lokalisation des Fusionsproteins in einzelnen Protoplasten gezeigt. Nicht alle Zellen exprimieren das Fusionsprotein in gleicher Stärke. Das ist in der Übersichtsaufnahme a) bzw. b) zu sehen. Die Ausgangssuspensionskultur wurde mehrere Wochen mit Kanamycin selektiert, sie sollte nach dieser Zeit nur noch aus transformierten Zellen bestehen. In den Zellen, die deutliche GFP-Signale zeigen, konnte das Fusionsprotein lokalisiert werden (b; c; d). Das GFP-Signal ist besonders stark an der Kernmembran und dem umgebenden Membransystem des Endoplasmatischen Reticulums (ER) sowie an bestimmten Bereichen der Plasmamembran zu erkennen. Auch das gesamte Lumen der Zelle weist ein diffuses, schwächeres Signal auf (c). Bild d) zeigt deutlich, daß die Fluoreszenz in fädigen, für das ER typischen Strukturen von der Kernmembran weg verlaufen.

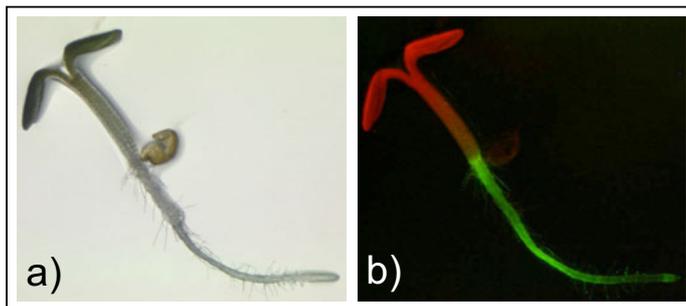
Um bessere Aufnahmen von der GFP-Fluoreszenz zu erhalten, wurde von der Lichtmikroskopie zur Confocalen-Laser-scanning-Mikroskopie gewechselt. Dabei wurden transgene Pflanzen analysiert, die mit dem zuvor in Protoplasten gezeigten Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ transformiert waren. Außerdem wurde eine weitere Suspensionskultur untersucht, die mit dem induzierbaren Expressionskonstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-kan“ transformiert war. Die Abbildungen 3.16, 3.17 und 3.18 zeigen typische Bilder, die aus der Analyse der Suspensionskultur bzw. den transgenen Pflanzen hervorgegangen sind.



**Abb. 3.16: Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Zellen der *A. thaliana* Suspensionskultur.** Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Laser-Confocal-Mikroskop in filamentös gewachsenen Zellen einer transgenen *A. thaliana* Suspensionskultur detektiert. Sie war mit dem induzierbaren CPD-GFP-Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)kan“ transformiert. In Bild a) ist eine Transmissionsaufnahme zu sehen, in Bild b) ist die GFP-Fluoreszenz von Zellen der *A. thaliana* Suspensionskultur, ca. 24 h nach erfolgter Induktion mit  $\beta$ -Östradiol (5  $\mu$ M Endkonzentration), gezeigt.

Die Suspensionskultur wurde mit unterschiedlichen Mengen  $\beta$ -Östradiol induziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion analysiert. Es stellte sich heraus, daß eine Endkonzentration des  $\beta$ -Östradiols von 5  $\mu$ M ausreichend ist, um eine deutliche Induktion der Kultur nach 12 h zu erhalten. Die Induktion hielt dann für 48 h an. Die Signale nach 12 h, 24 h bzw. 48 h nach Induktion wiesen keine Unterschiede auf. Die in Abbildung 3.16 dargestellten Bilder wurden 24 h nach erfolgter Induktion gemacht. Die Bilder zeigen fädig gewachsene Zellen der

Suspensionskultur, die wieder deutliche Fluoreszenzsignale an der Kernmembran und in fädigen Strukturen aufweisen, sie erstrecken sich von der Kernhülle zur Plasmamembran. Auch hier ist im Cytoplasma ein schwächeres Signal zu erkennen. Die gezeigten Zellen sind offenbar durch Teilung aus einer Zelle hervorgegangen. Das Fluoreszenzsignal entlang der Plasmamembran ist an den Verbindungsstellen der drei Zellen, der sogenannten Zellplatte, am stärksten. Dort wird die Plasmamembran während der Zellteilung aus interzellulären Vesikeln neu gebildet und oft von ER-Membranen an sogenannten Plasmodesmata durchbrochen, was ein verstärktes Auftreten von ER-lokalisierten Proteinen dort wahrscheinlich macht.

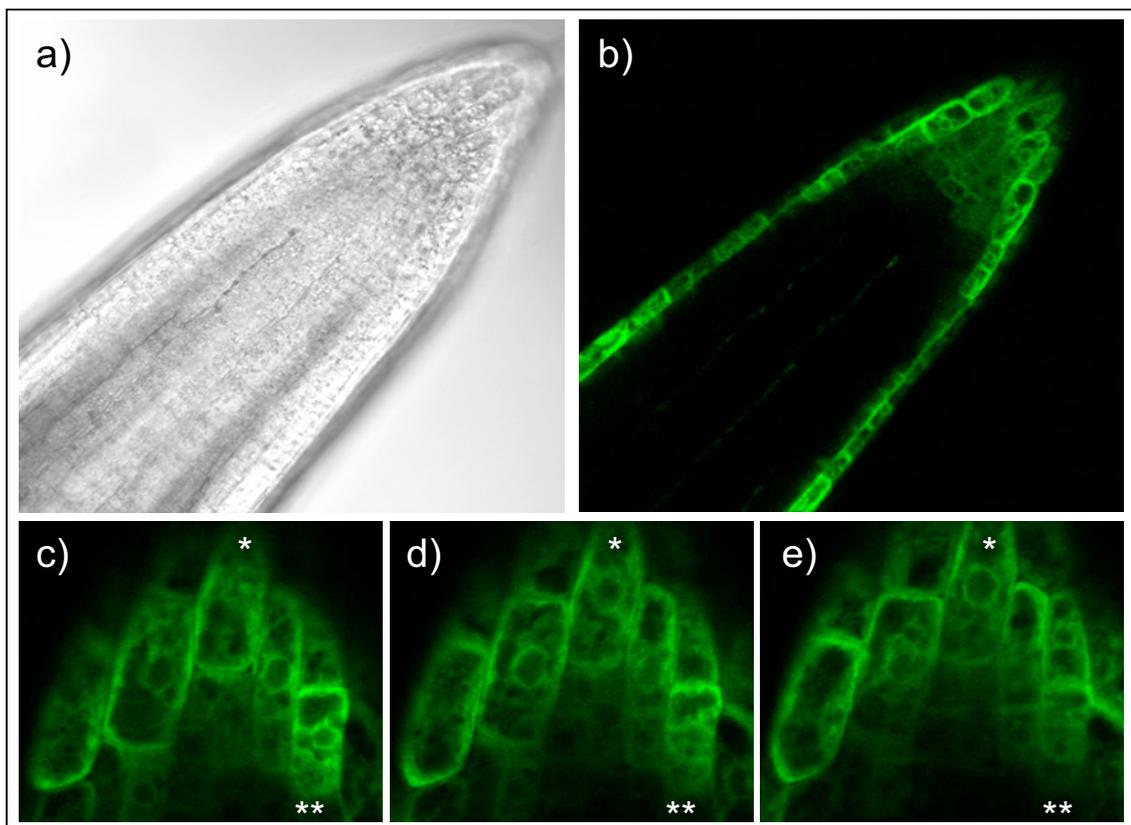


**Abb. 3.17: Phänotyp eines fünf Tage alten Keimlings der Linie „35S-K“.** Bei dem gezeigten Keimling handelt es sich um eine *cpd*-Mutante die durch das Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ zum Wildtyp komplementiert wurde. In Bild a) ist ein Durchlichtbild, in Bild b) die Chlorophyllautofluoreszenz (rot) und die GFP-Fluoreszenz (grün) gezeigt.

Im Folgenden wurden Keimlinge der in Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen, heterozygoten, 3:1 segregierenden Linien 35S-A, 35S-B, 35S-F, 35S-H und 35S-K sowie die Linien 35S-C, 35S-D und 35S-E analysiert. Bei diesen Pflanzen handelt es sich um mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ komplementierte *cpd*-Mutanten. Die Pflanzen stammen aus zumindestens vier unterschiedlichen  $T_0$ -Populationen. Zur mikroskopischen Analyse sind Keimlinge in Sterilkultur auf Agarplatten angezogen und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten betrachtet worden. Von jeder Linie wurden einige wildtypisch aussehende Pflanzen analysiert, die segregierenden *cpd*-Pflanzen zeigten keine GFP-Signale. Alle übrigen Pflanzen wiesen vergleichbare Signale auf wie die, die in den Abbildungen 3.17 und 3.18 zu sehen sind.

Stellvertretend ist in Abbildung 3.17 eine Übersichtsaufnahme eines fünf Tage alten Keimlings der Linie 35S-K dargestellt. Die GFP-Fluoreszenz (grün) ist deutlich von der Autofluoreszenz des Chlorophylls (rot) zu unterscheiden. Da die GFP-Fluoreszenz (grün) hauptsächlich in der Wurzel auftritt (b), lag die Konzentration bei der weiteren Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins auf der Wurzel, genau genommen auf der Wurzelspitze.

Die Bilder der Abbildung 3.18 zeigen die Wurzelspitze eines ca. eine Woche alten Keimlings, der Linie „35S-A“. Bei diesem Keimling handelt es sich um eine  $T_2$ -Pflanze, die phänotypisch nicht von gleich alten Pflanzen des *Columbia*-Wildtyps zu unterscheiden war. Es sind deutliche Fluoreszenz Signale in der Columella und in den Epidermiszellen, im Bereich der Zellteilungszone, zu erkennen. Die Zellen die ein GFP-Signal aufweisen, zeigen auch die bereits in Protoplasten und in den Zellen der Suspensionskultur beobachtete charakteristische Lokalisation in der Kernmembran und im ER. Eine weitere Detailaufnahme dieser Wurzelspitze ist in Abbildung 3.20, beim Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1- und des CPD-Proteins zu sehen.



**Abb. 3.18:** Analyse der zellulären Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in Wurzelspitzenzellen junger *A. thaliana*-Keimlinge. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Laser-Confocal-Mikroskop in Wurzelzellen von ca. einer Woche alten Keimlingen detektiert. Die Bilder **a)** und **b)** zeigen die Übersichtsaufnahme einer Wurzelspitze einer mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ komplementierten *cpd*-Mutante. In Bild **a)** ist eine Transmissionsaufnahme, in Bild **b)** die GFP-Fluoreszenz zu sehen. Die Bilder **c)**, **d)** und **e)** sind Detailaufnahmen der gleichen Wurzelspitze in unterschiedlichen Focusebenen. Zum einfacheren Vergleich sind zwei Zellen in den unterschiedlichen Abbildungen markiert (\*), (\*\*).

Mit dem Laser-Confocal-Mikroskop können Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts in verschiedenen Focusebenen gemacht werden, wobei sich ein räumlicher Eindruck ergibt. Von der in Abbildung 3.18 a) bzw. b) gezeigten Wurzelspitze wurden Detailaufnahmen in verschiedenen Focusebenen gemacht (c; d; e). Betrachtet man die gekennzeichnete Zelle (\*), so ist der Zellkern in der ersten Ebene (c) nicht zu erkennen. In der nächsten, darunter liegenden optischen Ebene (d) ist der Kern bzw. das Fluoreszenzsignal an der Kernmembran schwach, in der folgenden Ebene (e) sehr deutlich und mit dem größten Querschnitt zu erkennen. Für die zweite markierte Zelle (\*\*) ergibt sich die entsprechende Beobachtung in entgegengesetzter Richtung. Die Kerne der benachbarten Zellen liegen alle in etwas unterschiedlichen Ebenen, diese räumliche Betrachtung der Fluoreszenzsignale zeigt, daß die fädigen Fluoreszenzsignale, die von der Kernmembran weggehen, nicht in allen Ebenen kontinuierlich auftreten. Auch sind die Signale an den Zellgrenzen nicht in allen Ebenen gleich stark.

### 3.1.3.1.2 Analyse der CPD-Lokalisation mittels differentieller Zentrifugation und Western-Blot-Analyse

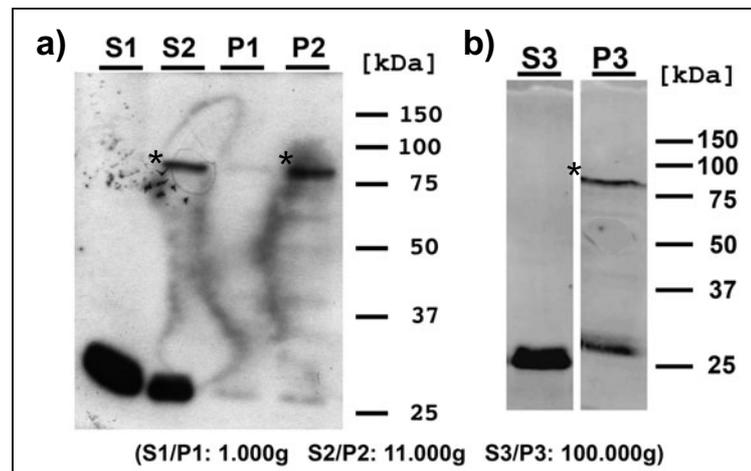
Neben der Lokalisation des CPD-Proteins in lebenden Pflanzenzellen durch direkte Detektion der GFP-Fluoreszenz, des CPD-GFP-Fusionsproteins, wurde auch die hier beschriebene Zellfraktionierung mit anschließender Detektion des Fusionsproteins, mittels einer Western-Blot-Analyse der einzelnen Fraktionen, durchgeführt.

In einer Western-Blot-Analyse eines Proteinextraktes ergaben sich mit einem GFP-spezifischen Antikörper zwei verschiedene Signale der entsprechenden Molekulargewichte von ca. 27 kDa und ca. 80 kDa. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des CPD-GFP-Fusionsproteins von ca. 80 kDa und dem Molekulargewicht des freien GFPs von ca. 27 kDa. Da der Nachweis eines Proteins in einem Gesamtzellextrakt keine Information über dessen subzelluläre Lokalisation gibt, wurden die aus den Suspensionskulturen hergestellten Proteinextrakte durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Dazu sind, wie in Abschnitt 2.2.1.5.1 beschrieben, drei verschiedene Zentrifugationen, bei 1.000g, 11.000g und 100.000g, durchgeführt worden. Dieses Vorgehen ermöglicht die Trennung verschiedener subzellulärer Kompartimente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Gewichte.

Als Ausgangsmaterial wurde eine *A. thaliana* Suspensionskultur verwendet, die mit dem induzierbaren CPD-GFP-Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)kan“ (3.1.2.1) transformiert war. Die Expression des Fusionsproteins wurde 24 h vor der Präparation durch die Gabe von  $\beta$ -Östradiol mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M induziert. Die Proteinextrakte wurden hergestellt, wie in Abschnitt 2.2.1.5.1 beschrieben und anschließend der differentiellen Zentrifugation unterzogen. Die Proteine der erhaltenen Fraktionen wurden mittels einer „SDS-PAGE“ (2.2.1.5.3) elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.2.1.5.4). Mit einem GFP-spezifischen Antikörper konnte sowohl das Fusionsprotein als auch das freie GFP-Protein in den unterschiedlichen Fraktionen nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 dokumentiert.

Das 27 kDa-Signal des freien GFPs kann in allen Überständen (S1; S2; S3) und zu geringem Maße auch im 100.000g-Pellet detektiert werden. Da der 100.000g-Überstand nur abgossen und das Pellet nicht gewaschen wurde, ist eine Kontamination des Pellets durch Reste des Überstandes sehr wahrscheinlich. Diese Lokalisation des freien GFP-Proteins entspricht der erwarteten Lokalisation eines löslichen, cytosolischen Proteins. Das Fusionsprotein kann im 11.000g-Überstand und Sediment (Pellet) sowie im 100.000g-Pellet, jedoch nicht im 100.000g-Überstand detektiert werden. Im 11.000g-Pellet sind Zellorganellen wie Mitochondrien und Chloroplasten zu finden. Auch Reste von Kernhüllen und andere Zelltrümmer, die in der 1.000g-Zentrifugation noch nicht sedimentiert sind, werden hier gefunden. Bei der 100.000g-Zentrifugation des 11.000g-Überstandes (S2) kann das Fusionsprotein ausschließlich im 100.000g-Pellet detektiert werden. Im 100.000g-Pellet, der microsomalen Fraktion, sind kleine Vesikel und Bruchstücke des Endoplasmatischen Reticulums (ER) vertreten. Da das CPD-Protein einen N-terminalen Membrananker aufweist, entspricht die gefundene Lokalisation des Fusionsproteins der erwarteten Membranlokalisierung des CPD-Proteins. Darüber

hinaus bestätigt diese Lokalisation des Fusionsproteins auch die Beobachtungen der mikroskopischen Analysen, in denen starke Fluoreszenzsignale in intarzellulären Membranen beobachtet wurden. Das Auftreten des freien, cytosolisch lokalisierten GFPs neben dem membrangebundenen Fusionsprotein, das nicht in der cytosolischen Fraktion detektiert werden konnte, erklärt die in der mikroskopischen Analyse beobachtete diffuse Fluoreszenz des Cytoplasmas.

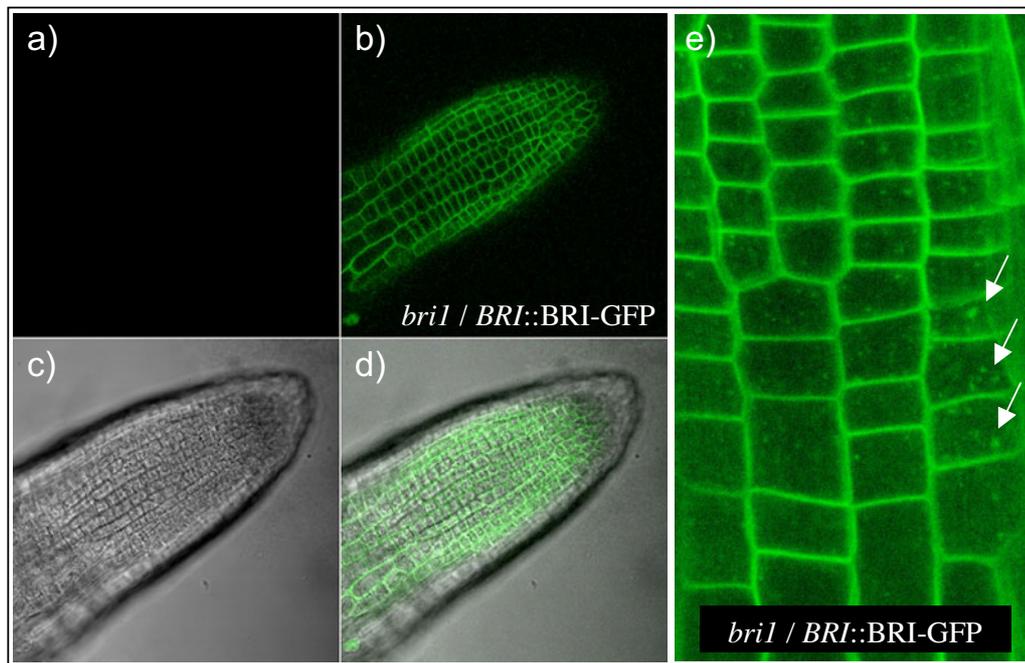


**Abb. 3.19: Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins mittels differentieller Zentrifugation.** Die Abbildung zeigt eine Western-Blot-Analyse eines differentiell zentrifugierten Proteinextrakts von Zellen einer *A. thaliana* Suspensionskultur. Das CPD-GFP-Fusionsprotein konnte mit einem GFP-spezifischen Antikörper detektiert werden. Die Suspensionskultur ist mit dem induzierbaren CPD-GFP-Expressionskonstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)kan“ transformiert und durch  $\beta$ -Östradiol induziert worden. Zur Induktion wurde  $\beta$ -Östradiol mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M ca. 24 h vor der Materialernte appliziert, der Proteinextrakt wurde, wie in 2.2.1.5.1 beschrieben, hergestellt und mehrfach, wie beschrieben, zentrifugiert. Es wurden drei Zentrifugationsschritte, 1.000g (S1/P1), 11.000g (S2/P2) und 100.000g (S3/P3) durchgeführt, die Proteine der sich ergebenden Fraktionen wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Anschließend wurde das CPD-GFP-Fusionsprotein mit einem primären GFP-spezifischen (2.1.7) und einem entsprechenden, peroxidasegekoppelten, sekundären Antikörper (2.1.7) unter Verwendung des ECL-Substrates detektiert. Die Abbildung zeigt die exponierten Röntgenfilme. In Bild a) ist das Ergebnis der 1.000g- und der 11.000g-Zentrifugation zu sehen. Der Überstand „S2“ der 11.000g-Zentrifugation wurde für die 100.000g-Zentrifugation eingesetzt, deren Ergebnis in Bild b) gezeigt ist. Das CPD-GFP-Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa, das GFP-Protein alleine ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa. Das Signal des CPD-GFP-Fusionsprotein ist mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.

### 3.1.3.2 Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1-Proteins und des CPD-Proteins *in planta*

Im Rahmen der Analyse der Lokalisation des CPD-Proteins wurde auch die Lokalisation der Rezeptorkinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) (Clouse *et al.*, 1996) untersucht. Zur Analyse der Lokalisation des BRI1-Proteins wurde die gleiche Strategie angewandt wie bei der CPD-Lokalisation. Das BRI1-Protein konnte auch durch die Detektion eines GFP-Fusionsproteins lokalisiert werden. Die Funktionalität dieses Fusionsproteins wurde ebenfalls durch die phänotypische Komplementation der *bri1*-Nullmutante sichergestellt. Eine entsprechende *A. thaliana bri1*-Linie, die

durch die Expression des BRI1-GFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen *BRI1*-Promotors komplementiert wird, hat freundlicherweise Joanne Chory zur Verfügung gestellt.

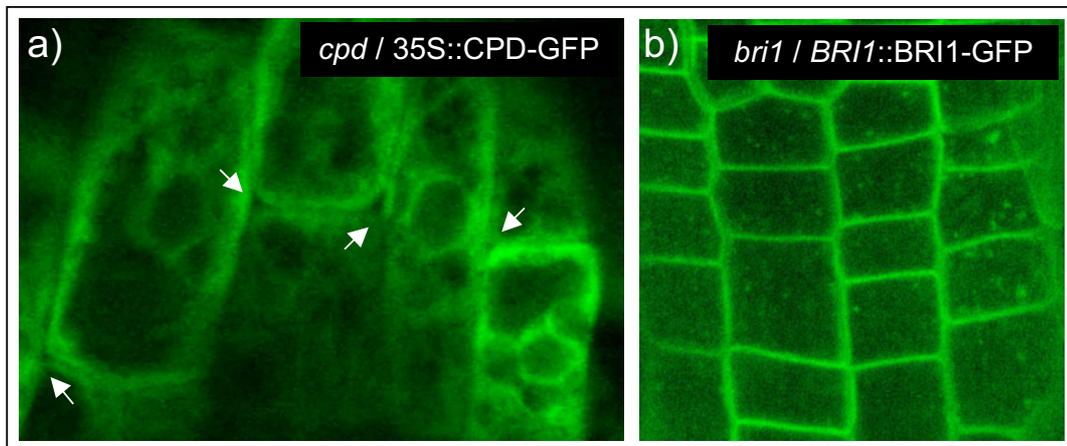


**Abb. 3.20: Analyse der Lokalisation des BRI1-GFP-Fusionsproteins.** Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Laser-Confocal-Mikroskop in Wurzelzellen komplementierter *bri1*-Pflanzen detektiert. In Bild **a**) ist die Chlorophyllautofluoreszenz (kein Signal), in Bild **b**) die GFP-Fluoreszenz, in Bild **c**) eine Transmissionsaufnahme, in Bild **d**) eine Überlagerung der Bilder a), b) und c) und in Bild **e**) ist eine Ausschnittsvergrößerung von Bild b) gezeigt. Die Pfeile deuten auf die intrazellulären Fluoreszenzsignale hin. Bei den analysierten Pflanzen handelt es sich um Keimlinge der *bri1*-Nullmutante, die mit dem Konstrukt „*BRI1::BRI1-GFP*“ komplementiert wurden. Das Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise von Joanne Chory zur Verfügung gestellt.

Keimlinge der Linie „*bri1 / BRI1::BRI1-GFP*“ wurden in Sterilkultur auf Agarplatten, parallel zu den komplementierten *cpd*-Pflanzen, angezogen und mikroskopisch untersucht. Das *BRI1*-Gen wird zwar ubiquitär exprimiert (Li *et al.*, 1997; Friedrichsen *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2004), die Analyse der *BRI1*-GFP-exprimierenden Pflanzen belegte jedoch, daß auch das *BRI1*-Protein hauptsächlich in Wurzeln vorkommt. Nahezu alle Zellen der Wurzelspitze weisen ein *BRI1*-GFP-Signal auf. In Abbildung 3.20 ist ein typisches Bild der Lokalisation des *BRI1*-Proteins zu sehen. Die Teilvergrößerung (e) zeigt deutlich die Lokalisation des GFP-Signals in der Plasmamembran. Des weiteren ist auch das Vorkommen des Fusionsproteins in intrazellulären Vesikeln zu erkennen. Dies ist mit weißen Pfeilen in Bild e) gekennzeichnet. Die beobachtete Lokalisation des *BRI1*-GFP-Proteins entspricht den Erwartungen. Die Rezeptorkinase *BRI1* besitzt eine Transmembrandomäne, die Lokalisation in der Plasmamembran wurde von Friedrichsen *et al.* (2000) und Nam *et al.* (2002), das Vorkommen in intrazellulären Vesikeln von Russinova *et al.* (2004) beschrieben.

In Abbildung 3.21 wurde die Lokalisation des CPD-GFP- mit der des *BRI1*-GFP-Fusionsproteins verglichen. Die in Bild a) gezeigten Zellen der Wurzelspitze weisen deutlich die zuvor beschriebene charakteristische Lokalisation des CPD-Proteins in der Kernmembran und dem Endoplasmatischen

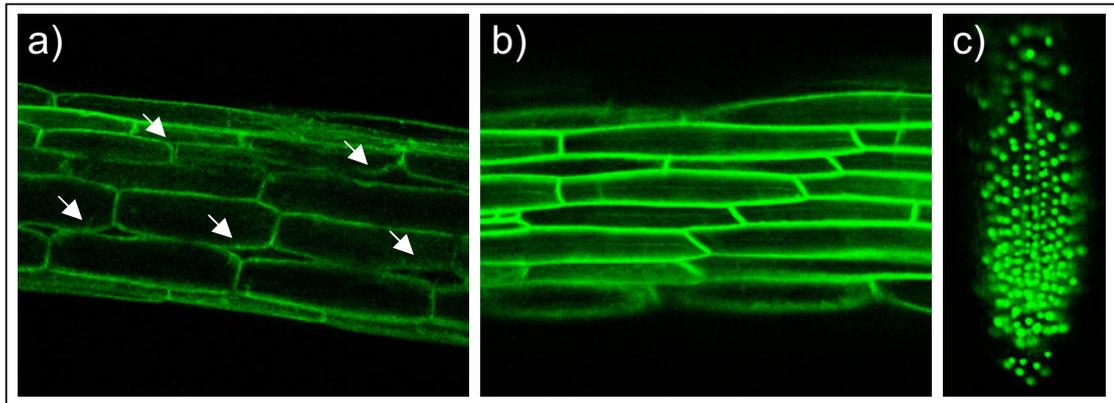
Reticulum auf, Bild b) zeigt erneut die Lokalisation des BRI1-Proteins in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln.



**Abb. 3.21: Vergleich der zellulären Lokalisation des BRI1-GFP- und des CPD-GFP-Fusionsproteins *in planta*.** Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Laser-Confocal-Mikroskop in Wurzelspitzenzellen transgener *A. thaliana* Pflanzen detektiert. Bild a) zeigt die zelluläre Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins in einer, mit dem Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ komplementierten *cpd*-Pflanze. Die weißen Pfeile deuten auf fluoreszenzfreie Bereiche zwischen den Zellen hin. In Bild b) ist die zelluläre Lokalisation des BRI1-GFP-Fusionsproteins in der Linie „*bri1* / *BRI1*::BRI1-GFP“ zu sehen, die freundlicherweise von Joanne Chory zur Verfügung gestellt wurde.

Ein genauer Vergleich der Lokalisationen der GFP-Fusionsproteine zeigt, daß im Fall des CPD-GFP-Fusionsproteins zwischen den Zellen, die deutliche GFP-Signale aufweisen, Bereiche auftreten, die frei von jeglichen Fluoreszenzsignalen sind. Solche Bereiche sind in Abbildung 3.21 a) mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Bei der Betrachtung des BRI1-GFP-Fusionsproteins treten solche Bereiche nicht auf, wie in Abbildung 3.21 b) zu sehen ist. Die Fluoreszenzsignale der GFP-markierten, in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptorkinase BRI1 bzw. des BRI1-GFP-Fusionsproteins zeichnen die „Zellumrandungen“ lückenlos nach. Die Fluoreszenz ist homogen, entlang der Plasmamembran, verteilt. Die in Abbildung 3.21 a) gezeigten CPD-GFP-Signale erscheinen recht stark, auch sie zeichnen weite Teile der Zellgrenzen nach. Sie sind im Vergleich zu den Fluoreszenzsignalen des BRI1-GFP-Fusionsproteins aber sehr inhomogen, was Intensität und Verteilung angeht. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn man in Betracht zieht, daß die Fluoreszenzsignale der CPD-GFP-Fusion durchschnittlich schwächer waren als die Signale anderer untersuchter Fluoreszenzproteine. Deshalb wurde bei der confocalen Mikroskopie der CPD-GFP-Fusionen mit etwas veränderten Einstellungen der Lochblende, des „*pinholes*“ gearbeitet. Das führte dazu, daß die Schichtdicke der optischen Ebene, die bei der Betrachtung der CPD-GFP-Fluoreszenz aufgenommen wurden, etwas größer waren. Deshalb erscheinen die CPD-GFP-Signale genauso intensiv wie z.B. die des BRI1-GFP-Signals. Allerdings wurde dazu die Fluoreszenz mehrerer Ebenen bzw. einer „dickeren“ Ebene gebündelt, was etwas unschärfere Bilder und einen Ausgleich der inhomogen verteilten Fluoreszenz zur Folge haben kann.

Zum Vergleich mit der CPD-GFP- bzw. der BRI-GFP-Lokalisation ist in Abbildung 3.22 die Lokalisation dreier unabhängigen GFP-Fusionsproteine zu sehen. Die Lokalisation der Fusion eines Transkriptionsfaktors mit GFP (c) zeigt die ausschließliche Fluoreszenz-Markierung des Zellkerns, es sind keine Signale im Cytoplasma zu erkennen. Im Fall beider zuvor gezeigter Fusionsproteine, CPD-GFP und BRI1-GFP, treten Fluoreszenzsignale im Bereich des Cytoplasmas auf.



**Abb. 3.22: Lokalisation einiger unabhängiger GFP-Fusionsproteine in *A. thaliana*-Keimlingen.** Die Abbildung zeigt die Lokalisation dreier unterschiedlicher GFP-Fusionsproteine, die Fluoreszenz wurde mit einem Laser-Confocal Mikroskop detektiert. In Bild a) ist die Lokalisation eines vakuolären Wasserkanals, DeltaTIP (U39485) zu sehen, die weißen Pfeile deuten auf fluoreszenzfreie Zwischenräume zwischen verschiedenen Zellen hin. Bild b) stellt die Lokalisation eines Wasserkanals, PIP2A (X75883), in der Plasmamembran dar. Bild c) zeigt die Lokalisation eines kernlokalisierten Transkriptionsfaktors, (CAA16704), in Wurzelspitzenzellen. Die beschriebenen Pflanzenlinien 1533-(Q5) (a), 1532-(Q8) (b) und 1530-(N7) (c) wurden freundlicherweise von Burkhard Schulz zur Verfügung gestellt, die Original-Linien wurden von Cutler S.R. *et al.* (1999) beschrieben.

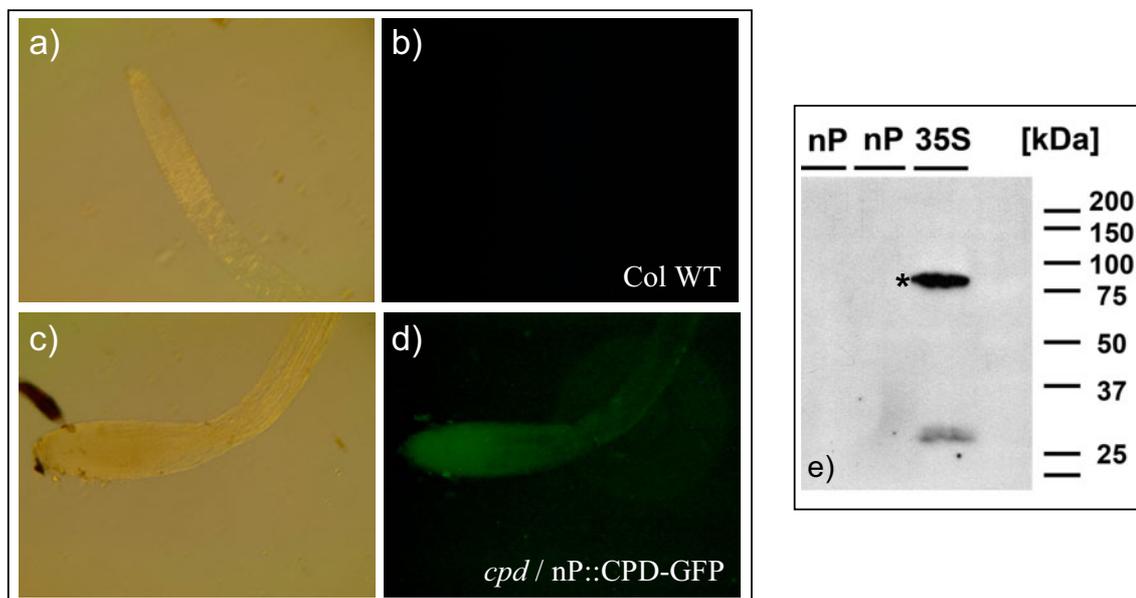
Der Vergleich mit der Lokalisation von Wasserkanälen im Tonoplasten bzw. im Plasmalemma weist einige Gemeinsamkeiten auf. So zeigt der, in der Plasmamembran lokalisierte Wasserkanal ebenso wie die BRI1-GFP-Fusion eine homogene und lückenlose Markierung der Zellumrisse (3.22 b). Es sind jedoch keine intrazellulären Vesikel, wie sie bei der BRI1-GFP-Fusion (3.20 e) auftreten, zu erkennen. Die Lokalisation des vakuolären Wasserkanals (3.22 a) zeigt ebenfalls eine homogene und lückenlose Verteilung des Fluoreszenzsignals, das jedoch entlang des Tonoplasten verläuft und so die Umrisse der Vakuolen abzeichnet. Dadurch treten fluoreszenzfreie Bereiche zwischen verschiedenen Vakuolen auf. Sie sind mit weißen Pfeilen in Abbildung 3.22, Bild a), markiert. In diesen Bereichen befinden sich Ansammlungen des Cytoplasmas und der Zellkern. Aufgrund dieser Bereiche sind die Signale der im Plasmalemma lokalisierten Fusionsproteine von den Signalen des im Tonoplasten lokalisierten Fusionsproteins zu unterscheiden. Es fällt weiterhin auf, daß die Fluoreszenzsignale beider, in der Plasmamembran lokalisierten Fusionsproteine den gesamten Bereich zwischen zwei Plasmamembranen auch den apoplastischen Bereich abdecken.

Die Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins ist von der Lokalisation dieser membran-gebundenen Proteine zu unterscheiden. Es fällt auf, daß die Fluoreszenzsignale der CPD-GFP-Fusion sehr inhomogen verteilt sind und den apoplastischen Bereich zwischen zwei Zellen nicht markieren. Diese

Beobachtungen deuten darauf hin, daß das CPD-GFP-Fusionsprotein nicht in der Plasmamembran, sondern nur in den intrazellulären Membranen und Vesikeln des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert ist.

### 3.1.3.3 Lokalisation des CPD-Proteins *in planta*

Neben der zellulären Lokalisation des CPD-Proteins wurde auch die gewebespezifische Lokalisation untersucht. Während die zelluläre Lokalisation mit allen vorgestellten Konstrukten untersucht werden konnte, so musste für die gewebespezifische Lokalisation das Konstrukt mit dem endogenen CPD-Promotor „nP::CPD-GFP (pGREEN-basta)“ verwendet werden.



**Abb. 3.23: *In planta* Lokalisation des CPD-GFP-Fusionsproteins.** Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Licht-Mikroskop in Wurzelspitzen transgener *A. thaliana*-Pflanzen im Vergleich zu nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen detektiert. Die Bilder **a)** und **b)** zeigen die Wurzelspitze einer Wildtyp-Pflanze, Bild **a)** zeigt eine Durchlichtaufnahme, Bild **b)** die GFP-Fluoreszenz (kein Signal). Auf den Bildern **c)** und **d)** ist die Wurzelspitze der mit dem Konstrukt „nP::CPD-GFP (pGREEN-basta)“ komplementierten *cpd*-Mutante zu sehen, Bild **c)** zeigt eine Durchlichtaufnahme, Bild **d)** die GFP-Fluoreszenz. In Bild **b)** ist kein GFP-Signal erkennbar, in Bild **d)** nur ein diffuses GFP-Signal. In Bild **e)** ist eine Western-Blot-Analyse der komplementierten *cpd*-Mutanten gezeigt. Keimlinge der mit dem „nP::CPD-GFP“- bzw. dem „35S::CPD-GFP“-Konstrukt komplementierten Linien wurden auf Agarplatten angezogen. Nach ca. einer Woche wurde jeweils aus mehreren Keimlingen ein Gesamtproteinextrakt hergestellt. Mittels einer Western-Blot-Analyse mit einem GFP-spezifischen Antikörper konnte das CPD-GFP-Fusionsprotein (\*) detektiert werden. In den Spuren 1 und 2 wurde ein Extrakt der Linie nP82 bzw. nP84 (**nP**), in Spur 3 ein Extrakt der Linie 35S-E (**35S**) geladen.

Wie in Abschnitt 3.1.2.2 beschrieben, wurde die *cpd*-Mutante mit dem „nP::CPD-GFP (pGREEN-basta)“-Konstrukt komplementiert. Es wurden homozygote und heterozygote Keimlinge der Linien nP8, nP9 und nP13, hauptsächlich jedoch die homozygoten Linien nP81, nP84, nP94, nP97 und nP131 analysiert. Die Keimlinge sind parallel mit den Keimlingen der „35S-Linien“ in Sterilkultur angezogen und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und zu verschiedenen

Tageszeiten analysiert worden. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein GFP-Signal detektiert werden, das mit den Signalen vergleichbar war, die die Analyse der Suspensionskultur bzw. der mit dem 35S-Konstrukt „35S::CPD-GFP (pPAM-NPT)“ komplementierten Keimlinge ergeben hat. Lediglich ein diffuses GFP-Signal in der Wurzelspitze junger Keimlinge konnte beobachtet werden.

Der in Abbildung 3.23 gezeigte Vergleich von Wildtyp-Keimlingen und Keimlingen, die mit dem nativ Promotorkonstrukt komplementiert wurden, demonstriert, daß dieses Signal von der Autofluoreszenz der Wurzel unterschieden werden kann. Da nicht die charakteristische Lokalisation des CPD-GFP-Fusions Proteins, wie sie zuvor beschrieben wurde, detektiert werden konnte und das Signal der Fluoreszenz des freien GFPs entspricht, könnte es von einem Abbauprodukt des Fusionsproteins hervorgerufen werden. Um dies zu überprüfen, wurde eine Western-Blot-Analyse (Abb.3.23 e) der gezeigten Keimlinge durchgeführt. Diese ergab jedoch kein GFP-Signal für die mit dem nativ Promotorkonstrukt komplementierten Linien. Dagegen ist in der mit dem 35S-Promotorkonstrukt komplementierten Linie sowohl das CPD-GFP-Fusionsprotein als auch das freie GFP nachweisbar. Die analysierten Keimlinge waren bastaresistent und konnten phänotypisch nicht von den mit dem „35S::CPD-GFP“-Konstrukt komplementierten Linien und den Wildtyp-Kontrollpflanzen unterschieden werden.

Diese Experimente bestätigen erneut, daß das CPD-Protein sehr instabil ist. Damit stehen die, durch CPD-GFP-Fusion ermittelten Ergebnisse im Einklang mit der zuvor erwähnten, im Vorfeld dieser Arbeit beobachteten Instabilität eines Epitop-markierten CPD-Proteins in transgenen Wildtyppflanzen. Die Analyse der Pflanzen, die mit dem nP::CPD-GFP-Konstrukt komplementiert wurden, gibt darüber hinaus weitere Informationen: Die Detektion eines diffusen GFP-Signals belegt die Transkription des Komplementationskonstrukts in der Wurzel. Daß kein Signal des vollständigen Fusionsprotein detektierbar ist, deutet auf eine sehr niedrige Halbwertszeit des CPD-Proteins hin, die dem GFP-Reporter nicht genügend Zeit zur Faltung gibt, um über Fluoreszenz detektierbar zu sein. Da die Pflanzen vollständig zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert waren, ist das ein Beleg dafür, daß nur geringe Mengen des CPD-Proteins ausreichend sind, um die gezeigte Funktion in der Brassinosteroidbiosynthese zu erfüllen. Welche Bedeutung eine Brassinosteroidbiosynthese in der Wurzel hat, ob dies ausreichend ist, um die gesamte Pflanze mit Brassinosteroiden zu versorgen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden, die sich z. B. mit der Frage des Steroidtransports beschäftigen.

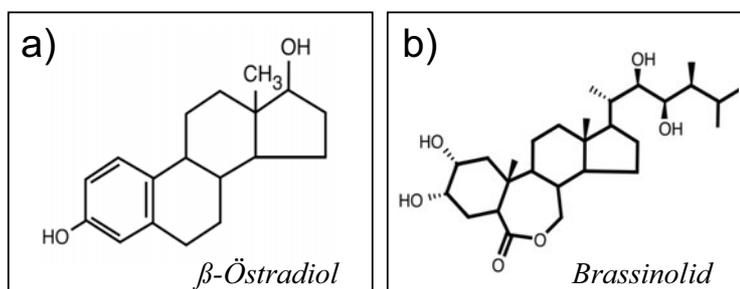
Die Komplementierten nP::CPD-GFP/*cpd*-Pflanzen können dazu verwendet werden, den Einfluss verschiedener Faktoren auf die CPD-Proteinstabilität zu prüfen. In vorläufigen Experimenten mit dem Pflanzenhormon Auxin und einem Auxin-Transportinhibitor (NPA) konnte keine Stabilisierung des CPD-Proteins erreicht werden. In Kapitel 3.4 werden Kreuzungsexperimente zwischen den nP::CPD-GFP/*cpd*-Linien und isolierten T-DNA-Insertionsmutanten beschrieben. Damit soll der Effekt verschiedener Mutationen auf die CPD-Proteinstabilität analysiert werden.

### 3.1.4 Induzierbare Expression der CPD-GFP-Fusion

Ein induzierbares Expressionssystem eröffnet verschiedene, interessante Fragestellungen bezüglich der *cpd*-Mutante und der Brassinosteroidbiosynthese. Mit einer induzierbaren Expression des CPD-Proteins bzw. des CPD-GFP-Fusionsproteins können konditionale Komplementationsstudien, Analysen von Steroid abhängigen Entwicklungsprozessen sowie die Analyse des Steroidtransports *in planta* durchgeführt werden. Das genaue Vorgehen zur Durchführung dieser Experimente wird im Folgenden beschrieben.

Bevor jedoch das durch  $\beta$ -Östradiol induzierbare Expressionssystem (Zuo *et al.*, 2000) zur Komplementation einer Brassinosteroidbiosynthesemutante verwendet wurde, mußten erst einige Kontrollexperimente durchgeführt werden. Um sinnvolle konditionale Komplementationsstudien durchführen zu können, war es notwendig die Induzierbarkeit und die eventuell vorhandene basale Expression unter nicht induzierten Bedingungen zu analysieren. Um das induzierbare System in Verbindung mit *A. thaliana* Steroidbiosynthesemutanten zu verwenden, muss sichergestellt sein, daß das tierische Steroidhormon  $\beta$ -Östradiol keine Bioaktivität in *A. thaliana* besitzt.

Ein struktureller Vergleich der Steroidhormone  $\beta$ -Östradiol und *Brassinolid* zeigt, daß beide Hormone aus einem Steroidgrundgerüst bestehen, aufgebaut aus vier Kohlenstoffringen, die an bestimmten Positionen hydroxyliert sind (Abb.3.34). Beide Strukturformeln weisen aber deutliche Unterschiede auf. So fehlt dem  $\beta$ -Östradiol (a) die für *Brassinolid* (b) charakteristische Seitenkette an Position C17 sowie der intramolekulare Ester zwischen C6 und C7 im B-Ring. Beide Eigenschaften des *Brassinolids* sind für dessen Bioaktivität unerlässlich. Biosynthetische Vorstufen und *Brassinolid*-Analoga, denen diese Funktionen fehlen, zeigen keine oder deutlich verminderte Bioaktivität (Szekeres *et al.*, 1996; Fujioka *et al.*, 1997; Choe *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2000; Wachsmann *et al.*, 2002; Back und Pharis, 2003; Michelini *et al.*, 2004). Ob  $\beta$ -Östradiol jedoch in *A. thaliana* metabolisiert wird und auf diese Weise doch eine relevante Funktion ausüben kann, muss in einem Bio-Essay überprüft werden, dies kann nicht vorausgesagt werden (Abb.3.26; Hong *et al.*, 2005).



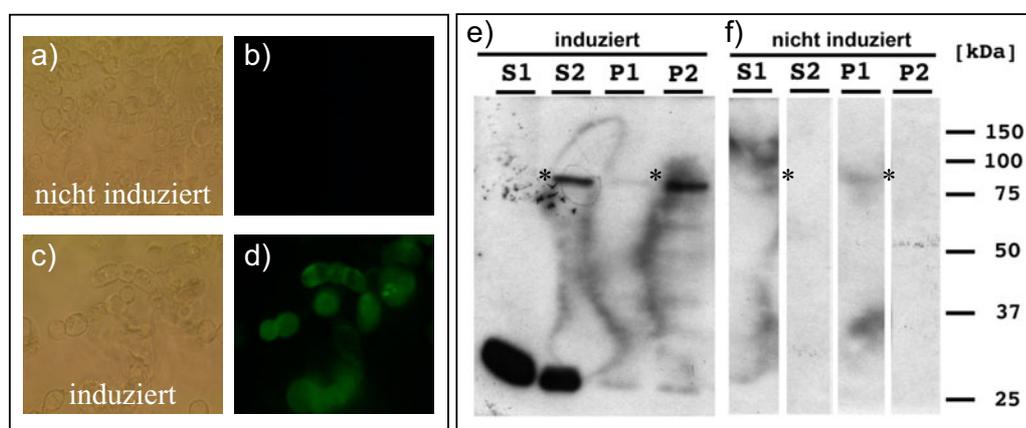
**Abb. 3.24: Struktureller Vergleich der Steroidhormone  $\beta$ -Östradiol und *Brassinolid*.** Die Abbildung zeigt die Strukturformel des tierischen Sexualhormons  $\beta$ -Östradiol (a) und die des pflanzlichen Wachstumshormons *Brassinolid* (b).

Es wurden drei Kontrollexperimente durchgeführt, die in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben sind. Um die zuvor beschriebenen Fragestellungen zu beantworten, wurde die *cpd*-Mutante mit dem induzierbaren Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)“ (3.1.2.1) transformiert und komplementiert. Die Experimente

zur induzierbaren Expression des CPD-GFP Fusionsproteins im „backroud“ der *cpd*-Mutante sind in Abschnitt 3.1.4.2 beschrieben.

### 3.1.4.1 Kontrollexperimente zur Verwendung des durch $\beta$ -Östradiol induzierbaren Expressionssystems in *A. thaliana*

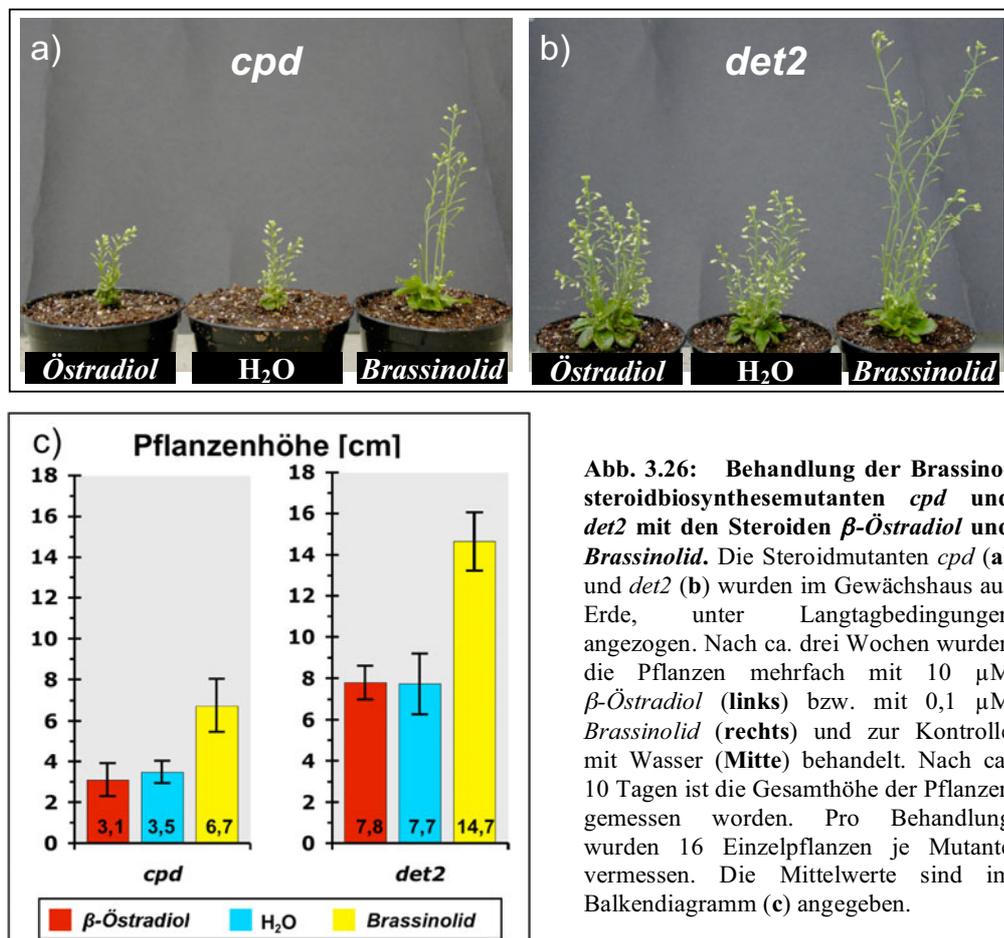
Zur Analyse der Induzierbarkeit und zur Überprüfung, ob bei der Verwendung des durch  $\beta$ -Östradiol induzierbaren Expressionssystems unter nicht induzierten Bedingungen eine basale Expression auftritt, wurde das in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebene Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)“ in eine *A. thaliana* Suspensionskultur transformiert. Nach erfolgter Selektion ist die Suspensionskultur mit unterschiedlichen Mengen  $\beta$ -Östradiol induziert und zu verschiedenen Zeiten analysiert worden.



**Abb. 3.25: Testinduktion der mit dem  $\beta$ -Östradiol induzierbaren Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-kan“ transformierten *A. thaliana*-Suspensionskultur.** Die Abbildung zeigt eine lichtmikroskopische Analyse (links) einer induzierten und einer nicht induzierten Kultur sowie eine Western-Blot-Analyse (rechts) der gezeigten Kulturen. Die Bilder a) bis d) sind Übersichtsaufnahmen der untersuchten Kulturen. Bild a) und c) zeigen Durchlichtaufnahmen, Bild b) die Fluoreszenzaufnahme der nicht induzierten Kultur (kein Signal). In Bild d) ist die Fluoreszenz der induzierten Kultur 24 h nach der Induktion mit  $\beta$ -Östradiol (Endkonzentration 5  $\mu$ M) gezeigt. Die Western-Blot-Analyse (rechts), zeigt die Detektion des CPD-GFP-Fusionsproteins mit einem GFP-spezifischen Antikörper in der induzierten Kultur (e) jedoch nicht in der nicht induzierten Kultur (f). Die Größe des Fusionsproteins ist mit (\*) gekennzeichnet. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in Abbildung 3.19 beschrieben durchgeführt. S1/P1 bzw. S2/P2 bezeichnet die einzelnen Fraktionen nach der 1.000g bzw. 11.000g Zentrifugation.

In einem Kontrollexperiment wurde die Suspensionskultur mit  $\beta$ -Östradiol, der Endkonzentration 5  $\mu$ M induziert und nach 24 h lichtmikroskopisch analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß die induzierte Kultur deutliche GFP-Signale aufwies, wohingegen bei der nicht induzierten Kultur kein Signal detektiert werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 a) bis d) gezeigt. Anschließend wurde die Kultur einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Dazu wurde ein Proteinextrakt aus der induzierten und der nicht induzierten Kultur hergestellt, der, wie in Abschnitt 2.2.1.5.1 beschrieben, differentiell zentrifugiert und einer Western-Blot-Analyse mit einem GFP-spezifischen Antikörper unterzogen wurde. Die Western-Blot-Analyse zeigt die erwarteten, zuvor dargelegten Signale der induzierten Kultur (e). Auch mittels der Western-Blot-Analyse konnte

kein GFP Signal in der nicht induzierten Kultur detektiert werden (f). Da ein rein struktureller Vergleich der beiden Steroidhormone nicht ausreichend ist, um die Bioaktivität von  $\beta$ -Östradiol in *A. thaliana* vorherzusagen, wurden die beiden bekannten *A. thaliana* Brassinosteroidbiosynthesemutanten *cpd* und *det2* (Abb.3.26) mit beiden Hormonen behandelt.



**Abb. 3.26: Behandlung der Brassinosteroidbiosynthesemutanten *cpd* und *det2* mit den Steroiden  $\beta$ -Östradiol und *Brassinolid*.** Die Steroidmutanten *cpd* (a) und *det2* (b) wurden im Gewächshaus auf Erde, unter Langtagbedingungen angezogen. Nach ca. drei Wochen wurden die Pflanzen mehrfach mit 10  $\mu$ M  $\beta$ -Östradiol (links) bzw. mit 0,1  $\mu$ M *Brassinolid* (rechts) und zur Kontrolle mit Wasser (Mitte) behandelt. Nach ca. 10 Tagen ist die Gesamthöhe der Pflanzen gemessen worden. Pro Behandlung wurden 16 Einzelpflanzen je Mutante vermessen. Die Mittelwerte sind im Balkendiagramm (c) angegeben.

Dazu wurden Pflanzen beider Mutanten auf Erde und unter Langtagbedingungen angezogen. Nach ca. drei Wochen wurden die Pflanzen mit einer 10  $\mu$ M  $\beta$ -Östradiol- bzw. mit einer 0,1  $\mu$ M *Brassinolid*-Lösung behandelt. Die Kontrollpflanzen wurden mit Wasser besprüht. Die Behandlung wurde alle zwei bis drei Tage wiederholt. Nach ca. 10 Tagen sind die Pflanzen photographiert und vermessen worden. Dabei wurde die Gesamthöhe der Pflanzen gemessen, denn die Zunahme der Gesamthöhe bei der Behandlung mit einem Steroidhormon wird als Maß für dessen Bioaktivität gewertet. Von jeder Mutante wurden jeweils 16 Einzelpflanzen mit  $\beta$ -Östradiol, mit *Brassinolid* und mit Wasser behandelt. Die Mittelwerte der Gesamtgrößen sind im Balkendiagramm in Abb.3.26 c) zu sehen. Für die mit Wasser behandelte *cpd*-Mutante wurde eine Gesamthöhe von 3,5 cm ( $\pm$ 0,5 cm) gemessen. Bei den mit  $\beta$ -Östradiol behandelten Pflanzen wurde eine Höhe von 3,1 cm ( $\pm$ 0,8 cm), bei den mit *Brassinolid* behandelten Pflanzen eine Höhe von 6,7 cm ( $\pm$ 1,3 cm) festgestellt. Für die *det2*-Mutante wurden entsprechend die Gesamthöhen von 7,7 cm ( $\pm$ 1,5 cm), bei den Kontrollpflanzen 7,8 cm ( $\pm$ 0,8 cm) bei der Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol und 14,7 cm ( $\pm$ 1,4 cm) bei der Behandlung mit

*Brassinolid* ermittelt. Prozentual ergibt das, bei der Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol, eine Gesamthöhe von ca. 89 % für die *cpd*-Mutante und von 101 % für die *det2*-Mutante im Vergleich zu den jeweiligen mit Wasser behandelten Kontrollpflanzen. Die Behandlung mit *Brassinolid* ergibt entsprechend eine Gesamthöhe von 193 % für die *cpd*-Mutante und von 190 % für die *det2*-Mutante.

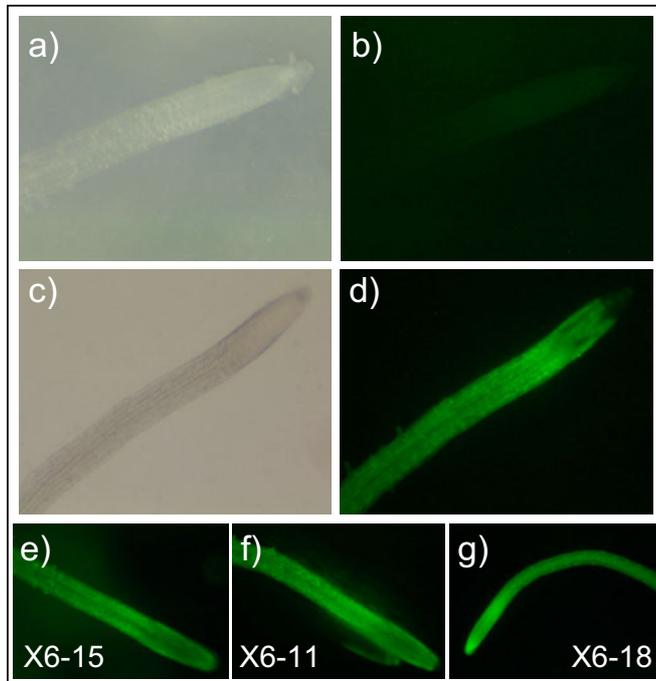
Die Größenzunahme bei der Behandlung mit *Brassinolid* auf die fast doppelte Größe der Kontrollpflanzen entspricht den Erwartungen, die Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol hat zu keiner Größenzunahme der getesteten Pflanzen geführt. Die leichte Größenreduktion der mit  $\beta$ -Östradiol behandelten *cpd*-Mutante kann im Rahmen dieser Analyse als nicht signifikant gewertet werden, da selbst die Größenschwankungen der unbehandelten *cpd*-Pflanzen von  $\pm 0,5$  cm bzw. 15 % recht hoch und damit größer als die Reduktion von 10 % sind. Aufgrund der geringen Anzahl getesteter Pflanzen ergeben sich generell Schwankungen von 10 bis 20 %, was in den Fehlerbalken in Abbildung 3.26 c) deutlich wird. Trotz der hohen Varianz sind die gemessenen Größendifferenzen zwischen den unbehandelten und den mit *Brassinolid* behandelten Pflanzen signifikant und deutlich in Abbildung 3.26 in den Bildern a) und b) zu sehen. Die mit  $\beta$ -Östradiol bzw. Wasser behandelten Pflanzen sind phänotypisch nicht zu unterscheiden. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die Behandlung mit *Brassinolid* die erwartete Zunahme des Streckungswachstums bei beiden Mutanten bewirkt, ein solcher Effekt mit  $\beta$ -Östradiol jedoch nicht nachweisbar ist.

T <sub>1</sub> Linie (hyg)	T <sub>2</sub> Segregation		ratio R/S	total	$\chi^2$ (3:1)
	R	S			
X6 1-01	48	18	2,7	66	0,67
X6 1-02	72	36	2,0	108	0,05
X6 1-04	23	13	1,8	36	0,12
X6 1-05	34	10	3,4	44	0,73
X6 1-06	25	7	3,6	32	0,68
X6 1-08	17	2	8,5	19	0,15
X6 1-09	11	4	2,8	15	0,88
X6 1-10	5	4	1,3	9	0,18
X6 2-02	12	6	2,0	18	0,41
X6 2-04	33	5	6,6	38	0,09
X6 2-05	60	13	4,6	73	0,16

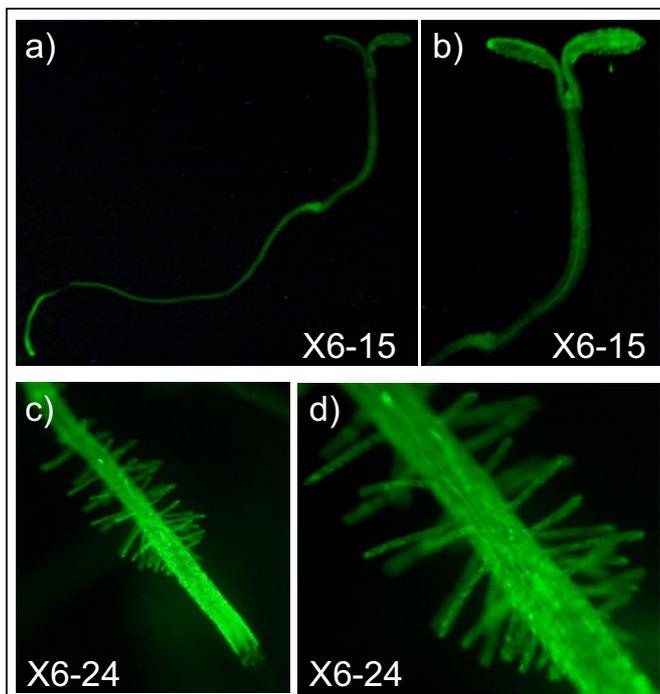
**Abb. 3.27: Segregationsanalyse der, mit dem  $\beta$ -Östradiol induzierbaren Konstrukt transformierten Wildtyp-Pflanzen.** Samen der genannten, mit dem Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-hyg“ transformierten T<sub>1</sub>-Pflanzen wurden in Sterilkultur auf hygromycinhaltigen Agarplatten ausgelegt. Die Segregation der T<sub>2</sub>-Populationen wurde ausgezählt, die Tabelle zeigt die Anzahl hygromycinresistenter (R) bzw. sensibler (S) Pflanzen, das Segregationsverhältnis (Ratio), die Gesamtmenge gezählter Pflanzen (Total) und die Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Segregation einer 3:1 Segregation entspricht.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde nun untersucht, wie die Expression *in planta* mit  $\beta$ -Östradiol induziert werden kann. Dazu wurde das induzierbare Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)“ in *A. thaliana* Pflanzen des *Columbia*-Wildtyps transformiert und durch unterschiedliche Behandlungen mit  $\beta$ -Östradiol induziert. Nach der Transformation sind einige Transformanten (T<sub>1</sub>) selektiert worden, deren Segregation in der T<sub>2</sub>-Generation ermittelt und in der Tabelle der Abbildung 3.28 festgehalten wurde. Ausgesuchte T<sub>2</sub>-Populationen wurden parallel auf Agarplatten, die mit 20  $\mu$ M  $\beta$ -Östradiol versetzt waren, bzw. auf Kontrollplatten, angezogen. Nach 12 Tagen konnten die Pflanzen licht-mikroskopisch untersucht werden, die GFP-Fluoreszenz konnte, wie in Abbildung 3.28 gezeigt, detektiert werden. Die Pflanzen wiesen hauptsächlich dort GFP Signale

auf, wo sie vom Plattenmedium bedeckt waren (Wurzel) oder zumindest direkten Kontakt mit der Plattenoberfläche (Kotyledonen) hatten. In allen analysierten Linien konnte eine Induktion von vergleichbarer Intensität beobachtet werden. Dieses Experiment zeigt, daß die Expression auch in Pflanzen induzierbar ist und daß die Induktion über längere Zeiträume aufrecht erhalten werden kann.



**Abb. 3.28: Induktion transgener Pflanzen auf  $\beta$ -Östradiol-haltigen Agarplatten.** Mit dem Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-hyg“ transformierte T<sub>2</sub>-Pflanzen wurden in Sterilkultur auf, mit  $\beta$ -Östradiol-haltigen Agarplatten (c; d) mit der Endkonzentration 20  $\mu$ M bzw. auf Kontrollplatten (a; b) angezogen. Nach 12 Tagen wurden die Keimlinge lichtmikroskopisch untersucht. Die Bilder a) und c) zeigen Durchlichtaufnahmen zweier Wurzelspitzen. Auf den Bildern b) und d) sind die detektierten Fluoreszenzsignale, von Keimlingen der Linie X6-25 zu sehen. In den Bildern e), f) und g) sind Wurzelspitzen von induzierten Keimlingen, aus drei weiteren Linien, abgebildet.



**Abb. 3.29: Induktion transgener, in Flüssigkultur angezogener, Pflanzen mit  $\beta$ -Östradiol.** Mit dem Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-hyg“ transformierte T<sub>2</sub>-Pflanzen der Linie X6-15 (a; b) bzw. X6-24 (c; d) wurden in Flüssigmedium angezogen. Die Induktion erfolgte mit  $\beta$ -Östradiol, der Endkonzentration 5  $\mu$ M (0,1% Tween20). Die Keimlinge wurden 16 h nach der Induktion lichtmikroskopisch untersucht. In Bild a) ist eine Übersichtsaufnahme eines ganzen Keimlings, in Bild b) eine Vergrößerung des Hypokotyls und der Kotyledonen, in Bild c) ist eine Übersichtsaufnahme einer Wurzelspitze, in Bild d) eine Vergrößerungen der Differenzierungszone gezeigt. Alle Bilder zeigen Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz.

Des weiteren kann die Induktion auch in Pflanzen induziert werden, die in Flüssigmedium angezogen wurden, was in Abbildung 3.29 gezeigt ist. Die Induktion in Flüssigmedium bietet den Vorteil, daß

alle Bereiche der Pflanze mit dem  $\beta$ -Östradiol in Kontakt kommen. Verschiedene Induktionsexperimente in Flüssigmedium haben gezeigt, daß die Induktion dort auch hauptsächlich in der Wurzel erfolgt. Durch die Zugabe des Detergens Tween20, mit einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v), konnte jedoch auch im Bereich des Hypokotyls und der Kotyledonen eine Induktion der Expression des GFP-Fusionsproteins erreicht werden. In Abbildung 3.29 ist ein entsprechender Keimling gezeigt.

### 3.1.4.2 Induzierbare Expression der CPD-GFP-Fusion in der *cpd*-Mutante

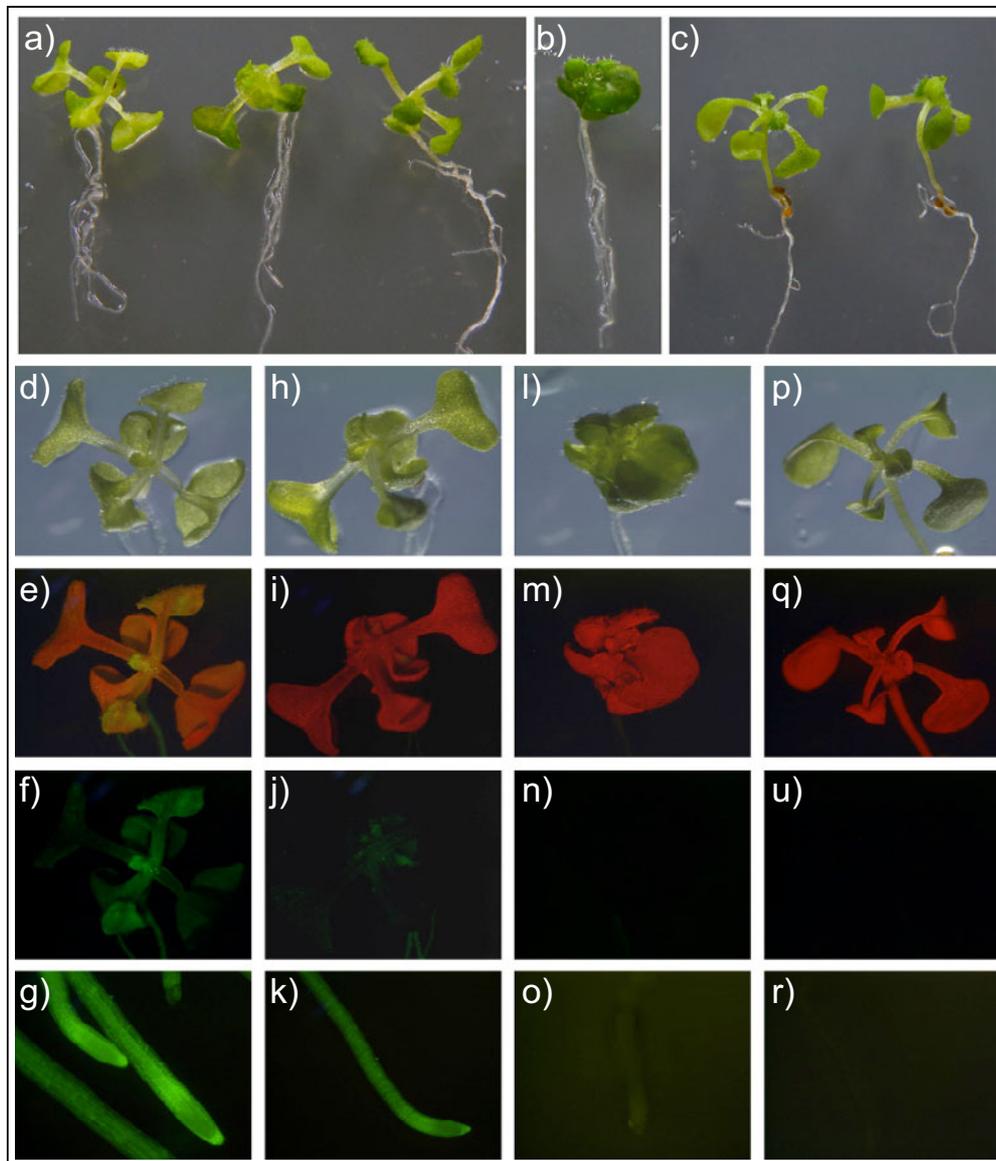
Das induzierbare CPD-GFP-Konstrukt, *iP::CPD-GFP*; *pER8(XVE)-hyg* wurde auch in die *cpd*-Mutante transformiert. Dazu ist die *cpd*-Linie „E1-1“ verwendet worden. Bei dieser Linie handelt es sich um eine heterozygote *cpd*-Linie, die aus der SALK-T-DNA-Linie N509263 isoliert wurde. Die Identität der Linie wurde durch Sequenzierung der T-DNA-Insertion und ein Komplementationsexperiment mit *Brassino*lid sichergestellt. Phänotypisch hat diese Linie außer des unterschiedlichen Resistenzmarkers keine Unterschiede zu der zuvor verwendeten, hygromycinresistenten *cpd*-Mutante (Szekeres M. *et al.*, 1996). Die Linie zeigt eine Segregation des Wildtyps zum *cpd*-Phänotyp von 3:1. Pflanzen die den Wildtypphänotyp aufweisen, wurden mit dem *iP::CPD-GFP*; *pER8(XVE)-hyg*-Konstrukt transformiert. Die Transformanten wurden auf Hygromycinplatten selektiert. Es konnten einige Transformanten ( $T_1$ ) isoliert werden, die hygromycinresistent waren und in der  $T_2$ -Generation erneut eine Segregation des Wildtyps zum *cpd*-Phänotyp von 3:1 zeigen. In Tabelle 3.30 sind die Ergebnisse einiger Linien zu sehen.

T <sub>1</sub> Linie	T <sub>2</sub> Segregation		ratio <i>WT/cpd</i>	total	$\chi^2$ (3:1)
	<i>WT</i>	<i>cpd</i>			
EX-B2-07	95	5	19,0	100	0,00
EX-B3-17	158	57	2,8	215	0,61
EX-C3-12	217	61	3,6	278	0,24
EX-C3-15	169	58	2,9	227	0,85

**Abb. 3.30: Segregationsanalyse der, mit dem  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Konstrukt transformierten *cpd*-Pflanzen.** Samen der genannten, mit dem Konstrukt „*iP::CPD-GFP*; *pER8(XVE)-hyg*“ transformierten  $T_1$ -Pflanzen wurden in Sterilkultur auf hygromycinhaltigen Agarplatten ausgelegt. Die Segregation der  $T_2$ -Populationen wurde ausgezählt, die Tabelle zeigt die Anzahl auftretender Wildtyp- (**WT**) bzw. *cpd*-Phänotypen (***cpd***), das Segregationsverhältnis (Ratio), die und die Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Segregation einer 3:1 Segregation entspricht.

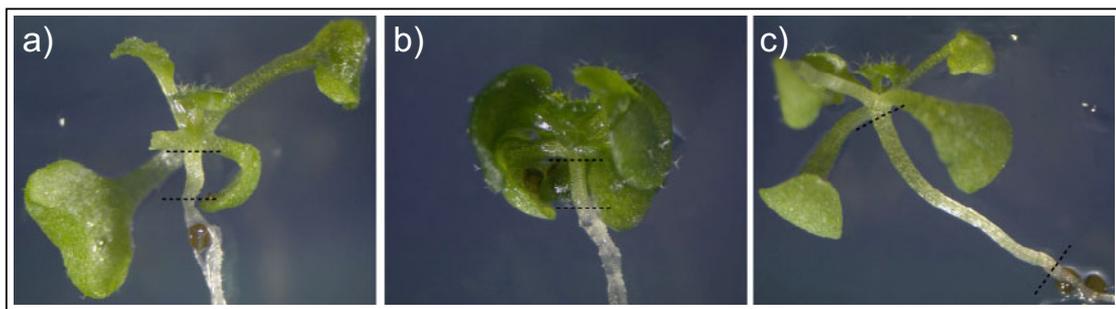
Im nächsten Schritt wurden einige der Pflanzen durch  $\beta$ -Östradiol induziert und mikroskopisch analysiert. Es konnte sowohl bei Pflanzen mit Wildtyp als auch mit *cpd*-Phänotyp induzierbare GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Damit kann die Identität der Transformanten ( $T_1$ ) als Pflanzen, die sowohl für die T-DNA-Insertion im *CPD*-Gen als auch für die Insertion des induzierbaren Konstrukts heterozygot sind, festgestellt werden. Das Auftreten von exakt einem Viertel der Pflanzen mit dem *cpd*-Phänotyp zeigt, daß das induzierbare Konstrukt unter nicht induzierten Bedingungen keine Komplementation des *cpd*-Phänotyps auslöst. Die Funktionalität des Konstruktes wurde sowohl durch die Detektion der GFP-Fluoreszenz nach der  $\beta$ -Östradiol-Gabe als auch durch die konditionale Komplementation der Pflanzen mit *cpd*-Phänotyp nach  $\beta$ -Östradiol-Gabe bestätigt. Für alle folgenden

Experimente wurden T<sub>2</sub>-Pflanzen der segregierenden Linien „EX-B3-17“, „EX-C3-12“ bzw. „EX-C3-15“ verwendet, dabei waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien erkennbar. In Abbildung 3.31 ist ein Experiment gezeigt, indem segregierende *cpd*-Pflanzen mit  $\beta$ -Östradiol behandelt und durch die induzierte Expression des CPD-GFP-Fusionsproteins auch weitestgehend phänotypisch komplementiert wurden.



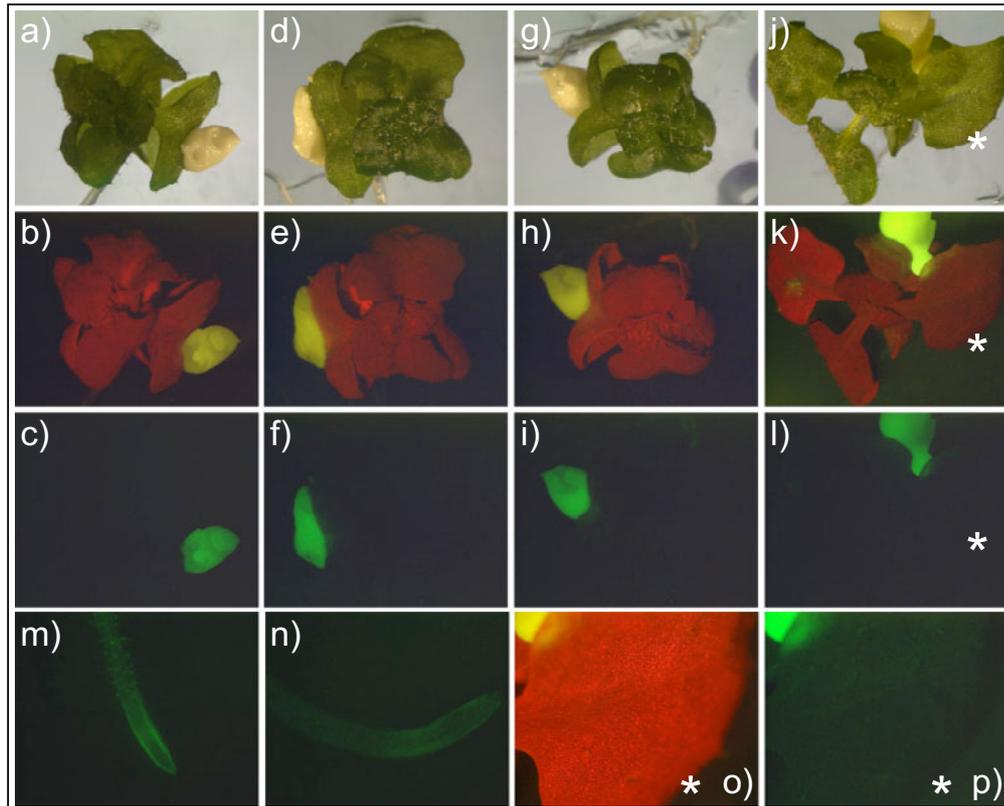
**Abb. 3.31: Komplementation der *A. thaliana cpd*-Mutante durch die, mit  $\beta$ -Östradiol induzierte Expression der CPD-GFP-Fusion.** Die Abbildung zeigt Keimlinge der Linie EX-B3-17 (Abb.3.30), die das induzierbare Konstrukt „iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-hyg“ tragen. Nach zehntägiger Anzucht in Sterilkultur wurden die Keimlinge auf  $\beta$ -Östradiol-haltige Agarplatten (10 $\mu$ M) bzw. Kontrollplatten pikiert und nach drei weiteren Tagen analysiert. In den Bildern **a**) und **b**) sind *cpd*-Mutanten, in Bild **c**) Wildtyp-Pflanzen gezeigt. Die Pflanzen in Bild **a**) wurden drei Tage auf  $\beta$ -Östradiol-haltigen Platten, die Pflanzen der Bilder **b**) und **c**) auf Kontrollplatten kultiviert. Die Bilder **d**) bis **k**) zeigen Detailaufnahmen der Pflanzen aus Bild **a**), die Bilder **l**) bis **o**) Details der Pflanze aus Bild **b**), die Bilder **p**) bis **r**) aus der linken Pflanze von Bild **c**). Die Bilder **d**), **h**), **l**) und **p**) sind Durchlichtbilder, die Bilder **e**), **i**), **m**) und **q**) zeigen die Chlorophyllfluoreszenz. In den Bildern **f**), **j**), **n**) und **u**) ist die GFP-Fluoreszenz der Rosettenblätter zu sehen, in **g**), **k**), **o**), und **r**) die GFP-Fluoreszenz in der Wurzelspitze. Die Bilder **n**), **o**), **u**) und **r**) zeigen kein GFP-Signal.

Zehn Tage alte Pflanzen der Linie EX-B3-17 wurden auf  $\beta$ -Östradiol-haltigen Agarplatten bzw. Kontrollplatten pikiert und nach drei Tagen analysiert. Die Abbildung zeigt *cpd*-Pflanzen, die vor der Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol nicht von den unbehandelten *cpd*-Pflanzen und hinterher kaum vom Wildtyp zu unterscheiden waren. In der Abbildung sind neben den Durchlichtbildern zur Orientierung auch die Chlorophyll- und die GFP-Fluoreszenz gezeigt. Es ist zu erkennen, daß unbehandelte Pflanzen keine GFP-Signale zeigen. Die *cpd*-Pflanzen die durch die  $\beta$ -Östradiol-Behandlung komplementiert wurden, weisen bis auf eine Pflanze (d bzw. f) nur GFP-Signale in der Wurzel und in den Blattbereichen auf, die mit der Medienoberfläche in Berührung kamen. Die Pflanze in Bild d) bzw. f) stellt eine Ausnahme dar, sie zeigte als einzige von 20 untersuchten und komplementierten *cpd*-Pflanzen so starke Signale. Abbildung 3.32 ist eine genaue Betrachtung der Hypokotyle der Versuchspflanzen. Es ist deutlich zu sehen, daß zwar die Blattstiele und Blattflächen der behandelten *cpd*-Pflanze vergrößert und von denen des Wildtyps nicht mehr zu unterscheiden sind, das Hypokotyl weist jedoch keine Streckung auf. Die  $\beta$ -Östradiol-Behandlung hat nur zu einer Teilkomplementation geführt.



**Abb. 3.32:** Hypokotylvergleich der in Abbildung 3.32 gezeigten Pflanzen. Die Abbildung zeigt die Hypokotyllänge einer durch die mit  $\beta$ -Östradiol-induzierten Expression der CPD-GFP-Fusion komplementierten *cpd*-Mutante (a) im Vergleich zu den Hypokotylen der Kontrollpflanzen, eine unbehandelte *cpd*-Mutante (b) sowie eine Wildtyppflanze (c). In den Bildern sind Pflanzen aus Abbildung 3.31 (a; b; c) zu sehen, denen zur besseren Ansicht des Hypokotyls ein bzw. zwei Rosettenblätter entfernt wurden. Die Hypokotylgrenzen sind durch gestrichelte Linien markiert. Die Abbildung zeigt Keimlinge der Linie EX-B3-17 (*iP::CPD-GFP; pER8(XVE)-hyg*).

Um die Reaktion der *cpd* / *iP::CPD-GFP*-Pflanzen genauer analysieren zu können, wurden lokal begrenzte Induktionsexperimente durchgeführt. Dazu ist eine  $\beta$ -Östradiol-haltige Lanolinpaste verwendet worden. Die *cpd* / *iP::CPD-GFP*-Pflanzen wurden in Sterilkultur angezogen, nach zehn Tagen wurde auf jeweils ein Blatt 5  $\mu$ l der vorgewärmten Lanolinpaste (500  $\mu$ M  $\beta$ -Östradiol; 0,1% Tween20) aufgetragen, sechs Tage später erfolgte die mikroskopische Analyse. In Abbildung 3.33 ist zu sehen, daß die Pflanzen unterschiedlich stark auf die  $\beta$ -Östradiol-haltige Paste reagieren, sie zeigen aber alle eine Vergrößerung, besonders des jeweiligen behandelten Blattes. Bei keiner der Pflanzen ist außer der Fluoreszenz der Lanolinpaste ein GFP-Signal zu erkennen. Bei einigen Pflanzen sind minimale Fluoreszenzsignale in den Wurzelspitzen zu sehen. Selbst in Pflanze j) bzw. l), die die stärkste Reaktion zeigt, sind selbst unter maximal sensitiven Einstellungen in einem unbehandelten Blatt (p) keine deutlichen Signale vorhanden.

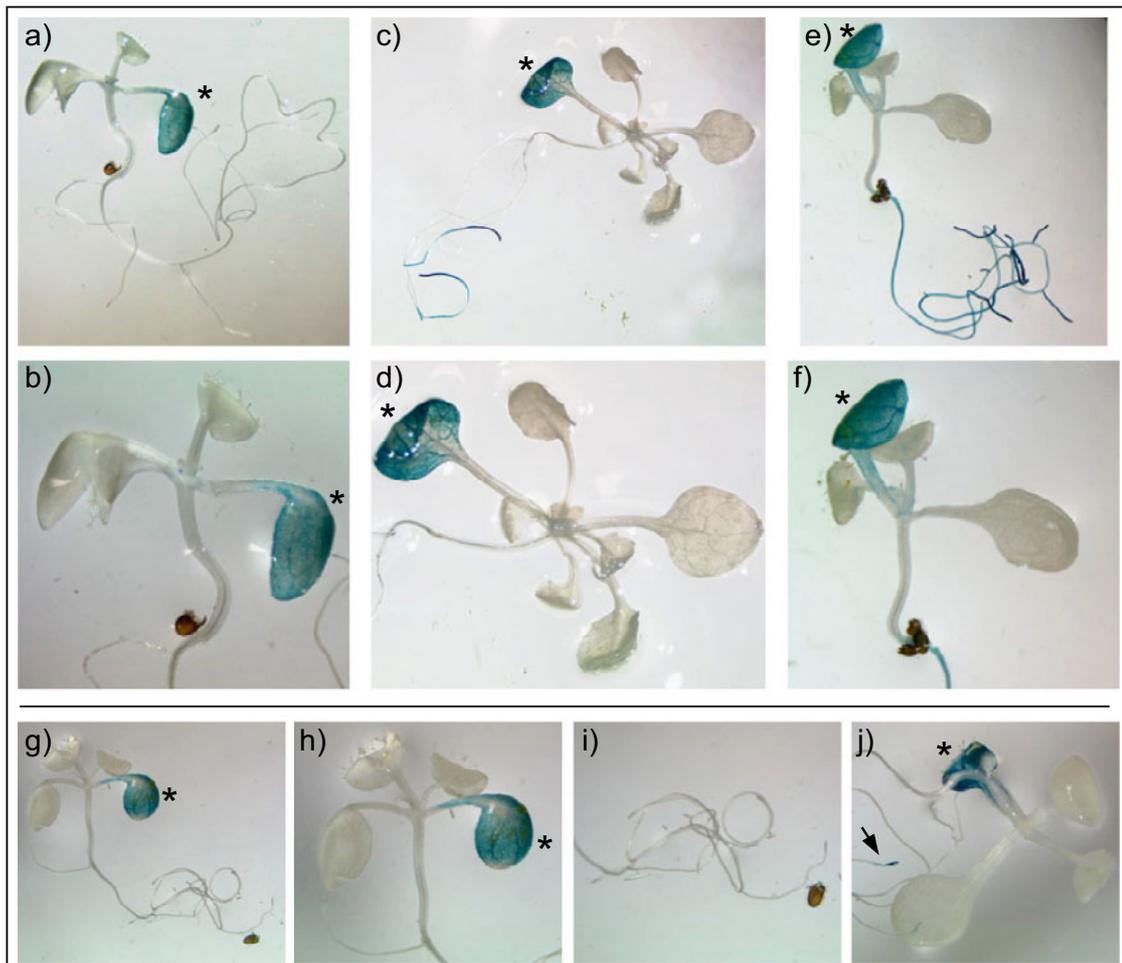


**Abb. 3.33:** Lokal begrenzte Induktion der Expression der *CPD-GFP*-Fusion durch Applikation einer  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpaste. Die *cpd*-Keimlinge der Linie EX-C3-12 (Abb.3.30) wurden nach zehntägiger Anzucht in Sterilkultur mit einer  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpaste (500 $\mu$ M  $\beta$ -Östradiol; 0,1% Tween20) behandelt. Jeweils auf ein Blatt wurden 5 $\mu$ l der erwärmten Paste so aufgetragen, daß sie nur das Blatt und nicht das Agarmedium berührten. Die Analyse der Pflanzen erfolgte nach sechs Tagen. Die Bilder **a)**, **d)**, **g)**, **j)** sind Durchlichtbilder, **b)**, **e)**, **h)**, **k)** zeigen die Chlorophyllfluoreszenz sowie die Fluoreszenz der Lanolinpaste. In den Bildern **c)**, **f)**, **i)**, **l)** ist die GFP-Fluoreszenz der Rosettenblätter zu sehen. Die Detailaufnahmen **m)** und **n)** zeigen GFP-Fluoreszenz der Wurzelspitzen, in den Bildern **o)** und **p)** sind die Fluoreszenz-Signale eines unbehandelten Blattes (\*) der Pflanze j) zu sehen.

Zur Kontrolle, in wie weit das  $\beta$ -Östradiol in der Pflanze nach einer lokalen Applikation verteilt wird, wurde auf ein induzierbares GUS-Konstrukt (iP::GUS) zurückgegriffen. Verschiedene unabhängige GUS-Linien wurden freundlicherweise von Dora Szakonyi (Köln, 2005) überlassen. Die iP::GUS-Pflanzen sind wie die iP::CPD-GFP/*cpd*-Pflanzen behandelt worden, die Färbung wurde nach zwei Tagen durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil man dann eine sehr deutliche Wachstumsreaktion bei den behandelten iP::CPD-GFP/*cpd*-Pflanzen feststellen konnte. Es ist festzuhalten, daß Blaufärbungen außerhalb des behandelten Blattes auftreten. Damit kann auch ein Transport des  $\beta$ -Östradiols belegt werden. Ob es sich bei dieser Verteilung des  $\beta$ -Östradiols um aktiven Transport oder um passive Diffusion und passiven Transport über das Leitgewebe handelt, kann nicht unterschieden werden. Es ist auffällig, daß sich bei den iP::CPD-GFP / *cpd*-Linien eine gleichmäßige Reaktion der Rosettenblätter ergibt, bei den iP::GUS-Linien dagegen nicht.

Zur Beurteilung welchen Einfluss die  $\beta$ -Östradiol-Konzentration hat und wie schnell sich das  $\beta$ -Östradiol in der Pflanze verteilt, wurden Lanolinpasten mit verschiedenen  $\beta$ -Östradiol-Konzentration

verwendet und auch Färbungen nach 24 h bzw. 48 h durchgeführt. Abbildung 3.34 zeigt die deutlichen Signale in den behandelten Rosettenblättern. Auch mit der hochkonzentrierten Paste kann nach einer 24-stündigen Behandlung kein Signal in der Wurzel detektiert werden (Abb.3.34a). Nach 48 h ergeben sich deutliche, aber zwischen verschiedenen Pflanzen leicht variierende, Signale in der Wurzel (Abb.3.34c, e). Die Experimente mit einer niedriger konzentrierten Paste (Abb.3.34 g-j) zeigen, daß die Signale in der Wurzel viel schwächer ausfallen. Nach 48 h sind nur vereinzelt Signale zu erkennen, die sich auf die Wurzelspitze beschränken.



**Abb. 3.34:** Die lokal begrenzte Induktion des *iP::GUS*-Konstrukts belegt den *in planta*-Transport des  $\beta$ -Östradiols. Keimlinge der *iP::GUS*-Linien wurden wie die *iP::CPD-GFP/cpd*-Pflanzen mit der  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpaste ( $50\mu\text{M}$  bzw.  $500\mu\text{M}$   $\beta$ -Östradiol; 0,1% Tween20) behandelt. In Bild a) ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen, in Bild b) eine Detailaufnahme einer Pflanze, die 24 h lang mit  $\beta$ -Östradiol-Paste ( $500\mu\text{M}$ ) behandelt wurde. Die Bilder c) und d) zeigen Übersichtsaufnahmen, die Bilder d) und f) Detailaufnahmen von Pflanzen, die 48 h lang mit  $\beta$ -Östradiol-Paste ( $500\mu\text{M}$ ) behandelt wurden. Zum Vergleich sind in den Bildern g) bis j) Pflanzen abgebildet die 48 h lang mit einer  $50\mu\text{M}$   $\beta$ -Östradiol-Paste behandelt wurden. Bild g) ist eine Übersichtsaufnahme, die Bilder h) und i) zeigen Detailansichten der selben Pflanze. Im Gegensatz dazu zeigt die Übersichtsaufnahme j) eine gleich behandelte Pflanze, die schon ein Signal in der Wurzelspitze aufweist (Pfeil). Alle Pflanzen wurden für 3 h bis 4 h gefärbt, das jeweils behandelte Rosettenblatt ist mit einem Stern (\*) markiert.

Die beschriebenen Analysen haben dargelegt, daß die  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Konstrukte in Kombination mit  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpasten zur lokalen Induktion verwendbar sind. Darüber

hinaus ermöglicht diese Expressionssystem eine Analyse des Steroidtransports *in planta*. Damit steht jetzt ein Testsystem zur Verfügung, mit dem die Auswirkung einer lokalen, gewebespezifischen Expression eines beliebigen Proteins analysiert werden kann. Im gezeigten Fall erlaubt dieses System die lokale Komplementation der Brassinosteroidbiosynthese, da im Hintergrund der Biosynthesemutante *cpd* gearbeitet wurde. In weiteren, detaillierteren Studien kann dieses System dazu verwendet werden, den Effekt der gewebespezifischen Komplementation an der *cpd*-Mutante in späteren Entwicklungsstadien z. B. bei der Blütenbildung zu analysieren.

Der Vergleich der Färbungsergebnisse, 24 h und 48 h nach erfolgter Induktion, zeigt, daß eine genaue Analyse der räumlichen und zeitlichen Verteilung des  $\beta$ -Östradiol möglich ist. Darüber hinaus kann das System auch dazu verwendet werden, um Transportmutanten zu isolieren, die keine oder eine abweichende  $\beta$ -Östradiol-Verteilung zeigen. In Analogie dazu ist – unter Verwendung des induzierbaren CPD-GFP-Konstruktes im Hintergrund der *cpd*-Nullmutanten – die Identifikation von Brassinosteroid-Transportmutanten möglich.

### 3.2 Isolierung von *A. thaliana*-Nullmutanten für die CPD-Interaktionspartner aus den Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien

Im Vorfeld der vorgelegten Arbeit wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudie mit dem CPD-Protein aus *A. thaliana* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden freundlicherweise von Zsuzsa Koncz überlassen (Kapitel 1). Als Interaktionspartner konnten verschiedene Proteine aus *A. thaliana* identifiziert werden. Für die Interaktionspartner konnten aufgrund einer „blast“-Analyse (Altschul *et al.*, 1997) homologe, tierische Proteine identifiziert werden. Basierend auf den gefundenen Homologien wurden die Interaktionspartner dann klassifiziert und als „inhibitor of apoptosis“ (IAPs) bzw. „oxysterol binding proteins“ (OBPs) benannt. Mit der Fertigstellung der *A. thaliana* Genomsequenz (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) war es möglich, die entsprechenden *A. thaliana*-Genfamilien zu charakterisieren. Im folgenden Kapitel wird die Klassifizierung der gefundenen Interaktionspartner näher erläutert und eine Übersicht über die identifizierten Genfamilien gegeben (3.2.1). Außerdem wird die Suche und Identifikation von Nullmutanten der Interaktionspartner beschrieben (3.2.2).

#### 3.2.1 Die CPD-Interaktionspartner sind Mitglieder von Proteinfamilien in *A. thaliana*

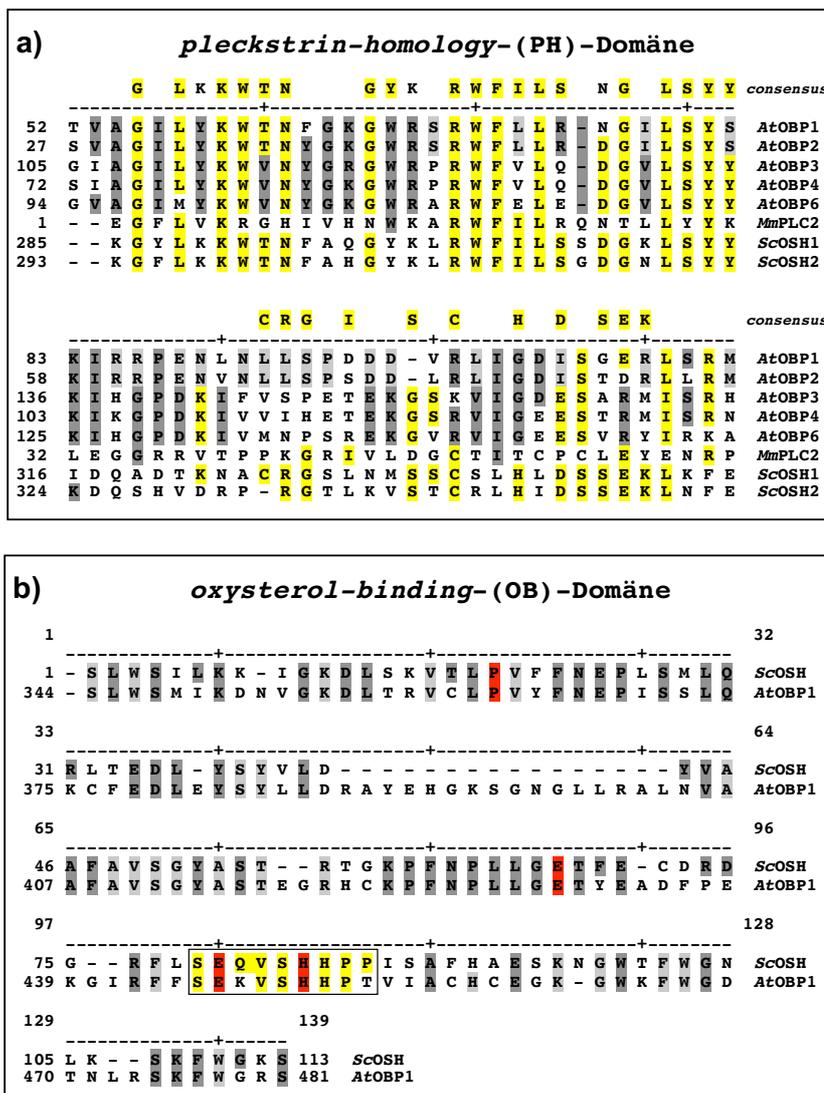
In Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien konnten Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem CPD-Protein und solchen Proteinen nachgewiesen werden, die eine starke Homologie zu tierischen „inhibitor of apoptosis“- (IAP)-Proteinen (Verhagen *et al.*, 2001) und humanen „oxysterol binding protein“- (OSBP)-Proteinen (Jaworski *et al.*, 2001) bzw. „oxysterol binding protein homologue“- (OSH)-Proteinen aus Hefe (Beh *et al.*, 2001) zeigen. Des weitern wurde die Interaktion mit einem MAP-Kinase-ähnlichen Protein (MAPK) bestätigt. Als primäre Interaktionspartner konnten die *A. thaliana* Proteine IAP1 (At1g10650; BAC\_F20b24), OBP1 (At4g22540; BAC\_F7K2) und MAPK1 (At5g41990; BAC\_MJC20) identifiziert werden. Da alle drei Mitglieder von Genfamilien sind, wurden die Homologien innerhalb dieser Genfamilien analysiert. In dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Analyse der IAP- und OBP-Proteine aus *A. thaliana* gelegt. Beide sind Mitglieder von Protein- bzw. Genfamilien, deren Vertreter starke Homologien aufweisen. Mittels einer blast-Analyse und genauer Sequenzvergleiche konnten sechs homologe OBPs und verschiedene IAP-Proteine in *A. thaliana* identifiziert werden. Bei den IAPs blieb es bei der Beschränkung auf vier Vertreter, da alle weiteren Ringfinger-Proteine Homologien < 21 % aufweisen. Ein Bild der Genfamilien ist jeweils in Form eines Homologie-Stammbaums und einer Identitätsmatrix in Abb.3.35 gegeben.

Die Sequenzanalyse ergab, daß die Homologie zwischen OBP1 und OBP2 einer Identität von 72,2 % auf Proteinebene entspricht, zwischen OBP1 und anderen OBPs jedoch nur weniger als 52 % beträgt. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei IAP1 und IAP2. Sie zeigen eine Identität von 62,6 % auf Proteinebene, im Vergleich zu anderen IAPs ist die Homologie geringer als 23,5 %. Daher wurden



zweite funktionale Domäne, die aufgrund ihrer Homologie zum Pleckstrin-Protein als „pleckstrin homology“- (PH)-Domäne bezeichnet wird (Rebecchi und Scalata, 1998). Beide Domänen zeigen konservierte Strukturen, alle analysierten OSBPs und OHS weisen in ihren steroidbindenden Domänen ein konserviertes Aminosäure-Motiv (EQVSHHPP) auf (Beh *et al.*, 2000). Die Sequenzvergleiche der funktionalen Domänen der *A. thaliana*-OBPs mit denen der OSBPs und OSH aus *H. sapiens* bzw. *S. cerevisiae* zeigen, daß diese Domänen auch in den pflanzlichen OBPs konserviert sind (Abb.3.37).

Aufgrund der sehr hohen Homologien zwischen den gefundenen Interaktionspartnern und den anderen Vertretern der entsprechenden Genfamilie wurde für alle weiteren Analysen jeweils der gefundene Interaktionspartner IAP1 bzw. OBP1 und das Mitglied der entsprechenden Proteinfamilie mit der höchsten Homologie, das entsprechend als IAP2 bzw. OBP2 benannt wurde, berücksichtigt. Es konnten für die Interaktionspartner und für ihre nächsten Homologen Insertionsmutanten isoliert werden (3.2.2). Des weiteren wurden Kreuzungsexperimente mit den Interaktionspartnern und ihren Homologen durchgeführt (3.4).



**Abb. 3.37: Sequenzvergleich der AtOBPs mit den homologen HsOSHs.** Die Abbildung zeigt einen Vergleich der PH-Domänen (a) und der OB-Domänen (b) der OBP-Proteine aus *A. thaliana* mit den OSH-Proteinen aus *S. cerevisiae*. Beide Proteinfamilien sind Homologe der humanen oxysterol-binding-proteins (OSBPs). Die *A. thaliana*-Genfamilie beinhaltet sechs OBPs, die Familie der OSHs umfasst sieben Mitglieder. Für den Vergleich der PH-Domäne ist die Sequenz des Pleckstrin-2 aus Maus (*MmPLC2*) und eine Consensus-Sequenz von 39 OSBP-Homologen (Beh *et al.*, 2001) gezeigt. Abbildung b) zeigt den Vergleich der OB-Domäne des *AtOBP1* mit der consensus-Sequenz der sieben *ScOSHs* aus Hefe. Die charakteristische Signatur der OB-Domäne ist gelb, invariante Aminosäurepositionen aller 39 OSBP-Homologe sind rot, darüber hinaus identische Positionen grau hinterlegt. Das Alignment ist mit dem Programm Clustel V erstellt worden.

### 3.2.2 Isolierung von T-DNA-Mutanten aus der Koncz- und der SALK-T-DNA-Population

Zur Identifikation von T-DNA-Insertionsmutanten wurden verschiedene T-DNA-Populationen durchmustert, mit Hauptaugenmerk auf der Koncz- (Rios G. *et al.*, 2002) und der SALK-T-DNA-Population (Alonso JM. *et al.*, 2003). Für die unterschiedlichen T-DNA-Populationen sind verschiedene Strategien zur Identifikation und Isolation der gewünschten T-DNA-Insertionsmutanten verfolgt worden:

#### 3.2.2.1 Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population nach *iap-*, *obp-* und *mapk*-T-DNA-Mutanten

Zur Identifikation einer T-DNA-Insertion in einem bestimmten Gen wurden unter Verwendung der Koncz-Population verschiedene PCR-Analysen der DNA-Pools der Kollektion durchgeführt. Genaue Details über die Struktur der Population und der *Screening*-Methode sind im Kapitel 2.1.13 bzw. 2.2.5 beschrieben. Die Einzelergebnisse der PCR-Analysen aller durchgeführten *Screens* sind im Anhang unter 6.5 aufgeführt.

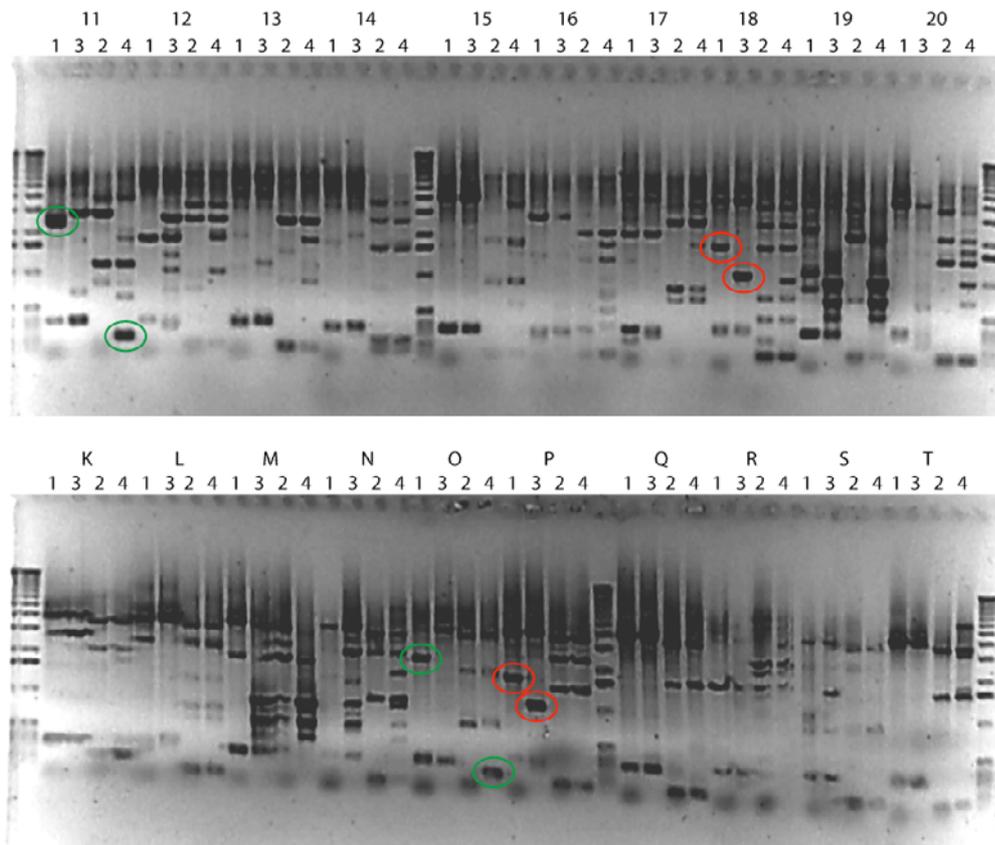
Das Ergebnis der PCR-Analysen stellt eine Einzellinie der Population dar, die die gesuchte T-DNA-Insertion trägt. Während der Durchmusterung der T-DNA-Populationen wurden die gesuchten Insertionen mittels PCR detektiert und identifiziert. Dies geschah durch Amplifikation des Übergangs zwischen der inserierten T-DNA und der flankierenden, genomischen DNA, unter Verwendung von genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden. Die Identität der erhaltenen Amplifikate wurde durch Sequenzierung sichergestellt. Anhand dieser Sequenzergebnisse können die genauen Positionen der T-DNA-Insertionen bestimmt werden. Die identifizierten Einzellinien, d.h. Samen der T<sub>1</sub>-Pflanzen, wurden auf Selektionsplatten ausgelegt, Einzelpflanzen abgeerntet. Diese Einzelpflanzen sind Teil einer segregierenden T<sub>2</sub>-Generation, in der die gesuchte T-DNA segregiert sowie eine unbestimmte Anzahl anderer T-DNAs segregieren können. Die isolierten T<sub>2</sub>-Einzelpflanzen wurden mittels PCR analysiert, um sicher zu stellen, daß sie die gesuchte T-DNA-Insertion und nicht eine andere tragen. Um festzustellen, ob die gesuchte T-DNA homozygot oder heterozygot ist und ob auch weitere T-DNAs vorliegen, wurde eine genaue Analyse der Hygromycin-Segregation in der T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Generation durchgeführt (3.2.2.2). Die Identität der homozygoten Linien wurde durch Southern-Blot-Analysen bestätigt (3.2.3). Im Folgenden wird an einem Beispiel repräsentativ die Isolation einer gesuchten T-DNA-Insertion im *IAP2*-Gen beschrieben.

##### 3.2.2.1.1 Identifikation bestimmter T-DNA-Insertionen in der Koncz-T-DNA-Population

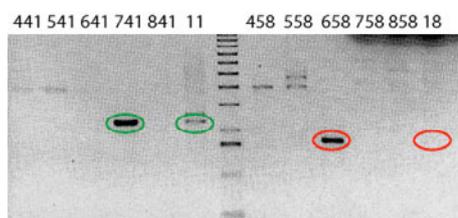
Für alle untersuchten Gene wurden jeweils beide Teile der Koncz-T-DNA-Population analysiert. Zur Vereinfachung wird für jedes Gen nur der Teil der Analyse gezeigt und erläutert, in dem auch eine T-DNA Insertion nachgewiesen werden konnte. Die Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population wurde, wie im Kapitel 2.2.5 beschrieben, mittels drei aufeinander folgenden PCR-Analysen durchgeführt. Im Primärscreen (*IAP2*, Abb.3.38a) konnten zwei positive Superpools

(Tausenderpools), Pool „11O“ (grün) und Pool „18P“ (rot), identifiziert werden. Der Nummernpool „11“ zeigt mit den Primerkombinationen 1 und 4 charakteristische Amplifikate, die in keinem anderen Nummernpool und nur in einem Buchstabenpool, dem Pool „O“, auftreten. Anhand dieser Koordinaten (11-O) wurden aus dem Poolschema (Abb.2.2) die korrespondierenden Subpools (441; 541; 641; 741; 841) identifiziert.

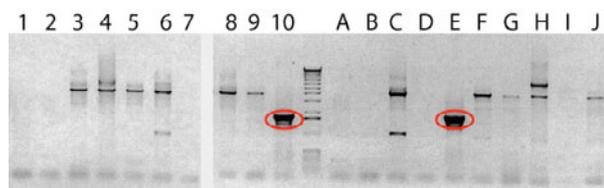
a) *IAP2* Primärscreen



b) *IAP2* Sekundärscreen:



c) *IAP2* Einzelpoolscreen:



**Abb. 3.38: Identifikation einer T-DNA-Insertion im *IAP2*-Gen.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Primärscreens (a), des Sekundärscreens (b) und des Einzelpoolscreens (c) bei der Durchmusterung der Konz-T-DNA-Population, die zur Identifikation einer Insertion im *IAP2*-Gen führte. Für die PCR-Analysen wurden die *IAP2*-genspezifischen Primer „ML01“ und „ML02“ sowie die T-DNA-spezifischen Primer „Fish1“ und „Fish2“ verwendet. Das Screening wurde durchgeführt, wie in 2.2.5 beschrieben.

Auch der Nummernpool 18 zeigt Amplifikate, die in keinem weiteren Nummernpool auftreten. Die Signale der Primerkombinationen 1 und 3 stimmen ausschließlich mit den Signalen des

Buchstabenpools „P“ überein. Anhand dieser Koordinaten (18-P) wurden ebenfalls die entsprechenden Subpools (458; 558; 658; 758; 858) identifiziert.

Für die Sekundärscreens (Abb.3.38b) der Superpools „110“ und „18P“ wurde jeweils die Primerkombination 1 verwendet. Zum Größenvergleich der Amplifikate der Hunderter- und der Superpools wurden jeweils die Nummernpools als Kontrolle verwendet. In beiden Fällen konnte das Amplifikat des Primärscreens in jeweils einem Hunderterpool identifiziert werden. Das 2,5 kb große Amplifikat des Pools „11“ (grün) wurde auch im Subpool „741“, das 1,8 kb große Amplifikat des Pools „18“ (rot) im Subpool „658“ gefunden. Die erhaltenen Fragmente wurden reamplifiziert und sequenziert. Anhand des Sequenzergebnisses konnte eine Insertion im *IAP2*-Gen eindeutig nachgewiesen werden. Die genauen Sequenzierungs-Ergebnisse der erhaltenen PCR-Fragmente sind im Anhang 6.7 zu sehen. Die Analyse der Sequenz zeigt den Übergang zwischen der genomischen Sequenz des *IAP2*-Gens und der inserierten T-DNA.

Nach Erhalt des Sequenzergebnisses sind die entsprechenden Einzellinien des identifizierten Hunderterpools ausgelegt, die präparierten DNAs, wie in 2.2.5 beschrieben, gepoolt und zur PCR-Analyse der Einzellinien eingesetzt worden. Im Screen der Einzellinien des Hunderterpools „658“ (Abb.38c) ergab sich wiederum ein eindeutiges Ergebnis: der Nummernpool „10“ und der Buchstabenpool „E“ zeigen beide die spezifische Amplifikation des 1,8 kb-Fragments. Damit kann die Einzellinie 65.800 der Koncz-T-DNA-Population als Träger einer T-DNA-Insertion im *IAP2*-Gen identifiziert werden. In gleicher Weise wurde für alle anderen Gene vorgegangen. Eine genaue Beschreibung der Einzelergebnisse ist im Anhang 6.5 gegeben. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle in Abbildung 3.39 zusammengefasst.

Gen		Primärscreen			Sekundärscreen	Tertiärscreen		Mutante
Name	AGI-Code	Signal (Superpools)	Primer- kombination	Größe [kb]	Hunderter- pool	Signal	Koncz-Linie	(Allel)
<i>IAP1</i>	At1g10650	-	-	-	-	-	#101	<i>iap1-1</i>
<i>IAP2</i>	At1g60610	18+P	P1	1,8 kb	658	10+E	#65.800	<i>iap2-1</i>
<i>OBP1</i>	At4g22540	1+H	P1	1,4 kb	171	2+E	#17.076	<i>obp1-2</i>
<i>OBP2</i>	At4g12460	5+F	P3	1,7 kb	55	1+E	#5451	<i>obp2-1</i>
<i>OBP2</i>	At4g12460	6+H	P1	1,3 kb	76	2+G	#7572	<i>obp2-2</i>
<i>MAPK</i>	At5g41990	18+P	P3	1,6 kb	558	1+J	#55.760	<i>mapk1-1</i>

**Abb. 3.39: Ergebnisse des PCR-Screenings der Koncz-T-DNA-Population.** Die Tabelle fasst die erhaltenen Ergebnisse, die sich während der Identifikation der Insertionslinien in den Genen *IAP1*, *IAP2*, *OBP1*, *OBP2* und *MAPK1* ergaben, zusammen. Es sind jeweils die Koordinaten (Superpools) und die Primerkombinationen (P1 bis P4) angegeben, die zu positiven Ergebnissen geführt haben. Die Fragmente der angegebenen Größe wurden mit den entsprechenden T-DNA-spezifischen Primern sequenziert. Die Primerkombinationen sind in 2.2.5 angegeben.

### 3.2.2.2 Hygromycin-Segregationsanalysen der identifizierten Koncz-T-DNA-Linien

Bei der Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population wurden T-DNA-Insertionen in den Genen *IAP1*, *IAP2*, *OBP1*, *OBP2* und *MAPK1* gefunden. Die entsprechenden Einzellinien sind in Sterilkultur auf Agar-Platten unter Hygromycin-Selektion angezogen worden. Hygromycinresistente Einzelpflanzen ( $T_2$ ) wurden auf Erde pikiert und später einzeln abgeerntet. In der nächsten Generation

(T<sub>3</sub>) wurde die Hygromycin-Segregation ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 3.40 dargestellt.

a)	T2	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	A 1	39	11	3,5	50	13	0,62
	A 4	82	28	2,9	110	28	0,91
	A 3	95	23	4,1	118	30	0,17
	A 1E	53	15	3,5	68	17	0,58

b)	T3	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	A 1-09	100%	-	-	-	-	-
	A 1-10	77	17	4,5	94	24	0,12
	A 3-11	14	5	2,8	19	5	0,89
	A 3-13	100%	-	-	-	-	-
	A 3-14	44	16	2,8	60	15	0,77
	A 3-17	66	20	3,3	86	22	0,71

c)	T2	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	B 4	95	12	7,9	107	27	0,00
	B 7	100%	-	-	-	-	-
	B 8	94	14	6,7	108	27	0,00
	B 9	75	5	15,0	80	20	0,00
	B 11	73	20	3,7	93	23	0,44

d)	T3	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	B 4-2	45	38	1,2	83	21	0,00
	B 8-2	55	37	1,5	92	23	0,00
	B 8-3	89	25	3,6	114	29	0,45

e)	T2	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	C 1	87	43	2,0	130	33	0,03
	C 2	105	32	3,3	137	34	0,66
	C 3	113	6	18,8	119	30	0,00
	C 4	119	13	9,2	132	33	0,00
	C 5	200	40	5,0	240	60	0,00
	C 20	137	54	2,5	191	48	0,30
	C 21	144	28	5,1	172	43	0,01
	C 22	131	2	65,5	133	33	0,00
	C 23	63	21	3,0	84	21	1,00
	C 24	129	6	21,5	135	34	0,00
	C 25	165	53	3,1	218	55	0,81
	C 26	125	33	3,8	158	40	0,23

f)	T2	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	D 1	139	37	3,8	176	44	0,22
	D 2	79	4	19,8	83	21	0,00
	D 3	94	35	2,7	129	32	0,58
	D 4	106	20	5,3	126	32	0,02
	D 5	93	5	18,6	98	25	0,00
	D 6	100	7	14,3	107	27	0,00
	D 7	105	38	2,8	143	36	0,66
	D 8	116	4	29,0	120	30	0,00
	D 9	78	27	2,9	105	26	0,87
	D 10	59	11	5,4	70	18	0,07
	D 11	87	43	2,0	130	33	0,03
	D 12	139	4	34,8	143	36	0,00

g)	T2	hyg R	hyg S	R / S	total	1/4	$\chi^2$
	F 1	185	5	37,0	190	48	0,00
	F 2	86	26	3,3	112	28	0,66
	F 3	97	10	9,7	107	27	0,00
	F 4	117	17	6,9	134	34	0,00
	F 5	100%	-	-	-	-	-
	F 6	70	1	70,0	71	18	0,00
	F 7	74	13	5,7	87	22	0,03
	F 8	54	12	4,5	66	17	0,20
	F 9	76	25	3,0	101	25	0,95
	F 10	143	12	11,9	155	39	0,00
	F 11	116	46	2,5	162	41	0,32
	F 12	86	4	21,5	90	23	0,00
	F 13	100%	-	-	-	-	-
	F 14	150	5	30,0	155	39	0,00
	F 15	100%	-	-	-	-	-
	F 16	100%	-	-	-	-	-
	F 17	194	57	3,4	251	63	0,40
	F 18	67	2	33,5	69	17	0,00
	F 19	73	17	4,3	90	23	0,18
	F 20	72	19	3,8	91	23	0,36
	F 21	49	3	16,3	52	13	0,00
	F 22	92	2	46,0	94	24	0,00
	F 23	78	6	13,0	84	21	0,00

**Abb. 3.40: Analyse der Hygromycinsegregation der identifizierten Koncz-T-DNA Linien.** Aus der T<sub>2</sub>-Generation der T-DNA-Linien #101 (*iap1*, **A**), #17.076 (*obp1*, **B**), #65.800 (*obp2*, **C**), #5.451 (*iap2*, **D**) und #55760 (*mapk*, **F**) wurden hygromycinresistente Einzelpflanzen isoliert, durchnummeriert und propagiert. Die *iap1-1*-Linien wurden von "A01" bis "A16", die *obp1-2*-Linien von "B01" bis "B16", die *iap2-1*-Linien von "C01" bis "C30", die *obp2-1*-Linien von "D01" bis "D16" und die *mapk1-1*-Linien von "F01" bis "F30" durchnummeriert. Von den erhaltenen Einzellinien wurde in der nächsten Generation (T<sub>3</sub>) die Hygromycin-Segregation (**a**, **c**, **e**, **f**, **g**) ermittelt. Für die Linien #101 (**b**) und #17.076 (**d**) wurden erst in der T<sub>4</sub>-Generation 3:1 segregierende Linien gewählt. Grundsätzlich wurden von allen 3:1 segregierenden Linien wieder Einzelpflanzen abgeerntet, um in der nächsten Generation (T<sub>4</sub> bzw. T<sub>5</sub>) homozygote 100 % hygromycinresistente Pflanzen zu isolieren. Alle 3:1 segregierenden Linien sind grau, die Linien, in denen die homozygoten *iap1-1*, *obp1-2*, *iap2-1*, *obp2-1* bzw. *mapk1-1*-Pflanzen isoliert wurden gelb hinterlegt.

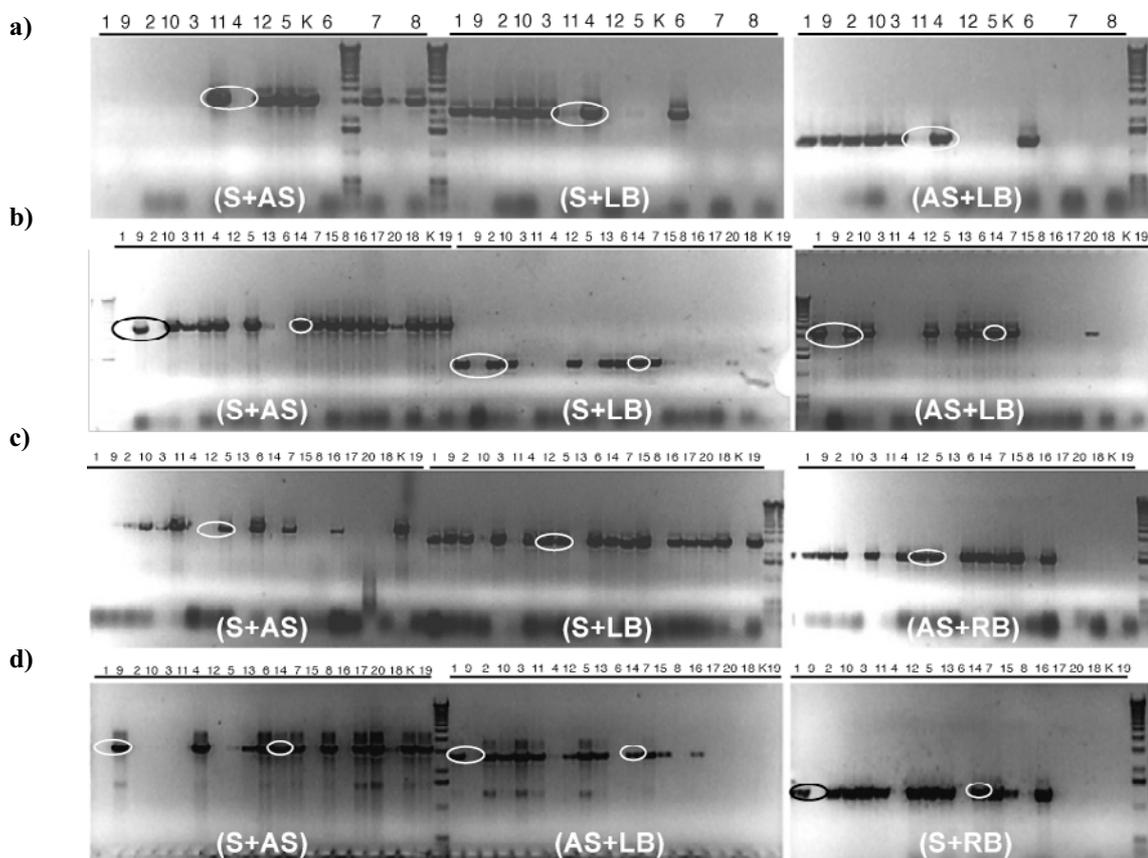
Für alle Linien konnte zumindest eine Einzelpflanze isoliert werden, die 3:1 hygromycinresistent zu sensitiv segregiert. Für jede Insertionslinie wurde zuerst eine 3:1-segregierende Linie identifiziert, um sicher zu gehen, daß nur eine einzelne T-DNA-Insertion vorliegt. Von solchen Linien sind dann erneut Einzelpflanzen abgeerntet worden, deren Segregation in der T<sub>4</sub>-Generation ermittelt wurde. Für die *iap1-1*-Mutante (#101) konnte die Linie A3-17, für die *obp1-2*-Mutante (#17.076) die Linie B8-3, für die *iap2-1*-Mutante (#65.800) die Linie C2, für die *obp2-1*-Mutante (#5.451) die Linie D7 und für die *mapk1-1*-Mutante (#55.760) die Linie F11 als 3:1 hygromycinresistent zu sensitiv segregierende Linie identifiziert werden. In der nächsten Generation konnten die Linien A3-17-4; B8-3-4; C2-a; D7-i und F11-b als 100 % hygromycinresistent identifiziert werden. DNA dieser Linien wurde für die Southern-Blot-Analysen eingesetzt.

### 3.2.2.3 Analyse und Identifikation der *iap*- und *obp*-SALK-T-DNA-Linien

Bei der Isolation von SALK-T-DNA-Insertionen wurde aufgrund des völlig anderen Konzepts der Population entsprechend anders vorgegangen. Insertionen in den bearbeiteten Genen wurden durch eine „blast“-Suche auf der SALK-Homepage (<http://signal.salk.edu/>) identifiziert. Samen dieser T-DNA-Linien sind über das *Nottingham Arabidopsis Stock Center, NASC* (<http://arabidopsis.info/>), bezogen worden. Die erhaltenen Samen wurden auf Erde ausgelegt, die Pflanzen durchnummeriert und einzeln abgeerntet. Von den Einzelpflanzen wurden vor der Samenernte einige Rosettenblätter abgenommen, die zur DNA-Präparation dienten. Mittels einer PCR-Analyse wurde eine Genotypisierung der Einzelpflanzen durchgeführt (Abb.6.7.1, Abb.341). Dabei konnten die gesuchten Insertionen identifiziert werden. Die Samen wurden in der nächsten Generation auf Selektionsplatten ausgelegt. Weil sich die SALK-Linien als durchweg kanamycinsensitiv erwiesen haben, konnte der Kanamycin-Marker der SALK-T-DNA nicht für die weiteren Analysen verwendet werden. Deshalb wurden die positiv getesteten Einzelpflanzen auf Erde ausgelegt, zur Samengewinnung wieder einige Einzelpflanzen abgeerntet, die restlichen wurden vereinigt und zur DNA-Präparation eingesetzt. Diese DNA konnte dann für eine genomische Southern-Blot-Analyse verwendet werden (3.2.3). Anhand dieser Analysen sind Einzellinien identifiziert worden, die die gesuchten SALK-T-DNA Insertionen tragen, für einige der analysierten Gene konnten sogar homozygote Linien belegt werden.

Es war möglich auf der *SALK-Homepage* T-DNA-Insertionen in den Genen *OBP1* (N530489), *OBP3* (N040837), *OBP4* (N568577, N632547) und *OBP5* (N610343) sowie *IAP1* (N5333864, N515099) und *IAP2* (N649179) zu identifizieren und vom NASC zu beziehen. Von den *obp1-1*, *obp3-1*, und *iap1-2* bzw. *iap1-3*-Linien wurden zwischen fünf und sieben Einzelpflanzen analysiert, die von SL01 bis SL22 durchnummeriert wurden. Mit einer PCR-Analyse konnten Einzelpflanzen identifiziert werden die die gewünschten T-DNA-Insertionen tragen. Die PCR-Analyse ist im Anhang unter 6.6 gezeigt. Die Identität der Amplifikate wurde durch Sequenzierung bestätigt. Für die *iap1-2* bzw. *iap1-3*-Linie wurden die Einzelpflanzen SL02 bzw. SL11 identifiziert, die eine T-DNA-Insertion im *IAP1*-Gen tragen. Für die *obp1-1* bzw. *obp3-1*-Linien wurden die Linien SL13, bzw. SL18 ermittelt. Diese Linien wurden anhand einer genomischen Southern-Analyse weiter charakterisiert, ihre Identität als homozygote Linien bestätigt (3.2.3.1).

Für die *iap2*, *obp4* und *obp5*-Linien konnten zwischen 12 bis 20 Einzelpflanzen analysiert werden, die *iap2-2*-Linien wurden von 7901 bis 7912, die *obp4-1* von 7821 bis 7840, die *obp4-2*-Linien von 7841 bis 7860 und die *obp5-1*-Linien von 7861 bis 7880 durchnummeriert. Anhand der PCR-Analysen der *iap2*, *obp4* und *obp5*-Linien konnten ebenfalls für die T-DNA-Insertion im entsprechenden Gen homo- und heterozygote Pflanzen identifiziert werden (Abb.3.41). Die Identitäten der PCR-Fragmente wurde ebenfalls durch Sequenzierung sichergestellt. Weil mit der Analyse dieser Linien jedoch später begonnen wurde, konnte die Identität dieser Linien noch nicht durch eine genomische Southern-Analyse bestätigt werden. Keine der identifizierten Linien zeigt unter Standardgewächshausbedingungen einen auffälligen Phänotyp.

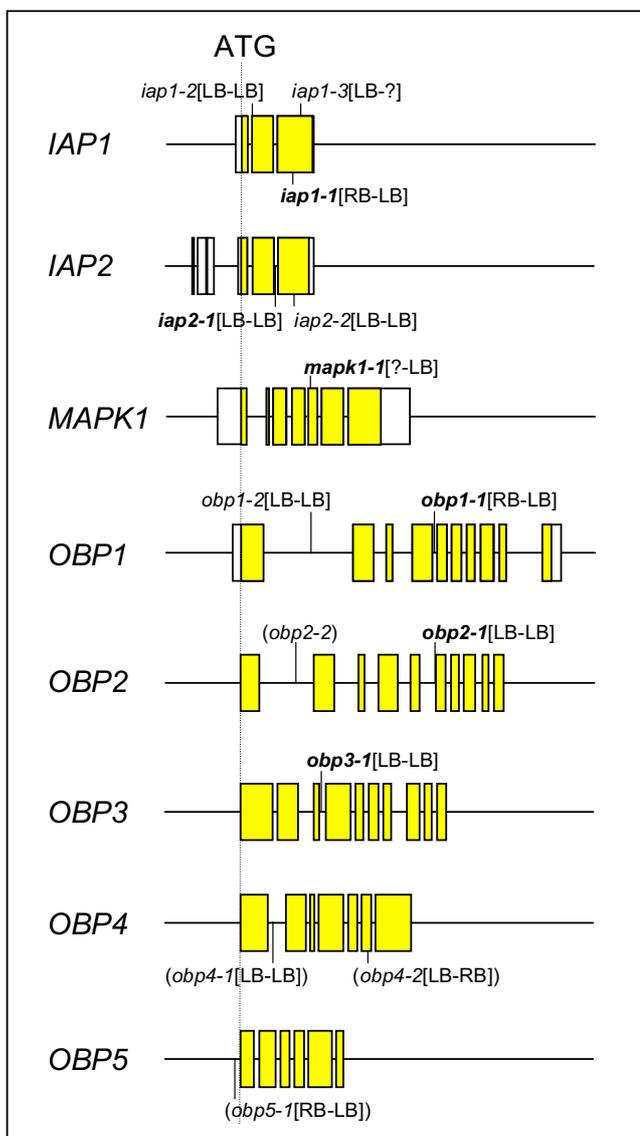


**Abb. 3.41: Genotypisierung der Einzelpflanzen der SALK-*iap2*-, *obp4*- und *obp5*-Linien.** Die Abbildung zeigt die PCR-Analysen der Einzelpflanzen der *iap2-2*; N649179 (a), der *obp4-1*; N568577 (b), der *obp4-2*; N632547 (c) und der *obp5-1*; N610343 (d) Linien. Für die *iap2-2*-Linie konnten die homozygoten Einzelpflanzen: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10 identifiziert werden. Entsprechend für die *obp4-2*-Linie die homozygoten: 1, 2, 6, 12, 13 sowie die heterozygoten Pflanzen: 10, 14, 20 identifiziert werden. Für die *obp4-3*-Linie ergeben sich die homozygoten: 1, 4, 9, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20 und die heterozygoten: 2, 3, 5, 6, 7, 16 Pflanzen, für die *obp5-1*-Linie die homozygoten: 1, 2, 3, 5, 10, 11, 12, 15, 16 und die heterozygoten Einzelpflanzen: 7, 13, 14. Die PCR-Analysen wurden mit den genannten Primerkombinationen und folgenden Oligonucleotiden durchgeführt: *IAP2*: ML01-S, ML02-AS; *OBP4*: Q4-S, Q4-AS; *OBP5*: Q5-S, Q5-AS; T-DNA: SL-LB-PCR (LB), Fish2 (RB). Die Oligosequenzen sind in Kapitel 6.3 angegeben.

In Abbildung 3.41 sind einige Linien markiert worden, die bestimmte Amplifikationsmuster zeigen. Die Linie 11 in Analyse a) zeigt, wie die Wildtypkontrolle (K), die Amplifikation des Wildtyp-*IAP2*-Locus (A) jedoch keine Amplifikation der T-DNA-Fragmente (B; C). Die Linie 4 hingegen weist nur die T-DNA-spezifischen Amplifikate auf (B; C). Entsprechende Linien sind auch in den Analysen b), c) und d) markiert. Dort sind auch heterozygote Linien wie die Linien 14 (b), 5 (c) und 14 (d) zu sehen.

### 3.2.2.4 Übersicht der identifizierten T-DNA-Insertionen

Mit den durchgeführten PCR-Analysen der Koncz-T-DNA-Population und der erhaltenen SALK-Einzelpflanzen konnte für jedes der untersuchten Gene mindestens eine T-DNA-Insertionslinie identifiziert werden. In Abbildung 3.42 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse gezeigt.



**Abb. 3.42: Positionen der identifizierten T-DNA-Insertionen.**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der analysierten Gene, codierende Exons sind gelb ausgefüllt. Die Positionen der mittels PCR-Analysen identifizierten, T-DNA-Insertionen sind eingetragen, die Art der flankierenden T-DNA-border-Bereiche sind in Klammern angegeben. Die Identität aller Insertionen wurde durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Amplifikate mit T-DNA-spezifischen Oligonucleotiden sichergestellt. Die erhaltenen Sequenzergebnisse sind im Anhang unter 6.7 zu sehen. In Klammern genannte Allele konnten nur durch PCR- noch nicht anhand von Southern-Analysen bestätigt werden. Die fett markierten Allele wurden durch Southern- und RT-PCR-Analysen bestätigt und für die phänotypischen Analysen verwendet.

Identifizierte Allele: *iap1-1*, #101 (A174); *iap1-2*, N533864 (SL02); *iap1-3*, N515099 (SL11); *iap2-1*, #65.800 (C2A); *iap2-2*, N649179 (7901ff); *mapk1-1*, #55.760 (F11B); *obp1-1*, N530489 (SL13); *obp1-2*, #17.076 (B84); *obp2-1*, #5.451 (D7I); *obp2-2*, #7.572 (E-); *obp3-1*, N040837 (SL18); *obp4-1*, N568577 (SL7821ff); *obp4-2*, N632547 (SL7841ff); *obp5-1*, N610343 (SL7861ff)

#### Analysierte Gene:

*IAP1* (At1g10650, BAC\_F20B24);  
*IAP2* (At1g60610, BAC\_F8A5);  
*MAPK1* (At5g41990, BAC\_MJC20);  
*OBP1* (AT4g22540, BAC\_F7K2);  
*OBP2* (At4g12460, BAC\_T1P17);  
*OBP3* (At4g08180, BAC\_T12G13);  
*OBP4* (At2g31020, BAC\_F7F1);  
*OBP5* (At2g31030, BAC\_F7F1)

### 3.2.3 Verifizierung der isolierten T-DNA-Mutanten mittels Southern-Blot- und Expressions-Analysen

Die Identität der isolierten T-DNA-Mutanten konnte durch eine genomische Southern-Blot-Analyse sichergestellt werden. Durch die Hybridisierung mit Gen- und T-DNA-spezifischen Sonden ist es möglich, die genomischen Loci der untersuchten Gene in den jeweiligen T-DNA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp exakt durchzuführen. Die Identität aller untersuchter T-DNA-Mutanten kann im Folgenden durch die gezeigte Southern-Blot-Analyse eindeutig belegt werden (3.2.3.1). Darüber hinaus wurden einige der Mutanten mittels einer RT-PCR-Analyse untersucht (3.2.3.2).

#### 3.2.3.1 Genomische Southern-Blot-Analysen der identifizierten Koncz- und SALK-T-DNA-Linien

Die Koncz-T-DNA stammt aus dem Vector pPCV6NF-Hyg und ist ca. 7 kb groß (Abb.43a). Zur Analyse der Koncz-T-DNA Mutanten wurden die Restriktionsendonucleasen *Bgl*II und *Eco*RI verwendet, da sie die T-DNA relativ endständig spalten. Die genauen Positionen und die daraus resultierenden Fragmentgrößen sind in Abbildung 3.43 gezeigt. Die SALK-T-DNA ist ca. 5 kb groß und stammt aus dem Vector pBIN19-ROK2 (Abb.3.43b). Zur Analyse der SALK-Mutanten konnte nur die Restriktionsendonuclease *Eco*RI, die die T-DNA einmal spaltet, verwendet werden. Die Restriktionsendonuclease *Pst*I sollte die SALK-T-DNA zwar an zwei günstigen Positionen spalten, da das *Pst*I-Enzym jedoch methylierungssensitiv ist, war dies in den meisten Fällen nicht möglich.

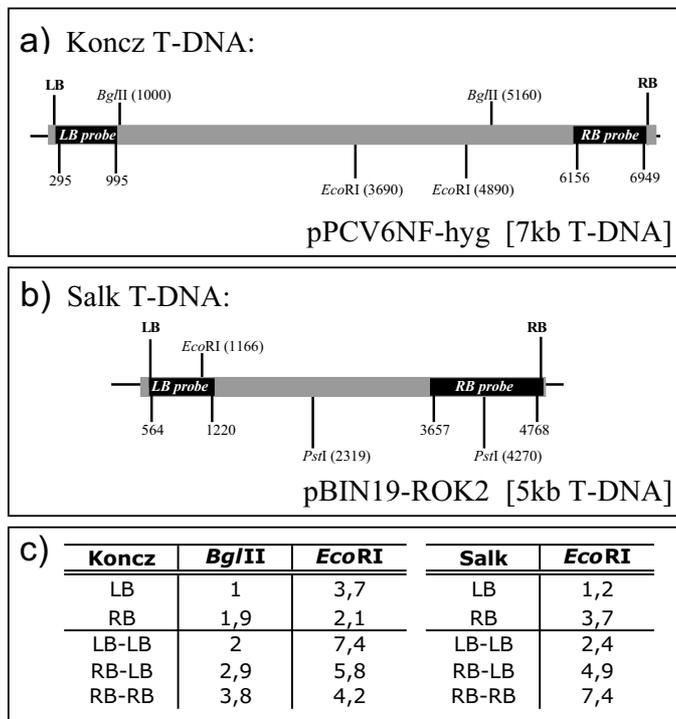
Für die Hybridisierungsexperimente wurden verschiedene T-DNA-spezifische Sonden hergestellt, die jeweils mit den endständigen Fragmenten hybridisieren können. Die Hybridisierungspositionen sind auch in Abb.3.43 gezeigt. Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Oligonucleotide sind im Anhang 6.3 angegeben

Aufgrund der Wahl der Restriktionsendonucleasen und der Positionierung der Hybridisierungsproben, ergeben sich für jede Kombination aus T-DNA, Restriktionsenzym und Sonde charakteristische Signale unterschiedlicher Größe. Im Fall einer Tandem-T-DNA-Insertion ergeben sich spezifische T-DNA-Fragmente, deren genaue Größen in Abb.3.43c) angegeben sind.

In Abbildung 3.43 sind nur die Größen der erwarteten T-DNA-Fragmente aufgeführt, die bei der Restriktionsspaltung einer "isolierten" T-DNA entstehen. Wenn eine T-DNA jedoch in genomische DNA inseriert ist, ergeben sich natürlich entsprechend größere Fragmente. Zu der angegebenen Größe der T-DNA-Fragmente kommen noch die flankierenden Bereiche der genomischen DNA hinzu, und zwar von der Position der T-DNA-Insertion bis zur nächsten Spaltungsstelle der verwendeten Restriktionsendonuclease in der genomischen DNA-Sequenz.

Die Größe der zu erwartenden Fragmente ist für jedes der analysierten Gene berechnet worden. Dazu wurde mit dem Computer-Programm "mapsort" zuerst die genauen Positionen ermittelt, an denen die genomischen Loci der untersuchten Gene von der verwendeten Restriktionsendonuclease gespalten werden. Die genomischen Sequenzen der Loci konnten mit Hilfe der angegebenen Namen der BAC-Klone, aus der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen werden.

Anhand der Spaltpositionen wurden die Größen der genomischen Restriktionsfragmente berechnet, die das entsprechende Gen abdecken. Diese Fragmente sind in der genomischen Southern-Analyse unter Verwendung der genspezifischen cDNA-Sonden nachweisbar.

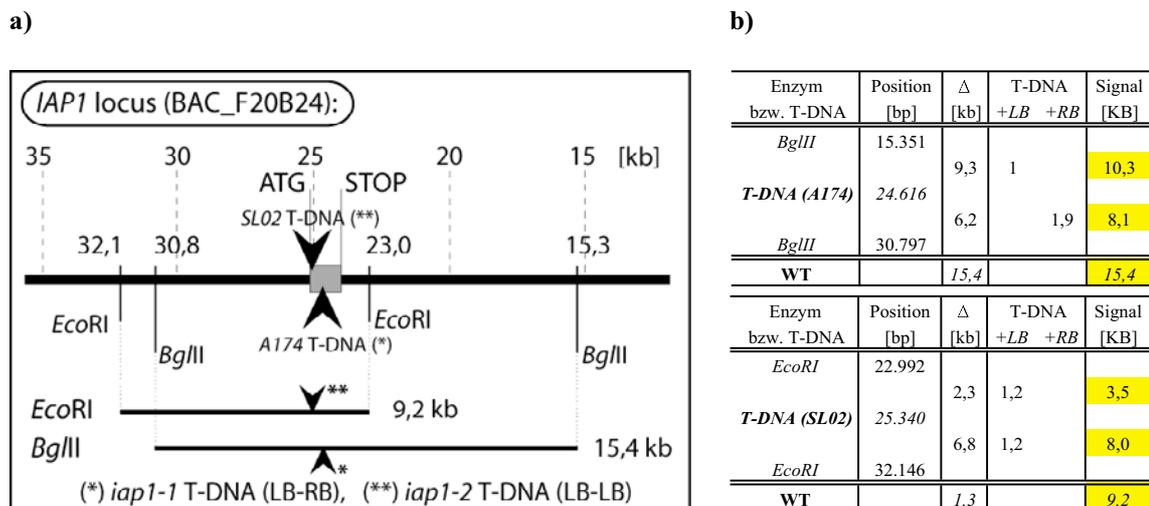


**Abb. 3.43: Struktur der Koncz- und SALK-T-DNAs.** In der Abbildung ist eine schematische Darstellung der Koncz (a) und der SALK-T-DNA (b) zu sehen. Die Bereiche der T-DNAs, die mit den verwendeten Hybridisierungsproben für den "left border"-Bereich (LB) bzw. den "right border"-Bereich (RB) übereinstimmen, wurden schwarz hinterlegt. Die Positionen, an denen die T-DNAs von den verwendeten Restriktionsendonucleasen, *BglII*; *EcoRI* und *PstI* gespalten werden, sind eingezeichnet. Die Tabellen (c) zeigen die Restriktionsfragmentgrößen (LB; RB), die unter Verwendung der angegebenen Restriktionsendonucleasen auftreten und mit den verwendeten Hybridisierungsproben nachgewiesen werden können. Des Weiteren sind die möglichen Fragmentgrößen (LB-LB; RB-LB; RB-RB) angegeben, die auftreten, wenn Tandemwiederholungen der T-DNAs vorliegen.

Aufgrund der T-DNA-Insertion wird die Größe dieser Fragmente entsprechend der Größe der inserierten DNA-Sequenz verändert. Weil mit einer T-DNA-Insertion auch weitere Restriktionsspaltstellen eingefügt werden, entstehen nun völlig neue Restriktionsfragmente. Es ergeben sich Hybridfragmente, die aus den beschriebenen "border"-Fragmenten der T-DNA und den flankierenden, genomischen Fragmenten bestehen. Die Größe dieser Fragmente wurde jeweils aus den Positionen der genomischen Spaltstellen, der Position der T-DNA-Insertion und der entsprechenden T-DNA-Restriktionsfragmente für jedes Gen und für jede T-DNA-Insertion berechnet. Diese berechneten Fragmentgrößen ermöglichen eine einfache Auswertung der erhaltenen Hybridisierungsergebnisse. Die Orientierungen und die Identitäten der inserierten T-DNAs "left border" oder "right border" ergaben sich aus den Primerkombinationen, die während der Durchmusterung der T-DNA-Population zu positiven Signalen geführt haben. Diese wurden durch die Sequenzierung der PCR-Fragmente bestätigt (6.7). Bei allen Analysen wurden Hybridisierungen mit beiden T-DNA-Sonden und der genspezifischen cDNA-Sonde durchgeführt. Zum Vergleich der Fragmentgrößen ist immer auch Wildtyp-DNA mit aufgetragen worden. Bei allen Analysen zeigten die Hybridisierungen mit der entsprechenden, genspezifischen cDNA-Sonde und der WT-DNA die erwarteten Signale, entsprechend der berechneten Fragmentgrößen. Auch die Hybridisierungen mit den T-DNA-spezifischen Proben zeigen die erwarteten Fragmentgrößen. Im Folgenden werden die Einzelergebnisse für jedes Gen detailliert aufgeführt.

### 3.2.3.1.1 Genomische Southern-Blot-Analyse der *iap1-1*- und *iap1-2*-Mutante

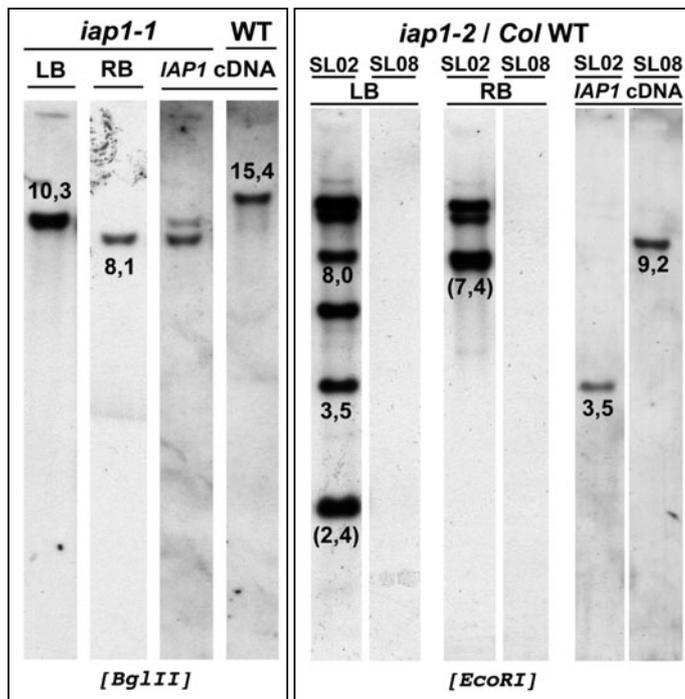
Für die Southern-Blot-Analyse der *iap1-1*-Mutante (Koncz\_#101) wurde DNA der 100 % hygromycinresistent segregierenden Einzellinie "A3-17-4" (3.2.2.2) eingesetzt. Die Abbildung 3.44 zeigt eine schematische Darstellung des genomischen *IAP1*-Locus, die Positionen an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.45 dargestellt. Zur Analyse der *iap1-2*-Mutante wurde DNA der isolierten SALK-Linie SL02 (N533864) und SALK-Wildtyp-DNA der Linie SL08 verwendet (3.2.2.3).



**Abb. 3.44: Struktur des genomischen *IAP1*-Locus.** Diese Abbildung ist eine schematische Darstellung des *IAP1*-Locus (a). Gezeigt ist der flankierende, genomische Bereich um das *IAP1*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (25.522) und STOP-Codons (24.326) gegeben. Die Positionsangaben beziehen sich auf die beschriebenen BAC-Klonen des NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Die schwarzen Pfeile zeigen die Position der T-DNA-Insertion der *iap1-1*-Mutante im *IAP1*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten. Die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. Allerdings sind nur die Restriktionsfragmente gezeigt, die aufgrund der T-DNA-Insertion verändert werden und mit T-DNA-spezifischen Sonden in der Southern-Analyse nachgewiesen werden können. Die Tabellen (b) führen die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente auf, die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutanten entstehen (Signal). Die Positionsangaben der Restriktionsstellen und der T-DNA-Insertionen beziehen sich ebenfalls auf die Positionen der angegebenen BAC-Klone. Die Entfernung zwischen den Restriktionsstellen und der T-DNA-Insertion ist als Δ [kb] angegeben. Die Größen der T-DNA-Restriktionsfragmente sind in Abb.3.43 beschrieben, die Orientierung der inserierten T-DNAs und die Identität der flankierenden *border*-Bereiche ist für alle untersuchten Mutanten in Abb.3.42 zusammengefasst.

Die Hybridisierungen mit DNA der *iap1-1*-Mutante weisen die erwarteten Signale von 10,3 kb bei der LB-Sonde und von 8,1 kb bei der RB-Sonde auf (Abb.3.45 Spur 1 und 2). Die Hybridisierungen mit der genspezifischen cDNA-Sonde zeigen mit WT-DNA das erwartete Signal von 15,4 kb. Mit *iap1-1*-DNA treten nur die Signale der Größe 8,1 kb und 10,3 kb auf (Abb.3.45 Spur 4 und 3). Da mit der genspezifischen Sonde nur die Hybridfragmente (8,1 kb; 10,3 kb) und nicht das WT-Fragment

(15,4 kb) auftreten, belegt die Analyse eindeutig, daß die Linie "A3-17-4" in Bezug auf die T-DNA-Insertion im *IAP1*-Gen homozygot ist. Weil mit den T-DNA-spezifischen Sonden keine weiteren Signale detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, daß diese Linie keine weiteren T-DNA-Insertionen trägt. Die Southern-Analyse der *iap1-2*-Mutante ergibt die erwarteten Fragmente der Größen 8,0 kb und 3,5 kb mit der LB-Sonde und DNA der *iap1-2*-Mutante.



**Abb. 3.45: Genomische Southern-Blot-Analyse der *iap1-1*- und *iap1-2*-Mutante.** In der Abbildung ist das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden zu sehen. Genomische DNA der *iap1-1* (Koncz #101) bzw. der *iap1-2* (SL02) Mutante und des *Columbia*-Wildtyps (WT/SL08) wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*III bzw. *Eco*RI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Der erhaltene Filter ist mit den angegebenen DIG-markierten Sonden hybridisiert worden. Zwischen den Hybridisierungen wurde die Membran gestrippt. Die Hybridisierung der *Col*/WT-DNA (WT) mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southern-Experiment wurde, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

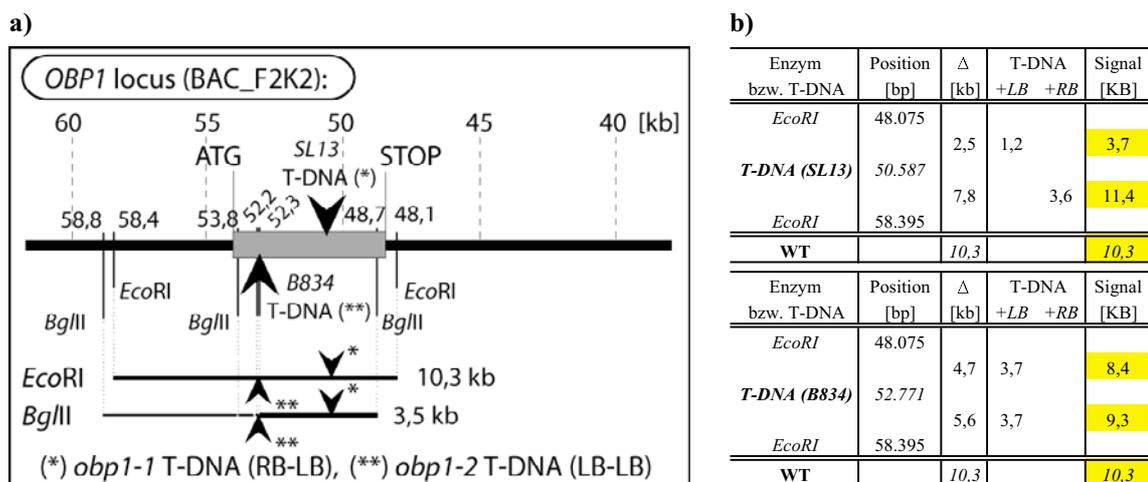
Die Hybridisierung der cDNA-Sonde und der genomischen Wildtyp-DNA zeigt ein Fragment der erwarteten Größe von 9,2 kb. Mit DNA der *iap1-2*-Mutante konnte nur das 3,5 kb- aber weder das zweite LB-Fragment der Größe 8,0 kb noch das Wildtyp-Fragment von 9,2 kb erhalten werden. Das Fehlen des Wildtyp-Fragments belegt, daß die *iap1-2*-Mutante ebenfalls homozygot für die T-DNA-Insertion im *IAP1*-Gen ist. Das Fehlen des zweiten cDNA-LB-Hybridfragments (8 kb) kann durch die Insertion der T-DNA im ersten Intron erklärt werden. Angesichts der sehr stringenten Hybridisierungsbedingungen ist die Homologie der cDNA-Probe zum entsprechenden Restriktionsfragment, das nur noch im Bereich des ersten Exons – in ca. 100 bp – mit der Sonde übereinstimmt, nicht ausreichend für eine Hybridisierung beider DNA-Fragmente.

Mit den T-DNA-Sonden wurden zwei Fragmente nachgewiesen, die Tandem-T-DNA-Integrationen zugeordnet werden können. Die Hybridisierung mit der LB-Sonde weist ein Fragment der Größe 2,4 kb, welches auf eine LB-LB-Tandem-Integration hinweist. Die RB-Sonde zeigt ein Fragment mit einer Größe von ca. 7,4 kb, welches ein Hinweis für eine RB-RB-T-DNA-Integration ist. Außerdem konnten mit beiden T-DNA-spezifischen Sonden weitere Fragmente detektiert werden. Diese Fragmente bleiben ohne Zuordnungsmöglichkeit. Deshalb ist davon auszugehen, daß die *iap1-2*-Mutante auch weitere T-DNA-Insertionen trägt.

### 3.2.3.1.2 Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp1-1*-Mutante

Für die Southern-Blot-Analyse der *obp1-1*-Mutante (Salk\_N530489) wurde DNA der SALK-Einzellinie "SL13" eingesetzt (3.2.2.2). Die Abbildung 3.46 zeigt eine schematische Darstellung des genomischen *OBPI*-Locus, die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.47 dargestellt.

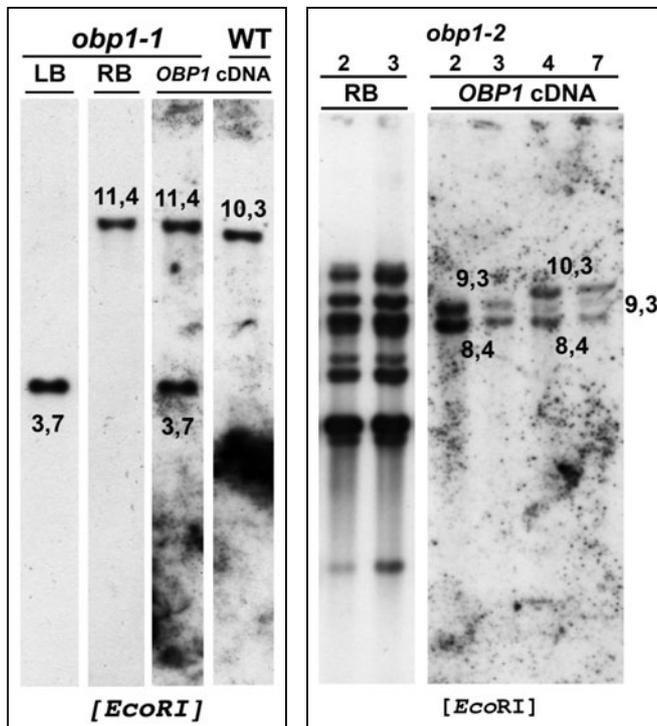
Die Hybridisierungen weisen die erwarteten Signale von 3,7 kb bei der LB-Sonde und von 11,4 kb bei der RB-Sonde mit DNA der *obp1-1*-Mutante auf (Abb.3.47 Spur 1 und 2). Die Hybridisierung mit der genspezifischen cDNA-Sonde führt mit WT-DNA zum erwarteten Signal von 10,3 kb. Mit *obp1-1*-DNA treten nur die Signale der Größe 3,7 kb und 11,4 kb auf (Abb.3.47 Spur 4 und 3). Da mit der genspezifischen Sonde nur die Hybridfragmente (3,7 kb; 11,4 kb) und nicht das WT-Fragment (10,3 kb) auftreten, belegt die Analyse eindeutig, daß die Linie "SL13" in Bezug auf die T-DNA-Insertion im *OBPI*-Gen homozygot ist. Weil mit den T-DNA-spezifischen Sonden keine weiteren Signale detektiert werden, ist davon auszugehen, daß diese Linie keine weiteren T-DNA-Insertionen trägt.



**Abb. 3.46: Struktur des genomischen *OBPI*-Locus.** Die Abbildung ist eine schematische Darstellung des *OBPI*-Locus (a). Zu sehen ist der flankierende, genomische Bereich um das *OBPI*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (54.006) und STOP-Codons (48.511) gegeben. Die schwarzen Pfeile geben die Position der T-DNA-Insertion der *obp1-1*-Mutante im *OBPI*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten an. Die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. Die Tabellen (b) führen die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente auf, die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutante auftreten. Genauere Angaben sind der Abb.3.44 zu entnehmen.

Auch für die *obp1-2*-Mutante konnten homozygote Pflanzen der Koncz-T-DNA-Linie #17.076 (3.2.2.2) identifiziert werden. Die Hybridisierungen von mit *Bgl*II- bzw. *Eco*RI-gespaltener DNA der *obp1-2*-Mutante mit T-DNA-spezifischen LB- und RB-Sonden hat diverse Fragmente ergeben, die Tandem- bzw. Mehrfachinsertionen aufweisen. In Abbildung 3.47 ist stellvertretend das Ergebnis

einer Hybridisierung mit der RB-Sonde aufgeführt. Die Hybridisierungen der DNA verschiedener Einzelpflanzen mit der *OBP1*-cDNA-Sonde zeigt homo- (2; 3) und heterozygote (4; 7) Linien. Es konnten die erwarteten Fragmente der Größen 8,4 kb bzw. 9,3 kb und das 10,3 kb große Wildtyp-Fragment detektiert werden. Alle *obp1-2*-Einzelpflanzen zeigten mit den T-DNA-spezifischen Sonden das gleiche Muster.



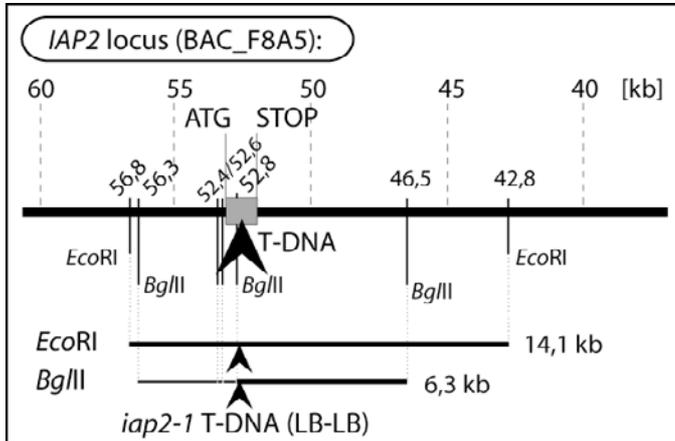
**Abb. 3.47: Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp1-1*- bzw. *obp1-2*-Mutante.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden. Genomische DNA der *obp1-1*-Mutante (Salk\_N530489) bzw. der *obp1-2*-Mutante (Koncz #17.076) und des *Columbia*-Wildtyps (WT) wurde mit der Restriktionsendonuclease *EcoRI* gespalten. Die Hybridisierung der *Col*/WT-DNA mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southernexperiment wurde, wie in Abb.345 bzw. 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

### 3.2.3.1.3 Genomische Southern-Blot Analyse der *iap2-1*-Mutante

Für die Southern-Blot-Analyse der *iap2-1*-Mutante (Koncz\_#65.800) wurde DNA der hygromycinresistenten Linie "C2-a" (3.2.2.2) eingesetzt. In Abbildung 3.48 ist eine schematische Darstellung des genomischen *IAP2*-Locus, die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung zu sehen. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.49 gezeigt. Die Hybridisierung mit der LB-Sonde zeigt die erwarteten Signale von 7,0 kb und 1,3 kb bzw. 13,5 kb und 8,0 kb. Mit der RB-Sonde ergibt sich ein Signal von 3,8 kb bzw. 4,2 kb mit DNA der *iap1-1*-Mutante (Abb.3.49 Spur 1 und 2 bzw. 5 und 6). Diese Größen entsprechen genau der Größe eines RB-RB-Fragments bei einer Tandeminsertion. Die Hybridisierung mit der genspezifischen cDNA-Sonde zeigt mit WT-DNA das erwartete Signal von 6,3 kb bzw. 14,1 kb, mit *iap2-1*-DNA sind nur die Signale der Größen 7,0 kb bzw. 13,5 kb und 8,0 kb zu sehen (Abb.3.49 Spur 4 und 3 bzw. 8 und 7). Da mit der genspezifischen Sonde nur die Hybridfragmente (7,0 kb bzw. 13,5 kb; 8,0 kb) und nicht das WT-Fragment (6,3 kb bzw. 14,1 kb) auftreten, belegt die Analyse eindeutig, daß die Linie "C2-a" in Bezug auf die T-DNA-Insertion im *IAP2*-Gen homozygot ist. Weil außerdem mit den

T-DNA-spezifischen Sonden keine weiteren Signale detektiert werden, ist davon auszugehen, daß diese Linie keine weiteren T-DNA-Insertionen trägt.

a)



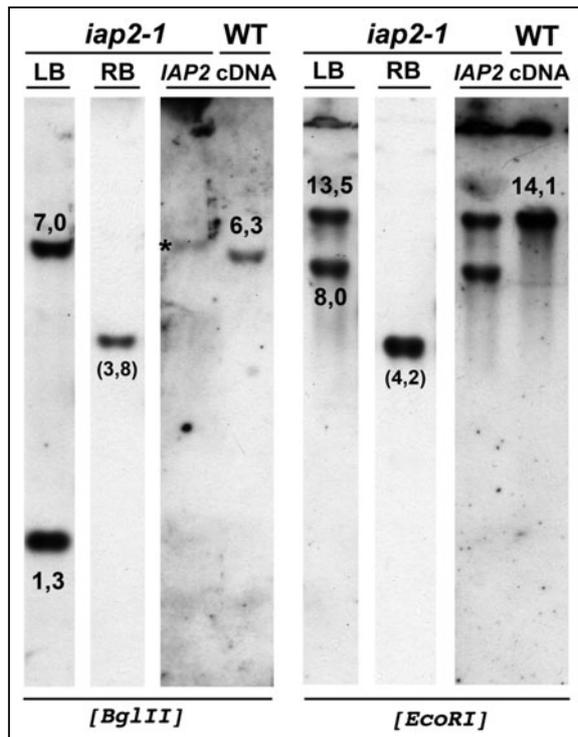
b)

Enzym bzw. T-DNA	Position [bp]	Δ [kb]	T-DNA		Signal [KB]
			+LB	+RB	
<i>Bgl</i> III	46.427	6,0	1		7,0
<i>T-DNA (C2a)</i>	52.567				1,3
<i>Bgl</i> III	52.841	0,3	1		
<b>WT</b>		6,3			6,3

Enzym bzw. T-DNA	Position [bp]	Δ [kb]	T-DNA		Signal [KB]
			+LB	+RB	
<i>Eco</i> RI	42.759	9,8	3,7		13,5
<i>T-DNA (C2a)</i>	52.567				8,0
<i>Eco</i> RI	56.837	4,3	3,7		
<b>WT</b>		14,1			14,1

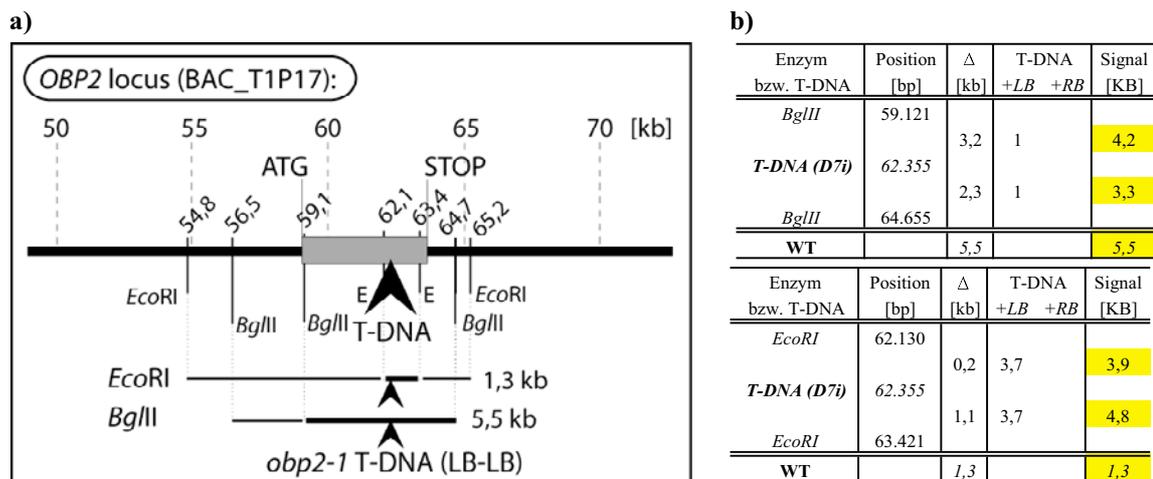
**Abb. 3.48: Struktur des genomischen *IAP2*-Locus.** Die Abbildung ist eine schematische Darstellung des *IAP2*-Locus (a). Gezeigt ist der flankierende, genomische Bereich um das *IAP2*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (53.176) und STOP-Codons (51.989) gegeben. Die schwarzen Pfeile zeigen die Position der T-DNA-Insertion der *iap2-1*-Mutante im *IAP2*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten. Die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. Die Tabellen (b) enthalten die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente, die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutante auftreten. Genauere Angaben sind der Abb.3.44 zu entnehmen.



**Abb. 3.49: Genomische Southern-Blot-Analyse der *iap2-1*-Mutante.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden. Genomische DNA der *iap2-1*-Mutante (Koncz\_#65.800) und des *Columbia*-Wildtyps (WT) wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*III bzw. *Eco*RI gespalten. Die Hybridisierung der *Co*/WT-DNA mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southernexperiment, wurde wie in Abb.3.45 bzw. 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

### 3.2.3.1.4 Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp2-1*-Mutante

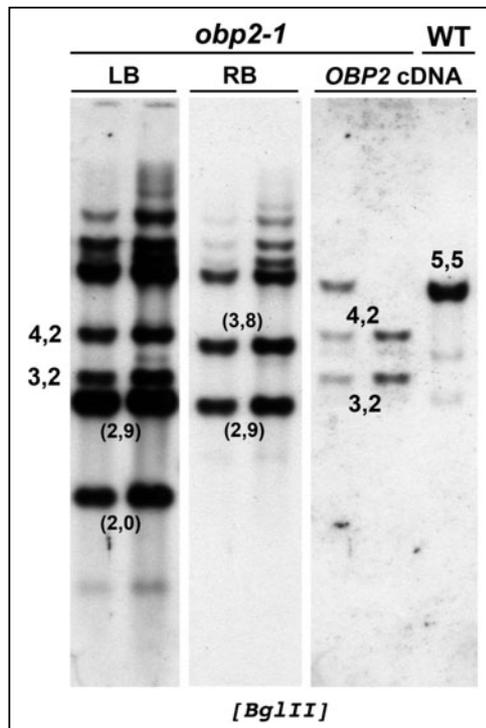
Für die Southern-Blot-Analyse der *obp2-1*-Mutante (Koncz\_#5.451) wurde DNA der hygromycinresistenten Linie “D7-i” und einer heterozygoten Linie eingesetzt (3.2.2.2). Die Abbildung 3.50 zeigt eine schematische Darstellung des genomischen *OBP2*-Locus, die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.51 zu sehen.



**Abb. 3.50: Struktur des genomischen *OBP2*-Locus.** Die Abbildung ist eine schematische Darstellung des *OBP2*-Locus (a). Zu sehen ist, der flankierende, genomische Bereich um das *OBP2*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (58.995) und STOP-Codons (63.651) gegeben. Die schwarzen Pfeile geben die Position der T-DNA Insertion der *obp2-1*-Mutante im *OBP2*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten an. Die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. In den Tabellen (b) sind die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente, die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutante auftreten, zu sehen. Genauere Angaben sind der Abb.3.44 zu entnehmen.

Die Hybridisierungen zeigen die erwarteten Signale von 4,2 kb und 3,2 kb mit der LB-Sonde und DNA der *iap2-1*-Mutante (Abb.3.51 Spur 1 und 2). Unter Verwendung der RB-Sonde sind zwei weitere Fragmente der Größen 3,8 kb und 2,9 kb zu erkennen (Abb.3.51 Spur 3 und 4). Das 3,8 kb-Fragment erscheint nur bei der RB-Sonde. Die Größe entspricht einem RB-RB-Fragment einer Tandeminsertion. Im Gegensatz dazu tritt das 2,9 kb-Fragment bei beiden T-DNA-Sonden auf, diese Größe entspricht einem LB-RB-Fragment einer Tandeminsertion. Die Hybridisierung mit der genspezifischen cDNA-Sonde zeigt mit WT-DNA das erwartete Signal von 5,5 kb, mit DNA der *iap2-1*-Linie “D7-i” (rechts) sind nur die Signale der Größe 4,2 kb und 3,2 kb zu sehen (Abb.3.51 Spur 7, 6 und 5). Weil mit der genspezifischen Sonde nur die Hybridfragmente (4,2 kb; 3,2 kb), nicht aber das WT-Fragment (5,5 kb) erscheint, belegt die Analyse eindeutig, daß die Linie “D7-i” in Bezug auf die T-DNA-Insertion im *OBP2*-Gen homozygot ist. Da bei der Hybridisierung mit der genspezifischen Sonde bei der anderen *obp2-1*-Linie (links) neben den Hybridfragmenten

(4,2 kb; 3,2 kb) auch das WT-Fragment (5,5 kb) erkennbar ist, belegt diese Analyse auch, daß es sich um eine heterozygote Linie handelt. Mit den T-DNA-spezifischen Sonden wurden auch weitere Signale detektiert, die von keiner Tandeminserktion stammen können. Deshalb ist davon auszugehen, daß diese Linie auch weitere T-DNA-Insertionen trägt.

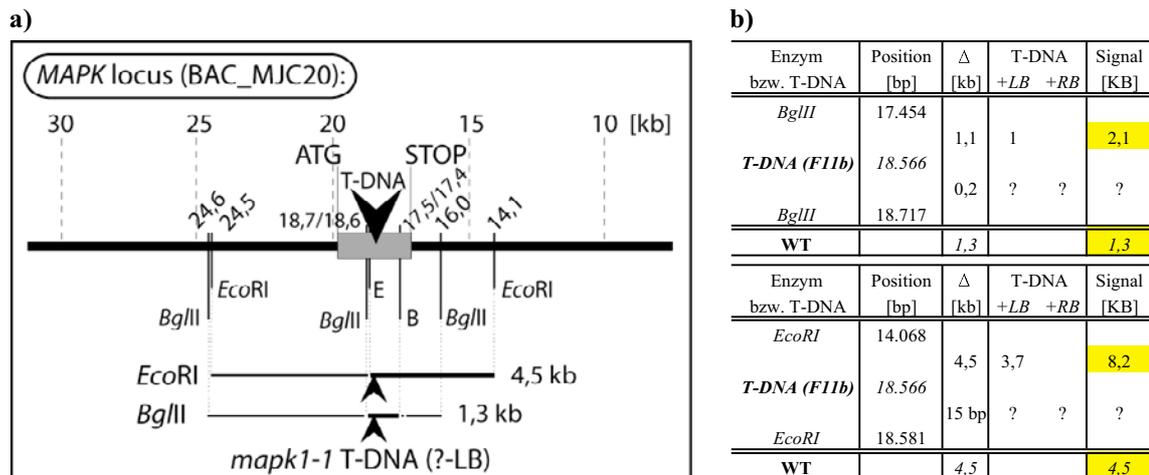


**Abb. 3.51: Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp2-1*-Mutante.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden. Genomische DNA der *obp2-1*-Mutante (Koncz\_#5.451) und des *Columbia*-Wildtyps (WT) wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*III gespalten. Die Hybridisierung der *Co*/WT-DNA mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southern-Experiment wurde, wie in Abb.3.45 bzw. 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

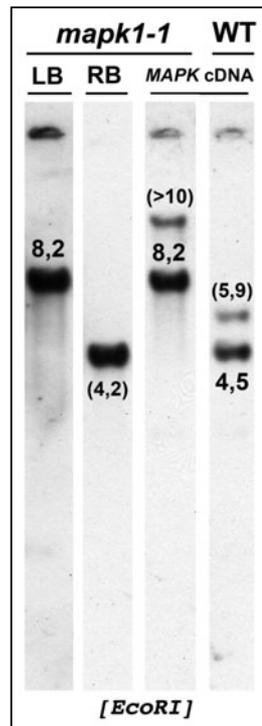
### 3.2.3.1.5 Genomische Southern-Blot-Analyse der *mapk1-1*-Mutante

Für die Southern-Blot-Analyse der *mapk1-1*-Mutante (Koncz\_#55.760) wurde DNA der hygromycinresistenten Linie "F11-b" eingesetzt (3.2.2.2). Die Abbildung 3.52 zeigt eine schematische Darstellung des genomischen *MAPK1*-Locus, die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.53 gezeigt.

Die Hybridisierung mit der LB-Sonde weist das erwartete Signal von 8,2 kb auf (Abb.3.53 Spur 1). Mit der RB-Sonde und DNA der *mapk1-1*-Mutante ergibt sich ein Signal von 4,2 kb, was der Größe eines RB-RB-Tandemfragmentes entspricht (Abb.3.53 Spur 2). Weil in der PCR-Analyse der *mapk1-1*-Mutante nur für eine Seite der Insertion ein PCR-Amplifikat erhalten wurde, konnte für die Hybridisierung auch nur ein Fragment, das 8,2 kb Signal mit der LB-Sonde, vorhergesagt werden. Bei der Hybridisierung mit der genspezifischen cDNA-Sonde und WT-DNA sind die erwarteten Signale von 4,5 kb und 5,9 kb zu erkennen (Abb.3.53 Spur 4). Das 5,9 kb-Fragment erscheint deutlich schwächer, da es nur in einem kurzen Bereich mit der Sonde überlappt. Mit *mapk1-1*-DNA und der genspezifischen cDNA-Sonde tritt das erwartete 8,2 kb-Fragment sowie ein weiteres Fragment >10 kb auf, das, wie das 5,9 kb-Fragment, ein deutlich schwächeres Signal aufweist (Abb.3.53 Spur 3).



**Abb. 3.52: Struktur des genomischen *MAPK1*-Locus.** Die Abbildung ist eine schematische Darstellung des *MAPK1*-Locus (a). Gezeigt ist der flankierende genomische Bereich um das *MAPK1*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (19.795) und STOP-Codons (17.318) gegeben. Die schwarzen Pfeile geben die Position der T-DNA Insertion der *mapk1-1*-Mutante im *MAPK1*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten an. Die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. Die Tabelle (b) führt die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente auf die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutante auftreten. Genauere Angaben sind der Abb.3.44 zu entnehmen.



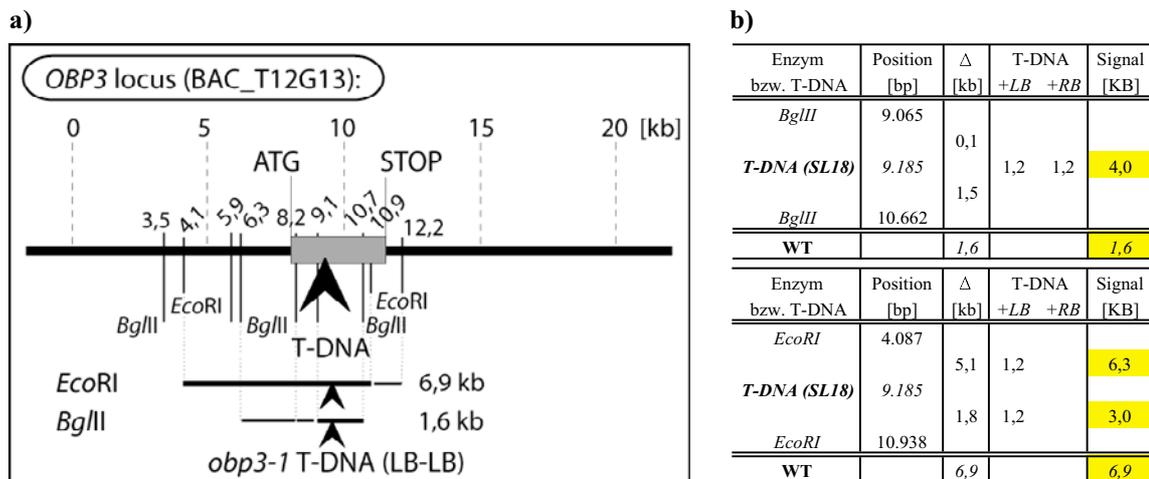
**Abb. 3.53: Genomische Southern-Blot-Analyse der *mapk1-1*-Mutante.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden. Genomische DNA der *mapk1-1*-Mutante (Koncz\_#55.760) und des *Columbia*-Wildtyps (WT) wurde mit der Restriktionsendonuclease *EcoRI* gespalten. Die Hybridisierung der *Col*/WT-DNA mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southern-Experiment wurde, wie in Abb.3.45 bzw. 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

Da in der Hybridisierung der *mapk1-1*-DNA mit der cDNA-Sonde das 5,9 kb-Fragment fehlt bzw. eine Größenzunahme um mindestens 4 kb aufweist, muß die T-DNA-Insertion in der *mapk1-1*-Mutante die benachbarte, ca. 15 bp entfernte *EcoRI* Spaltstelle zerstört haben. Die inserierte

T-DNA wird durch die Restriktionsendonuclease *EcoRI* gespalten. Dabei entstehen zwei Fragmente. Wie erwartet, ist das 3,7 kb große Fragment, das den “left-border”-Bereich abdeckt, mit dem genomischen 4,5 kb-Fragment fusioniert, der andere Teil der T-DNA mit dem 5,9 kb-Fragment. Dieser Teil der inserierten DNA ist ca. 4 kb groß. Weil dieses Fragment mit keiner der T-DNA-spezifischen Sonden hybridisiert, handelt es sich um ein Stück T-DNA ohne “border”-Bereich oder um ein Fragment unbekannter Herkunft. Die Analyse zeigt eindeutig, daß die Linie “*F11-b*” in Bezug auf die T-DNA Insertion im *MAPK1*-Gen homozygot ist, da bei der Hybridisierung mit der genspezifischen cDNA-Sonde keines der WT-Fragmente detektiert wird.

### 3.2.3.1.6 Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp3-1*-Mutante

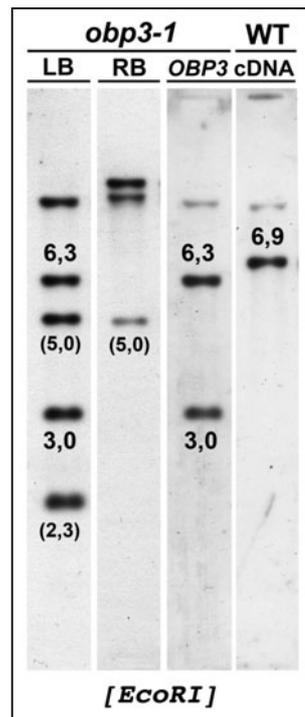
Für die Southern-Blot-Analyse der *obp3-1*-Mutante (Salk\_N530489) wurde DNA der SALK-Einzellinie “*SL18*” eingesetzt (3.2.2.3). Die Abbildung 3.54 zeigt eine schematische Darstellung des genomischen *OBP3*-Locus und die Positionen, an denen die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird sowie die zu erwartenden Fragmentgrößen in der Southernhybridisierung. Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 3.55 dargestellt.



**Abb. 3.54: Struktur des genomischen *OBP3*-Locus.** Die Abbildung ist eine schematische Darstellung des *OBP3*-Locus (a). Gezeigt ist der flankierende, genomische Bereich um das *OBP3*-Gen, das als grauer Kasten dargestellt ist. Die Orientierung des Gens ist durch die Position des ATG- (7.759) und STOP-Codons (11.392) gegeben. Die schwarzen Pfeile geben die Position der T-DNA-Insertion der *obp3-1*-Mutante im *OBP3*-Gen und in den sich ergebenden Restriktionsfragmenten an. Die Positionen, an den die genomische DNA von den verwendeten Restriktionsendonucleasen gespalten wird, sind eingezeichnet. Die Tabelle (b) zeigt die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente, die bei einer Restriktionsspaltung genomischer WT-DNA und DNA der isolierten T-DNA-Mutante auftreten. Genauere Angaben sind der Abb.3.44 zu entnehmen.

Die Hybridisierung mit der LB-Sonde zeigt die erwarteten Signale von 3,0 kb und 6,3 kb bei DNA der *obp3-1*-Mutante (Abb.3.55 Spur 1). Bei den Hybridisierungen mit der genspezifischen cDNA-Sonde ist mit WT-DNA das erwartete Signal von 6,9 kb aufgetreten, mit DNA der *obp3-1*-Mutante sind nur die Signale der Größe 3,0 kb und 6,3 kb zu sehen (Abb.3.55 Spur 4 und 3). Da mit der genspezifischen

Sonde nur die Hybridfragmente (3,0 kb; 6,3 kb) und nicht das WT-Fragment (6,9 kb) erkennbar ist, belegt diese Analyse eindeutig, daß die Linie "SL18" in Bezug auf die T-DNA-Insertion im *OBP3*-Gen homozygot ist. Mit beiden T-DNA-Sonden konnte ein 5,0 kb-Fragment detektiert werden. Dies weist eine LB-RB-Tandem-T-DNA-Integration nach. Im Gegensatz dazu, deutet das 2,3 kb-Fragment auf eine LB-LB-Tandem-T-DNA-Integration hin. Die weiteren Fragmente die mit den T-DNA-Sonden detektiert wurden, können jedoch keiner Tandem-Integration zugeordnet werden. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß diese Linie weitere T-DNA-Insertionen trägt.



**Abb. 3.55: Genomische Southern-Blot-Analyse der *obp3-1*-Mutante.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit T-DNA-spezifischen (LB; RB) und genspezifischen (cDNA) Sonden. Genomische DNA der *obp3-1*-Mutante (SL18; N040837) und des *Columbia*-Wildtyps (WT) wurde mit der Restriktionsendonuclease *EcoRI* gespalten. Die Hybridisierung der *Col*-WT-DNA mit den T-DNA-Sonden ergab kein Signal (nicht gezeigt). Das Southern-Experiment wurde, wie in Abb.3.45 bzw. 2.2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

### 3.2.3.2 Expressionsanalysen der isolierten T-DNA-Mutanten mittels RT-PCR

Nachdem anhand der Southern-Bot-Analysen die Identitäten der isolierten T-DNA-Mutanten eindeutig belegt werden konnten, stellte sich die Frage ob, die T-DNA-Insertionen wirklich zu Nullmutationen führen. Für die CPD-Interaktionspartner, IAP1 und MAPK wurden T-DNA-Mutanten isoliert, die T-DNA-Insertionen in Exons tragen. Diese T-DNA-Insertionen verändern die codierende Sequenz der entsprechenden Gene. In denen Mutanten können keine wildtypischen Transkripte dieser Gene gebildet werden. Im Fall des dritten CPD-Interaktionspartners, OBP1, wurde eine T-DNA-Mutante isoliert, deren T-DNA in einem Intron inseriert ist. Aufgrund dieser Insertionsposition wird die codierende Sequenz des *OBP1*-Gens nicht verändert. Daher ist es theoretisch möglich, daß für den Fall, daß die inserierte T-DNA mit dem Intron herausgespleißt wird, ein Wildtyp-*OBP1*-Transkript gebildet werden kann. Deshalb ist es im Falle der *obp1-1*-Mutante fraglich, ob es sich um eine Nullmutante handelt und ob ein Wildtyp-Transkript des *OBP1*-Gens vorliegt. Um dieser Frage nachzugehen wurde eine RT-PCR-Analyse der *obp1-1*-Mutante durchgeführt (3.2.3.2.1). Zum Vergleich wurde parallel die entsprechende Analyse der *iap1-1*-Mutante vorgenommen (3.2.3.2.2). Der Vollständigkeit halber wurden auch die *iap2-1*, *obp2-1* und *mapk1-1*-Mutanten analysiert (3.2.3.2.2.3).

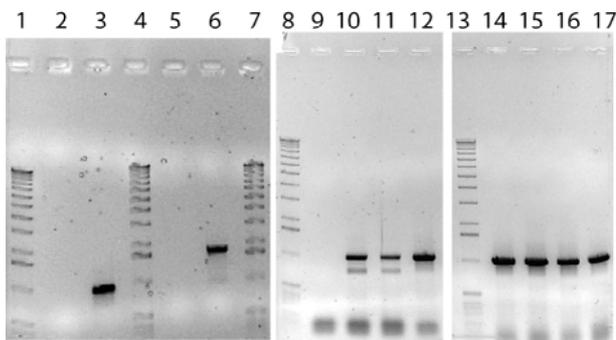
#### 3.2.3.2.1 Analyse der *OBP1*-Expression in der *obp1-1*-Mutante mittels RT-PCR

Wie bereits erläutert, befindet sich die T-DNA-Insertion der *obp1-1*-Mutante im vierten Intron des *OBP1*-Gens. Um zu überprüfen, ob in dieser Mutante ein Wildtyp-Transkript des *OBP1*-Gens vorliegt, wurde die hier gezeigte RT-PCR-Analyse der *obp1-1*-Mutante durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Keimlingen der *obp1-1*-Mutante (N530489) und zum Vergleich auch von *Columbia*-Wildtyp-Keimlingen (*Col*/WT) isoliert. Für die *obp1-1*-Mutante sind Keimlinge der isolierten Einzellinie „*SL13*“, für die Wildtyp-Kontrolle Keimlinge der Einzellinie „*SL08*“ verwendet worden (3.2.2.3). Bei der Einzellinie „*SL08*“ handelt es sich um Nachkommen einer Wildtyppflanze der SALK-Population, die keine T-DNA-Insertion trägt. Dies wurde durch Southern-Blot-Analysen mit T-DNA-spezifischen Sonden überprüft (siehe Abb.3.45; Southern-Analyse der *iap1-2*-Mutante).

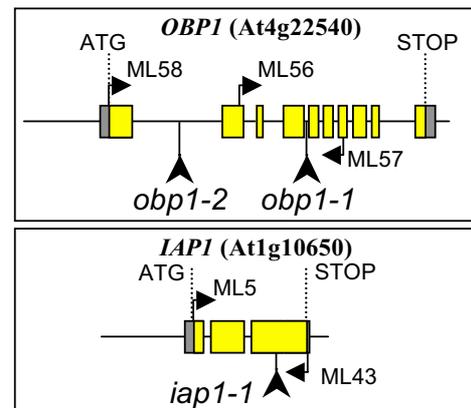
Die isolierte RNA wurde, wie in Kapitel 2.2.1.2.8 beschrieben, zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erhaltene cDNA diente in einer PCR mit spezifischen Primern für das *OBP1*-Transkript als Matrize. Für die RT-PCR sind zwei Primerkombinationen eingesetzt worden, die beide die Position der inserierten T-DNA, in der *obp1-1*-Mutante flankieren. Es wurden ganz bewusst keine Primer verwendet, die das gesamte *OBP1*-Transkript abdecken, weil es mit ca. 2 kb sehr groß ist und die Amplifikation kleinerer Fragmente weit effizienter und damit sensitiver ist. Mit den verwendeten Primerkombinationen ML56+ML57 und ML58+ML57 ergeben sich Amplifikate der Größe 963 bp und 1.677 bp mit cDNA als Matrize. Aufgrund der Positionen der verwendeten Primern ergibt sich, daß die erwarteten Amplifikate mit cDNA der *obp1-1*-Mutante als Matrize, nur dann amplifiziert werden können, wenn die T-DNA-Sequenzen mit dem Intron zusammen aus dem primären Transkript gespleißt wird. Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse ist in Abbildung 3.56 gezeigt.

Die RT-PCR zeigt die erwarteten Amplifikate mit cDNA der Wildtyp-Kontrolle als Matrize. Die Reaktionen mit der *obp1-1*-cDNA als Matrize zeigen keine Amplifikate. Daraus ist zu schließen, daß die T-DNA-Sequenzen in der *obp1-1*-Mutante nicht mit dem Intron herausgespleißt wird und somit kein *OBP1*-Wildtyp-Transkript vorliegt. Des weiteren ist zu erkennen, daß die RNA-Präparationen keine genomische DNA enthielten, es treten keine Amplifikate der entsprechenden Größen von 2.100 bp bzw. 4.100 bp auf. Die Amplifikation der *IAP1*- und *IAP2*-Transkripte mit *obp1-1*-cDNA als Matrize belegt, daß das Ausbleiben der *OBP1*-spezifischen Amplifikate nicht in unzureichender cDNA-Qualität begründet ist.

**a) Gelphotographie der RT-PCR:**



**b) Primer und T-DNA Positionen:**



**c) Gelbelegung:**

- |                                                          |                                                            |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1 DNA-Größenmarker                                       | 8 DNA-Größenmarker                                         |
| 2 <i>obp1-1</i> cDNA / Primer: ML56+ML57 ( <i>OBP1</i> ) | 9 <i>iap1-1</i> cDNA / Primer: ML5 + ML43 ( <i>IAP1</i> )  |
| 3 <i>ColWT</i> cDNA / Primer: ML56+ML57 ( <i>OBP1</i> )  | 10 <i>obp1-1</i> cDNA / Primer: ML5 + ML43 ( <i>IAP1</i> ) |
| 4 DNA-Größenmarker                                       | 11 <i>ColWT</i> cDNA / Primer: ML5 + ML43 ( <i>IAP1</i> )  |
| 5 <i>obp1-1</i> cDNA / Primer: ML58+ML57 ( <i>OBP1</i> ) | 12 <i>SL08</i> cDNA / Primer: ML5 + ML43 ( <i>IAP1</i> )   |
| 6 <i>ColWT</i> cDNA / Primer: ML58+ML57 ( <i>OBP1</i> )  | 13 DNA-Größenmarker                                        |
| 7 DNA-Größenmarker                                       | 14 <i>iap1-1</i> cDNA / Primer: ML6 + ML42 ( <i>IAP2</i> ) |
|                                                          | 15 <i>obp1-1</i> cDNA / Primer: ML6 + ML42 ( <i>IAP2</i> ) |
|                                                          | 16 <i>ColWT</i> cDNA / Primer: ML6 + ML42 ( <i>IAP2</i> )  |
|                                                          | 17 <i>SL08</i> cDNA / Primer: ML6 + ML42 ( <i>IAP2</i> )   |

**Abb. 3.56: RT-PCR-Analyse der *obp1-1*- und *iap1-1*-Mutante.** RNA von Keimlingen der *obp1-1* (N530489), der *iap1-1*-Mutante (Koncz #101), und des *Columbia*-Wildtyps (*ColWT* bzw. *SL08*) wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erhaltenen cDNAs sind als Matrize in einer PCR mit *OBP1*- (1 bis 7), *IAP1*- (8 bis 12) und *IAP2*-spezifischen Primern (13 bis 17) eingesetzt worden. Es wurden die *OBP1*-spezifischen Primerkombinationen ML56+ML57 und ML58+ML57 verwendet, die beide die T-DNA-Insertion in der *obp1-1*-Mutante überspannen. Die Primerkombination ML56+ML57 ergibt ein Amplifikat der Größe 963 bp mit cDNA, ein Amplifikat von 2.100 bp mit genomischer DNA als Matrize. Für die Primerkombination ML58+ML57 ergeben sich entsprechend Amplifikate der Größe 1.677 bp und 4.100 bp. Die *IAP1*- bzw. *IAP2*-spezifischen Primerkombinationen überspannen ebenfalls die T-DNA-Insertionen in den entsprechenden Mutanten. Die *IAP1*-spezifische Primerkombination ML5+ML43 ergibt ein Amplifikat der Größe 1007 bp mit cDNA und ein Amplifikat der Größe 1.196 bp mit genomischer DNA als Matrize. Für die *IAP2*-spezifische Primerkombination ML6+ML42 ergeben sich entsprechend Amplifikate der Größe 1.022 bp und 1187 bp. Die cDNA Synthese und die PCR-Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. In **a)** sind die Gelbilder, in **b)** eine graphische Darstellung der T-DNA- sowie Primerpositionen und in **c)** die genaue Gelbelegung gezeigt. Die Positionen der *IAP2*-spezifischen Primer sind nicht gezeigt, sie wurden ebenfalls an ATG- und STOP-Codon positioniert. Die Struktur des *IAP2*-Gens entspricht der des *IAP1*-Gens (Abb.3.42). Primersequenzen siehe Anhang 6.3.

### 3.2.3.2.2 Analyse der *IAP1*-Expression in der *iap1-1*-Mutante mittels RT-PCR

Parallel zur Expressionsanalyse der *OBP1*-Expression in der *obp1-1*-Mutante wurde die Expression des *IAP1*-Gens und zur Kontrolle des *IAP2*-Gens in der *iap1-1*-Mutante durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Keimlingen der *iap1-1*-Mutante (Koncz\_#101) und zum Vergleich von *Columbia*-Wildtyp-Keimlingen (*Col*WT) isoliert. Für die *iap1-1*-Mutante sind Keimlinge der isolierten Einzellinie „A3-17-4“ verwendet worden (3.2.2.2).

Die isolierte RNA wurde, wie in Kapitel 2.2.1.2.8 beschrieben, zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erhaltene cDNA diente in einer PCR mit spezifischen Primern für das *IAP1*- und *IAP2*-Transkript als Matrize. Die verwendeten Primerkombinationen decken das gesamte Transkript des entsprechenden *IAP*-Gens vom ATG bis zum STOP-Codon ab. Dies ist im Fall der *IAP*-Gene nötig, weil sie sehr klein sind und es nur so sichergestellt werden kann, daß der Größenunterschied zwischen dem Amplifikat der cDNA und dem der genomischen DNA zu erkennen ist. Mit den verwendeten Primerkombinationen ML5+43 und ML6+ML42 ergeben sich Amplifikate der Größe 1.007 bp und 1.022 bp mit cDNA als Matrize. Die möglichen Amplifikate genomischer DNA sind nur ca. 200 bp größer. Aus den Positionen der verwendeten Primer ergibt es sich, daß die erwarteten Amplifikate mit cDNA als Matrize nur dann auftreten können, wenn keine T-DNA vorliegt oder wenn diese ausgespleißt wird. Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse ist in Abbildung 3.56 dargestellt.

Die RT-PCR zeigt die erwarteten Amplifikate mit cDNA der Wildtyp-Kontrollen und der *obp1-1*-Mutante als Matrize. Die Reaktionen mit der *iap1-1*-cDNA als Matrize zeigen keine Amplifikate mit der *IAP1*-spezifischen wohl aber mit der *IAP2*-spezifischen Primerkombination. Daraus ist zu schließen, daß die T-DNA in der *iap1-1*-Mutante nicht ausgespleißt wird und somit kein *IAP1*-Wildtyp-Transkript vorliegt. Des weiteren ist zu erkennen, daß die RNA-Präparationen keine genomische DNA enthielten. Es treten keine Amplifikate der entsprechenden Größen von 1.196 bp bzw. 1.187 bp auf.

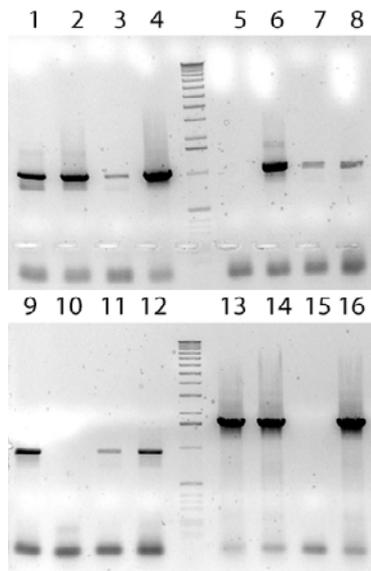
### 3.2.3.2.3 Analyse der *IAP2*-, *OBP2*- und *MAPK1*-Expression in der entsprechenden *iap2-1*-, *obp2-1*- bzw. *mapk1-1*-Mutante mittels RT-PCR

Die Analyse der *IAP2*-, *OBP2*- und *MAPK1*-Expression in den entsprechenden Mutanten zeigt das gleiche Bild wie die zuvor beschriebene Analyse der *IAP1*- und *OBP1*-Expression. Für die Analyse wurde RNA der *iap2-1* (C2a), der *obp2-1* (D7i) und der *mapk1-1*-Mutante (F11b) sowie des *Columbia*-Wildtyps eingesetzt (3.2.2.2, 3.2.2.3).

Als Kontrolle wurde, mit allen cDNAs als Matrize, das *IAP1*-Transkript amplifiziert. Auch die *IAP2*-, *OBP2*- und *MAPK1*-Transkripte konnten mit allen cDNAs als Matrize - außer mit denen der entsprechenden T-DNA-Mutante (Abb. 3.57; Spur 5, 10, 15) - amplifiziert werden. Damit können alle analysierten T-DNA-Mutanten als Nullmutanten bestätigt werden, in keiner Mutante ist ein wildtypisches Transkript des betroffenen Gens identifiziert worden. Zu Expressionsanalyse der *IAP2*-, *OBP2*- und *MAPK1*-Gene wurden wie für die *IAP1*- und *OBP1*-Gene beschrieben,

Oligonucleotidpaare eingesetzt, die die entsprechenden T-DNA-Insertionen überspannen. In Abbildung 3.57 ist gezeigt, daß die erhaltenen Amplifikate die erwarteten Fragmentgrößen aufweisen.

**a) Gelphotographie der RT-PCR:**



**b) Gelbelegung:**

- 1 *iap2-1* cDNA / Primer: ML05+ML43 (*IAP1*)
- 2 *obp2-1* cDNA / Primer: ML05+ML43 (*IAP1*)
- 3 *mapk1-1* cDNA / Primer: ML05+ML43 (*IAP1*)
- 4 *Col/WT* cDNA / Primer: ML05+ML43 (*IAP1*)  
DNA-Größenmarker
- 5 *iap2-1* cDNA / Primer: ML06+ML42 (*IAP2*)
- 6 *obp2-1* cDNA / Primer: ML06+ML42 (*IAP2*)
- 7 *mapk1-1* cDNA / Primer: ML06+ML42 (*IAP2*)
- 8 *Col/WT* cDNA / Primer: ML06+ML42 (*IAP2*)
- 9 *iap2-1* cDNA / Primer: ML30+ML31 (*OBP2*)
- 10 *obp2-1* cDNA / Primer: ML30+ML31 (*OBP2*)
- 11 *mapk1-1* cDNA / Primer: ML30+ML31 (*OBP2*)
- 12 *Col/WT* cDNA / Primer: ML30+ML31 (*OBP2*)  
DNA-Größenmarker
- 13 *iap2-1* cDNA / Primer: ML16+ML17 (*MAPK1*)
- 14 *obp2-1* cDNA / Primer: ML16+ML17 (*MAPK1*)
- 15 *mapk1-1* cDNA / Primer: ML16+ML17 (*MAPK1*)
- 16 *Col/WT* cDNA / Primer: ML16+ML17 (*MAPK1*)

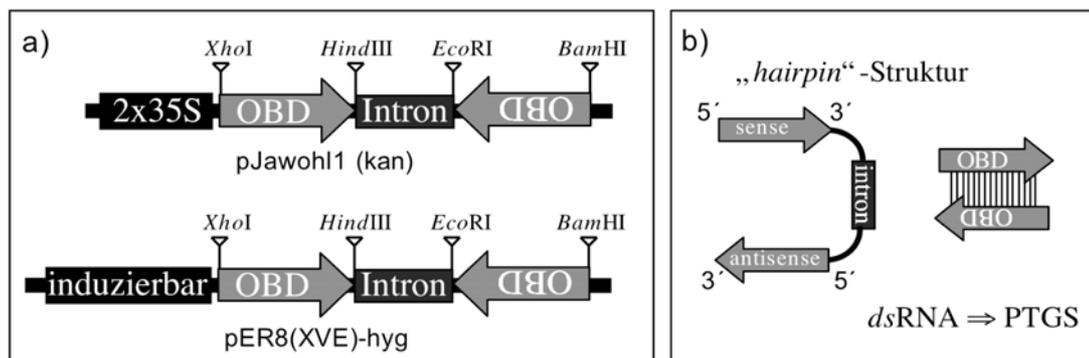
**Abb. 3.57: RT-PCR-Analyse der *iap2-1*-, *obp2-1*- und *mapk1-1*-Mutante.** RNA von Keimlingen der *iap2-1* (#65.800, C2A), der *obp2-1* (#5.451, D7i), der *mapk1-1* (#55.760, F11B) Mutante und des *Columbia*-Wildtyp (*Col/WT*) wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erhaltenen cDNAs sind als Matrize in einer PCR mit *IAP1*-, *IAP2*-, *OBP2*-, *MAPK1*-spezifischen Primern eingesetzt worden. Es kamen die Primerkombinationen ML05+ML43, ML06+ML42, ML30+ML31 und ML16+ML17 zum Einsatz, die jeweils die entsprechende T-DNA-Insertion in der *iap1*, *iap2*, *obp2-1* und *mapk1*-Mutante überspannen. Die Primerkombination ML05+ML43 ergibt ein Amplifikat der Größe 1007 bp mit cDNA, ein Amplifikat von 1.196 bp mit genomischer DNA als Matrize. Für die Primerkombination ML06+ML42 ergeben sich entsprechend Amplifikate der Größe 1.022 bp und 1.187 bp, für die Primerkombination ML30+ML31 entsprechend Amplifikate der Größe 952 bp und 2.260 bp und für die Primerkombination ML16+ML17 entsprechend Amplifikate der Größe 1.691 bp und 2.477 bp.

### 3.2.4 Generation von *obp*-Mutanten mittels konstitutiver und induzierbarer *dsRNAi*-Konstrukte

Neben der Analyse der T-DNA-Mutanten wurden alternativ auch zwei *dsRNAi*-Konstrukte auf Basis der *OBP1*-cDNA-Sequenz hergestellt. Da durch ein induziertes Gen-*silencing* auch homologe Gene ausgeschaltet werden können, schien die *dsRNAi*-Technologie optimal zur Durchbrechung der Redundanz innerhalb einer Genfamilie geeignet zu sein.

Zur Herstellung der Konstrukte wurde ein Teil der *OBP1*-cDNA von Position ca. 900 bp bis ca. 1550bp mit den Oligonucleotiden ML67 und ML83 bzw. ML69 und ML84 amplifiziert. Es folgte dann die sequenzielle Klonierung über *EcoRI* und *BamHI* bzw. *XhoI* und *HindIII* Restriktionsspaltung in den Vector pJawohl1(NPT). Zur Generation des induzierbaren *dsRNAi*-Konstruktes wurden die durch ein Intron getrennten *OBP1*-Fragmente nach einer Restriktionsspaltung mit *XhoI* und *BamHI* in den Vector pER8(XVE)-hyg kloniert.

Mit dem *dsRNAi*-Konstrukt, dessen Expression durch einen konstitutiven 2x35S-Promotor reguliert war, konnten keine transgenen Pflanzen isoliert werden. Mit dem induzierbaren *dsRNAi*-Konstrukt konnten problemlos diverse unabhängige Transformanten isoliert werden. Weder durch die Anzucht auf östradiolhaltigen Agarplatten noch durch Besprühen mit  $\beta$ -Östradiol konnten irgendwelche phänotypischen Veränderungen induziert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb muss, vor weiteren Analysen, die Funktionalität des induzierbaren RNAi-Konstruktes auf RNA-Ebene überprüft werden.



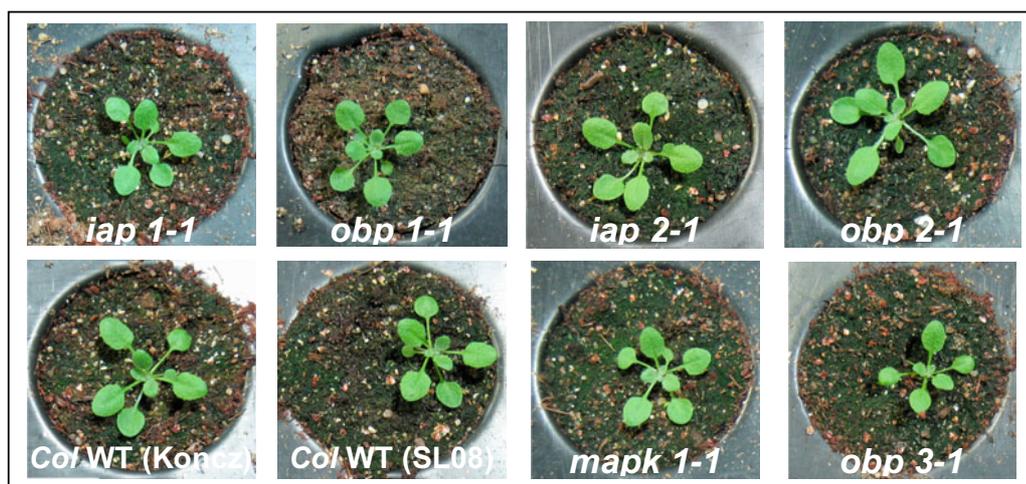
**Abb. 3.58: Übersicht der *dsRNAi*-Konstrukte.** Die Abbildung zeigt die generierten *dsRNAi*-Konstrukte (a) sowie die erwartete „hairpin“-Struktur (b), die zur Bildung der doppelsträngigen (*ds*) RNA-Fragmente führt und ein *Post-Transkriptionelles-Gen-Silencing* (PTGS) der homologen oxysterolbindenden Domänen (OBD) verursachen soll. Dazu wurden zwei Konstrukte hergestellt, ein konstitutives 35S-Konstrukt (a, oben) und ein durch  $\beta$ -Östradiol induzierbares Konstrukt (a, unten). Zur Herstellung der Konstrukte wurden die *AtOBP1*-cDNA sowie die Vektoren „pJawohl-1(NPT)“ bzw. „pER8(XVE)-hyg“ verwendet.

### 3.3 Phänotypische Analysen der homozygoten T-DNA-Linien

Zur phänotypischen Analyse der isolierten T-DNA-Mutanten wurden Pflanzen der beschriebenen homozygoten Linien *iap1-1* (Koncz #101; A174), *iap2-1* (Koncz #65.800; C2A), *obp1-1* (N530489; SL13), *obp2-1* (Koncz #5.451; D7i), *obp3-1* (N040837; SL18) und *mapk1-1* (Koncz #55.760; F11B) im Gewächshaus auf Erde und in Sterilkultur auf Agarplatten angezogen. Die Phänotypen der einzelnen T-DNA-Mutanten der CPD-Interaktionspartner sind im Anschluss mit dem des *Columbia*-Wildtyps und den bekannten Brassinosteroidbiosynthesemutanten *det2/dwf6* (Fujioka S. *et al.*, 1997); *dwf4* (Choe S. *et al.*, 1998) und *cpd/dwf3* (Szekeres M. *et al.*, 1996) sowie den Signaltransduktionsmutanten *bri1* (Clouse S.D. *et al.*, 1996) und *bri1-5* (Noguchi T. *et al.*, 2000) verglichen worden. Darüber hinaus wurden die Mutanten dem klassischen Wurzelwachstums-Inhibitionstest auf Hochsteroidplatten (Clouse S.D. *et al.*, 1996) unterzogen. Die Transkription der CPD-Interaktionspartner wurde mittels Promotor::GUS-Fusionen analysiert, die Proteinlokalisierung wird ebenfalls mit GFP-Fusionen untersucht werden.

#### 3.3.1 Phänotypen der homozygoten T-DNA-Mutanten

Die isolierten T-DNA-Mutanten wurden parallel im Gewächshaus in 54er-Multiplatten, je 27 Pflanzen pro Linie, unter Langtag- und Kurztagbedingungen angezogen. Die Phänotypen wurden, wie in Abbildung 3.59 gezeigt, verglichen. Die Abbildung zeigt eine Aufsicht auf die Rosetten 20 Tage alter Pflanzen, die im Gewächshaus auf Erde angezogen wurden. Der Vergleich der drei Wochen alten Pflanzen zeigt keine auffälligen Unterschiede zwischen den isolierten Mutanten und dem *Columbia*-Wildtyp bzw. den bekannten Steroidmutanten. Die beschriebenen Pflanzen wurden auch zu einem späteren Zeitpunkt analysiert. In Abbildung 3.60 sind die Phänotypen adulter Pflanzen zu sehen.



**Abb. 3.59: Phänotypischer Vergleich der isolierten, homozygoten T-DNA-Mutanten.** Die Abbildung zeigt ca. 3 Wochen alte, auf Erde unter Langtagbedingungen angezogene Pflanzen, der isolierten T-DNA-Linien im Vergleich zum *Columbia*-Wildtyp. Es wurden die Linien *iap1-1* (Koncz #101; A174), *iap2-1* (Koncz #65.800; C2A), *obp1-1* (N530489; SL13), *obp2-1* (Koncz #5.451; D7i), *obp3-1* (N040837; SL18) und *mapk1-1* (Koncz #55.760; F11B) verwendet.



**Abb. 3.60: Phänotypischer Vergleich adulter Pflanzen der isolierten T-DNA-Mutanten.** Die Abbildung zeigt den *Columbia*-Wildtyp der Koncz-Population (a) bzw. der SALK-Population (f), die *iap1-1*- (b), die *iap2-1*- (c), die *obp2-1*- (d), die *mapk1-1*- (e) und die *obp1-1*-Mutante (g). Es handelt sich dabei um ca. acht Wochen alte Pflanzen, die im Gewächshaus unter Kurztag-Bedingungen angezogen wurden. Der Durchmesser der gezeigten Töpfe beträgt sechs cm. Es wurden die in Abb.3.60 genannten Linien verwendet

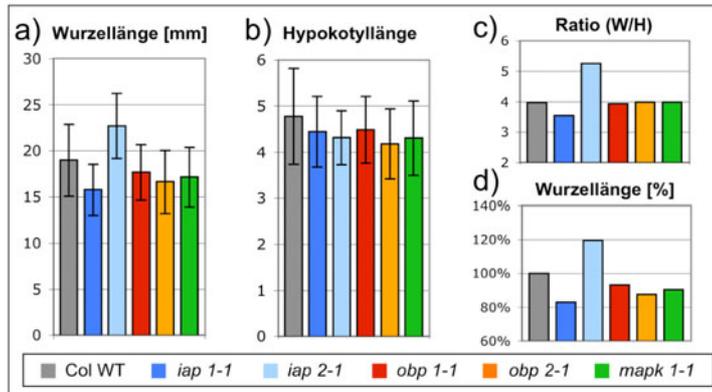
Auch die Betrachtung der Gesamthöhe der Pflanzen am Ende des Entwicklungszyklus weist nur geringe Unterschiede von maximal 6 % der Gesamthöhe auf (Abb.3.61). Bei einer allgemeinen Varianz von 5 % bis 10 % erscheint das als nicht signifikant. Zum Vergleich wurde auch die Gesamthöhe der – mit dem nativ-Promotorkonstrukt komplementierten – *cpd*-Mutante ermittelt. Diese ist 6 % größer als der Wildtyp, die *iap1-1*- und die *obp1-1*-Mutante sind 5 % bzw. 4 % kleiner als die entsprechenden Wildtypen. Der phänotypische Vergleich, insbesondere die ermittelten Gesamthöhen, bestätigt erneut die volle Komplementation der *cpd*-Mutante mit dem nativen Promotorkonstrukt.

Linie	Gesamthöhe (G)			$X_G/WT_G$	T-Test
	[cm]	[±cm]	[±%]		
<i>Col</i> WT (1)	42,3	3,4	8,0%	100%	-
<i>iap1-1</i>	40,0	3,9	9,7%	95%	0,03
<i>iap2-1</i>	42,5	3,7	8,8%	100%	0,88
<i>obp2-1</i>	42,3	3,6	8,4%	100%	0,96
<i>mapk1-1</i>	41,9	2,0	4,7%	99%	0,62
nP::CG131	44,8	3,8	8,5%	106%	0,03
<i>Col</i> WT (2)	42,7	3,5	8,2%	100%	-
<i>obp1-1</i>	40,8	2,8	6,8%	96%	0,05

**Abb. 3.61: Gesamthöhe der analysierten T-DNA-Linien.** Die Gesamthöhe der genannten Linien wurde an seneszenten Pflanzen ermittelt, für jede Linie ist der Mittelwert von 25 Pflanzen gezeigt. In der Tabelle (links) ist die Gesamthöhe (G) und die Standardabweichung sowie die prozentuale Höhe in Bezug auf den entsprechenden Wildtyp ( $X_G/WT_G$ ) zu sehen. Es wurden die in Abb.3.60: genannten Linien verwendet. Der zweiseitige T-Test gibt die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) wieder mit der die jeweilige Gesamthöhe mit der des Wildtyps übereinstimmt.

Unter Gewächshausbedingungen weist keine der isolierten T-DNA-Mutanten der *CPD*-Interaktionspartner phänotypische Gemeinsamkeiten zur *cpd*-Mutante oder zu einer anderen bekannten Steroidmutante auf. Neben dem phänotypischen Vergleich auf Erde angezogener Pflanzen sind auch in Sterilkultur angezogene Pflanzen analysiert worden. Dazu wurden Keimlinge der beschriebenen Linien auf Agarplatten ausgekeimt und nach zwei Tagen geordnet auf neue Platten pikiert. Diese

wurden senkrecht aufgestellt, damit die Wurzeln entlang der Plattenoberfläche wachsen können. Nach zehn Tagen konnten die Keimlinge vermessen und die Wurzel- und Hypokotyllängen ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.62 festgehalten.



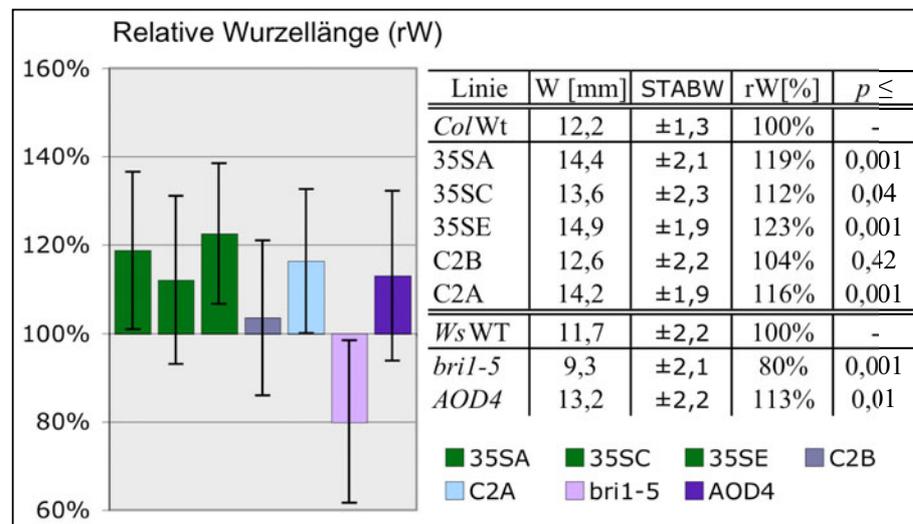
Linie	Wurzel-Länge (W)				Hypocotyl-Länge (H)				Ratio W/H	T-Test $p \leq$
	[mm]	± Δ	[%]	± Δ	[mm]	± Δ	[%]	± Δ		
Col WT	18,9	3,9	100%	21%	4,8	1,0	100%	22%	4,0	-
<i>iap1-1</i>	15,7	2,7	83%	14%	4,4	0,8	93%	16%	3,5	0,01
<i>iap2-1</i>	22,7	3,5	120%	19%	4,3	0,6	90%	12%	5,3	0,001
<i>obp1-1</i>	17,6	3,0	93%	16%	4,5	0,7	94%	15%	3,9	0,44
<i>obp2-1</i>	16,6	3,4	88%	18%	4,2	0,8	88%	16%	4,0	0,58
<i>mapk1-1</i>	17,1	3,2	90%	17%	4,3	0,8	90%	17%	4,0	0,76

**Abb. 3.62: Vergleich der Wurzel- und Hypokotyllängen der homozygoten T-DNA-Mutanten.** Keimlinge der homozygoten Linien und des *Columbia*-Wildtyps wurden in Sterilkultur, auf senkrecht stehenden Agarplatten, angezogen. Die Wurzel- und die Hypokotyllängen sind nach zehn Tagen gemessen worden. In der Tabelle (unten) sind die Mittelwerte von ca. 50 Keimlingen zu sehen. Der T-Test gibt die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ), mit der die jeweilige Ratio W/H mit der des Wildtyps übereinstimmt. Die Balkendiagramme (oben) zeigen eine graphische Darstellung der ermittelten Wurzellängen (a), der Hypokotyllängen (b) und das Verhältnis zwischen Wurzel- und Hypokotyllänge (c). Diagramm (d) gibt die prozentuale Wurzellänge der Mutanten, in Bezug auf die Wurzellänge des *Columbia*-Wildtyps wieder.

Der Vergleich der Hypokotyllängen ergibt keine signifikanten Unterschiede, die Hypokotyle der Mutanten sind gegenüber dem Wildtyp nur leicht verkleinert, die Unterschiede liegen jedoch bei unter 10 % der Gesamtlänge. Der Vergleich der Wurzellängen zeigt ein vergleichbares Bild: die Wurzeln der Mutanten sind im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls verkürzt, die *iap1-1*-Mutante weist die größte Differenz auf, sie beträgt 17 %. Die *iap2-1*-Mutante hat eine um 20 % verlängerte Wurzel. Sie ist damit die einzige untersuchte Mutante, die eine längere Wurzel als der Wildtyp hat.

Trotz der großen Varianz zeigt der Vergleich der *iap1-1* mit der *iap2-1*-Mutante, daß diese Differenz signifikant ist, was an den nicht überlappenden Fehlerbalken in Abbildung 3.62 erkennbar ist. Um die Veränderungen der Wurzel- und Hypokotyllängen besser beurteilen zu können, wurde das Verhältnis beider Längen betrachtet. Bis auf die *iap*-Mutanten weisen alle untersuchten Linien ein exaktes Verhältnis zwischen Wurzel- zu Hypokotyllänge von 4:1 auf. Die *iap1-1*-Mutante zeigt ein Verhältnis von 3,5:1 die *iap2-1*-Mutante von 5,3:1. Da beide Mutanten nahezu identische Hypokotyllängen besitzen, wird das Verhältnis beider Längen hauptsächlich durch die veränderte Wurzellänge bestimmt. Die Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzeln gemessenen Wurzel- und Hypokotyllängen im Vergleich zum *Columbia*-Wildtyp erscheinen aufgrund der hohen Varianz bzw. großen Fehlerbalken als schwierig. Das nicht veränderte Verhältnis (4:1) von Wurzel- zu Hypokotyllänge bei der *mapk*- und den *obp*-Mutanten zeigt, daß diese Linien dem Wildtyp entsprechen. Im Gegensatz dazu zeigt zumindest die *iap2-1*-Mutante eine deutliche morphologische

Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Da auch Steroidmutanten vergleichbare morphologische Unterschiede zum Wildtyp aufweisen, wurde die Wurzellänge der *iap2-1*-Mutante in einem weiteren Experiment mit verschiedenen Steroidmutanten verglichen. Dazu ist das schwache *bri1-5* Allel verwendet worden, das eine verkürzte Wurzel aufzeigt und die *DWF4*-Überexpressionslinie (*ADO4*) mit einer längeren Wurzel. In Abb.3.63 ist der Vergleich dieser bekannten Steroidmutanten mit der *iap2-1*-Mutante und den *CPD*-Überexpressionslinien (3.1.2.2) gezeigt. Dabei wird deutlich, daß die Zunahme der Wurzellänge bei der *iap2-1*-Mutante in der gleichen Größenordnung wie bei den Überexpressionslinien liegt. Für die *DWF4*-Überexpressionslinie konnte ein höherer, endogener Steroidgehalt nachgewiesen werden (Choe S. *et al.*, 2001).

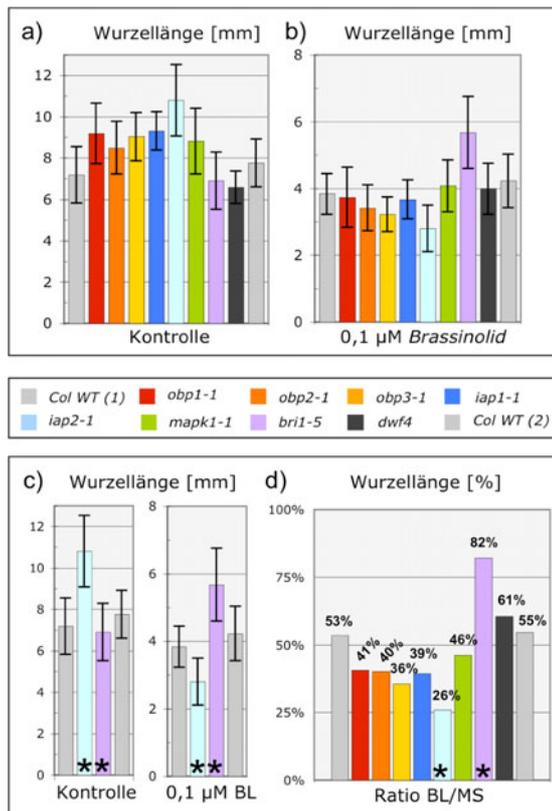


**Abb.3.63: Vergleich der relativen Wurzellängen der CPD- und DWF4-Überexpressionslinien mit der *iap2-1*-Mutante.** Die Abbildung zeigt die absoluten Wurzellängen (W [mm]) der angegebenen *CPD*-Überexpressionslinien (35S-A, 35S-C, 35S-E), der *DWF4*-Überexpressionslinie (*AOD4*) und der *bri1-5*- bzw. *iap2-1*-Mutante (C2A). Bei den *CPD*-Überexpressionslinien handelt es sich um die in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen, mit dem 35S::CPD-GFP-Konstrukt komplementierten *cpd*-Linien. Das Balkendiagramm zeigt den Vergleich der relativen Wurzellängen (rW). Die relative Wurzellänge bezieht sich auf den jeweiligen Wildtyp, die *cpd*- und *iap2-1*-Linien sind im *Columbia* die *bri1-5* und *AOD4* im *Wassilewskija*-Hintergrund. Die Pflanzen wurden in Sterilkultur auf Agarmedium angezogen und nach ca. acht Tagen vermessen. Bei der Linie C2B handelt es sich um eine heterozygote *iap2-1*-Linie.

### 3.3.2 Hormonbehandlungen der homozygoten Mutanten

Die Mutanten haben unter Standardkulturbedingungen keine auffälligen Phänotypen gezeigt, daher wurde ihre Reaktion auf veränderte Kulturbedingungen überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Mutanten z.B. im Dunkeln, im Langtag bzw. Kurztag, im Gewächshaus und in Sterilkultur angezogen. Auch das Wachstum auf Agarplatten, die mit verschiedenen Pflanzenhormonen wie Abszinsäure (ABA), Auxin (AUX), Cytokinin (CYT) und Gibberelinsäure (GA) versetzt waren, wurde überprüft. Dabei konnten keine Besonderheiten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Des weiteren ist die Responsivität auf die exogene Steroidgabe überprüft worden. Dazu wurden die genannten Linien in Sterilkultur auf Agarplatten angezogen und nach zwei Tagen auf Kontroll- bzw. brassinolidhaltigen

Agarplatten pikiert. Diese wurden senkrecht aufgestellt, nach fünf Tagen konnten die Keimlinge vermessen werden. Die Wurzellängen der Keimlinge auf den Kontrollplatten wurde mit der entsprechenden Länge auf den Steroidplatten verglichen. Das Verhältnis zwischen der Wurzellänge auf Steroidplatten und auf Kontrollplatten ist ein Maß für die Inhibition des Wurzelwachstums durch hohe Brassinosteroid-Konzentrationen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.64 gezeigt.



**Abb. 3.64: Inhibition des Wurzelwachstums auf Hochsteroidmedium.** Keimlinge der genannten Linien wurden in Sterilkultur ausgekeimt und nach zwei Tagen auf brassinolidhaltigen Agarplatten mit einer Endkonzentration von 0,1 µM BL bzw. Kontrollplatten (0 µM BL) pikiert, die senkrecht aufgestellt waren. Nach fünf Tagen wurden jeweils ca. 20 Keimlinge pro Platte vermessen und die Wurzellängen ermittelt. Die Balkendiagramme geben die Wurzellänge auf Kontroll- (a) und auf *Brassinolid*-Platten (b) wieder. In Abbildung c) ist ein Vergleich der Wurzellängen der *iap2-1*-Mutante mit dem der *bril-5*-Mutante und des *Columbia*-Wildtyps gezeigt. Die markierten Messwerte (\*) unterscheiden sich signifikant vom Wildtyp ( $p < 0,0001$ ). Das Balkendiagramm d) stellt die relative Wurzellänge auf den brassinosteroidhaltigen Platten in Bezug zu den Wurzellängen auf den entsprechenden Kontrollplatten in Prozent dar. Das schwache *bril*-Allel, *bril-5*, zeigt dabei die geringste Inhibition des Wurzelwachstums, was anhand der größten, relativen Wurzellänge von 82 % auf 0,1 µM BL im Vergleich zur Wurzellänge auf der Kontrollplatte deutlich wird. Es wurden zwei Wildtyp-Linien verwendet: *Col WT (1)* entspricht dem Wildtyp der Koncz-T-DNA-Linien, *Col WT (2)* dem Wildtyp der SALK-T-DNA-Linien.

Die gemessenen Wurzellängen auf Kontrollplatten und brassinolidhaltigen Agarplatten sowie das Verhältnis beider Längen zueinander ist in Abbildung 3.64 gezeigt. Zum Vergleich wurde auch die Brassinosteroidbiosynthesemutante *dwf4* und die Signaltransduktionsmutante *bril-5* analysiert. Die *bril-5*-Mutante trägt ein schwaches *BRII*-Allel, sie zeigt jedoch nicht den Phänotyp der Nullmutante, sondern einen intermediären Phänotyp zum Wildtyp und der *bril*-Nullmutante. Sie ist gegenüber hohen Brassinosteroidkonzentrationen nicht völlig insensitiv, weist aber eine stark verminderte Sensitivität auf. Im Vergleich dazu zeigen die untersuchten *mapk*-, *iap*- und *obp*-Mutanten eine größere Sensitivität gegenüber dem *Brassinolid* als der Wildtyp, was an der erhöhten Inhibition der Wurzellänge auf Werte zwischen 26 % und 46 % im Vergleich zu 53 % bzw. 55 % des Wildtyps deutlich wird. Die größte Sensitivität gegenüber *Brassinolid* weist – mit einer Wurzellänge von nur 26 % auf den Steroidplatten – die *iap2-1*-Mutante auf. Im Gegensatz dazu zeigen die *dwf4* und *bril-5* die erwarteten Reaktionen. Die *dwf4*-Mutante hat mit einer Wurzellänge von 61 %, eine leicht geringere Inhibition des Wurzelwachstums, die *bril-5*-Mutante zeigt mit einer Wurzellänge von 82 % deutlich die erwartete, partielle Insensitivität gegenüber *Brassinolid*. Ein direkter Vergleich der gemessenen Wurzellängen der *iap2-1* und der *bril-5*-Mutante zum Wildtyp (Abbildung 3.64c)

verdeutlicht, daß sich die absoluten Längenunterschiede zwischen den Wurzeln im Rahmen der Messgenauigkeit des Experiments – wegen der überlappenden Fehlerbalken – nicht deutlich unterscheiden. Der zweiseitige T-Test zeigt aber, daß die Unterschiede zwischen den Mutanten und dem jeweiligen Wildtyp signifikant sind ( $p < 0,0001$ ). Abschließend ist festzuhalten, daß die *iap2-1*-Mutante hypersensitiv, die *bril-5*-Mutante hyposensitiv in Bezug auf ihr Wurzelwachstum und im Vergleich zum Wildtyp auf das *Brassinolid* reagiert.

### 3.3.3 Expressionsanalyse der CPD-Interaktoren mittels Promotor-GUS-Fusionen

Zur Analyse der Expression der CPD-Interaktionspartner wurden Promotor::GUS-Fusionen verwendet. Dazu sind die Promotorbereiche mittels PCR amplifiziert und in den Promotor-Test-Vektor pPCV812 kloniert worden. Der Vektor erlaubt die Fusion beliebiger Promotoren mit dem *uidA*-Gen. Für die Amplifikation der Promotoren wurden Oligonucleotide verwendet, die es ermöglichen, ca. 2 kb große DNA Fragmente zu amplifizieren, die wiederum den Promotorbereich und den untranslatierten Bereich bis zum ATG-Codon abdecken. Des weiteren wurden die Oligonucleotide so generiert, daß sie eine Fusion der ersten drei bis fünf Aminosäuren des codierten Proteins im gleichen Leseraster mit dem GUS-Protein ergeben. Mit der Einbeziehung der nicht translatierten 5'-Bereiche in die Promotor::GUS-Fusionen soll die native Regulation des entsprechenden Promotors sichergestellt werden. Die erhaltenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft und in Pflanzen des *Columbia*-Wildtyps transformiert. Die Transformanden sind durch eine Selektion mit Hygromycin isoliert und durch eine PCR-Analyse der T<sub>1</sub>-Pflanzen verifiziert worden.

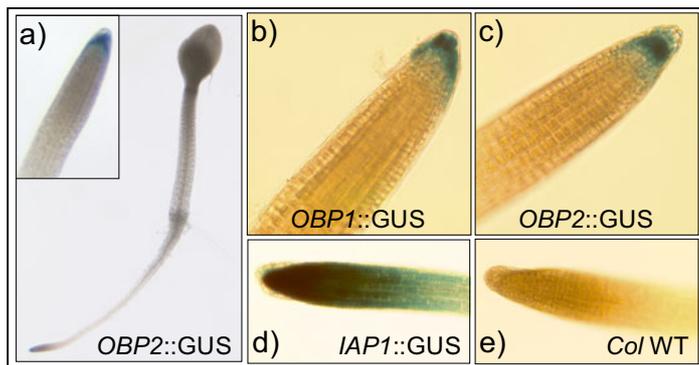
T <sub>0</sub> Pool	T <sub>1</sub> (sp) Nr.	T <sub>2</sub> Segregation		Ratio R/S	Total	$\chi^2$ (3:1)
		hygR	hygS			
<i>IAP1</i> ::GUS (A)	7	254	94	2,7	348	0,39
<i>IAP1</i> ::GUS (B)	145	36	16	2,3	52	0,34
<i>IAP1</i> ::GUS (C)	149	35	12	2,9	47	0,93
<i>IAP1</i> ::GUS (C)	153	48	18	2,7	66	0,67
<i>IAP1</i> ::GUS (C)	159	100	27	3,7	127	0,33
<i>IAP2</i> ::GUS (C)	12	452	160	2,8	612	0,51
<i>IAP2</i> ::GUS (C)	30	257	93	2,8	350	0,50
<i>IAP2</i> ::GUS (C)	74	195	58	3,4	253	0,45
<i>IAP2</i> ::GUS (C)	76	136	47	2,9	183	0,83
<i>IAP2</i> ::GUS (A)	78	81	31	2,6	112	0,51
<i>IAP2</i> ::GUS (A)	172	57	23	2,5	80	0,44
<i>MAPK1</i> ::GUS (A)	1	156	56	2,8	212	0,63
<i>MAPK1</i> ::GUS (A)	2	84	14	6,0	98	0,01
<i>MAPK1</i> ::GUS (C)	96	64	27	2,4	91	0,30
<i>MAPK1</i> ::GUS (C)	138	102	34	3,0	136	1,00
<i>MAPK1</i> ::GUS (D)	162	44	15	2,9	59	0,94
<i>MAPK1</i> ::GUS (D)	163	14	5	2,8	19	0,89
<i>MAPK1</i> ::GUS (D)	164	24	9	2,7	33	0,76
<i>OBP1</i> ::GUS (A)	186	27	8	3,4	35	0,77
<i>OBP2</i> ::GUS (B)	91	232	70	3,3	302	0,46

**Abb. 3.65: Segregationsanalyse der Promotor::GUS-Fusionen.** Pflanzen des *Columbia*-Wildtyps wurden mit den Promotor::GUS-Fusionskonstrukten *IAP1*::GUS, *IAP2*::GUS, *MAPK1*::GUS, *OBP1*::GUS und *OBP2*::GUS transformiert. Die Transformanden sind mittels Hygromycin selektiert worden. Für das *IAP1*-, *IAP2*- und *MAPK1*-Konstrukt konnten mehr als drei unabhängige Transformanden isoliert werden, die in der T<sub>2</sub>-Generation 3:1 hygromycinresistent zu sensitiv segregieren. Die nebenstehende Tabelle stellt die Segregation einiger T<sub>2</sub>-Pools dar. Sie zeigt die Anzahl Hygromycin-resistenter (hygR) bzw. sensitiver (hygS) Pflanzen, das Segregationsverhältnis (R/S), die Gesamtzahl an Pflanzen (Total) und die Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Segregation einer 3:1 Segregation entspricht.

Die Hygromycin-Segregation wurde in der T<sub>2</sub>-Generation ermittelt, das Ergebnis ist in Abbildung 3.65 gezeigt. Einzelpflanzen von 3:1 hygromycinresistent zu sensitiv segregierender Linien wurden einer

GUS-Färbung unterzogen. Dazu sind die Keimlinge in Sterilkultur auf Agarplatten bzw. in Flüssigkultur im Licht und im Dunkeln angezogen worden. Die Ergebnisse von langen - ca. 16-stündigen - und kurzen - ca. zweistündigen - GUS-Färbungen wurden verglichen. Darüber hinaus sind die Keimlinge auch mit verschiedenen Pflanzenhormonen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt worden, die Wirkung wurde durch eine anschließende GUS-Färbung überprüft. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.66 bis 3.71 festgehalten.

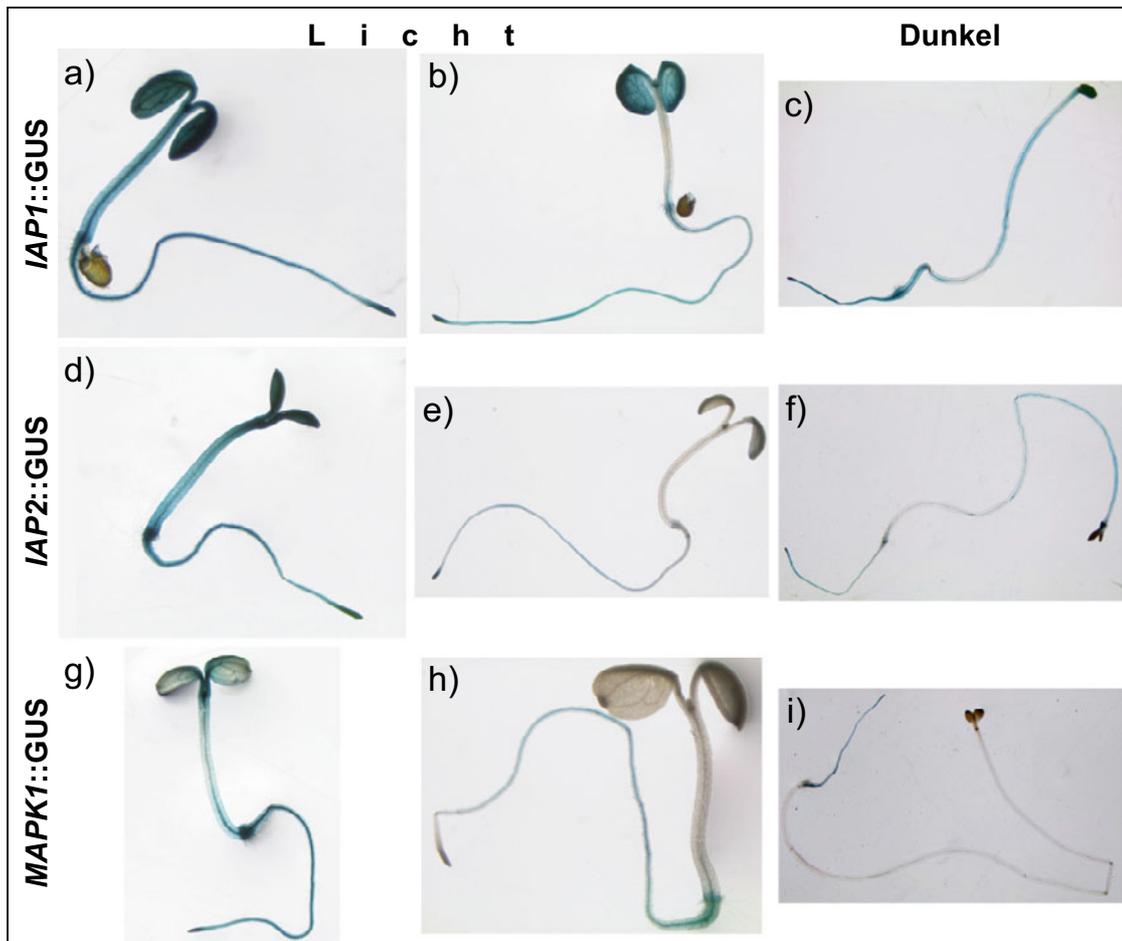
Zuerst wurden die in Abbildung 3.65 genannten Pflanzen-Linien in Sterilkultur ausgekeimt und nach vier Tagen einer GUS-Färbung unterzogen. Die einzelnen Linien eines Konstruktes zeigten alle übereinstimmende GUS-Färbungen, wohingegen die Ergebnisse verschiedener Promotoren sich deutlich unterschieden. Für die *IAP1*- bzw. *IAP2*- und *MAPK1*-Konstrukte konnten mehrere unabhängige Transformanten isoliert werden, die in der T<sub>2</sub>-Generation 3:1 auf Hygromycin-Platten resistent zu sensitiv segregieren. Dies war bei den *OBP*-Promotor::GUS-Linien nicht möglich, auch konnte außer in den Wurzelspitzen keine GUS-Färbung detektiert werden. In Abbildung 3.65 ist ein Vergleich gefärbter Wurzelspitzen der *OBP*::GUS-Linien mit einer *IAP1*::GUS- und einer Wildtyp-Pflanze zu sehen. Auch in den später beschriebenen Hormonexperimenten wurden keine Änderungen wahrgenommen. Daher werden die *OBP*-Promotor::GUS-Linien im Folgenden nicht weiter beschrieben.



**Abb. 3.66: GUS-Färbung der *OBP*::GUS-Linien 186 und 91.** Bild a) zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Keimlings der Linie 91-*OBP2*::GUS sowie eine Vergrößerung der Wurzelspitze. Die anderen Bilder sind Wurzelspitzen der Linien 186-*OBP1*::GUS (b), 91-*OBP2*::GUS (c), 12-*IAP1*::GUS (d) und des *Columbia*-Wildtyps (e). Die gefärbten Pflanzen wurden ca. 4 Tage in Flüssigkultur angezogen und einer zweistündigen Färbung unterzogen.

In Abbildung 3.67 ist das Ergebnis der GUS-Färbung des *IAP1*::GUS, des *IAP2*::GUS und des *MAPK1*::GUS-Konstruktes wiedergegeben. Da die lange, 16-stündige GUS-Färbung so starke Signale zeigte, wurden im Folgenden nur noch kurze, zweistündige GUS-Färbungen durchgeführt. Die lange Färbung weist beim *IAP1*::GUS-Konstrukt eine durchgehende Färbung aller Organe auf, besonders stark im vaskulären Gewebe und in der Wurzelspitze. In der kürzeren Färbung ist die GUS-Aktivität hauptsächlich auf die Wurzel und die Kotyledonen beschränkt, das Hypokotyl zeigt keine Färbung. Auch die im Dunkeln angezogenen Keimlinge zeigen eine durchgehende Blaufärbung, auch im Hypokotyl. Für das *IAP2*::GUS-Konstrukt ergibt sich ebenfalls bei der langen Färbung ein homogener Blauton in allen Geweben. Bei der kurzen Färbung ist die GUS-Aktivität auf die Wurzel und das vaskuläre Gewebe in den Kotyledonen beschränkt. Die Färbung fällt deutlich schwächer aus als bei dem *IAP1*::GUS-Konstrukt. Die im Dunkeln angezogenen Pflanzen des *IAP2*::GUS-Konstrukts zeigen die gleiche Verteilung wie beim *IAP1*::GUS-Konstrukt. Die Intensität ist jedoch etwas schwächer,

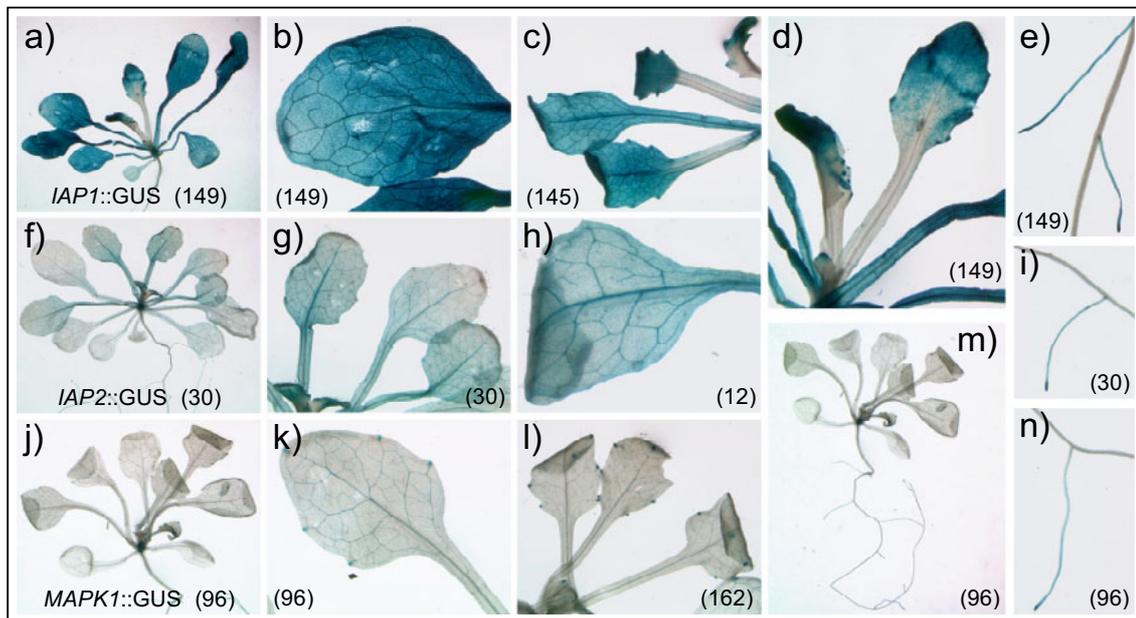
wodurch deutlicher auffällt, daß die Färbung im Hypokotyl nicht homogen verteilt ist, sie ist im oberen Abschnitt stärker und im unteren Bereich kaum oder gar nicht sichtbar. Für das *MAPK1::GUS*-Konstrukt ergibt die lange Färbung eine Färbung der Wurzel, des vaskulären Gewebes im Hypokotyl und in den Kotyledonen. Das periphere Gewebe in den Kotyledonen und der Hypokotylmitte zeigt kaum bzw. keine Färbung. Bei den kürzeren Färbungen ist die GUS-Aktivität im Licht und im Dunkeln hauptsächlich auf die Wurzel beschränkt.



**Abb. 3.67: Expressionsanalyse der *IAP1*-, *IAP2*- und *MAPK1*-Gene mittels Promotor::GUS-Fusionen.** Die Abbildung zeigt GUS-Färbungen vier Tage alter Pflanzen der *IAP1::GUS* Linie „PG149“ (a, b, c), der *IAP2::GUS* Linie „PG012“ (d, e, f) und der *MAPK1::GUS*-Linie „PG001“ (g, h, i). Die Bilder a), d), und g) zeigen eine 16 stündige GUS-Färbung, die Bilder b), e), und h) eine zweistündige GUS-Färbung im Licht gewachsener Pflanzen. In den Bildern c), f) und i) ist eine zweistündige GUS-Färbung von im Dunkeln angezogener Pflanzen gezeigt. Bei den genannten Linien handelt es sich um Wildtyp-Pflanzen, die mit dem entsprechenden Promotor::GUS-Konstrukt transformiert wurden.

Neben der Analyse junger Keimlinge wurden auch ältere Pflanzen analysiert. Abbildung 3.68 zeigt, daß die untersuchten Gene *IAP1*, *IAP2* und *MAPK1* auch in drei Wochen alten Pflanzen exprimiert sind. Das Expressionsmuster weist kaum Veränderungen zu den jungen Keimlingen auf. *IAP1* ist stark und ubiquitär exprimiert, lediglich in den Blattstielen junger Blätter ist kein GUS-Signal zu sehen. Für alle drei Gene beschränkt sich die Expression im Bereich der Wurzel auf die Wurzelspitze und junge Seitenwurzeln. Die Expression von *IAP2* ist hauptsächlich auf vaskuläres Gewebe beschränkt, einige

Blattflächen zeigen schwache Signale. Das *MAPK1*-Gen ist ausschließlich im vaskulären Gewebe der Blätter und Blattstiele sowie in jungen Seitenwurzeln exprimiert.

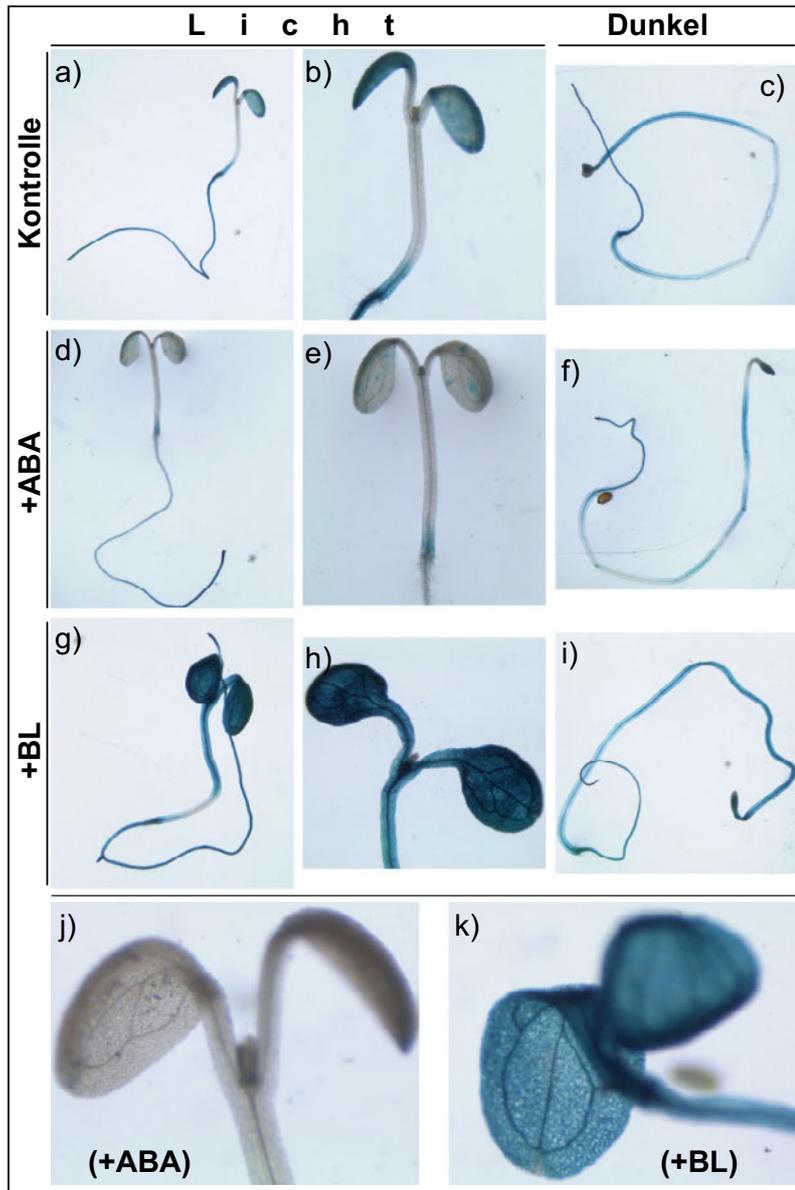


**Abb. 3.68:** GUS-Färbung älterer Pflanzen der *IAP1*-, *IAP2*- und *MAPK1*-Promotor::GUS-Linien. In der Abbildung sind Pflanzen der *IAP1*::GUS-Linien 145 und 149 (a, b, c, d, e), der *IAP2*::GUS-Linien 12 und 30 (f, g, h, i) sowie der *MAPK1*::GUS-Linien 96 und 162 (j, k, l, m, n) zu sehen. Die Pflanzen wurden ca. drei Wochen in Sterilkultur angezogen und zwei Stunden lang gefärbt. Die Bilder a), f), j) zeigen Übersichtsaufnahmen der Rosetten. In Bild d) ist eine Ausschnittsvergrößerung von Bild a) zu sehen, in Bild m) eine Übersicht über Pflanze j), mit Wurzel. Die Bilder e), i), n) sind Detailaufnahmen junger Seitenwurzeln, die übrigen Bilder zeigen Detailaufnahmen einzelner Blätter.

Im Folgenden stand der Einfluss verschiedener Hormone auf die Expression der untersuchten Gene *IAP1*, *IAP2*, und *MAPK1* im Mittelpunkt der Untersuchungen. Es wurden die *IAP1*-Linien PG7; PG145; PG149 und PG153, die *IAP2*-Linien PG12, PG72 und PG74 sowie die *MAPK1*-Linien PG1, PG96 und PG162 eingesetzt. Dabei wurde Abscisinsäure (ABA) [0 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M], Auxin (IAA) [0 $\mu$ M; 2,3 $\mu$ M; 11,4 $\mu$ M], Auxininhibitor (NPA) [0 $\mu$ M; 2 $\mu$ M; 20 $\mu$ M], *Brassinolid* (BL) [0 $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M], Gibberelinsäure (GA3) [0 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M] und Salizylsäure (SA) [0 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 200 $\mu$ M] getestet. Mit ABA und *Brassinolid* konnten die stärksten Effekte erzielt werden.

Der Effekt von ABA und BL auf die *IAP1*-Expression wurde detailliert anhand der Linie PG149 analysiert. Pflanzen der *IAP1*-Linie sind in Sterilkultur in Flüssigmedium angezogen und nach fünf Tagen durch eine zweistündige Färbung analysiert worden. 24 h zuvor wurde das Medium durch ein mit dem entsprechenden Hormon versetztes Medium ausgetauscht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.68 zu sehen. Die Kontrollpflanzen zeigen die zuvor besprochene Färbung der Wurzel und der Kotyledonen. Durch die Behandlung mit ABA wurde die GUS-Aktivität in den Kotyledonen unterdrückt, die Färbung der Wurzel ist nicht beeinflusst. Durch die Behandlung mit *Brassinolid* wurde das GUS-Signal noch weiter verstärkt. Diese Effekte konnten nur bei im Licht angezogenen Pflanzen beobachtet werden. Die Dunkelkeimlinge zeigen keine Reaktion auf ABA, die Behandlung

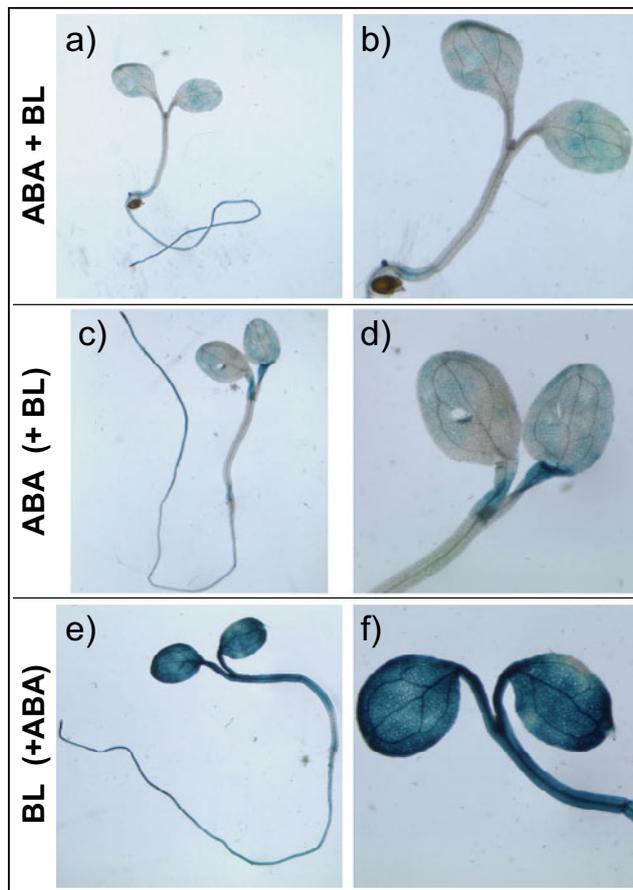
mit BL führt zu einer leichten Steigerung der GUS-Aktivität. In einem weiteren Experiment wurde die Interaktion von ABA und BL bei der Regulation der *IAP1*-Expression analysiert.



**Abb. 3.69: Analyse der *IAP1*-Expression nach Hormonbehandlung mittels der Promotor::GUS-Fusion.** Die Abbildung zeigt GUS-Färbungen fünf Tage alter Pflanzen der *IAP1*::GUS-Linie „PG149“ (a bis k), die in Flüssigkultur angezogen wurden. Die Bilder a), b), und c) zeigen zur Kontrolle in MS-Medium angezogene Keimlinge, auf den Bildern d), e), f) und j) sind Keimlinge die 24 h vor der Färbung mit ABA der Endkonzentration 10  $\mu$ M, auf den Bildern g), h) i) und k) Keimlinge die mit *Brassinolid* (BL) der Endkonzentration 0,1  $\mu$ M behandelt wurden zu sehen. Die Bilder a), d) und g) sind Übersichtsaufnahmen ganzer, im Licht gewachsener Keimlinge. Die Bilder b), e) und h) sind Detailansichten der Kotyledonen und des Hypokotyls. Die Bilder c), f) und i) zeigen Übersichtsaufnahmen von im Dunkeln angezogenen Pflanzen. In Bild j) ist eine Vergrößerung der Kotyledonen einer, mit ABA behandelten, in Bild k) einer mit BL behandelten Pflanze gezeigt. Mit allen Pflanzen wurde eine zweistündige GUS-Färbung durchgeführt.

Weil die in Dunkelheit angezogenen Keimlinge keine besondere Reaktion zeigten, wurden später nur noch im Licht angezogene Pflanzen beobachtet. Keimlinge der Linie PG149 wurden erneut angezogen, diesmal jedoch 48 h vor der Färbung mit ABA und BL zusammen behandelt oder 48 h vor der Färbung für 24 h mit ABA bzw. BL alleine behandelt. 24 h vor der Färbung wurde dann das andere Hormon BL bzw. ABA zugegeben. In Abbildung 3.70 sind die Ergebnisse festgehalten. Die Behandlung mit ABA und BL zusammen (a; b) ergibt das gleiche Ergebnis wie die Behandlung mit BL und der Vorbehandlung mit ABA (c; d). Wie bei der Behandlung mit ABA alleine zeigen die Kotyledonen eine geringere GUS-Aktivität, das Hypokotyl hatte keine Färbung. Im Gegensatz ergab die Behandlung mit ABA mit einer Vorbehandlung mit BL das gleiche Ergebnis wie die Behandlung

mit BL alleine. Die Färbung ist, wie zuvor beschrieben, deutlich stärker in den Kotyledonen und auch das Hypokotyl zeigt eine starke Blaufärbung.

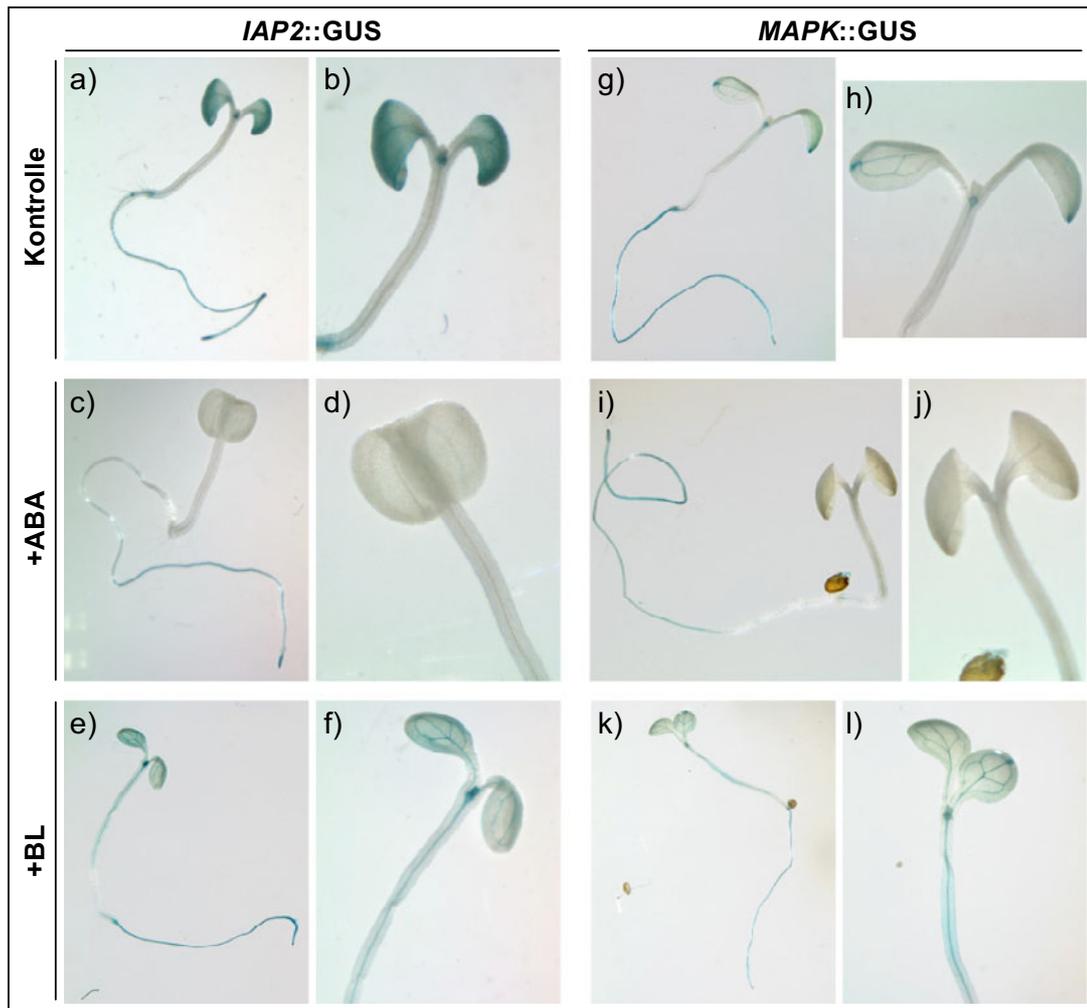


**Abb. 3.70: Analyse der ABA- und BL-Interaktion bei der Regulation der *IAP1*-Expression.**

Die Bilder zeigen Keimlinge, die nach vier Tagen für 48 h mit verschiedenen Kombinationen von ABA und BL behandelt wurden. Die in a) abgebildete Pflanze wurde 48 h vor der Färbung mit ABA und BL behandelt. Die in c) gezeigte Pflanze wurde 24 h mit ABA dann 24 h mit BL behandelt. Bei der Pflanze in Bild e) war dies umgekehrt: erst 24 h mit BL dann 24 h mit ABA. Die Bilder a), c) und e) zeigen Übersichtsaufnahmen sechs Tage alter Pflanzen, die Bilder b), d) und f) sind Detailansichten der Kotyledonen. Alle Pflanzen gehören zur *IAP1::GUS*-Linie „PG149“, die einer zweistündigen GUS-Färbung unterzogen wurden. Wie in den vorherigen Experimenten wurde *Brassinolid* (BL) mit der Endkonzentration  $0,1 \mu\text{M}$  und ABA mit der Endkonzentration  $10 \mu\text{M}$  eingesetzt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß sowohl ABA als auch BL die *IAP1*-Expression bei im Licht angezogenen Pflanzen beeinflussen. Dabei wirkt sich ABA negativ, BL positiv auf die *IAP1*-Expression aus. Bei einer gleichzeitigen Gabe beider Hormone und bei der Vorbehandlung mit ABA ist die ABA-Wirkung dominant. Bei der Vorbehandlung mit BL vor der ABA-Gabe ist der aktivierende Effekt des *Brassinolids* zumindest für 24 h stärker als die inhibierende Wirkung des ABA auf die *IAP1*-Expression.

Nach der Analyse der *IAP1::GUS*-Fusion wurden auch die *IAP2::GUS* und die *MAPK1::GUS*-Fusionen auf ihre Responsivität gegenüber den Pflanzenhormonen ABA und *Brassinolid* (BL) überprüft, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.71 zusammengefasst. Es fällt auf, dass die Reaktionen der *IAP2::GUS*- und der *MAPK1::GUS*-Fusion viel schwächer ausfallen als zuvor bei *IAP1::GUS* festgestellt wurde. Beide Promotoren sind auch über ABA und BL reguliert. Der Vergleich der Bilder b) und d) bzw. h) und j) zeigt dass die Expression in den Kotyledonen (Leitgewebe) negativ durch ABA reguliert ist. Die Behandlung mit BL ergibt auch ein Signal im Hypokotyl (Leitgewebe).



**Abb. 3.71: Analyse der *IAP2*- und *MAPK1*-Expression nach Hormonbehandlung mittels der Promotor::GUS-Fusionen.** Die Abbildung zeigt GUS-Färbungen fünf Tage alter Pflanzen der *IAP2*::GUS-Linie „PG12“ (a bis f) und der *MAPK1*::GUS-Linie „PG162“ (g bis l), die in Flüssigkultur angezogene Keimlinge. Die Bilder a), b), g) und h) zeigen zur Kontrolle in MS-Medium angezogene Keimlinge, auf den Bildern c), d), i) und j) sind Keimlinge die 24 h vor der Färbung mit ABA der Endkonzentration 10  $\mu$ M, auf den Bildern e), f) k) und l) Keimlinge die mit *Brassinolid* (BL) der Endkonzentration 0,1  $\mu$ M behandelt wurden zu sehen. Die Bilder a), c), e), g), j) und k) sind Übersichtsaufnahmen ganzer, im Licht gewachsener Keimlinge. Die Bilder b), d), f), h), j), und l) sind Detailansichten der Kotyledonen und des Hypokotyls. Mit allen Pflanzen wurde eine dreistündige GUS-Färbung durchgeführt.

Die phänotypischen Analysen haben ergeben, daß keine der isolierten T-DNA-Mutanten einen typischen Steroidphänotyp zeigt. Die genaue Analyse der *iap2-1*-Mutante hat aber deutlich gemacht, daß diese eine verändertes Wurzelwachstum aufweist, das mit dem einer CPD-Überexpressionslinie übereinstimmt. Die Analyse der isolierten *obp*-Mutanten ergibt keine signifikanten Änderungen zum Wildtyp, was auf eine redundante Funktion der OBPs schließen lässt. Dies wird durch die in 3.4 durchgeführten Kreuzungsexperimente eingehender analysiert. Mit der Analyse der CPD-GFP-Proteinstabilität in nP::CPD-GFP/*iap/cpd*-Doppelmutanten soll die Funktion der IAPs untersucht werden (3.4). Die Expressionsanalysen mittels GUS-Reporterkonstrukten haben eine sehr deutliche Regulation der *IAP*-Gene durch ABA und *Brassinolid* aufgezeigt. Dieses Ergebnis muss im Folgenden auch auf RNA-Ebene bestätigt werden.

### 3.4 Kreuzungsexperimente mit den isolierten, homozygoten Mutanten und den nP::CPD-GFP-Linien

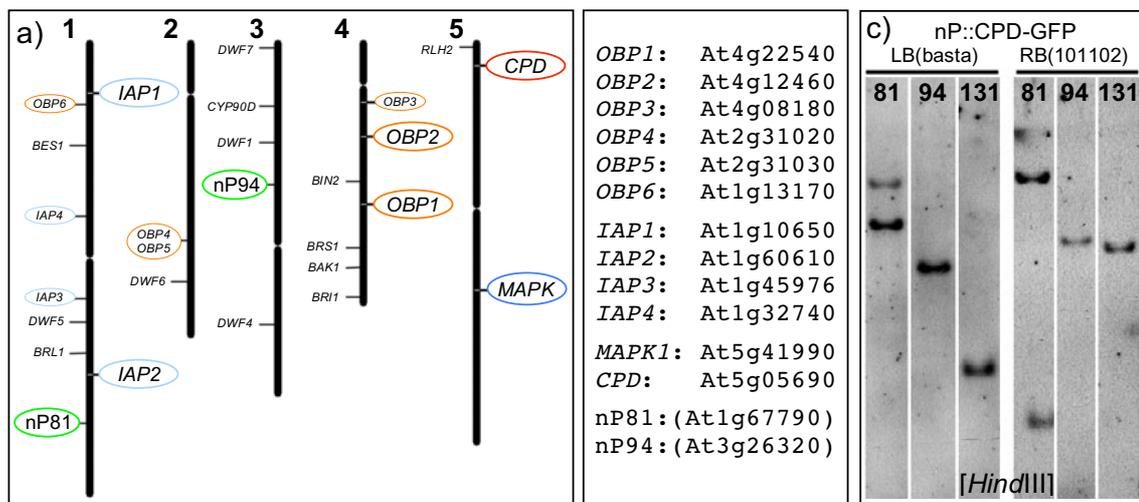
Mit den isolierten T-DNA Mutanten der CPD-Interaktionspartner wurden zwei verschiedene Kreuzungsexperimente durchgeführt. Zum einen sind die Mutanten untereinander (3.4.2) zum anderen mit den komplementierten „nP::CPD-GFP“ *cpd*-Linien gekreuzt worden (3.4.1). Da die Einzelmutanten keine drastischen Phänotypen aufweisen, die mit einer Funktion innerhalb der Brassinosteroidbiosynthese oder Signaltransduktion in Verbindung gebracht werden können, wurden die Mutanten der Mitglieder einer Genfamilie (*IAP* und *OBP*) miteinander gekreuzt. Durch Kreuzung der Mutanten des CPD-Interaktionspartners IAP1 bzw. OBP1 mit den Mutanten des Mitglieds der entsprechenden Genfamilie mit der größten Homologie, IAP2 bzw. OBP2, soll die entsprechende Proteinfunktion völlig ausgeschaltet und der Effekt auf die Pflanzenentwicklung überprüft werden. Diesbezüglich wurden auch Kreuzungen der Mutanten der Interaktionspartner IAP1 bzw. IAP2, OBP1 bzw. OBP2 und MAPK1 miteinander durchgeführt. Um den Einfluss der Mutationen in den Genen der CPD-Interaktionspartner auf die CPD-Proteinlokalisierung und Stabilität zu untersuchen sind die Einzelmutanten *iap1-1*, *iap2-1* und *obp1-1* mit den komplementierten nP::CPD-GFP *cpd*-Linien gekreuzt worden.

#### 3.4.1 Kreuzungen der nP::CPD-GFP-Linien mit Mutanten der CPD-Interaktoren

Um die Kreuzungen der Mutanten der CPD-Interaktionspartner mit den komplementierten nP::CPD-GFP / *cpd*-Linien durchführen zu können, musste die Position der nP::CPD-GFP-T-DNA im Genom ermittelt werden. In Abbildung 3.72 sind die Positionen der analysierten Gene *CPD*, *MAPK1*, *IAPs*, *OBPs* und einiger Gene gezeigt, die für Proteine bekannter Funktionen im Rahmen der Brassinosteroidbiosynthese und Signaltransduktion codieren.

Anhand einer Southern-Blot-Analyse, die in Abbildung 3.72 zu sehen ist, konnte bestätigt werden, daß die Linien nP81, nP94 und nP131 unabhängige Insertionen der nP::CPD-GFP-T-DNA, tragen. Die genauen Positionen der T-DNA-Insertionen wurden mittels iPCR ermittelt. Dazu ist, wie in Kapitel 2.2.1.4.1 beschrieben, genomische DNA mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *HindIII* gespalten, gereinigt und in eine Ligationsreaktion eingesetzt worden. Mit speziellen iPCR-Primern, die spezifisch für den BASTA-Resistenzmarker sind, konnten die flankierenden, genomischen Bereiche der jeweiligen nP::CPD-GFP-T-DNA amplifiziert werden. Die Fragmente wurden aus Agarosegelen gereinigt und mit bastaspezifischen Oligonucleotiden sequenziert. Zumindest für die Linien nP81 und nP94 konnte anhand der Sequenzierungsergebnisse die Position der T-DNA-Integration eindeutig bestimmt werden. Für die Linie nP131 war dies nicht möglich, da die erhaltene Sequenz einen repetitiven Bereich zeigt, der nicht eindeutig einem Locus zugeordnet werden kann. Die T-DNA der Linie nP81 ist auf Chromosom 1 (BAC\_F12A21/At1g67790) inseriert. Weil die T-DNA der Linie nP94 auf Chromosom 3 (BAC\_F20C19/At3g26320) inseriert ist und sich dort kein weiteres zu betrachtendes Gen befindet, konnte die Linie nP94 für alle Kreuzungen mit den Mutanten

der CPD-Interaktionspartnern verwendet werden. Die Positionen der zu betrachtenden Loci sind der Abbildung 3.72 zu entnehmen.



**Abb. 3.72: Analyse der nP::CPD-GFP-Transformanten.** In Abbildung (a) sind die T-DNA-Insertionspositionen der nP::CPD-GFP-Transformanten nP81 und nP94 im *A. thaliana* Genom sowie die Positionen der *IAP*-, *OBP*-, *MAPK*-Gene und einiger Gene zu sehen, die für Proteine der Brassinosteroidbiosynthese und Signaltransduktion codieren. Die zugrunde liegenden Annotationen sind unter b) angegeben, die Positionen wurden mit dem Programm „Chromosome Map Tool“ (<http://www.arabidopsis.org>) ermittelt. In Bild c) ist die Southern-Blot-Analyse der Linien nP81, nP94 und nP131 zu sehen. Genomische DNA der genannten Linien wurde mit der Restriktionsendonuclease *Hind*III gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran immobilisiert. Die Membran ist mit T-DNA-spezifischen Sonden (LB, RB) hybridisiert worden. Die T-DNA wird von der Restriktionsendonuclease *Hind*III gespalten, die T-DNA-Sonden wurden so gewählt, daß die jeweils endständigen T-DNA-Fragmente und damit die flankierenden, genomischen Fragmente detektiert werden. Zur Amplifikation der Sonden sind die Oligonucleotide Bar-f+Bar-r (LB) ML101+ML102 (RB) verwendet worden. Die Positionen der nP81-, nP94- und nP131-T-DNAs wurden durch iPCR und Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente ermittelt. Anhand der Sequenzen konnte die Position der T-DNA-Insertion der Linie nP81 (BAC\_F12A21) und der Linie nP94 (BAC\_F20C19) eindeutig bestimmt werden. Die Insertion der Linie nP131 befindet sich in einem repetitiven Bereich, der nicht eindeutig lokalisiert wurde.

Die Linie nP94(HygR, BastaR) wurde mit den Mutanten *iap1-1* (A174-HygR), *iap2-1* (C2a-HygR) und *obp1-1* (SL13) durch Übertragung von Pollen der *cpd/nP::CPD-GFP*-Pflanzen auf Blüten der jeweiligen Mutanten gekreuzt. In den Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation wurde das Vorhandensein der nP::CPD-GFP-T-DNA(BastaR) mit *CPD*- bzw. *GFP*-spezifischen Oligonucleotiden sichergestellt (Daten nicht gezeigt). In der F<sub>2</sub>-Population konnte die Kreuzung ebenfalls durch das Auftreten von *cpd*-Phänotypen bestätigt werden. In der F<sub>2</sub>-Population sind einige Pflanzen isoliert worden, deren Segregation in der F<sub>3</sub>-Generation analysiert wurde. Anhand der Segregation des Basta- bzw. Hygromycin-Markers und des *cpd*-Phänotyps kann auf den Genotyp der F<sub>2</sub>-Pflanzen geschlossen werden. Dabei ist zu beachten, das zwei T-DNAs mit einem Hygromycin-Resistenzmarker segregieren. Sowohl die T-DNA der *cpd*-Mutante als auch die T-DNAs der *iap*-Mutanten haben einen Hygromycin-Resistenzmarker. In Abbildung 3.73 sind die erwarteten Genotypen sowie die entsprechend zu erwartenden Segregationen gezeigt, in den Tabellen der Abbildung 3.74 sind die tatsächlich beobachteten Segregationen zu sehen.

Anhand der F<sub>3</sub>-Segregationen konnten sowohl für die Kreuzung von *iap1-1* als auch für die Kreuzung von *iap2-1* mit der Linie nP94 einige Pflanzen isoliert werden, die einen der beiden, in Abbildung 3.73 grau hinterlegten Genotypen *IAP*(+/-)/*CPD*(+/-)/nP::CPD-GFP(+/-) bzw. *IAP*(-/-)/*CPD*(+/-)/nP::CPD-GFP(+/-), aufweisen. Die entsprechenden Segregationsanalysen sind in Abbildung 3.74 beschrieben. Alle ausgewählten Linien zeigen eine Basta-Segregation im Verhältnis 3:1 resistent zu sensitiv sowie eine Segregation des Wildtyp zum *cpd*-Phänotyp im Verhältnis 15:1. Daraus lässt sich schließen, daß die F<sub>2</sub>-Pflanzen sowohl für die Insertion im *CPD*-Gen als auch für die „komplementierende“ T-DNA, nP::CPD-GFP, im nP94-Locus heterozygot sind. Darüber hinaus zeigen die Hygromycin-Segregationen von 15:1 resistent zu sensitiv bzw. die 100%ige Resistenz, daß die orange hinterlegten Linien heterozygot, die blauen Linien homozygot für die Insertion im *IAP1*- bzw. *IAP2*-Gen sind.

Anteil (F <sub>2</sub> )	Genotyp (F <sub>2</sub> )	Segregation (F <sub>3</sub> )			Anteil (F <sub>2</sub> )	Genotyp (F <sub>2</sub> )	Segregation (F <sub>3</sub> )		
		<i>cpd</i> (-/-)	basta	hyg			<i>cpd</i> (-/-)	basta	hyg
1/4	<i>IAP</i> +/+	-	(S)	100% S	8/64	<i>IAP</i> +/- <i>CPD</i> +/- nP94 +/-	1/16 <i>cpd</i>	3R:1S	15R:1S
2/4	<i>IAP</i> +/-	-	(S)	3R:1S	4/64	<i>IAP</i> -/- <i>CPD</i> +/- nP94 +/-	1/16 <i>cpd</i>	3R:1S	100% R
1/4	<i>IAP</i> -/-	-	(S)	100% R	4/64	<i>IAP</i> +/- <i>CPD</i> -/- nP94 +/-	1/4 <i>cpd</i>	3R:1S	100% R
1/4	<i>CPD</i> +/+	-	(S)	100% S	4/64	<i>IAP</i> +/- <i>CPD</i> +/- nP94 -/-	100% WT	100% R	15R:1S
2/4	<i>CPD</i> +/-	1/4 <i>cpd</i>	(S)	3R:1S	2/64	<i>IAP</i> -/- <i>CPD</i> -/- nP94 +/-	1/4 <i>cpd</i>	3R:1S	100% R
1/4	<i>CPD</i> -/-	100% <i>cpd</i>	(S)	100% R	2/64	<i>IAP</i> +/- <i>CPD</i> -/- nP94 -/-	100% WT	100% R	100% R
1/4	nP94 -/-	-	100% S	(S)	2/64	<i>IAP</i> -/- <i>CPD</i> +/- nP94 -/-	100% WT	100% R	100% R
2/4	nP94 +/-	(1/4 <i>cpd</i> )	3R:1S	(S)	1/64	<i>IAP</i> -/- <i>CPD</i> -/- nP94 -/-	100% WT	100% R	100% R
1/4	nP94 +/+	WT	100% R	(S)					

**Abb. 3.73: Erwartete Segregationen in der F<sub>3</sub>-Generation.** Die erhaltenen F<sub>1</sub>-Pflanzen der Kreuzungen der *iap1-1*, *obp1-1* und *iap2-1*-Mutanten mit der komplementierten *cpd*-Linie nP94 sind für alle drei betrachteten Loci heterozygot. Die Abbildung zeigt exemplarisch anhand der Kreuzung „*iap1-1*(A174) x *cpd*/nP94“ die erwarteten Segregationen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beide T-DNAs der *iap1-1* und der *cpd*-Mutanten einen Hygromycin-Resistenzmarker besitzen, die nP::CPD-GFP-T-DNA trägt einen Basta-Resistenzmarker. In der F<sub>2</sub>-Generation segregieren alle drei Loci bzw. T-DNAs, *IAP1*(A174), *CPD*(*cpd*) und nP94(nP::CPD-GFP) unabhängig voneinander jeweils im Verhältnis 1<sup>(+/+)</sup>:2<sup>(+/-)</sup>:1<sup>(-/-)</sup>. Die linke Tabelle zeigt jeweils eine isolierte Betrachtung der einzelnen Loci. Es sind der F<sub>2</sub>-Genotyp und die erwarteten Ausprägungen der drei betrachteten Merkmale - *cpd*-Phänotyp, Basta- bzw. Hygromycin-Resistenz - in der F<sub>3</sub>-Generation zu sehen. In der rechten Tabelle ist eine Auswahl der möglichen F<sub>2</sub>-Genotypen und der daraus resultierenden Segregationen in der F<sub>3</sub>-Generation unter Berücksichtigung aller drei Loci zu sehen. Die grau hinterlegten Genotypen können aufgrund der Kombination der Einzelsegregationen (orange bzw. blau) eindeutig identifiziert werden. Ziel ist es, eine F<sub>4</sub>-Pflanze des gelb hinterlegten Genotyps zu isolieren.

Eine vergleichbare Analyse der Kreuzung „*obp1-1* x nP94“ war wegen des fehlenden Resistenzmarkers der SALK-T-DNA nicht möglich. Einige der blau hinterlegten Linien (A1-26, A1-32, C1-07, C1-16) wurden mikroskopisch und auch mittels einer Western-Blot-Analyse untersucht. Aufgrund der ermittelten Genotypen der F<sub>2</sub>-Pflanzen, müssen in den genannten Linien Pflanzen des gesuchten Genotyps „*IAP*(-/-)/*CPD*(-/-)/nP::CPD-GFP(+/-)“ segregieren. Weder mikroskopisch noch durch die Western-Blot-Analyse konnte eine veränderte Lokalisation bzw. Stabilität des CPD-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies muss aber eindeutig an Einzelpflanzen in der nächsten Generation sowie in Verbindung mit Hormonbehandlungen überprüft werden. Darüber hinaus muss eine entsprechende Analyse der Kreuzung der Linien „*IAP1*(-/-)/*CPD*(-/-)/nP::CPD-GFP(+/-) und „*IAP2*(-/-)/*CPD*(-/-)/nP::CPD-GFP(+/-) erfolgen.

a)	Linie	basR	basS	Ratio	Total	1/4	3/4
A1-24	157	53	3,0	210	52,5	157,5	
A1-26	108	30	3,6	138	34,5	103,5	
A1-27	137	48	2,9	185	46,3	138,8	
A1-34	186	90	2,1	276	69,0	207,0	
A1-9	114	38	3,0	152	38,0	114,0	
A1-10	80	22	3,6	102	25,5	76,5	
A1-22	127	48	2,6	175	43,8	131,3	
A1-30	96	36	2,7	132	33,0	99,0	
A1-32	43	14	3,1	57	14,3	42,8	

b)	Linie	WT	cpd	hygR	hygS	Total	1/4	3/4	1/16	15/16	14/16
A1-24	239	23	262	22	284	71,0	213,0	17,8	266,3	248,5	
A1-26	194	10	204	0	204	51,0	153,0	12,8	191,3	178,5	
A1-27	196	14	210	12	222	55,5	166,5	13,9	208,1	194,3	
A1-34	168	15	183	5	188	47,0	141,0	11,8	176,3	164,5	
A1-9	194	16	210	12	222	55,5	166,5	13,9	208,1	194,3	
A1-10	142	7	149	8	157	39,3	117,8	9,8	147,2	137,4	
A1-22	185	7	192	9	201	50,3	150,8	12,6	188,4	175,9	
A1-30	95	10	105	39	144	36,0	108,0	9,0	135,0	126,0	
A1-32	60	22	82	0	82	20,5	61,5	5,1	76,9	71,8	

c)	Linie	basR	basS	Ratio	Total	1/4	3/4
C1-03	146	49	3,0	195	48,8	146,3	
C1-04	244	83	2,9	327	81,8	245,3	
C1-06	318	100	3,2	418	104,5	313,5	
C1-07	228	74	3,1	302	75,5	226,5	
C1-09	198	66	3,0	264	66,0	198,0	
C1-16	123	44	2,8	167	41,8	125,3	
C1-17	164	57	2,9	221	55,3	165,8	
C1-20	97	28	3,5	125	31,3	93,8	
C1-21	226	64	3,5	290	72,5	217,5	
C1-30	138	42	3,3	180	45,0	135,0	
C1-32	358	126	2,8	484	121,0	363,0	

d)	Linie	WT	cpd	hygR	hygS	Total	1/4	3/4	1/16	15/16	14/16
C1-03	169	7	176	7	183	45,8	137	11,4	171,6	160,1	
C1-04	219	13	232	15	247	61,8	185	15,4	231,6	216,1	
C1-06	381	23	404	0	404	101,0	303	25,3	378,8	353,5	
C1-07	287	15	302	0	302	75,5	227	18,9	283,1	264,3	
C1-09	242	12	254	0	254	63,5	191	15,9	238,1	222,3	
C1-16	136	46	182	0	182	45,5	137	11,4	170,6	159,3	
C1-17	273	23	296	0	296	74,0	222	18,5	277,5	259,0	
C1-20	143	11	154	0	154	38,5	116	9,6	144,4	134,8	
C1-21	180	16	196	11	207	51,8	155	12,9	194,1	181,1	
C1-30	155	5	160	11	171	42,8	128	10,7	160,3	149,6	
C1-32	469	33	502	0	502	125,5	377	31,4	470,6	439,3	

**Abb. 3.74: Segregationsanalysen der *iap1-1*- bzw. *iap2-1*-Kreuzung mit der *cpd/nP::CPD-GFP*-Linie, nP94.** In den F<sub>2</sub>-Generationen der Kreuzungen *iap1-1* (A) bzw. *iap2-1* (C) mit der Linie nP94 wurden jeweils ca. 30 Einzelpflanzen (A1-1 bis A1-30 bzw. C1-1 bis C1-30) isoliert, deren Segregation in der F<sub>3</sub>-Generation näher analysiert wurde. Die Basta- (a, c), die Hygromycin- und die Segregation des *cpd*-Phänotyps (WT:*cpd*) (b, d) wurde ermittelt. In den Tabellen ist die Anzahl der Basta-(bas) bzw. Hygromycin- (hyg) resistenten (R) bzw. sensitiven (S) sowie die Gesamtanzahl (Total) der Pflanzen angegeben. Im Fall der Basta-Segregation ist das Verhältnis von resistenten zu sensitiven Pflanzen (Ratio) angegeben. Im Fall der Hygromycin-Segregation und der Segregation des *cpd*-Phänotyps sind die aufgrund der Gesamtanzahl errechneten Anteile ( $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{15}{16}$ ,  $\frac{14}{16}$ ) angegeben. Die ermittelten Werte sind entsprechend farbig hinterlegt. Die hygromycinresistenten Pflanzen wurden nach Wildtyp- und *cpd*-Phänotypen unterschieden.

### 3.4.2 Generation von Doppelmutanten der CPD-Interaktionspartner

Zur Generation von Doppelmutanten wurden die isolierten T-DNA-Mutanten der CPD-Interaktionspartner gekreuzt. Bei den Kreuzungen der Mutanten sind alle möglichen Kombinationen der Mutanten sowie jeweils die reziproken Kreuzungen durchgeführt worden. Abbildung 3.75 ist eine Übersicht über die durchgeführten Kreuzungen.

In der F<sub>1</sub>-Generation wurden alle Einzelpflanzen mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Für jede Kreuzung konnten mehrere Pflanzen (F<sub>1</sub>) identifiziert werden, die beide T-DNA-Insertionen der gekreuzten Eltern tragen. Die Isolation der Doppelmutanten erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde in der F<sub>2</sub>-Generation eine Pflanze isoliert, die beide T-DNA-Insertionen der Eltern trug und für eine der beiden Insertionen homozygot war. Dies wird in der PCR-Analyse durch die Amplifikation beider T-DNA-Fragmente und nur einem der beiden Wildtyp-Loci deutlich. Dann wurden in der F<sub>3</sub>-Generation Einzelpflanzen identifiziert, die für beide T-DNA-Insertionen homozygot sind. Solche Pflanzen zeigen keine Amplifikationen der Wildtyp-Loci. Die identifizierten Linien wurden in der F<sub>4</sub>-Generation durch eine RT-PCR-Analyse verifiziert. Im Folgenden liegt die Konzentration auf der Generation der *iap1/iap2*-, der *iap1/obp1*- und der *obp1/obp2*-Doppelmutante.

a)	x	I1	I2	Q1	Q2	Q3	M
I1	-	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	
I2	X <sub>6</sub>	-	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	
Q1	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	-	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>	
Q2	X <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>	X <sub>18</sub>	-	X <sub>19</sub>	X <sub>20</sub>	
Q3	X <sub>21</sub>	X <sub>22</sub>	X <sub>23</sub>	X <sub>24</sub>	-	X <sub>25</sub>	
M	X <sub>26</sub>	X <sub>27</sub>	X <sub>28</sub>	X <sub>29</sub>	X <sub>30</sub>	-	

b)	x	I1	I2	Q1	Q2	Q3	M
I1	-	27	58	45	-	46	
I2	59	-	-	5	13	13	
Q1	6	33	-	62	26	19	
Q2	-	1	33	-	50	6	
Q3	22	-	-	60	-	6	
M	29	21	7	26	34	-	

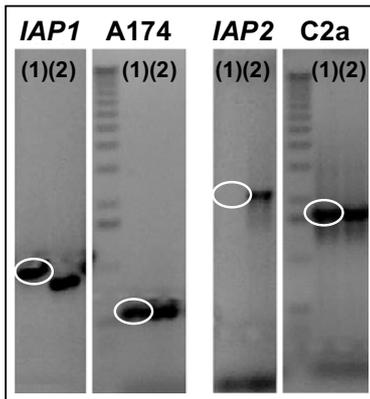
  

c)	Nr. (x)	Kreuzung (Locus)	F1 (sp)	F2 (sp)	F3 (sp)
1	iap1 x iap2	3	3-1	3-1-14; 3-1-16	
		4	4-7	4-7-2; 4-7-8	
2	iap1 x obp1	23	23-9	23-9-2; 23-9-8	
		23	23-10	23-10-1; 23-10-7	
13	obp1 x obp2	56	56-14	(56-14-2; 56-14-6)	
		61	61-2	(61-2-7)	
14	obp1 x obp3	67	67-1;3	(67-1-x /67-3-x)	
19	obp2 x obp3	85	85-14	(85-14-6)	
26	mapk1 x iap1	109	109-11	???	
28	mapk1 x obp1	127	127-18	???	
15	obp1 x mapk1	178	178-4	???	
27	mapk1 x iap2	118	118-13	???	
10	iap2 x mapk1	169	169-4	???	
29	mapk1 x obp2	142	142-20	???	
20	obp2 x mapk1	139	139-2	???	

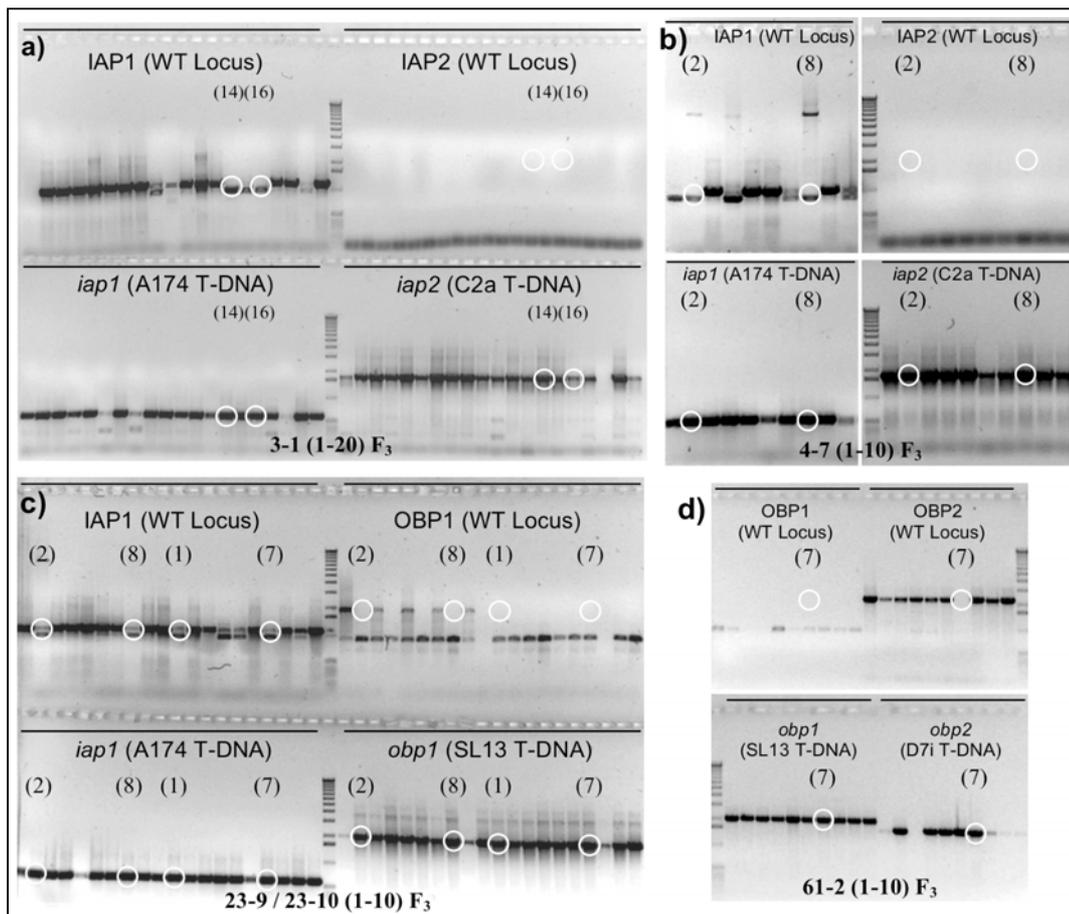
**Abb. 3.75: Kreuzungen der isolierten T-DNA-Mutanten.** Das Kreuzungsschema (a) zeigt alle möglichen Kreuzungskombinationen der isolierten T-DNA-Mutanten: I1: *iap1-1* (A174), I2: *iap1-2* (C2a), Q1: *obp1-1* (SL13), Q2: *obp2-1* (D7i), Q3: *obp3-1* (SL18) und M: *mapk1-1* (F11b). Die Kreuzungen wurden von 1 bis 30 durchnummeriert, in Tabelle b) ist die Anzahl erhaltener F<sub>1</sub>-Pflanzen je Kreuzung zu sehen. In den weiteren Analysen wurde sich auf wenige, in Tabelle c) genannte, Kreuzungen konzentriert. Die Doppelmutanten konnten anhand von PCR-Analysen verschiedener Einzelpflanzen der F<sub>2</sub>- und F<sub>3</sub>-Generation isoliert werden. In Tabelle c) sind die Nummern der zur Identifikation der entsprechenden Doppelmutanten analysierten F<sub>1</sub>-, F<sub>2</sub>- und F<sub>3</sub>-Pflanzen angegeben. Die genannten F<sub>3</sub>-Pflanzen wurden durch eine Expressionsanalyse der entsprechenden F<sub>4</sub>-Pools als homozygote Doppelmutanten identifiziert. Die in Klammern angegebenen Linien müssen erneut überprüft werden.

Bei den Kreuzungen der *iap1-1* (A174-HygR)-, *iap2-1* (C2a-HygR)-, *obp1-1* (SL13)- und *obp2-1* (D7i-HygR)-T-DNA-Mutanten wurden in der F<sub>2</sub>-Generation jeweils 20 Einzelpflanzen analysiert. Dazu sind je vier PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonucleotiden zur Amplifikation der Wildtyp-Loci (*IAP1*, *IAP2*, *OBP1*, *OBP2*) und zur Amplifikation der T-DNA-Insertionen (A174, C2a, SL13, D7i) durchgeführt worden. Im Rahmen der Identifikation der *iap1/iap2*-Doppelmutanten wurden die F<sub>2</sub>-Pflanzen 3-1 und 4-7 isoliert, die sowohl im *IAP1*- als auch im *IAP2*-Gen eine T-DNA-Insertion tragen. Sie sind für die Insertion im *IAP2*-Gen sogar homozygot. Abbildung 3.75 zeigt exemplarisch die Analyse der Einzelpflanzen 3-1 und 3-2. Bei beiden Linien können beide T-DNA-Insertionen, A174 und C2a, identifiziert werden. Die Pflanze 3-1 (links) zeigt die Amplifikation des *IAP1*-Gens, die Pflanze 3-2 die des *IAP2*-Gens.

Die positiv bewerteten F<sub>2</sub>-Pflanzen wurden abgeerntet, in der nächsten Generation (F<sub>3</sub>) sind dann in gleicher Weise Einzelpflanzen, mittels PCR untersucht worden. Die F<sub>3</sub>-Pflanzen 3-1-14, 3-1-16, 4-7-2 und 4-7-8 sind für beide Insertionen homozygot. In Abbildung 3.77 sind die PCR-Analysen der F<sub>3</sub>-Einzelpflanzen zu sehen. Die genannten Linien zeigen keine Amplifikate der Wildtyp-Loci (Abb.3.77a, b). Entsprechend konnten bei der Identifikation der *iap1/obp1*- bzw. *obp1/obp2*-Doppelmutanten die F<sub>2</sub>-Pflanzen 23-9 und 23-10 bzw. 56-14 und 61-2 isoliert werden. Die F<sub>3</sub>-Linien 23-9-2, 23-9-8, 23-10-1, und 23-10-7 sind für beide Insertionen im *IAP1*- und im *OBP1*-Gen homozygot (Abb.3.77c). Innerhalb der PCR-Analyse konnten die Linien 56-14-2, 56-14-6 und 61-2-7 ebenfalls als doppelt homozygote Linien für beide T-DNA-Insertionen identifiziert werden. In Abbildung 3.77 d) ist stellvertretend die Analyse der Linie 61-2 gezeigt.



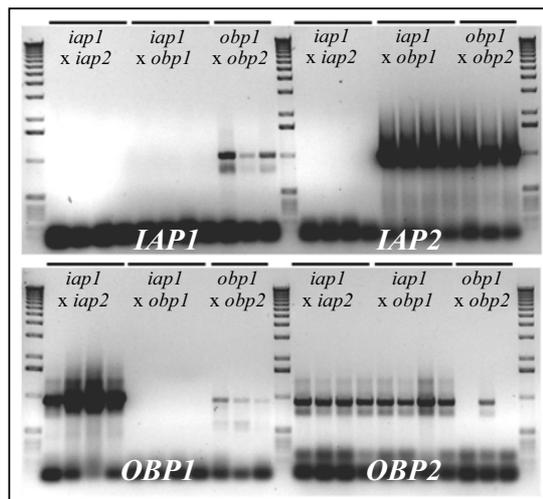
**Abb. 3.76: PCR-Analyse von F<sub>2</sub>-Einzelpflanzen aus den Kreuzungen der *iap*- und *obp*-T-DNA-Mutanten.** Zur Identifikation von Doppelmutanten wurde in der F<sub>2</sub>-Generation nach Einzelpflanzen gesucht, die je zwei T-DNA-Insertionen tragen und zumindest für eine der beiden Insertionen homozygot sind. Die Abbildung zeigt exemplarisch das PCR-Muster zweier F<sub>2</sub>-Pflanzen, die im Rahmen der Identifikation der *iap1/iap2*-Doppelmutanten analysiert wurden. Beide Pflanzen tragen eine T-DNA-Insertion im *IAP1*- und im *IAP2*-Gen. Die Pflanze (3-1) ist homozygot für die T-DNA-Insertion im *IAP2*-Gen und heterozygot für die Insertion im *IAP1*-Gen. Die Pflanze (3-2) zeigt den umgekehrten Fall. Es wurden vier PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Wildtyp-Loci *IAP1* bzw. *IAP2* und zur Amplifikation der korrespondierenden T-DNA-Insertionen A174 bzw. C2a durchgeführt.



**Abb. 3.77: PCR-Analyse von F<sub>3</sub>-Einzelpflanzen aus den Kreuzungen der *iap*- und *obp*-T-DNA-Mutanten.** Die Abbildung zeigt die PCR-Analysen einiger Einzelpflanzen der F<sub>3</sub>-Generation von Kreuzungen der *iap1-1* (A174) mit der *iap2-1* (C2a) (a; b), der *iap1-1* (A174) mit der *obp1-1* (SL13) (c) und der *obp1-1* (SL13) mit der *obp2-1* (D7i) (d) Mutante. Es sind jeweils vier PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Wildtyp-Loci (*IAP1*, *IAP2*, *OBP1*, *OBP2*) bzw. der korrespondierenden T-DNA-Insertionen (A174, C2a, SL13, D7i) durchgeführt worden. Es wurden jeweils 10 bzw. 20 F<sub>3</sub>-Einzelpflanzen analysiert, die von den F<sub>2</sub>-Pflanzen 3-1 bzw. 4-7 (*iap1xiap2*), 23-9 bzw. 23-10 (*iap1xobp1*) und 61-2 (*obp1xobp2*) abstammen. Es fanden folgende Primerkombinationen Verwendung: FiapLe+Fiap2 (*IAP1*; 1,1 kb), ML01+ML02 (*IAP2*; 2,1 kb), FOBP1+FOBP2 (*OBP1*; 1,9 kb), ML26+ML27 (*OBP2*; 2,1 kb), Fiap2(AS)+Fi1 (*A174*; 550 bp), ML01(S)+Fi1 (*C2a*; 1,7 kb), FOBP1(S)+Fi1 (*SL13*; 1,9 kb), ML27(AS)+Fi1 (*D7i*; 1,5 kb).

Die identifizierten Linien wurden mit einer RT-PCR-Analyse (Abb.3.78) verifiziert. Für die *iap1/iap2*-Linien konnte die Expression der *OBP1*- und *OBP2*-Gene, nicht aber der *IAP1*- und

*IAP2*-Gene nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die *iap1/obp1*-Linien. Für sie konnte die Expression des *IAP2*- und des *OBP2*-Gens, jedoch nicht die Expression des *IAP1*- und *OBP1*-Gens gezeigt werden. Anhand der durchgeführten RT-PCR-Analyse kann die Identität der *iap1/iap2*- sowie der *iap1/obp1*-Doppelmutante bestätigt werden. Für die *obp1/obp2*-Doppelmutante konnte keine Linie zweifelsfrei identifiziert werden. Die Linien 56-14-2 und 61-2-7 zeigen zwar keine Expression des *OBP2*-Gens jedoch schwache Signale für das *OBP1*-Gen. Diese Signale sind jedoch deutlich schwächer als in den Kontrollreaktionen der *iap1/iap2*-Linien, eine Kontamination ist nicht auszuschließen. Einzelpflanzen der Linie 61-2-7 werden in der nächsten Generation (F<sub>4</sub>) auf die *OBP1*-Expression hin überprüft werden.



**Abb. 3.78: Bestätigung der Doppelmutanten mittels RT-PCR.** Die durch PCR-Analysen von genomischer DNA identifizierten Doppelmutanten wurden mit einer RT-PCR-Analyse verifiziert. Dabei ist die Expression der entsprechenden Gene *IAP1*, *IAP2*, *OBP1* und *OBP2* überprüft worden. Es wurde cDNA der Linien: 3-1-14, 3-1-16, 4-7-2, 4-7-8 (*iap1x iap2*); 23-9-2, 23-9-8, 23-10-1, 23-10-7 (*iap1x obp1*); 56-14-2, 56-14-6, 61-2-7 (*obp1x obp2*); isoliert, und wie in Kapitel 2.2.1.3.2 beschrieben, in eine RT-PCR eingesetzt. Folgende Primerkombinationen wurden verwendet: ML05+ML43 (*IAP1*; 1007 bp), ML06+ML42 (*IAP2*; 1022 bp), ML56+ML57 (*OBP1*; 963 bp), ML30+ML31 (*OBP2*; 952 bp). Primersequenzen siehe Anhang 6.3.

Im Anschluss an die Verifikation der *obp1/obp2*-Doppelmutante kann eine vergleichende Analyse der *iap1/iap1*-, *iap1/obp1*- und *obp1/obp2*-Doppelmutanten mit den *iap1*-, *iap2*-, *obp1*-, *obp2*-Einzelmutanten erfolgen. Dazu müssen die, wie für die Einzelmutanten beschriebenen, phänotypischen Analysen sowie Hormonbehandlungen durchgeführt werden. Darüber hinaus ist es möglich die *obp1/obp2*- und *obp2/obp3*-Doppelmutanten zur Isolierung einer *obp1/obp2/obp3*-Triplemutante zu kreuzen. Entsprechend können auch die nachträglich identifizierten *obp4*- und *obp5*-Mutanten in die Kreuzungsexperimente miteinbezogen werden. Diese Kreuzungsexperimente zielen auf die Analyse der OBP-Genfamilie ab. Die Kreuzungsexperimente zwischen der *mapk1-1*-Mutante und anderen Mutanten der CPD-Interaktionspartner wurden noch nicht näher analysiert.

Anhand von Sequenzanalysen wurde das hier analysierte *MAPK1*-Gen als *WNK8* beschrieben. (Nakamichi *et al.*, 2002). Die WNK-Proteinfamilie (*with no lysine(K)*) in *A. thaliana* umfasst neun putative S/T-Protein-Kinasen, deren Funktion unbekannt ist. Lediglich *WNK1* wurde *in vitro* analysiert, die Transkription von *WNK1*, *WNK2*, *WNK4* und *WNK6* ist circadian kontrolliert. Die *mapk1-1*-Mutante wurde analysiert, da die Beteiligung einer Protein-Kinase an der Regulation der OBP-Proteine möglich ist, der Phänotyp der *mapk1-1*-Mutante konnte diese Verbindung nicht bestätigen. Da eine Analyse einer dritten Genfamilie, insbesondere eines möglichen Netzwerks verschiedener Kinasen nicht sinnvoll ist, liegt der Schwerpunkt auf der Identifikation der redundanten OBP-Funktion, die anhand von Mehrfachmutanten analysiert werden muss.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Komplementation der *cpd*-Mutante belegt die Funktionalität des CPD-GFP-Fusionsproteins

Die Komplementationsstudien der *cpd*-Mutante wurde hauptsächlich aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen kann anhand der vollständigen Komplementation der *cpd*-Mutante hin zum Wildtyp die Funktionalität des verwendeten CPD-GFP-Fusionsproteins belegt werden. Zum anderen stellt die komplementierte *cpd*-Mutante einen interessanten Ausgangspunkt für verschiedene Experimente dar, da so die Lokalisation der Brassinosteroidbiosynthese (3.1.3.3) und der Steroidtransport *in planta* (3.1.4) analysiert werden kann.

Die Überprüfung der Funktionalität des Fusionsproteins ist in Bezug auf die Beurteilung der beobachteten Lokalisation unbedingt notwendig. Es ist nicht auszuschließen, daß die Fusion eines Proteins mit einem 25 kDa Protein (GFP) dessen Funktion beeinträchtigt. Die Größe des GFPs kann die korrekte Faltung, die Interaktion mit anderen Proteinen und auch die Lokalisation beeinflussen. Die Funktionalität der generierten CPD-GFP-Fusion konnte anhand der vollständigen Komplementation der *cpd*-Mutante zum Wildtyp-Phänotyp belegt werden (Abb.3.10). Dies geschah sowohl unter Kontrolle des nativen als auch unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors (Abb.3.5). In beiden Fällen konnten Transformanten isoliert werden, die phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden sind (3.1.2.2). Anhand der beschriebenen Parameter, Wurzellänge, Hypokotylllänge, Gesamthöhe, Blattform und Farbe ist der *cpd*-Phänotyp eindeutig vom Wildtyp zu unterscheiden (3.1.1). Die vollständige Komplementation mit beiden Promotor-Konstrukten ist überraschend, da die Analysen von Mathur *et al.* (1998) eine sehr spezifische Regulation der *CPD*-Transkription gezeigt haben (Abb.3.5), die nicht durch den CaMV35S-Promotor gegeben ist.

Bei einer der 16, mit dem nativen Promotorkonstrukt komplementierten Linien, wurde ein Blattphänotyp beobachtet, der nur in den homozygoten Pflanzen auftritt. Dieser Effekt ist nicht dem Komplementationskonstrukt zuzuschreiben, da er nicht in allen Linien auftritt. Die Ursache ist eher in der Insertion der komplementierenden T-DNA in einem unbekanntem Gen zu sehen, das für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Im Falle des 35S-Konstruktes konnten 16 von 40 Transformanten isoliert werden, die dem Wildtyp gleichen. Die übrigen zeigten verschiedene Ausprägungen des beschriebenen Intermediärphänotyps. Dieser kann durch geringere oder abbrechende CPD-Expression, z.B. durch „*silencing*“ erklärt werden (Vaucheret *et al.*, 1998). Bei der Transformation von Expressionskonstrukten treten oft Linien auf, die keine Expression des Transgens aufgrund von Gen-*silencing*-Phänomenen zeigen (Scheid *et al.*, 1991; Jorgensen *et al.*, 1996; Thierry und Vaucheret, 1996; Lechtenberg B. *et al.*, 2003; Schubert D. *et al.*, 2004). Solche Linien müssen aus der Analyse

ausgeschlossen werden. Aufgrund des charakteristischen *cpd*-Phänotyps sind solche Effekte aber leicht beobachtbar.

Anhand der dargelegten Segregationsanalysen kann die Identität der komplementierten Linien als homozygote *cpd*-Mutanten, die das entsprechende Komplementationskonstrukt tragen, bestätigt werden (Abb.3.8; Abb.3.9). Darüber hinaus wurden die Pflanzen mittels PCR (Daten nicht gezeigt) und Southern-Blot-Analysen charakterisiert (3.4.1). Da die Segregationen über mehrere Generationen verfolgt wurden, sind die Segregationsanalysen alleine ausreichend, um die Linien zu beschreiben (Abb.3.8, Abb.3.9). Mit Hilfe des Hygromycin- (pPCV5013Hyg) und des Kanamycin- (35S::CPD-GFP) bzw. Basta-Resistenzmarkers (nP::CPD-GFP) kann das Vorliegen der entsprechenden T-DNA belegt werden. Aus der Kombination dieser Information und unter Einbeziehung der Segregation des *cpd*-Phänotyps kann immer genau auf den Genotyp geschlossen werden.

#### **4.2 Die zelluläre Lokalisation des CPD-Proteins und ihre Bedeutung für die Brassinosteroid-Biosynthese und Signaltransduktion**

Nachdem die Funktionalität des CPD-GFP-Fusionsproteins belegt ist, kann nun die ermittelte Lokalisation bewertet werden. Für die Lokalisation des CPD-GFP-Proteins haben alle Analysen verschiedener Zelltypen, verschiedener Konstrukte und mit unterschiedlichen Methoden ein übereinstimmendes Ergebnis gezeigt. Das CPD-Protein ist aufgrund des N-terminalen Membranankers membrangebunden, dies wurde sowohl anhand der GFP-Fluoreszenz (3.1.3.1.1) als auch durch die Detektion im 100.000 g Pellet eindeutig bestätigt (3.1.3.1.2). Das CPD-Protein lokalisiert hauptsächlich in der Kernmembran und in für das ER typischen, fädigen Strukturen. Die Lokalisation entspricht eindeutig der eines ER-Proteins (Boevink *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 2000). Dies stimmt mit den Beobachtungen bezüglich des DWF1-Proteins (Klahre *et al.*, 1998) überein. Weil DWF1 und CPD die einzigen Enzyme der Brassinolidbiosynthese sind, die in der beschriebenen Art und Weise analysiert und lokalisiert wurden, kann über die restlichen Enzyme der Brassinosteroidbiosynthese keine Aussage getroffen werden.

Die Steroidbiosynthese ist in Pflanzen wie auch im tierischen System hauptsächlich auf die ER-Membran beschränkt (Hartmann M.A. 2002). Die ER-Lokalisation der C23-Steroidhydroxylase CPD und der C24-Steroidreduktase DWF1 stellt demnach in Bezug auf den allgemeinen Steroidmetabolismus kein Novum dar. Die Kenntnis der zellulären Lokalisation der *Brassinolid*-Synthese ist aber für das Verständnis der Signaltransduktion und die Verbindung bzw. Interaktion zwischen der Biosynthese und der Signaltransduktion erforderlich. Die Zuordnung der Synthesenzyme zum ER schließt die Beteiligung des Chloroplasten oder der Mitochondrien an der Brassinosteroidsynthese aus.

Die Lokalisation von *Brassinolid*-Biosynthesenzymen im ER wirft die Frage nach dem intra- und interzellulären Brassinosteroidtransport auf, da der Rezeptorkomplex an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Hauptkomponente des *Brassinolid*-Rezeptorkomplexes, BRI1, ist ein Transmembranprotein, dessen steroidbindende Domäne sich auf der extrazellulären Seite des

Plasmalemmas befindet (Friedrichsen *et al.*, 2000). Die direkte Bindung zwischen der extrazellulären BRII-Domäne und einem bioaktiven, biotinmarkierten Photoaffinitäts-*Castasteron*-Derivats konnte durch UV-*crosslinking*-Studien gezeigt werden (Kinoshita *et al.*, 2005). Die offene Frage, wie ein im ER-synthetisiertes Steroidmolekül an der Außenseite der Plasmamembran perzeptiert werden kann, unterstreicht die Wichtigkeit der Analyse von steroidbindenden Proteinen, wie z.B. den in dieser Arbeit vorgestellten OBPs.

Bezüglich der zellulären Lokalisation des CPD-Proteins muß kritisch angemerkt werden, daß diese nur mit Hilfe der artifiziellen Expressionskonstrukte analysiert werden konnte, nicht aber mit dem nativen Promotorkonstrukt. Die Art des Promotors bestimmt nicht direkt die zelluläre Lokalisation des codierten Proteins. Eine starke ektopische Expression kann aber zu einer erhöhten Transkriptmenge und damit auch zu einer erhöhten, über das physiologische Maß hinaus gehende Proteinmenge führen. Proteine, die über einen Membrananker einer einzelnen Transmembrandomäne an einer Membran gebunden sind, können aufgrund des kontinuierlichen Vesikeltransports zwischen dem ER und der Plasmamembran über den Golgi-Apparat zirkulieren (Jürgens, 2004). Aufgrund spezifischer Signale, z.B. der Länge der hydrophoben Transmembrandomäne oder durch Protein-Protein-Interaktionen kann ihre Lokalisation so beeinflusst werden, daß sie unter physiologischen Bedingungen bevorzugt oder nahezu ausschließlich in einer Membran z.B. der Plasmamembran oder dem ER vorkommen (Brandizzi *et al.*, 2002). Unphysiologisch hohe Proteinmengen können dazu führen, daß die zelluläre Regulation nicht mehr ausreichend ist, die Lokalisation zu regulieren. Im Falle der CPD-Lokalisation kann ein solcher Effekt nicht ausgeschlossen werden, daher erscheint die Lokalisation an der Plasmamembran fragwürdig. Das Zirkulieren eines ER-Proteins kann jedoch nie ausgeschlossen werden, ob allerdings eine geringe Zirkulationsrate eine physiologische Bedeutung haben kann, muß im Einzelfall entschieden werden. Interessant an dieser Frage ist, daß auf diese Art und Weise Syntheseenzyme wie CPD selbst am Steroidtransport zwischen den Kompartimenten – Kernmembran/ER und dem Plasmalemma – beteiligt sein könnten. Von Bedeutung ist dies in Bezug auf die Bioaktivität der *Brassinolid*-Vorstufen wie *Cathasteron* (CT) und *Teasteron* (TE), den Produkten, der durch die DWF4- und CPD-Proteine katalysierten Reaktionen aus der Steroidbiosynthese.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß in Pflanzen ein vergleichbarer Steroidmetabolismus wie im tierischen System vorliegt. Die Lokalisation von Brassinosteroidsyntheseenzymen im ER weist eine Parallele zur allgemeinen Synthese von Membranstruktursteroiden auf. Es ist nicht auszuschließen, daß auch Brassinosteroide wie Membransteroid über den Vesikeltransport in der Zelle verteilt werden. Ob steroidbindende Proteine am Transport beteiligt sind, ist ebenso unklar wie die Frage, ob der Brassinosteroidrezeptorkomplex *Brassinolid* an der extrazellulären Seite der Plasmamembran oder in intrazellulären Vesikeln perzeptiert. Sicher ist, daß Brassinosteroide für die Bindung an die LRR-Domäne von BRII die Membranumgebung verlassen müssen. Ob *Brassinolid* dabei von einem unbekanntem steroidbindenden Protein oder direkt von einem Biosyntheseenzym auf BRII übertragen wird, muß in Zukunft geklärt werden. Dazu soll die Analyse der OBP-Genfamilie aus *A. thaliana* ihren Beitrag leisten.

### 4.3 Die gewebespezifische Lokalisation des CPD-Proteins – CPD als Markerenzym für die *Brassinolid*-Biosynthese?

Neben der zellulären Lokalisation des CPD-Proteins sollte auch die gewebespezifische Lokalisation und die temporale Verteilung des CPD-Proteins bestimmt werden. Die Idee war, daß das CPD-Protein als Markerenzym für die Brassinosteroidbiosynthese verwendet werden kann. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die *cpd*-Mutante die letzte, bekannte Synthesemutante vor dem Endprodukt *Brassinolid*. Kim *et al.* (2005) und Nomura *et al.* (2005) konnten weitere *A. thaliana*-Mutanten vorstellen, die die Umsetzung von *Castasteron* (CS) zu *Brassinolid* (BL) katalysieren. Die Umsetzung von 6-deoxo-CS zu CS wird in *A. thaliana* von zwei Isoenzymen CYP85A1 und CYP85A2 katalysiert, die genauen Substratspezifitäten der Enzyme bleiben unklar. Die *A. thaliana*-Einzelmutanten zeigen schwache Phänotypen. Lediglich die Doppelmutante *cyp85A1/cyp85A2* weist einen deutlichen Zwergphänotyp auf und belegt so die überlappende Funktion der beiden CYP85A-Proteine. Aufgrund dieser Analyse bleibt jedoch offen, ob weitere Enzyme existieren, die die Aktivität der CYP85A-Proteine ergänzen. In Tomate liegen auch zwei Enzyme CYP85A1 und CYP85A3 vor, die eine unterschiedliche gewebespezifische Verteilung zeigen (Nomura *et al.*, 2005). Sicher ist, daß für die letzten Schritte verschiedene Enzyme mit überlappender Substratspezifität existieren. Ein einzelnes dieser Enzyme kann schlecht als Markerenzym für die Steroidsynthese verwendet werden. Daher erscheint auch nach der weiteren Identifikation von Enzymen, die spätere Syntheseschritte als CPD katalysieren, die Wahl des CPD-Proteins zum Markerenzym als sehr sinnvoll. Der Phänotyp der *cpd*-Mutante legt nahe, daß die Existenz eines Isoenzym auszuschließen ist oder zumindest sehr unwahrscheinlich ist (3.1).

Anhand der Analyse der temporalen und gewebespezifischen Verteilung des CPD-Proteins während der Pflanzenentwicklung sollte eine genaue Aussage möglich sein, wann und wo zu welchem Entwicklungszeitpunkt in der Pflanze die Steroidbiosynthese stattfindet. Mit einem direkten Vergleich der BRI1-Lokalisation könnte das Vorkommen der Steroidbiosynthese mit dem der erfolgenden Signaltransduktion verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde die *cpd*-Mutante mit dem nativen Promotorkonstrukt komplementiert (3.1.2.2, Abb.3.7).

Erstaunlicherweise konnte in keiner der analysierten Linien zu keinem Entwicklungszeitpunkt ein deutliches GFP-Signal detektiert werden (Abb.3.23d). Damit war keines der erdachten Experimente durchführbar. Auch unter speziellen Bedingungen, unter denen die Transkription des *CPD*-Gens begünstigt wird (Mathur *et al.*, 1998) – Anzucht im Dunkeln oder Hormonbehandlungen mit Auxin (IAA, NAA) – konnte kein charakteristisches GFP-Signal wie bei der zellulären Lokalisation detektiert werden (Abb.3.16, Abb.3.18). Eine Western-Blot-Analyse der komplementierten Linien hat ebenfalls kein Signal ergeben (Abb.3.23e). Wie bereits dargelegt, ist die Identität der komplementierten Linien gesichert, auch wurden vier unabhängige Linien analysiert (Abb.3.10). Die Insertionspositionen der komplementierenden T-DNA wurden durch Southern- und iPCR-Analysen charakterisiert (3.4). Das Ergebnis der *in planta* Lokalisation bzw. die nicht erfolgte Detektion des CPD-GFP-Proteins kann nicht mit einem technischen Fehler erklärt werden.

Ein *silencing*-Problem des nativen Promotorkonstrukts ist auszuschließen. Ein induziertes „*silencing*“ aufgrund einer hohen Kopienzahl oder zu starker Transkription des Transgens (Schubert *et al.*, 2004) ist abwegig, da hauptsächlich mit Linien gearbeitet wurde, die nur eine T-DNA-Insertion tragen (Abb.3.8, Abb.3.9). Auch haben gleiche Kopienzahlen des *CPD*-Promotors bei der Verwendung im *CPD::GUS*-Konstrukts zu keinen Problemen geführt (Abb.3.5). Des weiteren ist der *CPD*-Promotor nur schwach exprimiert, selbst unter Kontrolle des starken 35S-Promotors konnten stark exprimierende Linien identifiziert werden, die eine vollständige Komplementation der *cpd*-Mutante bewirken (Abb.3.8, Abb.3.18).

Darüber hinaus ist davon auszugehen, daß im Falle eines *silencing*-Phänomens auch der Resistenzmarker der T-DNA unbrauchbar ist, wie es häufig bei den SALK-T-DNA-Linien beobachtet wird (3.2.2.3). Bei den komplementierten *cpd*-Linien waren aber immer beide Resistenzmarker funktional. Auch die vollständige Komplementation in späten Entwicklungsstadien würde ausbleiben, da aufgrund des einsetzenden *silencing* die *CPD*-Funktion unterdrückt würde. Es zeigt sich vielmehr ein komplexes Bild der *CPD*-Regulation auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene. Die schwachen, aber diffusen GFP-Signale, die mit dem nP::CPD-GFP-Konstrukt detektiert wurden, deuten auf eine Expression in der Wurzelspitze hin (Abb.3.23d). Dies war mit dem Promotor-GUS-Konstrukt nicht beobachtbar, wurde aber durch RT-PCR-Analysen bestätigt (Bancos *et al.*, 2002). Die Auswirkung einer *CPD*-Expression in der Wurzel kann mit dem induzierbaren Expressionskonstrukt überprüft werden.

#### 4.4 Das CPD-Protein ist auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene reguliert

Die Analyse des *CPD*-Promotor-GUS-Konstrukts hat eine genaue Regulation der Transkription des *CPD*-Gens gezeigt (Mathur *et al.*, 1998). Die *CPD*-Expression ist generell schwach und hauptsächlich auf das vaskuläre Gewebe der Kotyledonen beschränkt (Abb.3.5). Für die Herstellung des nativen Promotorkonstruktes wurde der identische Promotor-DNA-Klon wie zur Herstellung des *CPD::GUS*-Konstruktes verwendet (3.1.2.1.2). Der Unterschied in der Detektion des GUS-Signals und des CPD-GFP-Signals ist nicht mit einer unterschiedlichen Regulation der Transkription erklärbar. Die Ursache muß in einer spezifischen Regulation der Stabilität des CPD-Proteins begründet sein. Dies hat keinen Einfluß auf das gleichermaßen transkribierte *uidA*-Gen der *CPD::GUS*-Fusion. Daraus ist zu schließen, daß das *CPD*-Gen nicht nur gering exprimiert ist, sondern darüber hinaus das CPD-Protein auch stark reguliert ist.

Auf den ersten Blick widerspricht dem, daß mit dem 35S-Promotorkonstrukt und dem induzierbaren Konstrukt so starke Signale detektiert werden können. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß das *CPD*-Gen sehr stark auf transkriptioneller Ebene reguliert ist und nur sehr schwach exprimiert wird. Demgegenüber steht eine sehr starke Expression des 35S-Promotors und die sehr starke Induzierbarkeit des  $\beta$ -*Östradiol*-Systems, die beide zu sehr großen Proteinmengen führen. Mit dem induzierbaren Promotorkonstrukt können größere Transkriptmengen erreicht werden als mit einem 35S-Promotor (Zuo *et al.*, 2000). Es ist vorstellbar, daß die Regulation auf Proteinebene bei der ektopischen, 35S-getriebenen Expression mit der hohen CPD-GFP-Proteinmenge überlastet und die

Regulation auf die physiologische CPD-Proteinmenge nicht möglich ist. Dafür würden z.B. die recht hohen Mengen an gespaltenem Fusionsprotein sprechen, das nur anhand des freien GFPs detektiert werden kann, da kein CPD-spezifischer Antikörper vorliegt. Die Analysen der GFP-Fluoreszenz haben immer eine beträchtliche Menge an diffuser Fluoreszenz im Cytoplasma gezeigt, die mit der Detektion des freien GFPs im 100.000 g-Überstand, der cytosolischen Fraktion, korreliert.

Auch die schwachen, diffusen GFP-Signale in der Wurzelspitze der nP::CPD-GFP-Linien (Abb.3.23d) deuten auf eine Degradation des Fusionsproteins hin, die so schnell erfolgt, daß dem GFP-Reporter nicht genug Zeit zur Maturation bleibt. Experimente mit dem induzierbaren CPD-GFP-Konstrukt in der *A. thaliana*-Suspensionskultur (Abb.3.16) und in transgenen Wildtyppflanzen (Abb.3.29) haben gezeigt, daß erst ca. 8 h bis 12 h nach der Induktion mit  $\beta$ -Östradiol starke GFP-Signale detektierbar sind. Grundsätzlich sind bei dem  $\beta$ -Östradiol-Expressionssystem bereits nach 30 bis 60 Minuten nach der Induktion Transkripte detektierbar, nach sechs Stunden liegt die Transkriptionsrate auf dem Niveau des 35S-Promotors (Zuo *et al.*, 2000). Nach der Translation benötigt das GFP-Protein *in vitro* 20 min bis zwei Stunden zur Faltung, bis es über Fluoreszenz detektierbar ist (Persönliche Mitteilung Guido Jach, Köln 2005). Es ist davon auszugehen, daß die Verzögerung zwischen der Transkription und der Detektion des Fusionsproteins wahrscheinlich hauptsächlich von der benötigten Zeit bestimmt wird, bis eine mikroskopisch detektierbare Proteinmenge akkumuliert ist. Dies ist dann in erster Linie von der Stabilität des Fusionspartners, im untersuchten Fall von CPD, abhängig. Aufgrund der Instabilität des CPD-Proteins war es nicht möglich, die genaue, gewebespezifische Expression zu bestimmen. Mit Hilfe der komplementierten nP::CPD-GFP/*cpd*-Pflanzen besteht aber die Möglichkeit, die CPD-Proteininstabilität *in planta* zu analysieren. Es kann so der Einfluss verschiedener Faktoren, z. B. der anderer Hormone, auf die Proteininstabilität des CPD-Proteins analysiert werden. Mit den geschilderten Kreuzungsexperimenten wurde dies bereits für die Interaktion zwischen den IAP-Proteinen und CPD initiiert. Zu diesem Punkt muß abschließend darauf hingewiesen werden, daß trotz der hohen Instabilität des CPD-Proteins die entsprechenden Linien über den gesamten Lebenszyklus hinweg vollständig komplementiert waren, also die endogene CPD-Funktion durch das Transgen erfüllt wurde (Abb.3.11). Dies wird besonders unter der Berücksichtigung der Ergebnisse im Rahmen der biochemischen Komplementationsstudien (3.1.2.3) deutlich.

#### **4.5 *Brassinolid* wird kontinuierlich während der gesamten Pflanzenentwicklung als Wachstumssignal benötigt**

Die *cpd*-Mutante kann, wie die anderen Brassinosteroidmutanten – *dwf7*, *dwf1* und *det2* bis hin zur *dwf4*-Mutante – durch die Anzucht auf steroidhaltigem Medium in frühen Entwicklungsstadien zum Wildtyp komplementiert werden (Szekeres *et al.*, 1996; Fujioka *et al.*, 1997; Choe *et al.*, 1998, 1999a, 1999b). Auch bei der Anzucht auf Erde können diese Mutanten durch regelmäßiges Besprühen über längere Zeiträume mit *Brassinolid* nahezu vollständig komplementiert werden (Dierk Wanke Diplomarbeit, Köln 1999; Dierk Wanke, pers. Mitteilung, Köln 2000). Dabei stellt die *cpd*-Mutante eine interessante Ausnahme dar. Sie reagiert zwar wie andere Synthesemutanten auf die Steroidgabe mit erhöhtem Streckungswachstum, erreicht aber nicht die Größe des Wildtyps (Abb.3.13). Die

durchgeführten biochemischen Komplementationstudien haben eindeutig gezeigt, daß die *cpd*-Mutante mit Streckungswachstum reagieren kann (Abb.3.11). Die Experimente, in denen die Steroidgabe zeitlich begrenzt wurde, haben deutlich gemacht, daß für eine anhaltende Komplementation auch eine kontinuierliche Steroidversorgung während der gesamten Entwicklungsphase nötig ist (Abb.3.12). Diese Ergebnisse zeigen erneut, daß das CPD-GFP-Fusionsprotein in den komplementierten Linien über den gesamten Lebenszyklus dauerhaft aktiv und funktional ist, da es sonst zu einer phänotypischen Reversion – wie nach der zeitlich begrenzten Steroidgabe – kommen würde (Abb.3.12).

#### 4.6 Die Rolle und die Position des CPD-Proteins in der Brassinosteroid-Biosynthese und Signaltransduktion

Die phänotypische Betrachtung der Brassinosteroidmutanten hat eine außergewöhnliche Stellung der *cpd*-Mutante gezeigt. Im direkten Vergleich mit den Synthesemutanten *det2* und *dwf4*, aber auch mit der Rezeptormutante *bri1* fällt auf, daß *cpd* die kleinste Brassinosteroidbiosynthesemutante ist (Abb.3.1, Abb.3.2, Abb.3.3). Der phänotypische Unterschied zwischen der *cpd*-Mutante und der *dwf4*- bzw. *bri1*-Mutante ist nicht trivial, weil das DWF4-Protein den Syntheseschritt vor CPD katalysiert. Die Rezeptormutante ist gegenüber Brassinolid insensitiv (Clouse, *et al.*, 1996). Da sie keine Steroide perzeptieren kann, sollte sie die stärkste Inhibition des Wachstums zeigen und damit am kleinsten sein.

Entsprechend der Vorstellung einer linearen Synthesekette wurde bisher davon ausgegangen, daß die Synthese von einer inaktiven Vorstufe hin zu einem bioaktiven Endprodukt verläuft. Dabei sollten späte Intermediate grundsätzlich wegen der höheren Ähnlichkeit zum Endprodukt (*Brassinolid*) bessere Rezeptoragonisten sein und damit eine höhere Bioaktivität als frühe Vorstufen haben. Unter dieser Annahme müßte die *cpd*-Mutante größer als die *dwf4*-Mutante sein. Aufgrund dieser Beobachtungen wird die Position des CPD-Proteins innerhalb der Brassinosteroidsynthese in Frage gestellt. Der Phänotyp der *cpd*-Mutante wäre verständlich, wenn CPD am Beginn der Synthesekette stehen würde oder wenn in der *cpd*-Mutante eine Vorstufe akkumuliert, die das Wachstum inhibiert. Darüber hinaus könnte das CPD-Protein selbst eine Signalfunktion haben und an der Brassinosteroid-Signaltransduktion beteiligt sein.

Analysen des Steroidgehaltes von Brassinosteroidsynthesemutanten haben gezeigt, daß sie Vorstufen bis zum entsprechend blockierten Syntheseschritt akkumulieren und spätere Intermediate nicht detektierbar sind (Choe *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 1999; Choe *et al.*, 2001). Bei der *dwf7*-Mutante fällt die Akkumulation der direkten Vorstufe (Episterol) relativ gering aus. Das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung des alternativen Steroids 7-Dehydrocampestanol (7-dehydroCN) (Choe *et al.*, 1999). Diese und weitere Analysen von Fujioka *et al.* (2002) und Hong *et al.* (2005) zeigen parallele Synthesewege auf, die unsere Vorstellung über die Brassinosteroidbiosynthese maßgeblich geändert haben. Demnach stellt sich die Synthese nicht als lineare Synthesekette dar, in der exakt eine spezifische Synthesereaktion nach der anderen abläuft, sondern als ein Netzwerk aus verschiedenen Synthesenzymen, die relativ unabhängig voneinander Steroide metabolisieren. Daraus ergibt sich ein

völlig neues Bild für die Integration der Synthesemutanten in die Synthese. Die schwachen Phänotypen der frühen Mutanten können demnach aufgrund der Bioaktivität der alternativen Intermediate bzw. Endprodukte teilkomplimentiert werden. Dies erklärt aber nicht den Phänotyp der *cpd*-Mutante. Auch haben die Analysen von Choe *et al.* (1999) eindeutig belegt, daß einige Enzyme, wie DWF5 (C7-Reduktase) und DWF4 (C22-Steroidhydroxylase) feste Substratspezifitäten haben. Dies legt die Reihenfolge der Synthese grob fest. Die Analyse der Intermediate in der *dwf7*-Mutante hat ergeben, daß die Reduktion an Position C7 von der Desaturierung an Position C5 abhängig ist. Da keines der Intermediate an der Seitenkette Hydroxyliert war, ist dies auch Bedingung für die Umsetzung durch DWF4 und CPD. Damit ist eine Rolle von CPD als Initialschritt der Synthese auszuschließen.

Anhand des dargelegten Syntheschemas erscheint es abwegig, daß in der *cpd*-Mutante keine alternativen Intermediate vorliegen, die eine Teilkomplementation bewirken können. Es erscheint wahrscheinlicher, daß eine Vorstufe vorliegen muß, die das Wachstum inhibiert. Da der Steroidgehalt der *cpd*-Mutante bisher nicht analysiert wurde, kann nur vermutet werden, daß *Cathasteron* (CT) das Produkt der durch DWF4 katalysierten Reaktion in der *cpd*-Mutante akkumuliert. Mit der Akkumulation eines inhibierenden Intermediates kann die unvollständige Komplementation der *cpd*-Mutante nach der exogenen Applikation des Endprodukts erklärt werden (Abb.3.13). Die Aktivität des Endprodukts *Brassinolid* aktiviert die Zellstreckung, hebt aber die Wirkung des *Cathasterons* (CT) in der *cpd*-Mutante nicht auf. Das Ergebnis ist eine Teilkomplementation. Andere Steroidmutanten, in denen keine inhibierenden Intermediate akkumulieren, können durch die exogene Applikation vollständig komplementiert werden. Vergleichbar erklärt sich auch der Phänotyp der Rezeptormutante. Da in der *bri*-Mutante die Steroidsynthese bis zum Endprodukt abläuft, ist ihr Wachstum nicht durch die Akkumulation von Steroidintermediaten beeinflusst. In der Rezeptormutante *bri1* sind die Mengen aller Steroidvorstufen leicht erhöht. Hauptsächlich sind aber größere Mengen an *Castasteron* (CS) und *Brassinolid* (BL) als im Wildtyp detektierbar (Noguchi *et al.*, 1999).

Offen bleibt, bisher wie eine *Brassinolid*-Vorstufe wie z. B. *Cathasteron* (CT) das Wachstum inhibieren kann. Dazu bieten sich zwei Möglichkeiten: Die Vorstufe kann aufgrund der ersten Seitenkettenhydroxylierung bereits eine Affinität zum Rezeptor haben, ohne diesen zu aktivieren. Dazu ist erst *Brassinolid* aufgrund der Modifikation des B-Rings in der Lage. Dies entspricht dem klassischen Fall eines Rezeptorantagonisten, einer Substanz, die den Rezeptor binden kann, ohne diesen zu aktivieren. Der Rezeptorantagonist (CT) kann die Wirkung des Rezeptoragonisten (BL) durch eine kompetitive Bindung mindern. Im zweiten Fall wird die inhibierende Vorstufe von einem zweiten alternativen Rezeptorkomplex perzeptiert, der eine negative Signaltransduktion einleitet. Beide Vorstellungen können den *cpd*-Phänotyp zum Teil erklären.

Eine nähere Betrachtung der *cpd*- und *bri*-Mutante gibt Klarheit. Da beide Mutanten nahezu gleich groß sind impliziert, dies, daß entweder in der *cpd*-Mutante ein negatives Signal oder in der *bri1*-Mutante ein positives Steroidsignal vorliegen muss, das das Wachstum reguliert. Damit stellt sich die Frage nach einem alternativen Steroidrezeptor. Dieser Gedanke ist seit der Identifikation der

BRI1-Homologen BRL1, BRL2 und BRL3 nicht abwegig (Cano-Delgado *et al.*, 2004). Wie BRI1 können BRL1 und BRL3 *Brassinolid* binden. Sie haben jedoch eine unterschiedliche Spezifität, BRL2 zeigt keine spezifische Bindungsaktivität für *Brassinolid*. Entsprechend ihrer Bindungsaktivitäten können auch BRL1 und BRL3, sofern sie unter der Kontrolle des *BRI1*-Promotors exprimiert werden, die *brl1*-Mutante fast vollständig komplementieren. BRL2 ist dazu nicht in der Lage. Damit liegt nahe, daß die BRL-Proteine alternative Steroidrezeptorkomplexe bilden können, die eine unterschiedliche Substratspezifität wie BRI1 aufweisen. Ergänzend berichten Zhou *et al.* (2004), daß BRL1 durch einen *brl1-5*-Supressorscreen identifiziert wurde. Die Supressormutante *brl1-1D* ist etwas größer als *brl1-5*. Eine 35S-getriebene *BRL1*-Überexpressionslinie im Hintergrund der *brl1-5*-Mutante führt zu einem vergleichbaren Effekt. Im Gegensatz dazu zeigt eine *brl1*-Nullmutation den gegensätzlichen Effekt, die *brl1/brl1-5*-Doppelmutante ist kleiner als die *brl1-5*-Einzelmutante. Dies zeigt, daß auch BRI1-ähnliche Rezeptorkinasen an der Steroidsignaltransduktion beteiligt sein können. Die unterschiedliche Bindungsspezifität der BRL-Proteine und das Ausbleiben der Komplementation bei der *brl1*-Mutante durch eine *BRL2*-Überexpression zeigt, daß möglicherweise verschiedene Steroide perzeptiert werden und eine verschaltete Signaltransduktion vorliegt. BRL2 ist somit ein guter Kandidat für die Perzeption einer inhibierenden Synthesevorstufe, die die BRI1 abhängige Signaltransduktion moduliert. Eine Analyse einer *brl2*-Mutante – insbesondere einer *brl2/cpd*-Doppelmutante im Vergleich zur *brl2/dwf4*-Doppelmutante – sollte dies bestätigen. Eine *brl2*-Mutante konnte jedoch bisher nicht isoliert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß der *cpd*-Phänotyp vor diesem Hintergrund durch eine inhibierende Vorstufe – die in der *cpd*-Mutante akkumuliert und mit einem alternativen Steroidrezeptorkomplex, der die BRI1-abhängige Signaltransduktion negativ moduliert – erklärt werden kann. Zu einer letztendlichen Klärung des Sachverhaltes kann eine Analyse der in der *cpd*-Mutante vorliegenden Metabolite und gezielte Fütterungsexperimente einzelner Synthesemutanten – insbesondere mit alternativen bzw. inhibierenden Intermediaten – beitragen. Die Durchführung dieser Experimente ist aufgrund der benötigten Steroidstandards zur GC-MS-Analyse und der speziellen Steroide für die Fütterungsexperimente nicht zu unterschätzen. Eine genaue Analyse verschiedener Doppelmutanten einzelner Syntheseschritte ist zwar aufwendig, aber durchführbar. Problematisch dabei ist, daß nicht alle Synthesemutanten im gleichen *A. thaliana*-Ökotyp vorliegen und für einige Mutanten nur EMS- und keine T-DNA-Insertionsallele verfügbar sind. Eine entsprechende Analyse von Doppelmutanten verschiedener Biosynthesemutanten wurde bereits initiiert (Wanke D. und Lafos M., Köln, 1999). In vorläufigen Analysen konnten synergistische Effekte der Doppelmutanten beobachtet werden, die bisher nicht erklärlich waren. Jetzt können sie als Beleg für das Netzwerkmodell der Biosynthese gewertet werden.

Durch die genaue Analysen von Doppelmutanten der Biosynthesenzyme kann unterschieden werden zwischen einer Biosynthese, die nach dem Modell einer linearen Synthesekette oder nach dem Netzwerkmodell abläuft. Bei einer linearen Synthesekette wird ein epistatisches Verhältnis zwischen einzelnen Synthesenzymen erwartet. Im Fall eines Netzwerkes werden synergistische bzw. additive Effekte erwartet. Dadurch kann auch die Position von CPD innerhalb der Synthese belegt werden.

Attraktiv an dieser Deutung des *cpd*-Phänotyps ist, daß verschiedene Intermediate unterschiedliche, positive wie negative Effekte auf die Signaltransduktion haben. Dies ermöglicht z.B. die Unterscheidung von extrazellulären und intrazellulären Steroidsignalen. Damit kann die intrazelluläre Steroidsynthese von einem extrazellulären Steroidsignal unterschieden werden. Dies ist eine Voraussetzung dafür, daß *Brassinolid* eine Hormonfunktion ausüben kann.

#### 4.7 Die lokale, genetische Komplementation der *cpd*-Mutante ermöglicht die Analyse des Steroidtransports *in planta*

Neben der konditionalen biochemischen Komplementation wurde auch eine konditionale, genetische Komplementation der *cpd*-Mutante durchgeführt (3.1.4). Die konditionale, genetische Komplementation ermöglicht weiterreichende Fragestellungen und Experimente, weil unter Verwendung des CPD-GFP-Fusionsproteins die erfolgte Wiederherstellung der CPD-Funktion bzw. der Brassinosteroidbiosynthese anhand der GFP-Fluoreszenz detektierbar ist. Weil im Hintergrund der *cpd*-Mutante gearbeitet wird, ist die erfolgte Komplementation anhand des wiederhergestellten Wildtyp-Phänotyps sichtbar. Der Vergleich der CPD-Aktivität anhand der GFP-Fluoreszenz mit dem Ausmaß der Komplementation ermöglicht die Beurteilung, ob ein Steroidtransport *in planta* stattfindet.

Zu diesem Zweck wurde das durch  $\beta$ -Östradiol induzierbare Expressionssystem (Zuo *et al.*, 2000) verwendet. Aus den beschriebenen Gründen mußten das Expressionssystem und die Steroidwirkung des  $\beta$ -Östradiol getestet werden (3.1.4). Anhand der durchgeführten Kontrollexperimente ist festzustellen, daß das  $\beta$ -Östradiol eine sehr gute Transkriptionskontrolle ermöglicht. Eine nicht induzierte Suspensionskultur hat weder Fluoreszenzsignale noch ein Signal in der Western-Blot-Analyse ergeben (Abb.3.25). Die entscheidende Frage, ob  $\beta$ -Östradiol eine Brassinosteroid-Wirkung in *A. thaliana* hat, und ob das durch  $\beta$ -Östradiol induzierbare Expressionssystem zur Komplementation von Brassinosteroidmutanten verwendet werden kann, konnte eindeutig beantwortet werden. Weder die *A. thaliana cpd*- noch die *det2*-Mutante hat eine Reaktion auf die Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol gezeigt, die parallele Behandlung mit *Brassinolid* führte zu einer Steigerung der Gesamthöhe um 100 % (Abb.3.26).

Nach Transformation des induzierbaren Konstruktes (iP::CPD-GFP) in Wildtyp- und *cpd*-Pflanzen konnte auch die Induzierbarkeit *in planta* überprüft werden. Da es durch die Zugabe des Detergenz Tween20 möglich war, die Aufnahme des  $\beta$ -Östradiols in oberirdischen Organen zu steigern, eignet sich dieses System auch zur Verwendung *in planta* (Abb.3.28 bis Abb.3.29). Die Transformation des induzierbaren CPD-GFP-Expressionskonstrukts zeigt deutlich, daß beim  $\beta$ -Östradiol-Expressionssystem unter nicht induzierten Bedingungen keine Transkription auftritt. Die selektierten Transformanten der *cpd*-Linien weisen ohne Induktion eindeutig den *cpd*-Phänotypen auf (Abb.3.31). Nach Induktion konnten sie zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden (Abb.3.31 bis Abb.3.33). Die biochemische Komplementation der *cpd*-Mutante hat gezeigt, daß *Brassinolid* von der Pflanze über die Wurzel aufgenommen werden kann und zu einer ganzheitlichen Komplementation führt. In Analogie dazu hat auch die Anzucht der iP::CPD-GFP/*cpd*-Linien auf mit  $\beta$ -Östradiol-versetzten

Agarplatten vergleichbare Resultate ergeben (Abb.3.31). Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß die Hypokotyle nicht komplementiert wurden, die Blätter jedoch nicht von denen des Wildtyps zu unterscheiden sind (Abb.3.32). Außerdem konnte nur in einer von ca. 20 Pflanzen ein GFP-Signal außerhalb der Wurzelspitze detektiert werden. Dies würde bedeuten, daß das  $\beta$ -Östradiol in der Pflanze nicht weiter verteilt wird. Aus der Komplementation der Blätter ist zu schließen, daß dann das Endprodukt der Synthese dorthin transportiert wurde. Dies wäre ein indirekter Nachweis des Steroidtransports *in planta*.

Um dies genauer zu analysieren, wurden die Experimente mit der Lanolinpaste durchgeführt (Abb.3.33). Der Einsatz der Lanolinpaste erlaubt eine präzise und lokal begrenzte Applikation des  $\beta$ -Östradiols. Durch die alleinige Applikation einer geringen Menge der Paste auf ein einzelnes Rosettenblatt sollte eine sehr begrenzte Komplementation induziert werden. Die Analyse der übrigen Pflanzenteile hat ergeben, daß auch benachbarte Blätter eine Reaktion aufweisen, das direkt behandelte Blatt hat dabei die stärkste Wachstumsreaktion gezeigt. Da in keinem der Blätter ein GFP-Signal detektiert werden konnte, spricht dies gegen eine lokale Komplementation durch die induzierte CPD-GFP-Fusion. Damit kann die morphologische Komplementation nur durch einen Transport des Endproduktes oder einer Vorstufe in die unbehandelten Blätter erklärt werden.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Instabilität des CPD-GFP-Fusionsproteins besteht die Möglichkeit, daß geringe, undetektierbare Mengen des Fusionsproteins vorliegen, die zur Komplementation der unbehandelten Organe führen. Dies würde der, in den nP::CPD-GFP/*cpd*-Linien beobachteten Situation entsprechen. Um sicher zu gehen, daß aufgrund der beobachteten Instabilität des CPD-Proteins die Verteilung des  $\beta$ -Östradiols nicht detektiert werden kann, wurde auf einen unabhängigen Reporter zurückgegriffen. Pflanzen, die mit einem induzierbaren GUS-Konstrukt transformiert waren, wurden in gleicher Weise mit Lanolinpaste behandelt (3.34). Die Analyse der GUS-Färbung hat gezeigt, daß das behandelte Blatt eine sehr starke Färbung aufweist. Darüber hinaus konnte in einigen Pflanzen auch eine Färbung der Wurzel, insbesondere der Wurzelspitze beobachtet werden.

Dies bedeutet, daß die lokale Applikation des  $\beta$ -Östradiols zu einer Expression und damit zur Komplementation der Brassinosteroidbiosynthese in dem behandelten Blatt und in der Wurzelspitze führt. Damit steht die ganzheitliche Reaktion der Pflanze der lokal begrenzten Komplementation in einem Rosettenblatt und der Wurzel gegenüber.

Da die lokale Applikation des  $\beta$ -Östradiols in dem behandelten Blatt und der Wurzelspitze zu einem GUS-Signal geführt hat, ist ein Transport des  $\beta$ -Östradiols vom Blatt in die Wurzel belegt. Das  $\beta$ -Östradiol wird nicht homogen in der Pflanze verteilt, ein Transport in andere unbehandelte Blätter war nicht nachweisbar, da diese keine Färbung zeigen. Daraus ist zu schließen, daß der Transport in die Wurzel gerichtet ist und nicht auf einer Gleichverteilung über Diffusion beruht. Weil in den induzierten *cpd*-Pflanzen auch unbehandelte Blätter eine Wachstumsreaktion gezeigt haben, das  $\beta$ -Östradiol aber nicht dorthin transportiert wird, konnten diese Organe nicht durch eine induzierte CPD-GFP-Expression komplementiert werden. Es muss demnach ein Transport des *Brassinolids* oder eines nachgeschalteten Signals stattfinden.

Das vorgestellte System zur lokalen und konditionalen Komplementation mittels einem  $\beta$ -Östradiol-induzierbaren Expressionssystem, in Kombination mit  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpasten, ermöglicht es, einen Steroidtransport *in planta* zu analysieren. Darüber hinaus ist auch ein *Screen* nach Transportmutanten durchführbar. Dazu kann das induzierbare GUS-Reporterkonstrukt zu einer näheren Analyse des  $\beta$ -Östradiol-Transportes, das induzierbare CPD-GFP-Konstrukt zur Identifikation neuer Brassinosteroid-spezifischer Transport- oder Signaltransduktionsmutanten verwendet werden.

#### 4.8 Beurteilung der T-DNA-Populationen und der *Screening*-Methoden

Insgesamt war die Suche nach T-DNA-Mutanten sehr erfolgreich, da für jedes untersuchte Gen mindestens eine T-DNA-Mutante identifiziert werden konnte. Dies wurde aber erst möglich, nachdem die komplette Koncz-T-DNA-Population (90.000 T-DNA-Linien, Rios *et al.*, 2002) fertiggestellt und zur Durchmusterung bereit war. Obwohl die SALK-Population mittlerweile deutlich größer ist (145.589 T-DNA-Linien, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress/statistik>, 2005), sind einige Mutanten dort nicht vertreten. Insgesamt decken beide Populationen alle CPD-Interaktionspartner und – im Falle der *OBP*-Genfamilie – sogar vier weitere Gene ab. Damit steht jetzt das nötige Pflanzenmaterial zur Verfügung, um eine genetische Analyse der Interaktionspartner und eine detaillierte Analyse der *OBP*-Genfamilie durchführen zu können.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß alle Koncz-T-DNA-Mutanten einen funktionsfähigen Hygromycin-Selektionsmarker tragen, der sich bei der Isolation der Mutanten und der Generation von Mehrfachmutanten als sehr hilfreich erwiesen hat (3.2.2.2). Bei allen analysierten SALK-Mutanten hat sich der Kanamycin-Resistenzmarker als unbrauchbar herausgestellt. Southern-Blot-Analysen mit der methylierungs-sensitiven Restriktionsendonuclease *PstI* haben gezeigt, daß die genomische DNA im Bereich der integrierten SALK-T-DNA nicht mit diesem Enzymen spaltbar ist, die Loci methyliert sind (Anhang, Abb.6.8.1). Methylierung ist ein Zeichen von transkriptionellem Gen-*silencing* (TGS) (Mette *et al.*, 2000; Vaucheret und Fagard, 2001; Bender, 2004). Die einzige Ausnahme stellt die *obp1-1*-Mutante dar, sie trägt nur eine T-DNA. Diese ist zwar mit *PstI* spaltbar, ihr Kanamycinmarker ist aber auch unbrauchbar. Die Isolierung einer T-DNA-Mutante aus der Koncz-T-DNA-Population ist recht aufwendig. Nach diversen PCR-Analysen müssen pro Insertion hundert Einzellinien ausgelegt werden, deren DNA zur Identifikation der gesuchten Insertionslinie verwendet wird. Die PCR-*Screening*-Methode hat sich aber als sehr robust herausgestellt. Da keine Hybridisierungen (McKinney *et al.* 1995; Krysan *et al.*, 1996, 1999; Winkler *et al.*, 1998) nötig sind ist die Methode relativ einfach (Rios *et al.*, 2002). Im Vergleich dazu kann eine Insertionslinie der SALK-Population durch eine Internet-Suche identifiziert werden. Der Zeitvorteil wird zwar durch die schlechte Verfügbarkeit des Samenmaterials zunichte gemacht, ist aber weniger arbeitsintensiv. Nach Erhalt des Samen-Materials erfolgt die Isolation einer homozygoten Linie. Diese Arbeitsschritte sind für beide Populationen gleich, doch stellt sich hier der funktionale Selektionsmarker der Koncz-Population wieder als sehr vorteilhaft dar (3.2.2.2).

#### 4.9 Identifikation homozygoter Mutanten mittels Southern-Analysen

Für alle identifizierten T-DNA-Insertionen konnten homozygote Pflanzen mittels PCR- bzw. Segregationsanalysen (3.2.2.2, 3.2.2.3) isoliert werden. Bevor die Pflanzen für weitere Analysen eingesetzt worden sind, wurde ihre Identität durch eine Southern-Analyse bestätigt (3.2.3.1). Die genauen Positionen der T-DNA-Insertionen waren zuvor durch die Sequenzierung der, während PCR-Analysen erhaltenen Amplifikate ermittelt worden (Abb.3.42). Daraus und aus den T-DNA-Sequenzen konnten die Fragmentgrößen vorhergesagt werden, die bei den Southern-Analysen auftreten. In allen Analysen stimmten die Vorhersagen mit den tatsächlichen Ergebnissen überein (Abb.3.43 bis Abb.3.55). Auch trat bei keiner Hybridisierung eine Unstimmigkeit zwischen den Ergebnissen der T-DNA-Sonden und denen der cDNA-Sonden auf. Nur in einem Fall – der *mapk1-1*-Mutante – zeigt eine Seite der T-DNA-Insertion keine T-DNA-*border*-Sequenz. Für diesen Übergang zwischen genomischer DNA und T-DNA wurde keine Sequenz ermittelt. Da die Southern-Hybridisierung mit der cDNA-Sonde ein eindeutiges Ergebnis gezeigt hat und davon auszugehen ist, daß dort nur eine T-DNA mit einem deletierten „*border*“-Bereich inseriert ist, wurde auf eine iPCR-Analyse verzichtet (Abb.3.53).

Anhand der Hybridisierungen mit den cDNA-Sonden und dem Vergleich mit Wildtyp-DNA konnte für jede Mutante eine homozygote Linie bestätigt werden. In einigen Fällen haben sich wegen Mehrfach- und/oder Tandeminsertionen zusätzliche Signale ergeben, die natürlich nicht vorhersagbar sind (Abb.3.49, Abb.3.51, Abb.3.55). Die Identität dieser Fragmente konnte aufgrund der verwendeten Restriktionsenzyme und dem Vergleich der Hybridisierungsergebnisse, die sich mit den T-DNA- und den cDNA-spezifischen Sonden ergaben, belegt werden. Wie von Ponce *et al.* (1998) für die Analyse von T-DNA-Insertionen der pGV3850:1003-T-DNA beschrieben wird, war es möglich, auch für die pPCV6NFHyg-T-DNA-Insertionen eine Analyse von Tandem-Integrationen durchzuführen. Diese Informationen sind für die Bewertung möglicher Phänotypen wichtig, es muß sichergestellt werden, mit welcher T-DNA sie cosegregieren. Deshalb werden zusätzliche T-DNAs möglichst ausgekreuzt. Im Fall der Hauptinteraktionspartner IAP1 und OBP1 wurden Mutanten – *iap1-1* und *obp1-1* – isoliert, die jeweils nur eine einzelne T-DNA-Insertion tragen. Die *iap2-1*- und die *mapk1-1*-Mutante enthalten eine LB-RB:RB-LB-Tandem-T-DNA-Insertion. Weitere T-DNA-Insertionen wurden nicht festgestellt (Abb.3.49, Abb.3.53). Diese Mutanten eigneten sich ohne weiteres für phänotypische Analysen und Kreuzungsexperimente. Für die übrigen Mutanten (*obp2-1*, *obp3-1*) wurden aus Zeitgründen die nötigen Rückkreuzungen mit den Kreuzungen der einzelnen Interaktionspartner kombiniert.

#### 4.10 Sind alle T-DNA-Mutanten Nullmutanten?

Es stellte sich die Frage, ob alle T-DNA Insertionen wirklich zu Nullmutanten führen. Grundsätzlich bringt eine T-DNA-Insertion in einem Gen eine Veränderung der Gensequenz mit sich und damit auch eine Mutation. Welche Relevanz diese Mutation hat, muß nun analysiert und interpretiert werden. Bei der T-DNA-Insertion in die codierende Sequenz (Exon) verursacht die T-DNA eine Unterbrechung

des Leserasters, das ursprünglich codierte Protein kann dann nicht mehr hergestellt werden. Da die T-DNA-Insertion aber nicht die Transkription verhindert, ist davon auszugehen, daß das betroffene Gen weiter transkribiert wird. Für den Fall, daß trotz der T-DNA-Insertion eine stabile mRNA gebildet wird, kann die Translation nur ein partielles Protein ergeben. Ob dieses Protein eine biologische Funktion haben kann, muß im Einzelfall geprüft und beurteilt werden. Prinzipiell kann auch der 3' Bereich eines Gens von der T-DNA aus transkribiert werden, da die T-DNA selbst Promotorsequenzen enthält. Im Fall der SALK-T-DNA befindet sich z. B. ein *nos*-Promotor im RB-Bereich und ein CaMV35S-Promotor ca. 700 bp zum LB-Bereich entfernt (Baulcombe *et al.*, 2000). Für die Analysen der, im Rahmen dieser Arbeit isolierten Mutanten wurden solche partiellen Genprodukte nicht berücksichtigt, da alle isolierten Mutanten T-DNA-Insertionen tragen, die relativ mittig in den Genen inseriert sind. Dies führt in allen Fällen zu einer Trennung der funktionalen Domänen der codierten Proteine. Im Fall der IAPs werden regulatorische Domänen bzw. Protein-Protein-Interaktionsdomänen am N-Terminus von den C-terminalen Ringdomänen getrennt (Abb.3.36). Bei den OBP-Proteinen wird die PH-Domäne (50AS-100AS), die für die subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist, von der putativ steroidbindenden Domäne (340AS-500AS) separiert (Abb.3.37). Es ist davon auszugehen, daß dies in beiden Fällen zu nicht funktionalen Proteinen führt. Das Vorkommen von partiellen Proteinen kann zu artifiziellen Phänotypen führen, wenn dadurch die Funktion anderer Proteine z.B. durch die Konkurrenz um Bindungsstellen inhibiert wird. In einem solchen Fall sollte der Effekt auch in heterozygoten Pflanzen auftreten und ist so von einem Nullphänotyp, der nur bei Homozygotie auftritt, zu unterscheiden.

Des Weiteren ist fraglich, ob eine Insertion in einem Intron auch zu einer Nullmutanten führt, da die codierende Sequenz des betroffenen Gens nicht verändert wird. Da primäre Transkripte gespleißt werden, ist es vorstellbar, daß dabei mit dem Intron auch die T-DNA-Sequenzen entfernt werden können. Die T-DNAs sind mit 5 kb bzw. 7 kb recht groß, die Intron-Größen der untersuchten Gene reichen von 25 bp bis 1586 bp. Da in anderen Pflanzenspezies wie z. B. in Tomate oder Reis auch noch größere Introns vorkommen ist es durchaus möglich, daß auch Introns die große T-DNAs beinhalten, ausgespleißt werden können. Das muß aber uneffizient sein, da die Wahrscheinlichkeit für alternative Spleiß-Akzeptor-Stellen mit der Größe des Introns bzw. der T-DNA zunimmt. Bei der Isolierung und Sequenzierung von cDNA-Klonen zur Herstellung von Expressionskonstrukten fällt auf, daß falsch prozessierte Transkripte relativ oft vorkommen.

Um zu klären, ob in den isolierten Mutanten die T-DNA-Sequenzen ausgespleißt werden, sind gezielte RT-PCR-Experimente durchgeführt worden (3.2.3.2). In keinem Fall konnte eine Amplifikation detektiert werden, die das Ausspleißen einer T-DNA belegen würde. Deshalb ist davon auszugehen, daß in allen analysierten Fällen die T-DNA-Insertion sowohl in Exons als auch in Introns die Herstellung des wildtypischen Transkripts und damit auch die Synthese des Wildtyp-Proteins verhindert. Damit stellen alle bearbeiteten Mutanten (*iap1-1*, *iap2-1*, *obp1-1*, *obp2-1*, *mapk1-1*) Nullmutanten dar, alle weiteren phänotypischen Analysen können Auskunft über die defekten Genfunktionen geben.

#### 4.11 Phänotypische Analyse der isolierten T-DNA-Mutanten

Die phänotypischen Analysen sollen Aufschluss über die defekten Genfunktionen geben. In erster Linie soll die Verbindung zwischen CPD, der Brassinosteroidbiosynthese und den CPD-Interaktionspartnern aufgezeigt werden, wichtig ist aber auch die Beziehung zwischen den Interaktionspartnern. Deshalb wurde das Hauptaugenmerk auf die Analyse der primären Interaktionspartner und ihrer nächsten Homologen gelegt. In Zukunft, wenn auch für alle weiteren Mitglieder der OBP-Genfamilie homozygote Mutanten vorliegen, kann diese Genfamilie gezielt genetischen Analysen unterzogen werden.

Im Falle einer direkten Regulation des CPD-Proteins oder der Brassinosteroidsynthese bzw. Signaltransduktion durch einen Interaktionspartner wird ein veränderter Phänotyp – vergleichbar mit dem von bekannten Synthese- oder Signaltransduktionsmutanten – erwartet. Da alle bisher beschriebenen Mutanten, die eine Funktion in der Brassinosteroidsynthese oder Signaltransduktion inne haben, nach der exogenen *Brassinolid*-Applikation, einen zum Wildtyp veränderten Phänotyp zeigen, wurde dieser Phänotyp besonders untersucht.

Keine der isolierten T-DNA-Mutanten hat einen vergleichbaren Phänotypen wie die *cpd*-Mutante gezeigt (Abb.3.59, Abb.3.60). Alle detektierten Abweichungen zum Wildtyp in Bezug auf die Gesamthöhe (Abb.3.62), die Hypokotyl- und Wurzellänge (Abb.3.62) haben sich als gering herausgestellt. Sie sind, wenn überhaupt, nur anhand statistischer Analysen – wie die gezeigten T-Test – als signifikant zu betrachten.

In frühen Entwicklungsstadien zeigen die *iap*-Mutanten aber deutliche Abweichungen im Wurzelwachstum (Abb.3.62). Besonders die um ca. 20% gegenüber dem Wildtyp verlängerte Wurzel der *iap2-1*-Mutante fällt auf ( $P < 0,001$ ). Dieser morphologische Unterschied wird besonders in dem veränderten Verhältnis von Wurzel- und Hypokotyllänge von 5,3 im Vergleich zu 4,0 beim Wildtyp deutlich. Der Vergleich mit verschiedenen Steroidmutanten zeigt, daß der Phänotyp der *iap2-1*-Mutante dem einer *CPD*-Überexpressionslinie gleicht (Abb.3.63).

##### 4.11.1 Die *iap2-1*-Mutante ist hypersensitiv gegenüber *Brassinolid*

Bei der Betrachtung der Wurzellänge auf Hochsteroidmedium wird der Phänotyp der *iap2-1*-Mutante noch deutlicher. Hohe Steroidkonzentrationen bewirken eine Inhibition des Wurzelwachstums (Clouse *et al.*, 1996). Die *iap2-1*-Mutante reagiert viel stärker auf die exogene *Brassinolid*-Applikation als der Wildtyp. Während sie auf Kontrollmedium eine längere Wurzel bildet, ergibt sich auf den Steroidplatten eine deutlich kürzere Wurzel als der Wildtyp. Die *iap2-1* zeigt nur 26 % der Wurzellänge im Vergleich zum Kontrollmedium. Der Vergleich mit der *bri1-5*-Mutante macht die Relevanz des Ergebnisses deutlich. Das schwache *bri1-5*-Allel zeigt aufgrund der verminderten Steroidperzeption einen intermediären Phänotyp. In den durchgeführten Experimenten diente die *bri1-5*-Mutante als Kontrolle. Sie weist mit einer Wurzellänge von 82 % auf Hochsteroidmedium eine partiell insensitive Reaktion auf. Im Gegensatz dazu zeigt der Wildtyp eine Wurzellänge von 53 % im Vergleich zum Kontrollmedium. Ein zweiseitiger T-Test zeigt das sich beide Mutanten vom Wildtyp

unterscheiden: die *iap2-1*-Wurzel ist signifikant kürzer, die *bri1-5*-Wurzel signifikant länger als die Wildtyp-Wurzel ( $P < 0,0001\%$ ).

Die insensitive Reaktion der *bri1-5*-Mutante lässt sich auf die verminderte Funktionalität des mutierten *BRI1-5*-Proteins und damit auf eine reduzierte Signaltransduktion zurückführen. Demgegenüber kann die hypersensitive Reaktion der *iap2-1*-Mutante durch einen erhöhten endogenen Steroidgehalt oder eine höhere Aktivität des Brassinosteroid-Rezeptorkomplexes, also einer gesteigerten Signaltransduktion, verursacht werden. Ein erhöhter endogener Steroidgehalt der *iap2-1*-Wurzel würde sowohl das erhöhte Streckenwachstum auf Kontrollmedium als auch die hypersensitive Reaktion auf Hochsteroidmedium erklären. Der physiologische Brassinosteroidgehalt ist sehr niedrig, er liegt im Bereich weniger Nanogramm pro Gramm Frischgewicht, die BL-Konzentration wird mit 0,2 ng/g angegeben (Choe *et al.*, 2001). Bei der exogenen Applikation von *Brassinolid* im femtomolaren Bereich ( $10^{-14}$ M) reagiert auch der Wildtyp mit einer leichten Wurzelstreckung (Li *et al.*, 2001). In höheren Konzentrationen tritt dann die Inhibition auf. Wegen eines höheren endogenen Steroidgehalts wird die inhibierende Steroidkonzentration bei der exogenen Applikation rascher erreicht und die Pflanze muß hypersensitiv reagieren.

Das IAP2-Protein zeigt die Struktur einer E3-Ligase (Abb.3.36). Wenn IAP2 eine regulatorische Funktion bei der Degradation des CPD-Proteins hat, kann CPD in der *iap2-1*-Mutante stabilisiert sein. Ein stabilisiertes CPD-Protein verursacht möglicherweise einen erhöhten Durchsatz der Brassinosteroidbiosynthese und damit einen erhöhten Steroidgehalt. Ein erhöhter Steroidgehalt der mit einem gesteigerten Hypokotylwachstum korreliert, wurde z.B. in einer *DWF4*-Überexpressionslinie (*AOD4*) beobachtet (Abb.3.4; Choe *et al.*, 2001). *AOD4* zeigt auch eine hypersensitive Reaktion der Wurzel auf Hochsteroidmedium im Dunkeln. Ob die *iap*-Mutationen wirklich die Stabilität des CPD-Proteins beeinflussen, wird sich durch die Analyse der CPD-Proteinstabilität im Hintergrund der *iap*-Einfach- und Mehrfachmutanten herausstellen. Die entsprechenden Kreuzungsexperimente und vorläufige Ergebnisse sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

Möglicherweise wird die Reaktion der *iap2-1*-Mutante aber auch durch eine verstärkte BR-Signaltransduktion verursacht, ohne daß sich der Steroidgehalt der Pflanze ändern muß. Als E3-Ligase könnte das IAP2-Protein auch an der Regulation anderer Komponenten der Brassinosteroidsignaltransduktion beteiligt sein. In Analogie zu dem zuvor beschriebenen Effekt der *bak1*-Mutation im Hintergrund der *bri1-5*-Mutanten, die zu einer erhöhten Internalisation des *BRI1*-Proteins und damit zu einer erhöhten Signaltransduktion und zur partiellen Komplementation der *bri1-5*-Mutante führte (Rossinova *et al.*, 2005), könnte auch eine E3-Ligase an der Regulation des Rezeptorkomplexes beteiligt sein.

Grundsätzlich regulieren E3-Ubiquitin-Ligasen die Ubiquitinierung ihrer Substrate, wobei verschiedene Formen der Mono- und Poly-Ubiquitinierung beobachtet werden (Pickart, 2001a, 2001b; Sun *et al.*, 2004; d'Azzo *et al.*, 2005). Die Ubiquitinierung kann ein Signal für die Proteasom-abhängige Degradation sein, aber auch die Endozytose von Rezeptoren an der Plasmamembran regulieren. Aus dem tierischen System ist bekannt, daß die Endozytose eines aktivierten Zelloberflächenrezeptors zum intrazellulären Transport in Lysosomen und damit zur

Degradation oder zum Rücktransport zur Plasmamembran führen kann. Die Rezeptorendozytose über Clathrin-besetzte Vesikel wird durch Mono-Ubiquitinierung reguliert (Holstein, 2002; Jürgens, 2004; Höller *et al.*, 2004). Da in Pflanzen erstmals im Fall der SOMATIC EMBRYOGENESIS REZEPTOR KINASE1 (SERK1) eine Rezeptorendozytose beobachtet wurde, ist es möglich, daß dieser Regulationsmechanismus auch in Pflanzen konserviert ist (Shah *et al.*, 2002). Die Mutation einer E3-Ligase die an der Regulation dieses Prozesses beteiligt ist, wird zu einer veränderten Internalisationsrate des Rezeptors und damit zu einer veränderten Signaltransduktion führen. Dieser Effekt kann sowohl positiv als auch negativ ausfallen, je nachdem, ob die Signaltransduktion von der Plasmamembran oder von den intrazellulären Vesikeln ausgeht. Dementsprechend könnte sich ein hypersensitiver oder insensitiver Phänotyp gegenüber der exogenen Steroidapplikation ergeben.

Eine Beteiligung von IAP2 an der Degradation des Rezeptors ist ebenfalls nicht auszuschließen, weil dann im Falle der *iap2-1*-Mutante mehr Rezeptormoleküle vorliegen würden, die zu einer erhöhten Signaltransduktion und einer höheren Sensitivität gegenüber Brassinosteroiden führen können. Zur Klärung dieser Frage wurden – nachdem die *BRI::BRI-GFP*-Linie verfügbar war – auch Kreuzungsexperimente mit den *iap*-Mutanten initiiert. Analysen der BRI-Lokalisation und Stabilität im Hintergrund der *iap*-Mutanten werden Aufschluss über diese neue Verbindung geben.

#### 4.11.2 Die OBP-Proteine aus *A. thaliana* zeigen überlappende Funktionen

Alle *obp*-Mutanten, die *iap1-1*- und die *mapk1-1*-Mutante haben im Wurzelinhibitionstest leicht sensitiver als der Wildtyp reagiert (Abb.3.36). Die Effekte sind aber viel schwächer als bei der *iap2-1*- oder *bri1-5*-Mutante, daher ist es wiederum schwierig, das Ergebnis zu beurteilen. Weil aber alle *obp*-Mutanten in gleicher Weise reagieren, besteht die Möglichkeit, daß sie aufgrund ihrer hohen Homologie auf Proteinebene redundante Funktionen haben (Abb.3.35). Keine der fünf identifizierten *obp*-Mutanten zeigt anhand der bisherigen Analysen einen deutlichen Phänotyp (3.3). Eine überlappende Funktionalität ist nicht verwunderlich, da zumindest die Gene *OBP1* und *OBP2* direkte Produkte einer Gendublikation, sogenannte paraloge Gene sind (Blanc *et al.*, 2000). Expressionsdaten wie z. B. die des „Genevestigator“ von der ETH Zürich ([www.genevestigator.ethz.ch/](http://www.genevestigator.ethz.ch/)), deuten auf eine ubiquitäre Expression der *OBPs*, dabei wird die stärkste Transkription in Blütenorganen beobachtet. Für die orthologen *OSH*-Gene in Hefe konnte diese Redundanz durch die Analyse von Mehrfachmutanten bereits belegt werden (Beh *et al.*, 2001). Die entsprechenden *OSHS* zeigen als Einfachmutanten ebenfalls keinen Phänotyp, der *Knockout* aller *OSH*-Gene in Hefe ist jedoch lethal. Es ist denkbar, daß eine solche Redundanz auch in der *OBP*-Genfamilie in *A. thaliana* vorliegt. Dafür spricht die sehr hohe Homologie untereinander und die gleichsinnige Reaktion auf Hochsteroidmedium. Ob der beobachtete Effekt in einer Mehrfachmutante additiv ist muß noch analysiert werden. Einen Ansatz dazu stellen die durchgeführten Kreuzungsexperimente verschiedener *obp*-Einzelmutanten dar (3.4)

#### 4.12 Stellt die *dsRNAi*-Technologie eine Alternative zur T-DNA-Mutagenese dar?

Die verwendeten *dsRNAi*-Konstrukte (Abb.3.58) haben widersprüchliche Ergebnisse ergeben (3.2.4). Mit dem konstitutiven 35S-regulierten Konstrukt konnten keine Transformanten isoliert werden. Dies kann darauf hinweisen, daß das Konstrukt funktional ist und die OBPs eine essentielle Funktion inne haben. Es kann aber auch ein fehlerhaftes Konstrukt vorliegen. Im Gegensatz dazu konnten mit dem induzierbaren *dsRNAi*-Konstrukt problemlos eine Vielzahl an Transformanten selektiert werden. Nach der Induktion mit  $\beta$ -Östradiol konnten keine phänotypischen Veränderungen beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten auf eine essentielle Funktion der OBPs in frühen Entwicklungsstadien während der Embryoentwicklung hin, die durch die  $\beta$ -Östradiol-Behandlung nicht beeinflusst wurden, da diese erst später einsetzte. Eine genaue Analyse der T-DNA-Mutanten, insbesondere von Mehrfachmutanten, muß zeigen, ob diese Redundanz durch systematische Kreuzungsexperimente aufgebrochen werden kann. Die durchgeführten Kreuzungsexperimente sind ein wichtiger Schritt in diese Richtung (3.4). Ob die RNAi-Technologie in Zukunft auch in Kombination mit T-DNA-Mutanten zur Analyse der *OBP*-Genfamilie einsetzbar ist, muß durch eine Analyse der induzierten Pflanzen auf RNA-Ebene überprüft werden. Da aus Transkriptionsanalysen ([www.genevestigator.ethz.ch/](http://www.genevestigator.ethz.ch/)) hervorgeht, daß *OBPs* sehr stark in Blüten exprimiert sind, ist eine Analyse der Blütenentwicklung bei den induzierten RNAi-Pflanzen sinnvoll. Dies kann mit den beschriebenen,  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpasten besser und gezielter als zuvor durch Besprühen analysiert werden.

#### 4.13 Kreuzungsexperimente

Weil die Analyse der Einzelmutanten außer bei der *iap2-1*-Mutante keine auffallenden Phänotypen ergeben hat, wurden zwei Arten von Kreuzungen durchgeführt: Kreuzungen der T-DNA-Mutanten der CPD-Interaktionspartner miteinander (3.4.2) und mit den nP::CPD-GFP/cpd-Linien (3.4.1). Darüber hinaus wurden Kreuzungen zwischen T-DNA-Mutanten und Expressionslinien z.B. den Promotor-GUS-Reporter-Linien (3.3.3) initiiert. Da es nicht vorhersehbar ist, ob – und wenn ja – welche Interaktionspartner an gleichen physiologischen Prozessen beteiligt sind, wurden alle möglichen Kreuzungskombinationen zwischen den *iap*-, *obp*- und der *mapk*-Mutanten ausgeführt (Abb.3.75). Bei der Analyse der Kreuzungen wurde ein Schwerpunkt auf die Identifikation von Doppelmutanten der primären CPD-Interaktionspartner und ihrer nächsten Homologen gelegt (3.4.2). Dabei konnte zumindest die *iap1-1/iap2-1*- und die *iap1-1/obp1-1*-Doppelmutante mittels RT-PCR identifiziert werden (Abb.3.78). Aus Material- und Zeitgründen wurde die Analyse der Doppelmutanten vorerst auf PCR- und RT-PCR-Experimente beschränkt. Bei der Analyse der Einzelmutanten hat sich diese Analytik aber als sehr verlässlich herausgestellt (3.2.3.2). Keine der identifizierten Doppelmutanten hat einen auffälligen Phänotyp gezeigt. Eine genaue Analyse und Beurteilung der Doppelmutanten muß aber unbedingt noch folgen. Da die Analysen der Einzelmutanten gezeigt haben, daß sich die *iap1-1*- und *iap2-1*-Mutanten im Wurzelwachstum (Abb.3.62) und in der Reaktion auf Hochsteroidmedium (Abb.3.64) unterscheiden, ist kein einfacher,

additiver Effekt in der Doppelmutante zu erwarten. Für die *iap*-Mutanten wird die gezielte Analyse von Kreuzungen mit Reportergenen (3.4.1) – wie CPD-GFP oder BRI-GFP – besser Auskunft über ihre Funktion bzw. Beteiligung an der Regulation der Steroidsynthese und Signaltransduktion zeigen.

Die *obp1-1/obp2-1*-Doppelmutante konnte nicht zweifelsfrei identifiziert werden (Abb.3.78). Da aber zumindest Linien – die für ein Gen homozygot, für das andere heterozygot sind – eindeutig identifiziert wurden (Abb.3.77), lagen in den analysierten, segregierenden Pools zu einem Viertel auch Doppelmutanten vor. Diese zeigten ebenfalls keinen Phänotyp. Daß auch die *obp1-1/obp2-1*-Doppelmutante keinen auffallenden Phänotyp aufweist, kann nur im Hinblick auf die hohe Homologie der OBP-Proteine hin interpretiert werden (Abb.3.35). Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit, möglichst für alle *OBP*-Gene Mutanten zu isolieren und diese zur Generation von Mehrfachmutanten zu verwenden. Auch für die *obp*-Doppelmutante gilt, daß eine ausführliche Analyse des Phänotyps unter verschiedensten, physiologischen Bedingungen folgen muß. Soweit zeigt das Ergebnis, daß noch keine große Spezifizierung der duplizierten *OBP*-Gene erfolgt ist. Darum müssen auch sehr subtile Phänotypen in Betracht gezogen werden. Analysen von Steroidmangelmutanten haben belegt, daß z.B. aufgrund von fehlenden Steroiden oder einem ungünstigen Verhältnis von Struktursteroiden die Blütenentwicklung beeinträchtigt ist (Schaeffer *et al.*, 2001). Entsprechende Analysen der Doppelmutanten konnten noch nicht durchgeführt werden.

Um den Einfluß der IAP-Proteine auf die CPD-Proteinstabilität zu prüfen, wurden die *iap*-Mutanten mit einer nP::CPD-GFP/cpd-Linie gekreuzt. Aus der Kombination der Hygromycin-, der Basta- und der *cpd*-Segregation war es möglich, die Genotypen der F<sub>2</sub>-Pflanzen durch Segregationsanalysen in der F<sub>3</sub>-Generation zu bestimmen. Als Vorläufiges Ergebnis konnte kein Effekt der *iap*-Einzelmutationen auf die CPD-Proteinstabilität gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist vorläufig, weil noch keine doppelt homozygoten-Linien, sondern nur segregierende Pools mikroskopisch analysiert wurden. Eine gemeinsame Regulation des CPD-Proteins durch die IAP-Proteine ist nicht auszuschließen, da beide Proteine mit CPD im Hefe-Testsystem interagieren können (Zsuzsa Koncz, pers. Mitteilung). Deshalb wird auch eine Kreuzung der *iap*-Doppelmutante mit der nP::CPD-GFP-Linie analysiert. Wie bereits zuvor erwähnt, wurde eine entsprechende Analyse der BRI-Lokalisation bzw. der Stabilität mit den Kreuzungen der *iap*-Mutanten mit der BRII::BRII-GFP-Linie initiiert.

#### **4.14 Expressionsanalysen mittels Promotor::GUS-Konstrukten**

Der entscheidende Vorteil bei der Verwendung von Promotor::GUS-Reporter-Linien gegenüber RT-PCR oder Microarray-basierenden Expressionsstudien ist, daß eine viel höhere Auflösung auf suborganer Ebene des Signals erreicht wird. Eine genaue mikroskopische Analyse der GUS-Färbungen erlaubt eine histologische Lokalisation der Transkription, was bei anderen Methoden aufgrund der groben Probenahme nicht durchführbar ist. Die Verwendung von Promotor::GUS-Linien ermöglicht auch die einfache Analyse, wie sich die Expression eines Promotors in verschiedenen Entwicklungsstadien ändert oder durch Hormone und veränderte Wachstumsbedingungen oder auch durch andere Mutationen beeinflusst wird.

Neben der gewebespezifischen Verteilung der Genexpression wurde auch der Einfluss von Pflanzenhormonen analysiert. Da Co-Expression in der Regel eine Bedingung für eine mögliche Protein-Protein-Interaktion ist, wurde ein Augenmerk auf die Expression der CPD-Interaktionspartner gelegt. Dabei ist auffällig, daß alle Interaktionspartner auch in der Wurzel exprimiert werden und so folglich auch dort physikalisch mit CPD interagieren könnten (Abb.3.67).

Die Expression von *CPD* in der Wurzel ist jedoch fraglich, da die CPD-Promotor-GUS-Fusion nur sehr schwache Signale ergab (Abb.3.5). Die gezeigten Analysen der komplementierten CPD-GFP-Linien haben gezeigt, daß nicht detektierbare Mengen des CPD-Proteins (3.1.3.3) zur Komplementation (Abb.3.10) ausreichend sind und daß ein ektopisch exprimiertes CPD-Fusionsprotein in der Wurzel stabilisiert ist (Abb.3.17). Da auch die Analyse der nP::CPD-GFP-Linien eine diffuse GFP-Fluoreszenz in der Wurzelspitze gezeigt hat (Abb.3.22), die von einem raschen CPD-Umsatz – der dem GFP-Reporter nicht die Zeit zur Maturation lässt – verursacht werden kann, ist das Vorkommen des CPD-Proteins und der möglichen Interaktion dort nicht auszuschließen. Dies ist in Hinblick auf neuste Erkenntnisse, wonach die Steroidsignaltransduktion aufgrund der höchsten Internalisationsrate von BRI1 (Rusinova *et al.*, 2004) hauptsächlich auf die Wurzelspitze konzentriert ist, entscheidend für die Beurteilung, in wie weit ein Steroidtransport in Pflanzen auftritt und für die Entwicklung notwendig ist.

Anhand der Stabilisierung des CPD-Proteins in 35S::CPD-GFP-Pflanzen im Bereich der äußeren Epidermisschicht der Wurzelspitze (Abb.3.18) ist ein Steroidkurzstreckentransport von den äußeren Epidermiszellen zu den zentral gelegenen Zellen, die die höchste BRI1-Aktivität zeigen, möglich. Es muß mindestens ein Zell-Zell-Transport für den Hormonstatus und die damit verbundene Signalfunktion des *Brassinolids* nachgewiesen werden.

Die Expressionsergebnisse der *OBP*::GUS-Fusionen sehen in Hinblick auf die mögliche Konzentration der Steroidsignaltransduktion auf die Wurzelspitze sehr viel versprechend aus. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß dieses Ergebnis nicht wie die übrigen GUS-Daten durch die Analyse vieler unabhängiger Linien, sondern nur durch jeweils eine Linie abgesichert ist. Auch steht diese spezifische Expression im Widerspruch zu den freiverfügbaren Microarray-basierenden Expressionsdaten ([www.genevestigator.ethz.ch/](http://www.genevestigator.ethz.ch/)). Dies deutet auf fehlerhafte Promotorkonstrukte oder eine Insertion in Heterochromatin hin, zur Klärung müssen weitere Transformanten analysiert werden. Darüber hinaus ist es auch möglich, daß zur wildtypischen Expression der *OBP*-Gene neben den Promotorsequenzen auch weitere Kontrollregionen, z. B. im ersten Intron benötigt werden. Dies muss mit entsprechenden Konstrukten überprüft werden.

Neben der Wurzel zeigen die, für alle übrigen Interaktionspartner codierenden Gene *IAP1*, *IAP2* und *MAPK1* auch eine Expression in den Kotyledonen. Dies stimmt mit der Lokalisation der *CPD*-Expression in den Kotyledonen während der ersten Tage nach der Keimung überein. Mit den GUS-Färbungen wurde gezeigt, daß die Co-Expression nicht nur räumlich, sondern auch zeitlich gegeben ist. Die Expression der CPD-Interaktionspartner wurde mit der von gleich alten *CPD*::GUS-Pflanzen (Mathur *et al.*, 1998) verglichen, die GUS-Färbung vier Tage alter

CPD::GUS-Pflanzen ist in Abb.3.5 gezeigt, parallel analysierte *IAP*::GUS und *MAPK*::GUS-Pflanzen in Abb.3.66.

#### 4.15 Der *IAP1*-Promotor wird positiv durch *Brassinolid*, negativ durch ABA reguliert

Von verschiedenen Genen, die für Cytochrom-P450-Enzyme der Brassinosteroidbiosynthese codieren, ist bekannt, daß sie durch eine *feed-back*-Inhibition des Endprodukts *Brassinolid* negativ reguliert werden (Mathur *et al.*, 1998; Bancos *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2005). Aufgrund von Expressionsanalysen mittels Microarray-Technologie sind Interaktionen zwischen dem Brassinosteroidsignal und anderen Pflanzenhormonen entdeckt worden (Bouquin *et al.*, 2001; Müssig *et al.*, 2002; Goda *et al.*, 2004). Vor diesem Hintergrund wurde auch der Einfluß verschiedener Pflanzenhormone und Inhibitoren auf die Expression der untersuchten Gene getestet. Es wurde aufgedeckt, daß die Expression des *IAP1*-Gens positiv durch *Brassinolid* – negativ durch ABA – reguliert wird (Abb.3.69). Dabei ist auffällig, daß die Regulation auf die Kotyledonen und auf das Hypokotyl beschränkt bleibt. Die *IAP1*-Expression in der Wurzel scheint gar nicht oder zumindest viel schwächer reguliert zu sein (Abb.3.69). Die gleichzeitige Applikation beider Hormone zeigt, daß der inhibierende Effekt des ABA überwiegt (Abb.3.70). Durch eine Vorbehandlung mit *Brassinolid* konnte der inhibierende Effekt von ABA aufgehoben oder zumindest für den Versuchszeitraum aufgeschoben werden. Eine Interaktion von *Brassinolid* und ABA bei der Genregulation wurde bereits beobachtet (Abraham *et al.*, 2003). Mit dem *IAP1*-Promotor wird erstmals ein Promotor beschrieben, der positiv durch *Brassinolid* und negativ durch ABA reguliert ist. Damit stellt die *IAP1*-Promotor-GUS-Fusion einen interessanten Reporter für die BR-Induktion *in planta* da. Zukünftige Analysen von *IAP1*-Promotor-GUS-Linien im Hintergrund von Brassinosteroid-Signaltransduktionsmutanten wie *bri1*, *bri1-5* und eventuell auch *iap2-1*, von denen zumindest die *bri*-Allele Steroide akkumulieren, müssen zeigen, ob der Promotor als *in planta*-Reporter für einen veränderten Steroidgehalt verwendbar ist. Auch im Hintergrund von Brassinosteroid-Biosynthesemutanten sollte sich ein anders Färbemuster als im Wildtyp ergeben, da diese Pflanzen auf ein verändertes Steroidprofil hinweisen.

Insgesamt hat sich die Analyse der Promotor::GUS-Reporterlinien als weit informativer als andere Expressionsdaten herausgestellt. Da die Promotoren der Gene *IAP2* und *MAPK1* eine zum *IAP1*-Promotor vergleichbare Regulation aufgezeigt haben, ist es sehr wahrscheinlich, daß die IAP-Proteine an ähnlichen Prozessen beteiligt sind (Abb.3.71). Die hormonale Regulation und die gewebespezifische Verteilung der *IAP1*- und *IAP2*-Expression (Abb.3.67, Abb.3.69, Abb.3.71) spricht für eine Beteiligung der IAP-Proteine an der Regulation der CPD-Protein-Stabilität. Die Kombination aus der *feedback*-regulierten Inhibition der *CPD*-Transkription und der gesteigerten Transkription der *IAP*-Gene, die eine erhöhte IAP-Aktivität nach sich ziehen kann, zeigt eine Möglichkeit, wie sich die Regulation des *CPD*-Gens auf transkriptioneller Ebene mit einer schnellen Regulation auf Proteinebene durch die Interaktion mit *IAP1* und *IAP2* ergänzen kann. Die gegensätzliche Regulation des *CPD*-Promotors und der *IAP*-Promotoren durch das gleiche Hormonsignal *Brassinolid* kann mit der Existenz verschiedener Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Es wurden zwei verschiedene,

durch die BRI1- und BIN2-abhängige Signaltransduktion regulierte Transkriptionsfaktoren beschrieben (He *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). Der Transkriptionsfaktor BZR1 wurde als Negativ-Regulator des *CPD*- und des *DWF4*-Gens beschrieben, die direkte Bindung von BZR1 an den *CPD*-Promotor konnte *in vitro* gezeigt werden (He *et al.*, 2005). Die Mutation der BZR1-Bindeposition im *CPD*-Promotor einer *mCPD::GUS*-Fusion führte zu einem starken GUS-Signal und damit zum Wegfall der Repression durch BL. Im Gegensatz dazu kann BES1 zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie BIM1 die Transkription BL-regulierter Gene positiv beeinflussen (Yin *et al.*, 2005).

#### 4.16 Zusammenfassung

Mit der Komplementation der *cpd*-Mutante – durch die Expression eines *CPD*-GFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des endogenen *CPD*-Promotors und des konstitutiven CaMV-35S-Promotors – konnte die Funktionalität des *CPD*-GFP-Fusionsproteins *in planta* belegt werden. Die Analyse der zellulären Lokalisation zeigt, daß das *CPD*-Protein ein membrangebundenes, im ER lokalisiertes Protein ist. Die Lokalisation wurde durch Detektion der GFP-Fluoreszenz und mit der Western-Blot-Analyse eines differentiell zentrifugierten Zellextrakts bestätigt. Bisher wurde nur die Lokalisation eines weiteren Brassinosteroidsyntheseenzym (DWF1), das auch im ER lokalisiert ist, beschrieben. Mit Hilfe des Nativ-Promotorkonstruktes (*CPD::CPD*-GFP) sollte die gewebespezifische Lokalisation des *CPD*-Proteins gezeigt werden. Ein Vergleich des *CPD::GUS*-Konstrukts mit den *CPD*-GFP-Expressionskonstrukten (35S::*CPD*-GFP; *nP*::*CPD*-GFP) belegt, daß die *CPD*-Expression auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene reguliert ist. Weil das *CPD*-Protein so instabil ist, war eine *in planta*-Detektion des *CPD*-GFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des *CPD*-Promotors nicht möglich.

Die phänotypische Betrachtung der *cpd*-Mutante zeigt, daß der *cpd*-Phänotyp anhand weniger Parameter – wie z. B. der Wurzel- und Hypokotyllängen, dem Rosettendurchmesser und der Gesamthöhe – beschreibbar ist und so eine einfache Analyse der Phänotypen der isolierten Mutanten möglich ist. Der Vergleich mit anderen Brassinosteroidsynthese- bzw. Signaltransduktions-Mutanten macht deutlich, daß die *cpd*-Mutante die kleinste Brassinosteroidmutante ist. Dies räumt ihr eine besondere Position in der Synthese ein. Darüber hinaus haben die biochemischen Komplementationsstudien der *cpd*-Mutante deutlich gemacht, daß während der gesamten Pflanzenentwicklung ein Steroidsignal zur normalen Entwicklung benötigt wird. Bei der konditionalen, biochemischen Komplementation der *cpd*-Mutante durch die zeitlich begrenzte Applikation des *Brassinolids* konnte eindeutig gezeigt werden, daß nach Beendigung der Steroidzufuhr eine Reversion zurück zum *cpd*-Phänotyp auftritt. Mit verschiedenen Kontrollexperimenten war es möglich zu demonstrieren, daß auch das  $\beta$ -Östradiol-induzierbare Expressionssystem für konditionale Komplementationsstudien von Brassinosteroidmutanten verwendbar ist. Es wurde unter anderem belegt, daß eine sehr starke Expressionskontrolle möglich ist, da unter nicht-induzierten Bedingungen weder GFP-Fluoreszenz noch Signale in der Western-Blot-Analyse detektierbar waren. Im Gegensatz zu *Brassinolid* hat  $\beta$ -Östradiol keine

Wachstumsreaktion bei Brassinosteroidsynthesemutanten wie *cpd* oder *det2* hervorgerufen. Mit einem induzierbaren CPD-GFP-Konstrukt und  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpasten wurde eine lokal begrenzte Komplementation der *cpd*-Mutante durchgeführt. Damit war es möglich, einen Steroidtransport *in planta* zu belegen. Nach der lokalen Applikation der  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpaste auf ein Rosettenblatt wurde nur in der Wurzelspitze eine GFP-Fluoreszenz beobachtet, die behandelten *cpd*-Pflanzen haben aber eine ganzheitliche Reaktion gezeigt. Mit Hilfe eines unabhängigen, induzierbaren GUS-Reporterkonstruktes konnte ein Transport des  $\beta$ -Östradiols von einem Rosettenblatt in die Wurzelspitze gezeigt werden. Allerdings wird das  $\beta$ -Östradiol nicht homogen in der Pflanze verteilt, weil unbehandelte Blätter kein GUS-Signal aufweisen. Die Komplementation unbehandelter Blätter muss folglich durch den Transport des *Brassinolids* oder eines nachgeschalteten Signals bedingt sein.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudie verschiedene Interaktionspartner des CPD-Proteins isoliert werden. Sequenzanalysen der identifizierten CPD-Interaktionspartner haben Homologien zu tierischen „INHIBITOR OF APOPTOSIS“- (IAP)- und „OXYSTEROL BINDING PROTEIN“- (OBP)-Proteinen gezeigt. Für alle CPD-Interaktionspartner und für vier weitere OBPs konnte in der SALK- bzw. Koncz-T-DNA-Population mindestens eine T-DNA-Insertionsmutante identifiziert und isoliert werden. Die Identität dieser Mutanten wurde durch Segregations-Analysen und genomische Southern-Blot-Analysen bestätigt. Da einzelne T-DNA-Insertionen in Introns vorliegen, wurde mittels RT-PCR-Analysen ausgeschlossen, daß die transkribierten T-DNA-Sequenzen mit dem Intron ausgespleißt werden. Die detaillierte, phänotypische Analyse der Einzelmutanten hat keine drastischen Phänotypen, wie sie bei Steroidmutanten beobachtet werden, ergeben.

Lediglich junge Keimlinge der *iap2-1*-Mutante zeigen eine – im Vergleich zum Wildtyp – verlängerte Wurzel. Dieser Phänotyp entspricht dem, bei *CPD*-Überexpressionslinien gefundenen Wachstum. Darüber hinaus reagiert die *iap2-1*-Mutante auf Hochsteroidmedium hypersensitiv gegenüber *Brassinolid*, was auf einen veränderten, endogenen Steroidgehalt oder eine modulierte Signaltransduktion hindeutet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der postulierten Funktion des IAP2-Ringfingerproteins, das als E3-Ubiquitin-Ligase an der Regulation der CPD-Proteinstabilität beteiligt sein kann. Es bleibt aber offen, ob IAP2 an der direkten Regulation des CPD-Proteins oder einer anderen Komponente der Brassinosteroidsignaltransduktion beteiligt ist.

Mit Promotor::GUS-Konstrukten konnte eine detaillierte Expressionsanalyse der CPD-Interaktionspartner durchgeführt werden. Dabei stellte sich heraus, daß alle Interaktionspartner in der Wurzel exprimiert sind. Die *IAP*-Gene sind mit *CPD* in den Kotyledonen co-exprimiert. Durch Hormonbehandlungen war es möglich, zu zeigen, daß die Transkription der *IAPs* negativ durch Abszissinsäure (ABA) und positiv durch *Brassinolid* (BL) reguliert wird. Die gegensinnige Regulation der *IAP*-Gene und des *CPD*-Gens ermöglichen eine Funktion der IAPs als Negativ-Regulatoren des CPD-Proteins.

Da keine der fünf isolierten *obp*-Einzelmutanten einen, vom Wildtyp abweichenden Phänotyp gezeigt hat, können auch die *A. thaliana*-OBPs eine überlappende Funktion haben. Gleiches wurde bei den

sieben homologen OSH-Proteinen in Hefe beobachtet. Um die gefundene Redundanz innerhalb der Genfamilien zu durchbrechen, wurden Kreuzungen zwischen den verschiedenen Mutanten durchgeführt. Die bisher isolierten Doppelmutanten konnten aber noch keine weiterreichenden Erkenntnisse liefern. Kreuzungen der komplementierten *cpd*-Linien mit den *iap*-Mutanten sollen zeigen, ob die IAP-Proteine an der Regulation des CPD-Proteins beteiligt sind. Allerdings war es nicht möglich, die Stabilisierung des CPD-Proteins durch vorläufige Analysen segregierender Linien zu belegen. Da eine gemeinsame Regulation durch beide IAP-Proteine wahrscheinlich ist, müssen weitere Analysen von Mehrfachmutanten folgen.

#### 4.17 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten T-DNA-Mutanten und das analysierte, durch  $\beta$ -Östradiol-induzierbare Expressionssystem – in Kombination mit  $\beta$ -Östradiol-haltigen Lanolinpasten – stellen wertvolle Ressourcen für weitere Analysen dar. Auch in Zukunft wird der Schwerpunkt auf genetischen Arbeiten liegen, die aber durch biochemische Analysen ergänzt werden müssen. Anhand der beschriebenen Doppelmutanten zwischen CPD-Interaktionspartnern und verschiedenen Reporterlinien wird es möglich sein, die aufgezeigte Verbindung zwischen CPD und den IAP-Interaktionspartnern zu belegen. In gleicher Weise wird die initiierte Analyse von *obp*-Mehrfachmutanten dazu beitragen können, die postulierte, redundante Funktion der OBP-Proteine in *A. thaliana* zu beschreiben. Ergänzende, biochemische Analysen, wie z. B. *in vitro* Ubiquitinierungs-Experimente oder Steroidbindungsexperimente mit den gereinigten IAP- bzw. OBP-Proteinen werden, dazu beitragen können, die molekulare Funktion der IAP-Proteine als E3-Ubiquitin-Ligasen bzw. der OBPs als steroidbindende Proteine zu analysieren. Die biologische Funktion der beschriebenen Proteine muss durch *in planta* Analysen, wie z. B. mit den beschriebenen Kreuzungsexperimenten zwischen *iap*-Mutanten und komplementierten CPD-GFP-Reporterlinien, erfolgen. In Analogie zu den gezeigten Lokalisationsstudien der CPD-GFP-Fusion ist darüber hinaus auch eine *in planta*-Lokalisationsanalyse der CPD-Interaktionspartner durch Protein-GFP-Fusionen durchführbar. Wie bereits beschrieben können die induzierbaren Konstrukte zur Identifikation von Steroidtransportmutanten verwendet werden. Eine generelle Analyse des Steroidtransports *in planta* in Kombination mit weiteren Lokalisationsstudien anderer Brassinosteroidbiosynthese- und Signaltransduktionsmutanten wird bei der Klärung helfen, wie die Brassinosteroidbiosynthese und die Signaltransduktion in die Pflanzenentwicklung integriert sind. In diesem Zusammenhang wird auch die Analyse von Doppelmutanten verschiedener Brassinosteroidbiosyntheseenzymen dazu beitragen können, das Netzwerkmodell der Biosynthese zu bestätigen und zu belegen, daß die schwachen Zwergphänotypen einiger Synthesemutanten auf alternativen Syntheseendprodukten beruhen. Der phänotypische Vergleich der *cpd*- und *dwf4*- bzw. *bri1*-Mutante hat gezeigt, daß ein direkter Vergleich verschiedener Brassinosteroidmutanten hilfreich ist. Der Vergleich verschiedener Brassinosteroidbiosynthese-Doppelmutanten wird zeigen ob, synergistische Effekte auftreten, die eine biologische Aktivität von Intermediaten bestätigen.

---

## 5. Literatur

**Abraham E, Rigo G, Szekely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L.**

Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*.

*Plant Mol Biol*, 2003 Feb;51(3):363-72.

**Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.**

Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*.

*Science*, 2003 Aug 1; 301(5633):653-7.

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.**

Gapped BLAST and PSI-BLASTS: a new generation of protein database search programs.

*Nucleic Acids Res*, 1997; 25: 3389-3402.

**Anderson P.**

Mutagenesis.

*Methods Cell Biol*, 1995;48:31-58. Review.

**Arabidopsis Genome Initiative.**

Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.

*Nature*, 2000 Dez; 408: 796 –815.

**Asami T, Yoshida S.**

Brassinosteroid biosynthesis inhibitors.

*Trends Plant Sci*, 1999 Sep;4(9):348-353.

**Asami T, Nakano T, Nakashita H, Sekimata K, Shimada Y, Yoshida S.**

The Influence of Chemical Genetics on Plant Science: Shedding Light on Functions and Mechanism of Action of Brassinosteroids Using Biosynthesis Inhibitors.

*J Plant Growth Regul*, 2003 Dec; 22(4):3 36-349. Epub 2003 Dec 18.

**Asami T, Oh K, Jikumaru Y, Shimada Y, Kaneko I, Nakano T, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S.**

A mammalian steroid action inhibitor spironolactone retards plant growth by inhibition of brassinosteroid action and induces light-induced gene expression in the dark.

*J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004 Jun;91(1-2):41-7.

**Azpiroz-Leehan, R und Feldmann KA.**

T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth.

*TIG*, 1997; 13: 152 ff.

**Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA.**

An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation.

*Plant Cell*, 1998 Feb; 10(2): 219-30.

**d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T.**

E3 Ubiquitin Ligases as Regulators of Membrane Protein Trafficking and Degradation  
Traffic, 2005; 6: 429-441

**Back TG, Pharis RP.**

Structure-Activity Studies of Brassinosteroids and the Search for Novel Analogues and Mimetics with Improved Bioactivity.  
J Plant Growth Regul, 2003; 22: 350-361

**Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnar G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M.**

Regulation of transcript levels of the Arabidopsis cytochrome p450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis.  
Plant Physiol. 2002 Sep; 130(1): 504-13.

**Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, Mazo MA, Harrison BD.**

Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of TRANSFORMED PLANTS, NATURE, 1986; 321(6068): 446-449

**Beh CT, Cool L, Phillips J, Rine J.**

Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues.  
Genetics, 2001 Mar; 157(3): 1117-40. Erratum in: Genetics 2001 Jul;158(3):1387.

**Bender J.**

DNA methylation and epigenetics.  
Annu Rev Plant Biol. 2004; 55: 41-68. Review.

**Bender J.**

Chromatin-based silencing mechanisms  
Curr Biol, 2004; 7: 521-526

**Bishop GJ, Harrison K, Jones JDG.**

The Tomato *Dwarf* Gene Isolated by Heterologous Transposon Tagging Encodes the First Member of a New Cytochrome P450 Family.  
Plant Cell, 1996 June; (8): 959-969

**Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JD, Kamiya Y.**

The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis  
Proc Natl Acad Sci USA, 1999 Feb 16; 96(4): 1761-6.

**Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M.**

Extensive and Reshuffling in the Arabidopsis Genome.  
The Plant Cell, 2000; 12: 1093-1101.

**Boevink P, Santa Cruz S, Hawes C, Harris N, Oparka K.J.**

Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells.  
The Plant Journal, 1996; 10(5): 935-941.

**Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen ME, Mundy J.**

Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid.  
Plant Physiol, 2001 Oct; 127(2): 450-8.

**Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M., Paris, N.**

The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. Plant Cell, 2002 May; 14(5): 1077-92.

**Cano-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, Cheng JC, Nam KH, Li J, Chory J.**  
BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*.

Development, 2004 Nov; 131(21): 5341-51.

**Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA.**

The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis.

Plant Cell, 1998 Feb; 10(2): 231-43.

**Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA.**

The *Arabidopsis* *dwf7/ste1* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis.

Plant Cell, 1999 Feb; 11(2): 207-21.

**Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA.**

The *Arabidopsis* *dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis.

Plant Physiol, 1999 Mar; 119(3): 897-907.

**Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA.**

Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis.

Plant J 2000 Mar; 21(5): 431-43.

**Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA.**

Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*.

Plant J 2001 Jun; 26(6): 573-82.

**Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE.**

*Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3beta-like kinase.

Plant Physiol, 2002 Nov; 130(3): 1506-15.

**Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A.**

An Alternative Brassinolide Biosynthetic Pathway via Late C-6 Oxidation

Phytochemistry, 1997; 44: 609-613.

**Chory J, Nagpal P und Peto CA.**

Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*.

Plant Cell, 1991; 3: 445-459.

**Clouse SD, Sasse JM.**

BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development.

Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998 Jun ;49: 427-451.

**Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR.**

Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency.

Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Mar 28; 97(7): 3718-23.

**Dornelas MC, Lejeune B, Dron M, Kreis M.**

The Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK) gene family: structure, organization and evolution.  
Gene, 1998 Jun 8; 212(2): 249-57.

**Ehsan H, Ray WK, Phinney B, Wang X, Huber SC, Clouse SD.**

Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein.  
Plant J. 2005 Jul;43(2):251-61.

**Edwards A, Caskey CT.**

Genetic marker technology.  
Curr Opin Biotechnol, 1991 Dec; 2(6): 818-22. Review.

**Feldmann, KA, Marks, MD.**

Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: a non tissue culture approach.  
Molecular Gen, Genetics, 1987; 208: 1-9.

**Feldmann KA, Marks MD, Christianson ML, Quatrano RS.**

A dwarf mutant in *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis.  
Science, 1989; 243: 1245-1408.

**Feldmann KA**

T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum.  
*Plant Journal*, 1991; 1: 71-82.

**Feldman KA.**

T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Seed infection / transformation.  
*Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Publishing Co*, 1992: 274 – 289.

**Feldmann KA, Malmberg RL, Dean C.**

Mutagenesis in *Arabidopsis*  
In: Meyerowitz E und Somerville C (Hgs.), *Arabidopsis*, 1995: 137-172

**Ferrando A, Farras R, Jasik J, Schell J, Koncz C.**

Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells.  
Plant J, 2000 Jun; 22(6): 553-60.

**Ferrando A, Koncz-Kalman Z, Farras R, Tiburcio A, Schell J, Koncz C.**

Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells.  
Nucleic Acids Res, 2001 Sep 1; 29(17): 3685-93

**Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T, Chory J.**

Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase.  
Plant Physiol, 2000 Aug; 123(4): 1247-56.

**Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, Sakurai A.**

The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis.  
Plant Cell, 1997 Nov; 9(11): 1951-62.

**Fujioka S, Noguchi T, Yokota T, Takatsuto S, Yoshida S.**

Brassinosteroids in Arabidopsis thaliana.  
Phytochemistry, 1998 Jun; 48(4): 595-9.

**Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S.**

An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway.  
Plant Physiol, 2002 Oct; 130(2): 930-9.

**Goda H, Shimada Y, Fujioka S, Yoshida S.**

Classification of brassinosteroid-regulated genes based on expression profiles in bri1 and in response to a protein kinase inhibitor, staurosporin.

Biosci Biotechnol Biochem, 2004 Jul; 68(7): 1605-7

**Hartmann MA, Perret AM, Carde JP, Cassagne C, Moreau P.**

Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols.

Biochim Biophys Acta, 2002 Aug 8; 1583(3): 285-96

**Hatanaka Y, Kempin U, Jong-Jip P.**

One-Step Synthesis of Biotinyl Photoprobes from Unprotected Carbohydrates.

J Org Chem, 2000; 65: 5639-5643.

**Hay BA.**

Understanding IAP function and regulation: a view from Drosophila.

Cell Death Differ, 2000 Nov; 7(11): 1045-56.

**He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY.**

The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis.

Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Jul 23; 99(15): 10185-90. Epub 2002 Jul 11

**He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY.**

BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses.

Science, 2005 Mar 11; 307(5715): 1634-8. Epub 2005 Jan 27. Erratum in: Science. 2005 Jun 17; 308(5729): 1743.

**He Z, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J.**

Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1.

Science. 2000 Jun 30; 288(5475): 2360-3.

**Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM.**

pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation.

Plant Mol Biol, 2000 Apr; 42(6):819-32.

**Hoffmann GR.**

Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds.

Mutat Res. 1980 Jan; 75(1): 63-129. Review.

**Holstein SE.**

Clathrin and plant endocytosis.

Traffic, 2002 Sep; 3(9): 614-20. Review.

**Holler D, Dikic I.**

Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways.

Biochem Pharmacol, 2004 Mar 15; 67(6): 1013-7.

**Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M.**

Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem.

Plant J. 2002 Nov;32(4):495-508.

**Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Uemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M.**

A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450.

Plant Cell, 2003 Dec; 15(12): 2900-10. Epub 2003 Nov 13.

**Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M.**

The Rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone.

Plant Cell, 2005 Aug; 17(8): 2243-54. Epub 2005 Jul 1

**Jaworski CJ, Moreira E, Li A, Lee R, Rodriguez IR.**

A family of 12 human genes containing oxysterol-binding domains.

Genomics, 2001 Dec; 78(3): 185-96.

**Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA.**

Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences.

Plant Mol Biol, 1996 Aug; 31(5): 957-73.

**Jürgens G.**

Membrane trafficking in plants.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:481-504. Review.

**Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, Szekeres M, Willmitzer L, Altmann T.**

Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development

*The Plant Journal* (1996) 9(5), 701-713

**Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H.**

The ROTUNDIFOLIA3 gene of Arabidopsis thaliana encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells.

Genes Dev. 1998 Aug 1;12(15):2381-91.

**Kim GT, Tsukaya H, Saito Y, Uchimiya H.**

Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in Arabidopsis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9433-7.

**Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H.**

CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in Arabidopsis thaliana.

Plant J, 2005 Mar; 41(5): 710-21.

**Kim TW, Hwang JY, Kim YS, Joo SH, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Kim SK.**

Arabidopsis CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis.

Plant Cell, 2005 Aug; 17(8): 2397-412. Epub 2005 Jul 1

**Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, Chory J.**

Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1.

Nature, 2005 Jan 13; 433(7022): 167-71

**Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH.**

The Arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1* Gene Encodes Involved in Steroid Synthesis

The Plant Cell, 1998 October, 10, 1677-1690,

**Koka CV, Cerny RE, Gardner RG, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Clouse SD.**

A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response.  
Plant Physiol. 2000 Jan; 122(1): 85-98.

**Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Rédei GP, Schell J.**

High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants.  
Proc Natl Acad Sci, 1989: 8467-8471.

**Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J.**

T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*.  
Plant Mol Biol, 1992; 20: 1337-1346.

**Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J.**

Homology recognition during T-DNA integration into the plant genome.  
Homologous Recombination in Plants, 1994: 167-189.

**Koncz C., Martini N, Szabados L, Hrouda M, Bachmair A, Schell J..**

Specialized vectors for gene tagging and expression studies.  
Plant Mol Biol, 1994, Manual B2:1-22.

**Koncz C, Schell J.**

T-DNA tagging.  
Mol Plant Biol, 2002; 1: 33-51.

**Krysan PJ, Young JC, Tax F, Sussmann MR.**

Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport.  
Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 8145-8150.

**Krysan PJ, Young JC, Sussmann MR.**

T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*.  
Plant Cell, 1999; 11: 2283-2290.

**Lechtenberg B, Schuberty D, Forsbachz A, Gils M, Schmidt R.**

Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing  
The Plant Journal 2003; 34: 507-517.

**Levine TP, Munro S.**

Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components.  
Curr Biol, 2002 Apr 30; 12(9): 695-704.

**Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J.**

A role for brassinosteroids in light-development of *Arabidopsis*.  
Science, 1996; 272: 398-401.

**Li J, Biswas MG, Chao A, Russell DW, Chory J.**

Conservation of function between mammalian and plant steroid 5alpha-reductases.  
Proc Natl Acad Sci USA. 1997 Apr 15; 94(8): 3554-9.

**Li J, Chory J.**

A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction.  
Cell, 1997 Sep 5; 90(5): 929-38.

**Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J.**

BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*.  
Plant Physiol. 2001 Sep;127(1):14-22.

**Li J, Lease KA, Tax FE, Walker JC.**

BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 8;98(10):5916-21. Epub 2001 Apr 24.

**Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC.**

BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling.  
Cell. 2002 Jul 26;110(2):213-22.

**Li J, Nam KH.**

Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase.  
Science. 2002 Feb 15;295(5558):1299-301.

**Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC.**

BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling.  
Cell, 2002 Jul 26; 110(2): 213-22.

**Li YY, Li XM.**

The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities.  
Cell Research, 2000; 10: 169-177

**Mandava NB.**

Plant growth-promoting brassinosteroids.  
Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol, 1988; 39: 23-52.

**Mathur J., Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, Schell J, Koncz C, Szekeres M.**

Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids.  
Plant J, 1998, 14(5):593-602.

**McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB.**

Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*:  
actin mutants *act2-1* and *act4-1*.  
Plant J, 1995; 8: 613-622.

**Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ.**

Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA.  
EMBO J. 2000 Oct 2;19(19):5194-201.

**Michelini FM, Ramirez JA, Berra A, Galagovsky LR, Alche LE.**

In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues.  
Steroids. 2004 Oct-Nov;69(11-12):713-20

**Min YK, Rao Y, Okada Y, Raisz LG, Pilbeam CC.**

Regulation of prostaglandin G/H synthase-2 expression by interleukin-1 in human osteoblast-like cells.  
J Bone Miner Res, 1998 Jul; 13(7): 1066-75..

**Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T, Bishop GJ.**

Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling.  
Plant Cell, 2002 Dec; 14(12): 3163-76

**Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, Cano-Delgado A, Hyeonsook C, Chory J.**

Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response of brassinosteroids in *Arabidopsis*

Genes & Development 2004, 18:448-460

**Müssig C, Fischer S, Altmann T.**

Brassinosteroid-Regulated Gene Expression

*Plant Physiology*, 2002 Jul, 129: 1241–1251,

**Nagata N, Asami T, Yoshida S.**

Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants (*Lepidium sativum*).

*Plant Cell Physiol*, 2001 Sep; 42(9): 1006-11.

**Nakamichi N, Murakai-Kojima M, Sato, E Kishi Y, Yamashino T, Mizuno T.**

Compilation and Characterization of a Novel WNK Family of Protein Kinases in *Arabidopsis thaliana* with Reference to Circadian Rhythms

*Biosci Biotechnol Biochem*, 2002; 66(11): 2429-2002

**Nakamura A, Matsuoka M.**

New development in studies on brassinosteroid

Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2005 Feb;50(2):121-30. Review. Japanese.

**Nakamura M, Satoh T, Tanaka S, Mochizuki N, Yokota T, Nagatani A.**

Activation of the cytochrome P450 gene, CYP72C1, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*.

*J Exp Bot*. 2005 Mar;56(413):833-40. Epub 2005 Feb 2.

**Nam KH, Li J.**

BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling.

*Cell*, 2002 Jul 26; 110(2): 203-12.

**Nam KH, Li J.**

The *Arabidopsis* transthyretin-like protein is a potential substrate of

BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1.

*Plant Cell*. 2004 Sep;16(9):2406-17. Epub 2004 Aug 19.

**Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H,**

**Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J.**

BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*.

*Proc Natl Acad Sci USA*, 1999 Dec 21; 96(26): 15316-23.

**Nemhauser L, Chory J.**

Bring it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action,

*J Exp Bot*, 2004; 55(395): 265-70

**Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA,**

**Tax FE.**

Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids.

*Plant Physiol*, 1999 Nov; 121(3): 743-52

**Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yoshida S, Li J, Chory J.**

*Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-En-3-one to (24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis.

*Plant Physiol*. 1999 Jul;120(3):833-40.

**Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA.**

Biosynthetic Pathways of Brassinolide in Arabidopsis1  
*Plant Physiology*, September 2000, Vol. 124, pp. 201–209,

**Nomura T, Kitasaka Y, Takatsuto S, Reid JB, Fukami M, Yokota T.**

Brassinosteroid/Sterol synthesis and plant growth as affected by lka and lkb mutations of Pea  
*Plant Physiol.* 1999 Apr;119(4):1517-26.

**Nomura T, Sato T, Bishop GJ, Kamiya Y, Takatsuto S, Yokota T.**

Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocasterone in Arabidopsis, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis.  
*Phytochemistry*, 2001 May; 57(2): 171-8.

**Nomura T, Bishop GJ, Kaneta T, Reid JB, Chory J, Yokota T.**

The LKA gene is a BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 homolog of pea.  
*Plant J*, 2003 Nov; 36(3): 291-300.

**Nomura T, Jager CE, Kitasaka Y, Takeuchi K, Fukami M, Yoneyama K, Matsushita Y, Nyunoya H, Takatsuto S, Fujioka S, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Reid JB, Yokota T.**

Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5alpha-reductase causes dwarfism in the lk mutant of pea.

*Plant Physiol.* 2004 Aug;135(4):2220-9. Epub 2004 Jul 30

**Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S.**

The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in Arabidopsis.

*J Biol Chem*, 2005 May 6; 280(18): 17873-9. Epub 2005 Feb 14.

**Oh MH, Ray WK, Huber SC, Asara JM, Gage DA, Clouse SD.**

Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro.

*Plant Physiol.* 2000 Oct;124(2):751-66.

**Olkkonen VM.**

Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatory factors involved in lipid metabolism.  
*Curr Opin Lipidol.* 2004 Jun;15(3):321-7.

**Park KH, Saimoto H, Nakagawa S, Sakurai A, Yokota T, Takahashi N, Syono K.**

Occurrence of Brassinolide and Castasterone in Crown Gall Cell of *Catharanthus roseus*  
*Agric Biol Chem*, 1989; 53(3): 805-811.

**Perez-Perez JM, Ponce MR, Micol JL.**

The UCU1 *Arabidopsis* Gene Encodes an SHAGGY/GSK3-like Kinase Required for Cell Expansion along the Proximodistal Axis.

*Dev Biol*, 2002; 242: 161-173

**Pickart CM.**

Ubiquitin enters the new millennium.

*Mol Cell*, 2001 Sep; 8(3): 499-504. Review.

**Pickart CM.**

Mechanisms underlying ubiquitination.

*Annu Rev Biochem*, 2001; 70: 503-33. Review.

**Ponce MR, Quesada V, Micol JL.**

Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the Arabidopsis genome.

*Plant J.* 1998 May;14(4):497-501.

**Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D.**

The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids.  
Proc Natl Acad Sci USA, 2005 Oct 7; [Epub ahead of print]

**Ramirez JA, Teme Centurion OM, Gros EG, Galagovsky LR.**

Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs.  
Steroids, 2000 Jun; 65(6): 329-37.

**Rios G, Lossow A, Hertel B, Breuer F, Schaefer S, Broich M, Kleinow T, Jasik J, Winter J, Ferrando A, Farras R, Panicot M, Henriques R, Mariaux JB, Oberschall A, Molnar G, Berendzen K, Shukla V, Lafos M, Koncz Z, Redei GP, Schell J, Koncz C.**

Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes.

Plant J, 2002 Oct; 32(2): 243-53.

**Rogers SO, Bendich AJ.**

Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues.  
Plant Mol Biol, 1985; 5: 69-76.

**Russell L, Larner V, Kurup S, Bougourd S Holdsworth M.**

The *Arabidopsis* COMATOSE locus regulates germination potential.  
Development, 2000; 127: 3759-3767.

**Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC.**

Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1).

Plant Cell. 2004 Dec;16(12):3216-29. Epub 2004 Nov 17.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.**

Molecular Cloning: A Laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

**Schaeffer A, Bronner R, Benveniste P, Schaller H.**

The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1.

Plant J. 2001 Mar;25(6):605-15.

**Scheid OM, Paszkowski J, Potrykus I.**

Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*.  
Mol Gen Genet. 1991 Aug; 228(1-2):104-12.

**Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur Sultan, Schmidt R.**

Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects

The Plant Cell, 2004 Oct;16: 2561–2572,

**Sekimata K, Kimura T, Kaneko I, Nakano T, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoshida S, Asami T.**

A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on *Arabidopsis*, cress, tobacco, and rice.

Planta, 2001 Sep; 213(5): 716-21.

**Sekimata K, Han SY, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoshida S, Asami T.**

A specific and potent inhibitor of brassinosteroid biosynthesis possessing a dioxolane ring.

J Agric Food Chem, 2002 Jun 5; 50(12): 3486-90.

**Shah K, Russinova E, Gadella TW Jr, Willemsen J, De Vries SC.**

The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1.  
Genes Dev. 2002 Jul 1; 16(13): 1707-20.

**Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S.**

Brassinosteroid-6-Oxidase from Arabidopsis and Tomato Catalyze Multiple C-6 Oxidations in Brassinosteroid Biosynthesis.  
Plant Physiol, 2001; 126: 770-779.

**Shiu SH, Bleecker AB.**

Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling.  
Sci STKE, 2001 Dec 18; 113: RE22.

**Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S.**

Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing.  
EMBO Rep; 2000 Sep; 1(3): 287-92.

**Steber CM, McCourt P.**

A Role for Brassinosteroids in Germination in Arabidopsis  
*Plant Physiology*, 2001 Feb;125, 763–769,

**Sun L, Chen ZJ.**

The novel functions of ubiquitination in signaling  
Curr Opin Cell Biol, 2004; 16:119-126.

**Sun Y, Fokar M, Asami A, Yoshida S, Allen RD.**

Characterization of the Brassinosteroid insensitive 1 genes of cotton  
Plant Molecular Biology 2004, 00: 1–12.

**Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C.**

Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis.  
Cell, 1996 Apr 19; 85(2): 171-82.

**Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Fujisawa Y, Kato H, Iwasakia Y.**

A Novel Cytochrome P450 Is Implicated in Brassinosteroid Biosynthesis via the Characterization of a Rice Dwarf Mutant, dwarf11, with Reduced Seed Length  
The Plant Cell, 2005, 17: 776–790.

**Tanaka K. et al., 2005 Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S.**

Brassinosteroid homeostasis in Arabidopsis is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism.  
Plant Physiol. 2005 Jun;138(2):1117-25. Epub 2005 May 20.

**Takahashi T, Gasch A, Nishizawa N, Chua NH.**

The *DIMINUTO* gene of Arabidopsis is involved in regulating cell elongation.  
Genes and Development 1995; 9: 97-107.

**Takahashi N, Nakazawa M, Shibata K, Yokota T, Ishikawa A, Suzuki K, Kawashima M, Ichikawa T, Shimada H, Matsui M.**

shk1-D, a dwarf Arabidopsis mutant caused by activation of the CYP72C1 gene, has altered brassinosteroid levels.  
Plant J, 2005 Apr; 42(1): 13-22.

**Thierry D, Vaucheret H.**

Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. *Plant Mol Biol*, 1996 Dec; 32(6): 1075-83.

**Töpfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH.**

A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, 1987 Jul 24; 15(14): 5890. No abstract available.

**Töpfer R, Maas C, Horicke-Grandpierre C, Schell J, Steinbiss HH.**

Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Methods Enzymol*, 1993; 217: 67-78. No abstract available

**Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ.**

A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(16): 8186

**Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Denzel MA, Torres QI, Neff MM.**

CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiol*, 2003 Dec; 133(4): 1643-53. Epub 2003 Nov 6.;

**Vidya Vardhini B, Rao SS.**

Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. *Phytochemistry*, 2002 Dec; 61(7): 843-7.

**Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S.**

Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*, 1998 Dec; 16(6): 651-9. Review. No abstract available.

**Vaucheret H, Fagard M.**

Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet*, 2001 Jan; 17(1): 29-35.

**Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL.**

Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*, 2001; 2(7): REVIEWS3009. Epub 2001 Jul 5. Review.

**Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J.**

Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Signaling in Plants *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 177-201.

**Vierstra RD.**

The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci*, 2003 Mar; 8(3): 135-42.

**Wachsman MB, Ramirez JA, Galagovsky LR, Coto CE.**

Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antivir Chem Chemother*, 2002 Jan; 13(1): 61-6.

**Wada K, Marumo S, Ikekawa N, Morisaki M, Mori K.**

Brassinolide and Homobrassinolide Promotion of Lamina Inclination of Rice Seedling. *Plant Cell Physiol*, 1981; 22(2): 323-25.

**Wang C, JeBailey L, Ridgway ND.**

Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments.

Biochem J, 2002 Feb 1; 361(Pt 3): 461-72.

**Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J.**

BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids.

Nature, 2001 Mar 15; 410(6826): 380-3. Erratum in: Nature 2001 May 10;411(6834):219.

**Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD.**

Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase.

Plant Cell, 2005 Jun; 17(6): 1685-703. Epub 2005 May 13.

**Winkler RG, Frank MR, Galbraith DW, Feyereisen R, Feldmann KA.**

Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis*.

Plant Physiol, 1998; 122: 1003-1013.

**Yamamoto R, Fujioka S, Demura T, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuda H.**

Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements.

Plant Physiol, 2001 Feb; 125(2): 556-63.

**Yamamoto C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M.**

Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint.

Plant Cell, 2000 Sep; 12(9): 1591-606.

**Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J.**

BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation

Cell, 2002 Apr 19, 109: 181-191.

**Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J.**

A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis.

Cell, 2005 Jan 28; 120(2): 249-59.

**Zhao J, Peng P, Schmitz RJ, Decker AD, Tax FE, Li J.**

Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling.

Plant Physiol, 2002 Nov; 130(3): 1221-9.

**Zhou A, Wang H, Walker JC, Li J.**

BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling.

Plant J, 2004 Nov; 40(3): 399-409.

**Zuo J, Niu QW, Chua NH.**

An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants.

Plant J, 2000 Oct; 24(2): 265-73.

## 6. Anhang

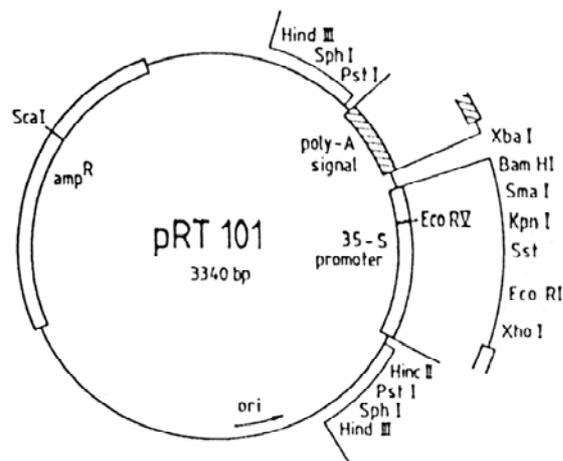
### 6.1 Geräte und Zubehör

Binokulare	
MZ FL III (Labor)	Leica
Wild M8 (Gewächshaus)	Wild Heerbrugg
Bodenzentrifuge (300 bis 4.000 RCF)	
Megafuge 2.0 R	Hereaus Instruments
Brutschränke	
zur Inkubation bei 28°C, 30°C, 37°C	New Brunswick Scientific
Crosslinker	
UV-Stratalinker 2400	Stratagene
Entwicklermaschine	
Optimax X-ray film processor	Piotec Processor Technology
Einschweißgerät	
Tube Sealer J2	Beckman
Feinwaage	
A200S	Sartorius
Folien-Schweißgerät	
Polystar 243	Rische & Herfurth GmbH
Geldokumentationssystem	
EDAS 290	Kodak
Kodak 1D 3,6,5 K2 (Software)	
Gene Pulser	Biorad
Heizblock (RT bis 95°C)	
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermostat 5320	Eppendorf
Infrared Imager	
Odyssey	Licor
Odyssey Software V 1,2	
Magnetrührer/ Heizplatte	
Combimag	IKA
Mikroskope	
Lichtmikroskop, DMRB	Leica
Laser-scanning Mikroskop, LSM 510 Meta	Zeiss
Mixer	
Blendor 8011	Waring
Mixer (Vortex)	
VF2	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Netzteil zur Gel-Elektrophorese	
PowerPac 300 bzw. 1000	BioRad
PCR-Maschine	
DNA-Engine Tetrad2	MJ-Research
pH-Meter	
Calimatik 766	Knick
Photometer	
Ultraspec 1000	
UV/visible Spectromer	Pharmacia Biotech
Pipetten	
20 µl; 200 µl; 1000 µl	Gilson
10 µl	Eppendorf
Mehrkanal (10 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	
macro-Pipettierhelfer	Rudolf Brand & Co

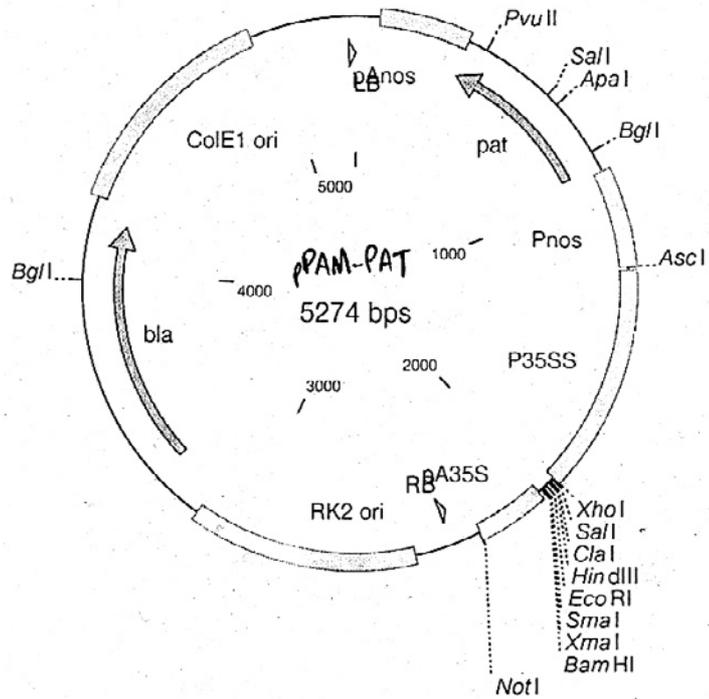
Radio	CFD S2002	Sony
Reagenzglasroller	TC7 Rollerdrum	New Brunswick Scientific
Schüttler	Horizontal-Rotationsschüttler 4010	Kottermann
	Horizontal-Rotationsschüttler Innova 2100	New Brunswick Scientific
	Orbital-Rotationsschüttler Polymax 2040	Herdolph Instruments
	Überkopfschüttler REAX2	Heidolph
Tischzentrifugen (2.000 bis 13.000 RPM)	Biofuge pico	Hereaus Instruments
	5417C und 5417R (ohne/mit Kühlung)	Eppendorf
UV-Handlampe	Fluorotest UV-Lampe 5320	Original Hanau / Hereaus
UV-Transilluminator	TFX-35M	Life Technologies GibcoBRL
Vakuumpumpe	DIVAC 2.2L	Leybold AG Köln
Waage	SBC52 (bis 2 kg)	Scal Tec Instruments
	1216 MP (bis 600g)	Sartorius
Wasserbad	EM 12B	Bulabo Labortechnik GMBH
	1083 (mit Schüttler; 42°C / 68°C)	GFL - Gesellschaft für Labortechnik
Wasserreinigungsanlage	MiliQ Gradient A10	Milipore
Zentrifugen	Sorval RC5B	DuPont Instruments
	Rotoren: GSA; GS3; SS34	
	J-6B	Beckman Coulter
	Rotor: JS 4,0 (1L Gefäße)	
	L8-70 Ultrazentrifuge	Beckman
	Optima L-80XP ZU	Beckman
	Rotoren: vti50; vti65; SW28; SW55	
	Optima MAX-E	Beckman
	Rotor: TLA 100.3	
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson

## 6.2 Vector-Karten

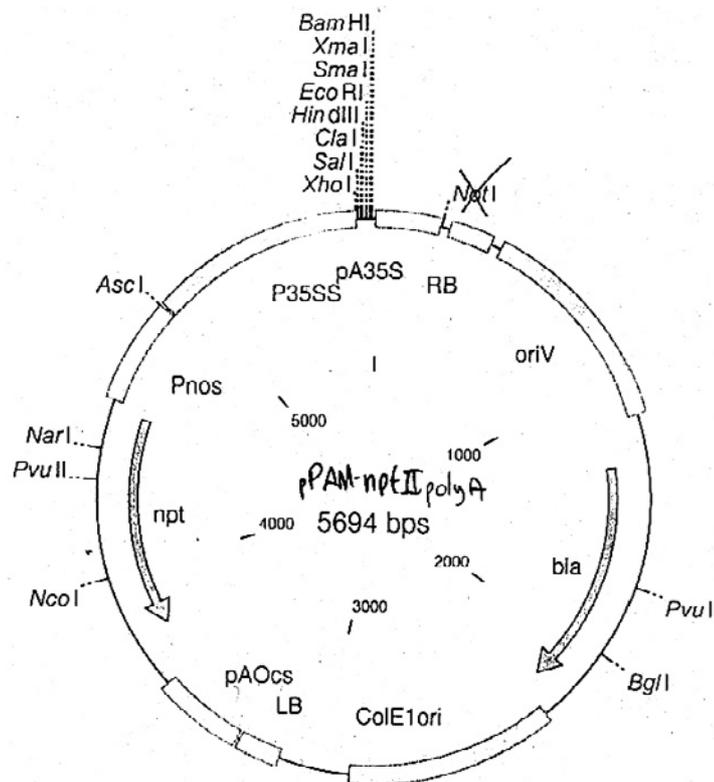
pRT101:



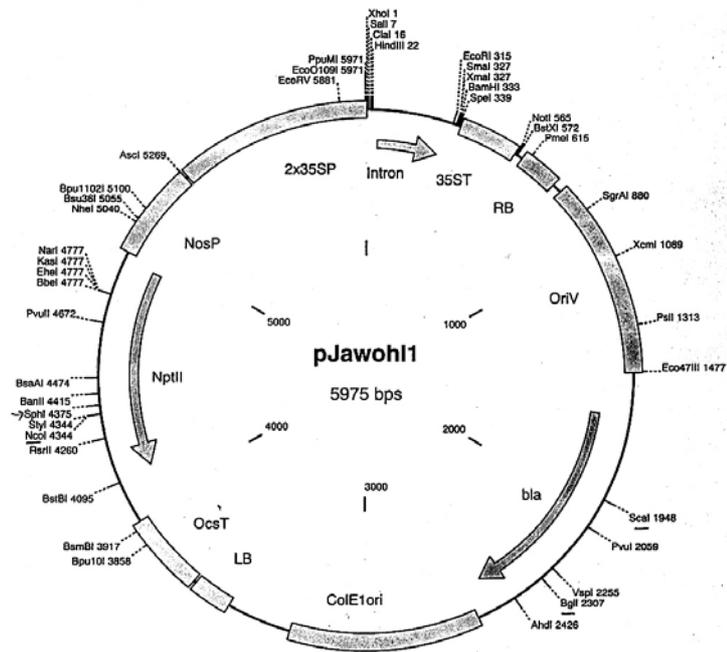
pPAM-PAT:



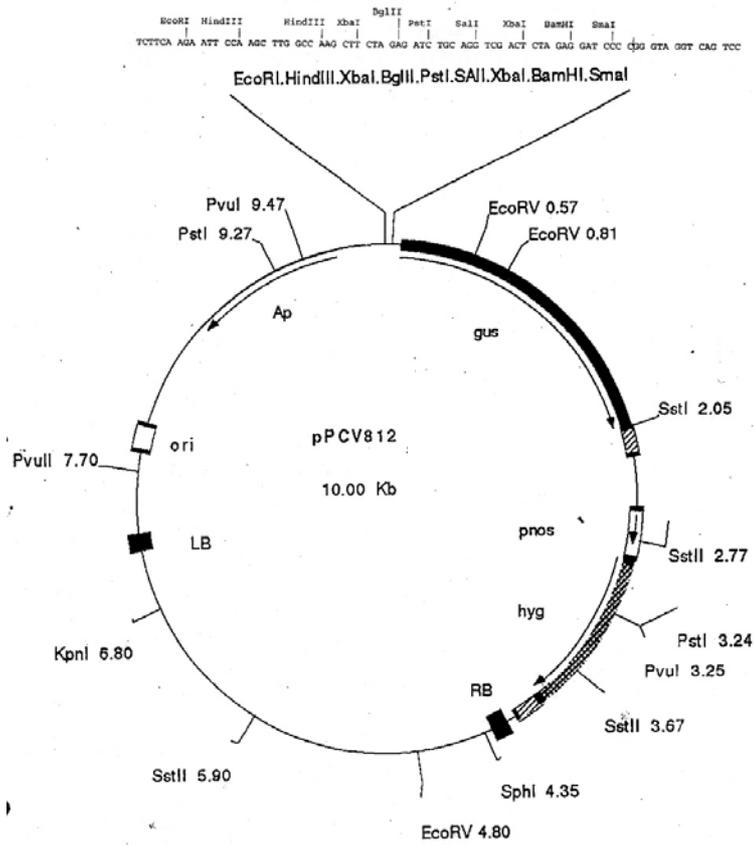
pPAM-NPT:



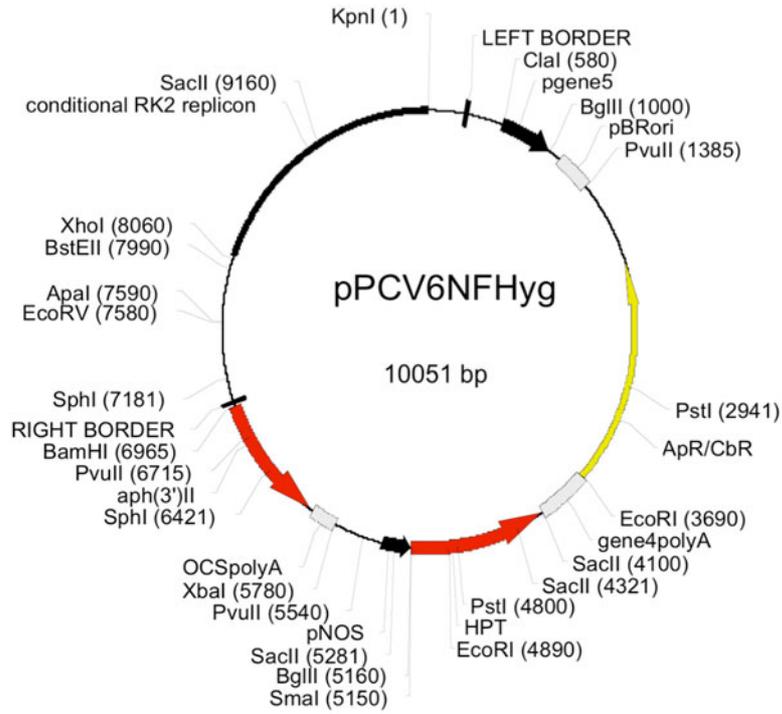
pJawohl1:



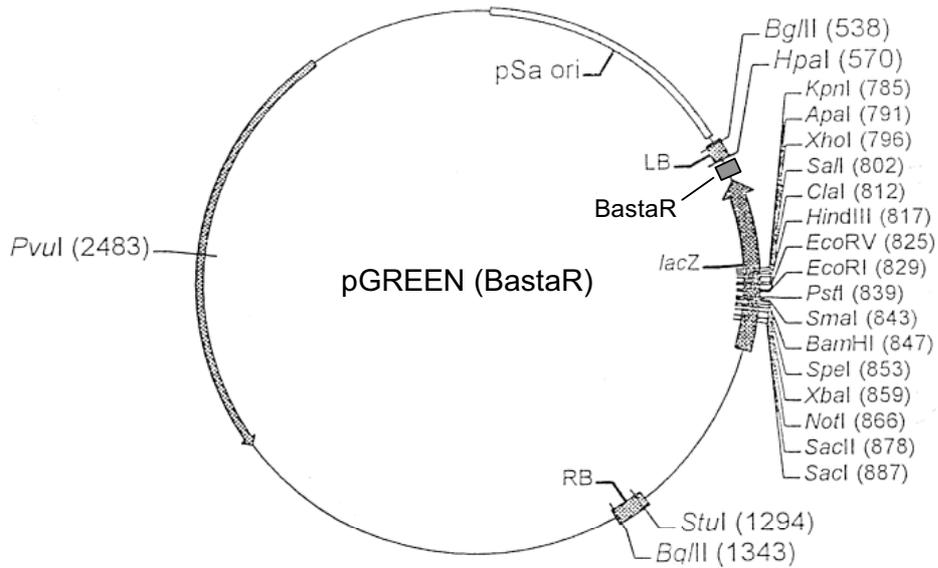
pPCV812(GUS):

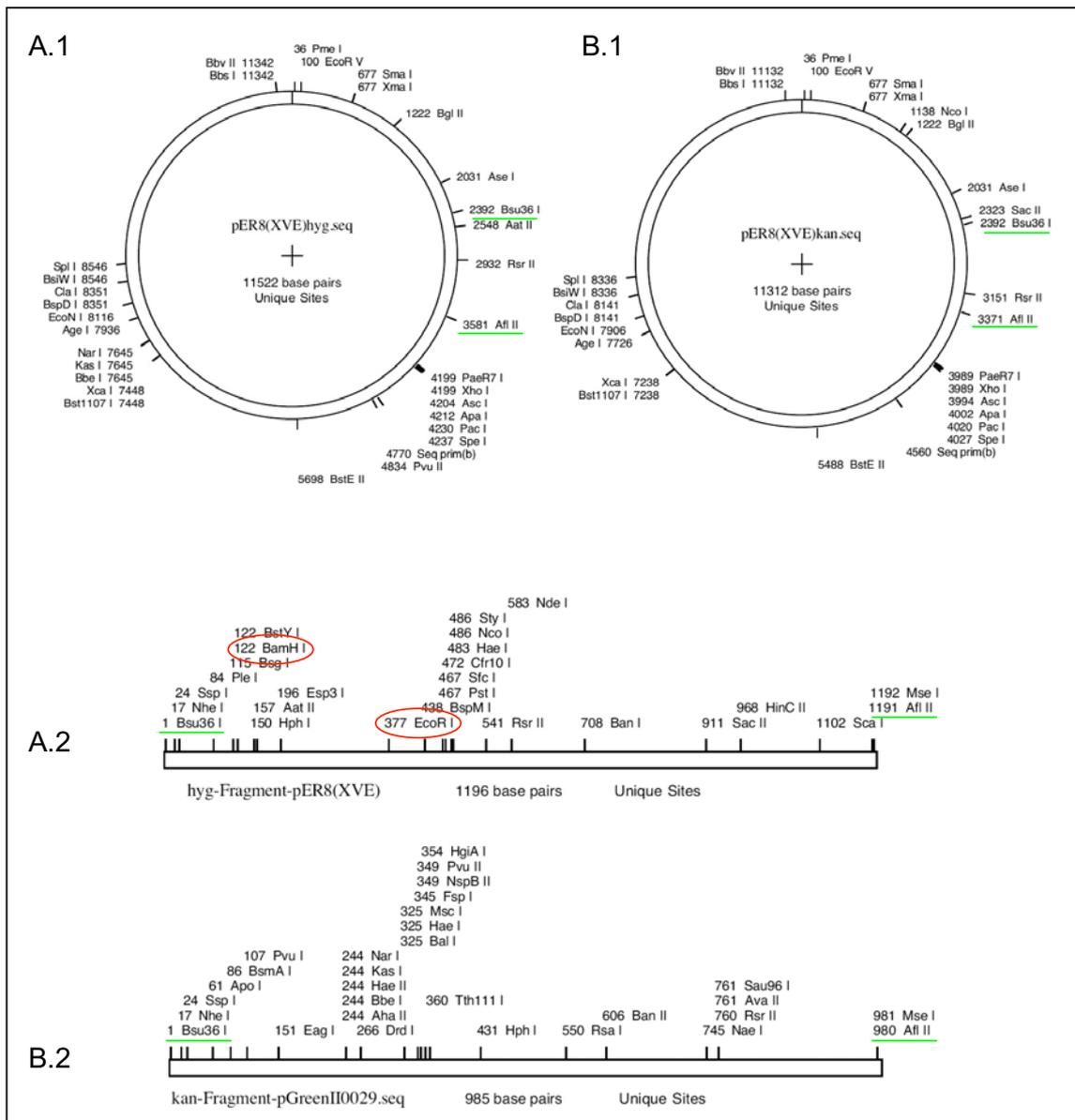


pPCV6NFHyg



pGREEN:





**Abb.6.2.1: Herstellung des Vektors pER8(XVE)-kan.** Der Vektor pER8(XVE)-hyg wird genau einmal von den Restriktionsendonucleasen *Afl*II und *Bsu*36I, im nos-Promotor bzw. im nos-Terminator gespalten. Beide Spaltstellen rahmen den Hygromycin-Resistenzmarker ein (A.1). Das *Afl*II/*Bsu*36I-Fragment des Vektors pER8(XVE)-hyg (A.2) wurde durch das *Afl*II/*Bsu*36I-Fragment (B.2) des Vektors pGreen0029(kan) ersetzt. Der dadurch entstandene Vector pER8(XVE)-kan (B.1) kann durch eine Restriktionsspaltung mit *Eco*RI bzw. *Bam*HI von dem Vector pER8(XVE)-hyg (A.1) unterschieden werden.

### 6.3 Oligonucleotide

#### OBPI-spezifische Oligonucleotide: (At4g22540)

Screening-Primer:

FOBP1-S 5'-GAG TCC TCA CGG GAT TAA TAGCCA G-3'  
FOBP2-AS 5'-CTT CTG TGA ACT CCC CGA AGA TGT C-3'

Sequenzierung:

ML 56-Seq700-S 5'-ACA CGA AGA ACG GAC TAA TTT GCT T-3'  
ML 57-Seq1700-AS 5'-TGC TAC GTC TTC TAC AAA ACC GTT-3'

ML 92 1200	5'-TTT GCG GTC TCT GGA TAT GCT TCC A-3'
cDNA-Amplifikation zur GST-Fusion:	
ML 58-BamHI-ATG	5'-CGG GAT CCC GAT GCG GGT TAA AGA GTT ACA T-3'
ML 59-Stop-Sall	5'-ACG TCG ACG GTC TAA GCG GCG TCC GCT AGC T-3'
cDNA-Amplifikation zur GST-HIS-Fusion:	
ML 58-BamHI-ATG	5'-CGG GAT CCC GAT GCG GGT TAA AGA GTT ACA T-3'
ML 60-HISstopSall	5'-ACG TCG ACG GTC TAG TGA TGG TGA TGG TCTA TGA GCG GCG TCC GCT AGC T-3'
cDNA-Amplifikation zur MBP-Fusion:	
ML 50-EcoRI-ATG	5'-CGG AAT TCC GAA TGC GGG TTA AAG AGT T-3'
ML 59-Stop-Sall	5'-ACG TCG ACG GTC TAA GCG GCG TCC GCT AGC T-3'
cDNA-Amplifikation zur MBP-HIS-Fusion:	
ML 50-EcoRI-ATG	5'-CGG AAT TCC GAA TGC GGG TTA AAG AGT T-3'
ML 60-HISstopSall	5'-ACG TCG ACG GTC TAG TGA TGG TGA TGG TCTA TGA GCG GCG TCC GCT AGC T-3'
cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:	
ML 34-tagSallIATG	5'-GCG TCG ACG AAA ATG CGG GTT AAA GAG TT-3'
ML 62-Stop-PstI	5'-TTC TCG AGT CTA AGC GGC GTC CGC TAG CTC TT-3'
cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem C-terminalen HA-tag:	
ML 65-HindIII-ATG	5'-CAA GCT TGA TGC GGG TTA AAG AGT TAC AT-3'
ML 63-ASohneSTOP	5'-TCC CGG GCG TCG ACG AAG CGG CGT CCG CTA GCT CTT CT-3'
cDNA-Amplifikation zur Generation eines dsRNAi-Konstrukts:	
ML 67-S-F EcoRI	5'-GGA ATT CCA CGG ATA TCA AGA GAA GAA CAA AA-3'
ML 83-S-R BamHI	5'-CGG GAT CCG CCA TGA TGA TCA CAG TAG AGT TTA-3'
ML 69-AS-F XhoI	5'-CCC TCG AGC CAT GAT GAT CAC AGT AGA GTT TA-3'
ML 84-AS-R HindIII	5'-CCA AGC TTC AGC GAT ATC AAG AGA AGA ACA AAA-3'
Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion:	
ML 36-PrS-EcoRI	5'-CGG AAT TCC ACA GCT TTT ATT ACT CTT TTC AAA T-3'
ML 46-PrAS-BamHI	5'-CGG GAT CCT TAA CCC GCA TTT TCG TCT CCG GTG A-3'
cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:	
ML 50-EcoRI-ATG	5'-CGG AAT TCC GAA TGC GGG TTA AAG AGT T-3'
ML 63-ASohneSTOP	5'-TCC CGG GCG TCG ACG AAG CGG CGT CCG CTA GCT CTT CT-3'
Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-cDNA-Fusion:	
ML 36-Pr-EcoRI	5'-CGG AAT TCC ACA GCT TTT ATT ACT CTT TTC AAA T-3'
ML 64-intAS-XbaI	5'-ACG TCG ACG CCT TAA GAT GAA CAA TGC CGA CGG TTT TTT GTT-3'

### **OBP2-spezifische Oligonucleotide: (At4g12460)**

#### Screening-Primer:

ML 26-S	5'-TCA GCG ATG CCT TTA ACG AGA TCA AAG AGT-3'
ML 27-AS	5'-TCG GCT TAA GCA CAA TCT GCA ACC TCT T-3'

#### Sequenzierung:

ML 30-seq600-S	5'-AAG AGT GCG AGC AGA TCG TGG A-3'
ML 31-seq1500-AS	5'-AGA ATA TTG GCG ATT TCC ACG GAT-3'

#### cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:

ML 61-Sall-ATG	5'-GCG TCG ACG TCA GCG ATG CCT TTA ACG AGA TCA-3'
ML 21-Stop-PstI	5'-TTC TGC AGT TCG GCT TAA GCA CAA TCT GCA A-3'

#### Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion :

ML 37-Pr-S-EcoRI	5'-GCG AAT TCC GTG ACC TAT AGA CCA TAG AAA CAA ATT A-3'
ML 47-Pr-AS-SmaI	5'-TCC CCC GGG GTC TCG TTA AAG GCA TCG CTG ATT TTG GAG A-3'

#### cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:

ML 71-ohneSTOP	5'-GGA CGT CGA CGC AGC ACA ATC TGC AAC CTC TT-3'
ML 72-KpnI-ATG	5'-GGG TAC CCC ATG CCT TTA ACG AGA TCA-3'

#### Promotor-Amplifikation zur Generation einer nativ-Promotor-cDNA-Fusion:

ML 37-Pr-EcoRI	5'-GCG AAT TCC GTG ACC TAT AGA CCA TAG AAA CAA ATT A-3'
ML 66-intAS-BglII	5'-ATG TTT CCG ACG ACT ACG GCC ACT ACA A-3'

### **OBP3-spezifische Oligonucleotide: (At4g08180)**

#### Screening-Primer:

ML 14-S	5'-ATG CAT CCC TTC TGT TGC GTT ACA-3'
ML 15-AS	5'-TCG ATG TGA ATG GTA ATT TCG T-3'

## Sequenzierung:

ML 32-seq600-S 5'-AAG CCA TTC GGA GAA G'LRG CAT CT-3'  
 ML 33-seq1800-AS 5'-TCT ATG ATG GAC TGC TCC TTG A-3'

## cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:

ML 24-BamHI-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GCA TCC CTT CTG TTG CGT TAC-3'  
 ML 25-Stop-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GTC GAT GTG AAT GGT AAT TTC GT-3'

## Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion

ML 38-Pr-S-EcoRI 5'-GCG AAT TCA ACA ACT ATT TAT ATG ACC AAA ACG GTT-3'  
 ML 48-Pr-AS-SmaI 5'-TCC CCC GGG GAT GCA TGT GGT TCT AAG ATG AGA AAT-3'

## OBP3 cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:

ML 75-EcoRI-ATG 5'-CCG GAA TTC CGG ATG CAT CCC TTC TGT TGC GTT-3'  
 ML 87-ohneStopNcoI 5'-ACC CAT GGA CTC TAT CAT TTG TTG ATC GGA AT-3'

## Promotor-Amplifikation zur Generation einer nativ-Promotor-cDNA-Fusion:

ML 38-Pr-S-EcoRI 5'-GCG AAT TCA ACA ACT ATT TAT ATG ACC AAA ACG GTT-3'  
 ML 74-intAS-EcoRV 5'-TCT ACC ATA ATT CAC CCA CTT ATA CAA AAT CCC A-3'

**OBP4-spezifische Oligonucleotide: (At2g31020)**

## Screening-Primer:

Q4-S 5'-AAG TCT CTC ATA AGA TAC CGT TGA CCA-3'  
 Q4-AS 5'-TTT GGT GCG TTT TAT TGA CTG TGT TC-3'

**OBP5-spezifische Oligonucleotide: (At2g31030)**

## Screening-Primer:

Q5-S 5'-CTC GAA CAC AGT CAA TAA AAC GCA CC-3'  
 Q5-AS 5'-GTT TTA TGG TAG ATC GCA AGC AGA AGA-3'

**MAPK1-spezifische Oligonucleotide:**

## Screening-Primer:

ML 28-MAPK-S 5'-TGT GCA TAC ATA TAT GGC TTC TGG TTC TGG ATT-3'  
 ML 29-MAPK-AS 5'-ACA CCG ATC TCA GCA AAG TTG AAG ACC AAA-3'

## Sequenzierung:

ML 19-seq586-S-EcoRI 5'-TCC TGA ATT CAT GGC ACC TGA-3'

## cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:

ML 16-SalI-ATG 5'-CGC GTC GAC GGA TAT GGC TTC TGG TTC TGG ATT-3'  
 ML 17-Stop-BamHI 5'-CGG GAT CCC GAA TCA AGA GAT GTT AAC TGC TT-3'

## cDNA-Amplifikation zur GST-Fusion:

ML 22-BamHI-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GGC TTC TGG TTC TGG ATT-3'  
 ML 23-Stop-SalI 5'-CGC GTC GAC GGA ATC AAG AGA TGT TAA CTG CTT-3'

## Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion:

ML 39-Pr-S-HindIII 5'-CCA AGC TTG GAA GAC GGA GAG AAC GAG GAG CCA A-3'  
 ML 49-Pr-AS-BamHI 5'-CGG GAT CCG AAC CAG AAG CCA TAT ATG TAT GCA CAA  
 CAC A-3'

## cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:

ML 76-ohneStop 5'-GGA CGT CGA CGC AGA GAT GTT AAC TGC TTT-3'  
 ML 77-KpnI-ATG 5'-GGG TAC CCC ATG GCT TCT GGT TCT GGA TT-3'

## Promotor-Amplifikation zur Generation einer nativ-Promotor-cDNA-Fusion:

ML 39-Pr-S-HindIII 5'-CCA AGC TTG GAA GAC GGA GAG AAC GAG GAG CCA A-3'  
 ML 78-int-AS 5'-AGG CAT CTG CAT TAC ATC TTC AAT GCT AAC TA-3'

**IAP1-spezifische Oligonucleotide: (At1g10650)**

## Screening-Primer:

FiapLe 5'-GCA CCA CCG GTT TTC ATG AAC GAG A-3'  
 Fiap2 5'-AAG AAG ACT TGG ACG CAA GAA GTT TTC A-3'

## Sequenzierung:

ML 12-IAPs-int 5'-AAG AAG CTT CAA GAG AAA GA-3'  
 ML 18-seq320-AS 5'-AGA TAG TCT CAG ACC AGT TGA-3'

## cDNA-Amplifikation zur Fusion mit GST:

ML 05-BamHI-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GTT AAG TGG AAA CAA TGG AA-3'  
 IAP1-stop-KpnI 5'-GTG GTA CCT CAA GAA AAG AAG ACT TGG ACG CA-3'

Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion:

ML 41-Pr-S-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GTT CTC ATG ATG TAC ATA GCA ACA TCT-3'  
 ML 44-Pr-AS-BamHI 5'-CGG GAT CCT TTC CAC TTA ACA TCT TCC TCA AAA GTG TTA T-3'

cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:

ML 05-BamHI-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GTT AAG TGG AAA CAA TGG AA-3'  
 ML 43-AS-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GTC AAG AAA AGA AGA CTT GGA CGC A-3'

cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:

ML 88-EcoRI-ATG 5'-CGG AAT TCC GAT GTT AAG TGG AAA CAA TGG AA-3'  
 ML 90-ohneStop-Sall 5'-GTC AAG AAA AGA AGA CTT GGA CGC A-3'

Promotor-Amplifikation zur Generation einer nativ-Promotor-cDNA-Fusion:

ML 41-Pr-S-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GTT CTC ATG ATG TAC ATA GCA ACA TCT-3'  
 ML 85-intAS-SpeI-NcoI 5'-ACC CAT GGT ACC ACT AGC AGA AGT CAC TGA AGA ATT  
 GTG TT-3'

### **IAP2-spezifische Oligonucleotide: (At1g60610)**

Screening-Primer:

ML 01-S 5'-TTC ACA ACT GTG TCC TGT CCT CTG CTG AT-3'  
 ML 02-AS 5'-CTT GAC ATA TCG CAC ACG ACA CGG AAC TCA-3'

Sequenzierung:

ML 12-IAPs-int 5'-AAG AAG CTT CAA GAG AAA GA-3'  
 ML 18-seq320-AS 5'-AGA TAG TCT CAG ACC AGT TGA-3'

cDNA-Amplifikation:

ML06-IAP1-Bam-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GTT GGG AGG CAA CAA TGA-3'  
 IAP2-stop-KpnI 5'-GAA GGT ACC TCA GAA GAA GAC CTG AAC GCT AGA-3'

Promotor-Amplifikation zur Generation einer Promotor-GUS-Fusion:

ML 40-Pr-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GAA ATC AGG GTT TAA GGA GAA GA-3'  
 ML 45-Pr-AS-BamHI 5'-CGG GAT CCT TGC CTC CCA ACA TCT TCT CTA GAG CTT AA-3'

cDNA-Amplifikation zur Fusion mit einem N-terminalen HA-tag:

ML 06-BamHI-ATG 5'-CGG GAT CCC GAT GTT GGG AGG CAA CAA TGA-3'  
 ML 42-AS-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GTC AGA AGA AGA AGA CCT GAA CGC TAG A-3'

cDNA-Amplifikation ohne Stop-Codon zur Generation einer C-terminalen GFP-Fusion:

ML 89-EcoRI-ATG 5'-CGG AAT TCC GAT GTT GGG AGG CAA CAA TGA-3'  
 ML 91-ohneStop-Sall 5'-GTC AGA AGA AGA AGA CCT GAA CGC TAG A-3'

Promotor-Amplifikation zur Generation einer nativ-Promotor-cDNA-Fusion:

ML 40-Pr-EcoRI 5'-CGG AAT TCC GAA ATC AGG GTT TAA GGA GAA GA-3'  
 ML 86-intAS-PstI-NcoI 5'-ACC CAT GGA GTT CTG CTT TGG GAC TTC ATC TTG AAC  
 AAC AGT A-3'

### **CPD-spezifische Oligonucleotide: (At5g05690)**

Sequenzierung:

ML 10-seq500 5'-TCT TCT CGT GTT CTC CTC AT-3'  
 ML 11-seq1150-S 5'-CCA CTT CAA AGA TGC TCG CAC T-3'

cDNA-Amplifikation, Sequenzierung, Klonierung:

ML 03-EcoRI-ATG 5'-CGG AAT TCC ATG GCC TTC ACC GCT TTT CTC CT-3'  
 ML 04-ohneStop-Sall 5'-GAC GTC GAC GCA GTA GCA AAA TCA CGG CGC TT-3'

### **GFP-cDNA-spezifische Oligonucleotide:**

cDNA-Amplifikation, Sequenzierung, Klonierung:

ML 07-S-Sall-NcoI-ATG 5'-ACG CGT CGA CGT CCA TGG GTA AAG GAG AAG AAC-3'  
 ML 08-AS-BamHI-XbaI 5'-GCT CTA GAG GAT CCT TAT TTG TAT AGT TCA T-3'  
 ML 96-GFP-seq-AS 5'-TGC TGC TTC ATA TGA TCT GGG TA-3'

### **RFP-cDNA-spezifische Oligonucleotide:**

cDNA-Amplifikation, Sequenzierung, Klonierung:

ML 79-Sall-NcoI-ATG 5'-AAC GCG TCG ACG TCC ATG GCT TCT TCC GAG GAT GTT-3'  
 ML 80-STOP-BamHI 5'-GCT CTA GAG GAT CCC TAA AGG AAC AGA TGG TGG CGT-3'



**Oligonucleotide, die zur iPCR verwendet wurden:**

Kanamycin-cDNA-spezifische Oligonucleotide:

iPCR-Kan-S                    5'-TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG AGT TCT TCT-3'  
 iPCR-Kan-AS                5'-AGA ACC TGC GTG CAA TCC ATC TTG TTC AAT CAT-3'

Basta-cDNA-spezifische Oligonucleotide:

iPCR-Basta-S                5'- GCC GGC ATG TCC GCC TCG GTG GCA CGG CGG ATG T-3'  
 iPCR-Basta-AS              5'- GCC CCG TCC GGT CCT GCC CGT CAC CGA GAT CT -3'

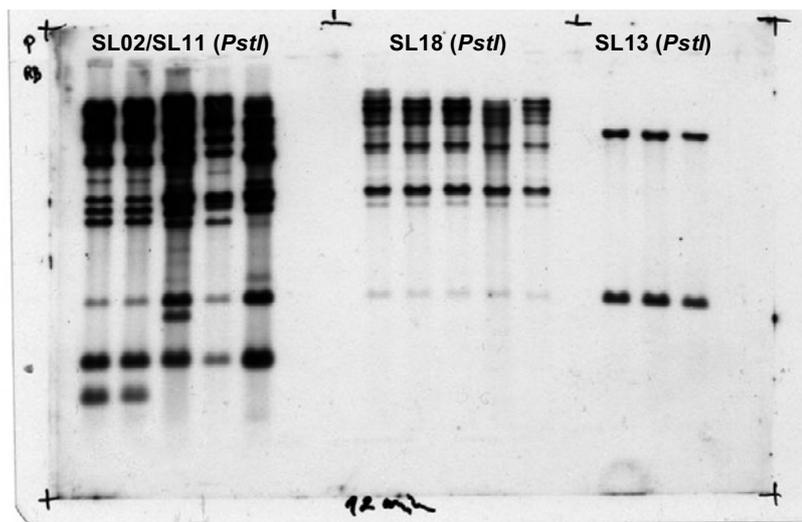
**Oligonucleotide, die zur cDNA-Synthese verwendet wurden:**

Oligo-dT-25TVA            5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVA -3'  
 Oligo-dT-25TVC            5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVC -3'  
 Oligo-dT-25TVG            5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVG -3'  
 Oligo-dT-25TVT            5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVT -3'

Die Oligo-dT-Primer wurden zu gleichen Teilen gemischt und zur cDNA-Synthese eingesetzt.

**6.4 Southern-Analyse von *PstI*-gesplattener DNA verschiedener SALK-T-DNA-Linien**

Im Rahmen der durchgeführten Southern-Analysen wurden auch Restriktionsspaltungen mit *PstI* und DNAs verschiedener SALK-Linien angefertigt.



**Abb.6.4.1: Genomische Southern-Analyse nach *PstI*-Restriktionsspaltung.** Die Abbildung zeigt die Southern-Analyse verschiedener SALK-Linien: SL02, SL11 (*iap1-2*; *iap1-3*), SL18 (*obp3-1*) und SL13 (*obp1-1*). Die Genomische DNA wurde mit *PstI* gespalten, die Filter mit der RB-spezifischen Sonde hybridisiert. Die SL13-DNA (*obp1-1*) zeigt klar die erwarteten Signale, die übrigen DNAs zeigen unvollständige Spaltungen der DNA, was auf eine Methylierung der analysierten Loci schließen lässt, da *PstI* methylierungssensitiv ist. Eine Spaltung der gleichen DNA-Proben mit den Enzymen *EcoRI* oder *HindIII* hat saubere Spaltungen – wie in 3.2.3.1 gezeigt – ergeben.

**6.5 Rohdaten des PCR-Screenings der Koncz T-DNA-Population**

Für alle untersuchten Gene wurden jeweils beide Teile der Koncz-T-DNA-Population analysiert. Zur Vereinfachung ist im Folgenden für jedes Gen nur der Teil der Analyse gezeigt und erläutert, in dem auch eine T-DNA Insertion nachgewiesen werden konnte. Die Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population wurde, wie im Kapitel 2.2.5 beschrieben, mittels drei aufeinander folgender PCR-Analysen durchgeführt.

### 6.5.1 Ergebnis des *iap1*-Screening

Die Durchmusterung der Koncz-T-DNA-Population nach der *iap1-1*-Mutante wurde freundlicherweise von Britta Hertel durchgeführt. Dazu sind die Primer „FiapLe“ und „Fiap2“ verwendet worden. Die Identität der Insertion wurde durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente sichergestellt.

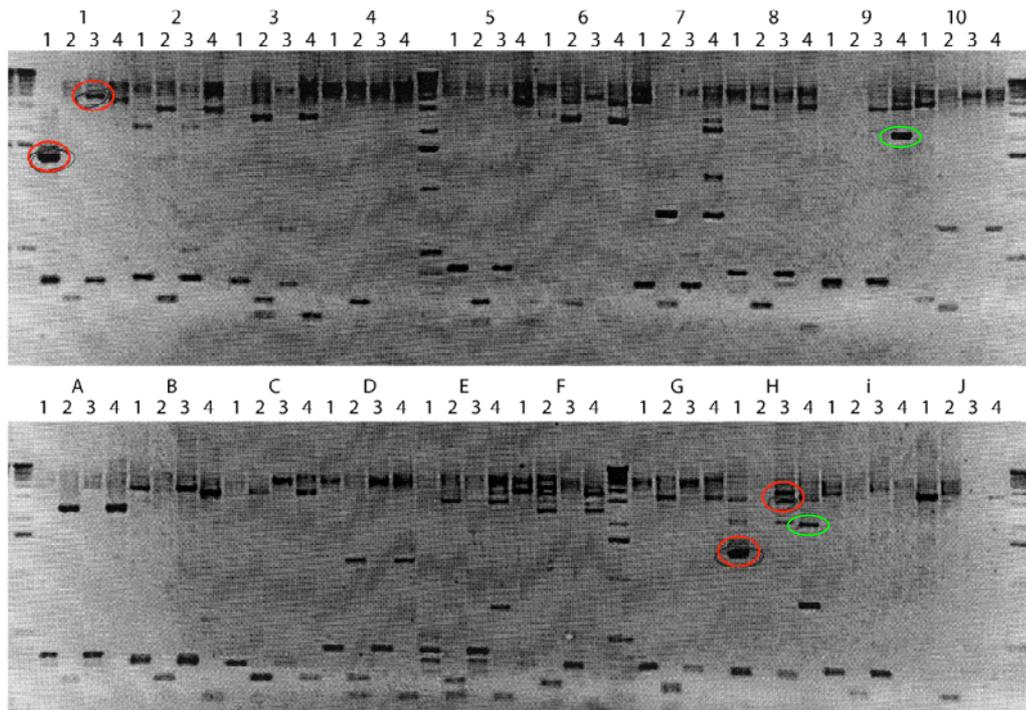
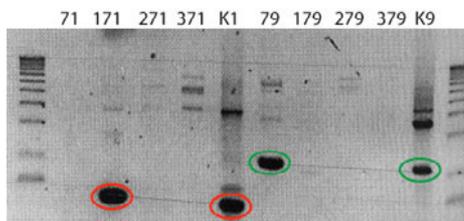
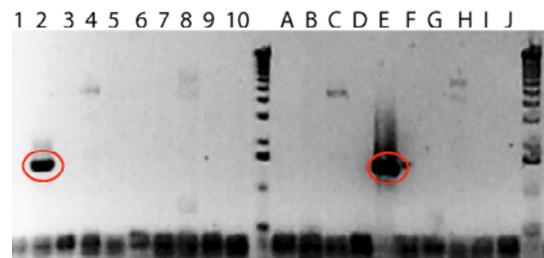
### 6.5.2 Ergebnis des *iap2*-Screening

Die Ergebnisse des *iap2*-Screens sind exemplarisch in Kapitel 3.2.2.1.1 gezeigt.

### 6.5.3 Ergebnis des *obp1*-Screening

Im Primärscreen (Abb. 6.6.1a) konnten zwei positive Superpools (Tausenderpools), Pool „1H“ (rot) und Pool „9H“ (grün) identifiziert werden. Der Nummernpool „1“ zeigt mit den Primerkombinationen 1 und 3 charakteristische Amplifikate, die in keinem anderen Nummernpool und nur in einem Buchstabenpool, dem Pool „H“, auftreten. Anhand dieser Koordinaten (1-H) wurden aus dem Poolschema (Abb.2.2) die korrespondierenden Subpools (71; 171; 271; 371) identifiziert. Im Nummernpool 9 tritt mit der Primerkombination 4 ein weiteres Amplifikat auf, das in keinem weiteren Nummernpool zu sehen ist. Für dieses Amplifikat ergibt sich ebenfalls Pool „H“ als korrespondierender Buchstabenpool. Ebenfalls mit diesen Koordinaten (9-H) konnten die entsprechenden Subpools (Hunderterpools) (79; 179; 279; 379) identifiziert werden. Sie sind im Sekundärscreen (Abb.6.6.1b) weiter analysiert worden.

Für den Sekundärscreen des Superpools „1H“ wurde die Primerkombination 1, für den Sekundärscreen des Superpools „9H“ die Primerkombination 4 verwendet. Zum Größenvergleich der Amplifikate der Subpools mit denen der Superpools wurden jeweils die Nummernpools als Kontrolle verwendet. In beiden Fällen konnte das Amplifikat des Primärscreens in jeweils einem Subpool identifiziert werden. Das 1,4 kb große Amplifikat des Pools „1“ (rot) ist auch im Subpool „171“ enthalten, das 2,1 kb große Amplifikat des Pools „9“ (grün) auch im Subpool „79“ gefunden worden. Die erhaltenen Fragmente wurden reamplifiziert und sequenziert. Anhand des Sequenzierungsergebnisses konnte eine Insertion im *OBPI*-Gen eindeutig nachgewiesen werden. Die genauen Ergebnisse der Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente sind in 6.6 dargestellt. Die Analyse der Sequenz zeigt den Übergang zwischen der genomischen Sequenz des *OBPI*-Gens und der inserierten T-DNA. Nach Erhalt des positiven Sequenzergebnisses wurden die entsprechenden Einzellinien des identifizierten Hunderterpools ausgelegt, die präparierten DNAs – wie in 2.2.5 beschrieben – gepoolt und zur PCR-Analyse der Einzellinien eingesetzt. Im Screen der Einzellinien des Hunderterpools 171 (Abb.6.6.1c) ergab sich wiederum ein eindeutiges Ergebnis. Der Nummernpool „1“ und der Buchstabenpool „E“ zeigen beide die spezifische Amplifikation des 1,4 kb-Fragments. Damit kann die Einzellinie 17.076 der Koncz-T-DNA-Population als Träger einer T-DNA-Insertion im *OBPI*-Gen identifiziert werden.

a) *OBPI* Primärscreen:b) *OBPI* Sekundärscreen:c) *OBPI* Einzelpoolscreen:

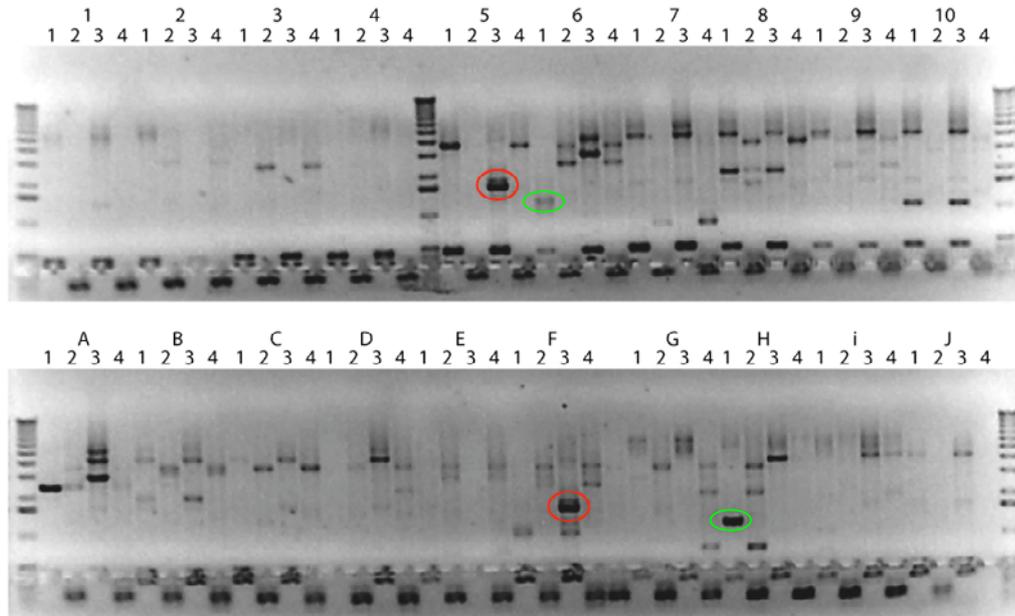
**Abb. 6.5.1: Identifikation einer T-DNA-Insertion im *OBPI*-Gen.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Primärscreens (a), des Sekundärscreens (b) und des Einzelpoolscreens (c) bei der Durchmusterung der Konz-T-DNA-Population, die zur Identifikation einer Insertion im *OBPI*-Gen führten. Für die PCR-Analysen wurden die *OBPI*-genspezifischen Primer „FOBP1-S“ und „FOBP1-AS“ sowie die T-DNA-spezifischen Primer „Fish1“ und „Fish2“ verwendet.

#### 6.5.4 Ergebnis des *obp2*-Screening

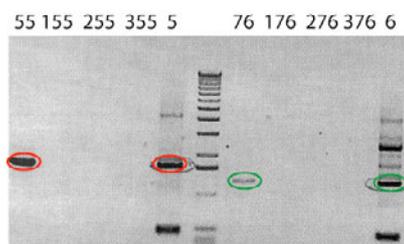
Im Primärscreen (Abb.6.6.2a) konnten zwei positive Superpools (Tausenderpools), Pool „5F“ (rot) und Pool „6H“ (grün) identifiziert werden. Der Nummernpool „5“ weist mit der Primerkombinationen 3 ein charakteristisches Amplifikat auf, das in keinem anderen Nummernpool und nur in einem Buchstabenpool, dem Pool „F“ auftritt. Aufgrund dieser Koordinaten (5-F) konnte aus dem Poolschema (Abb.2.2) die korrespondierenden Subpools (55; 155; 255; 355) identifiziert werden. Im Nummernpool 6 tritt mit der Primerkombination 1 ein weiteres Amplifikat auf, das in keinem weiteren Nummernpool zu sehen ist. Für dieses Amplifikat ergibt sich Pool „H“ als korrespondierender Buchstabenpool. Mit diesen Koordinaten (6-H) wurden nun ebenfalls die entsprechenden Subpools

(Hunderterpools) (76; 176; 276; 376) identifiziert und im Sekundärscreen (Abb.6.6.2b) weiter analysiert.

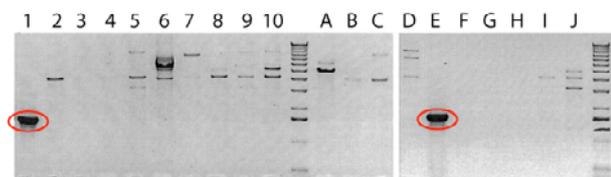
a) *OBP2* Primärscreen:



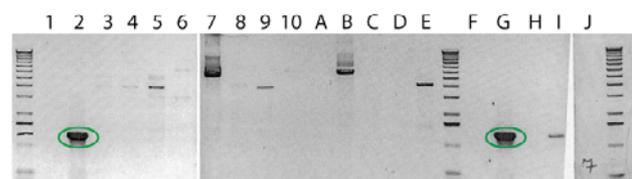
b) *OBP2* Sekundärscreen:



c) *OBP2* Einzelpoolscreen A:



d) *OBP2* Einzelpoolscreen B:



**Abb. 6.5.2: Identifikation einer T-DNA-Insertion im *OBP2*-Gen.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Primärscreens (a), des Sekundärscreens (b) und der Einzelpoolscreens (c) bei der Durchmusterung der Konz-T-DNA-Population, die zur Identifikation einer Insertion im *OBP2*-Gen führten. Für die PCR-Analysen wurden die *OBP2*-genspezifischen Primer „ML26-S“ und „ML27-AS“ sowie die T-DNA-spezifischen Primer „Fish1“ und „Fish2“ benutzt.

Für den Sekundärscreen des Superpools „5F“ wurde die Primerkombination 3, für den Sekundärscreen des Superpools „6H“ die Primerkombination 1 verwendet. Um einen Größenvergleich zwischen den Amplifikaten der Subpools und den der Superpools zu ermöglichen wurden die Nummernpools als Kontrolle verwendet. In beiden Fällen konnte das Amplifikat des Primärscreens in jeweils einem Subpool identifiziert werden. Das 1,7 kb große Amplifikat des Pools „5F“ (rot) tauchte im Subpool „55“, das 1,3 kb große Amplifikat des Pools „6H“ (grün) im Subpool „76“ auf. Die erhaltenen

Fragmente wurden reamplifiziert und sequenziert. Anhand des, daraus resultierenden Sequenzierungsergebnisses konnte eine Insertion im *OBP2*-Gen eindeutig nachgewiesen werden. Die genauen Sequenzierungsergebnisse der erhaltenen PCR-Fragmente, sind in 6.6 gezeigt. Die Analyse der Sequenz zeigt den Übergang zwischen der genomischen Sequenz des *OBP2*-Gens und der inserierten T-DNA. Nach die positiven Sequenzergebnisse vorlagen wurden die entsprechenden Einzellinien der identifizierten Hunderterpools ausgelegt, die präparierten DNAs, wie in 2.2.5 beschrieben gepoolt und zur PCR-Analyse der Einzellinien eingesetzt. Im Screen der Einzellinien der Subpools 55 bzw. 76 (Abb.6.6.2c) ergab sich jeweils ein eindeutiges Ergebnis. Der Nummernpool „1“ und der Buchstabenpool „E“ bzw. der Nummernpool „2“ und der Buchstabenpool „G“ zeigen jeweils beide die spezifische Amplifikation des 1,7 kb- bzw. 1,3 kb-Fragments. Damit können die Einzellinien 5.451 und 7.572 der Koncz-T-DNA Population als Träger einer T-DNA-Insertion im *OBP2*-Gen identifiziert werden.

#### **6.5.5 Ergebnis des *mapk1*-Screening**

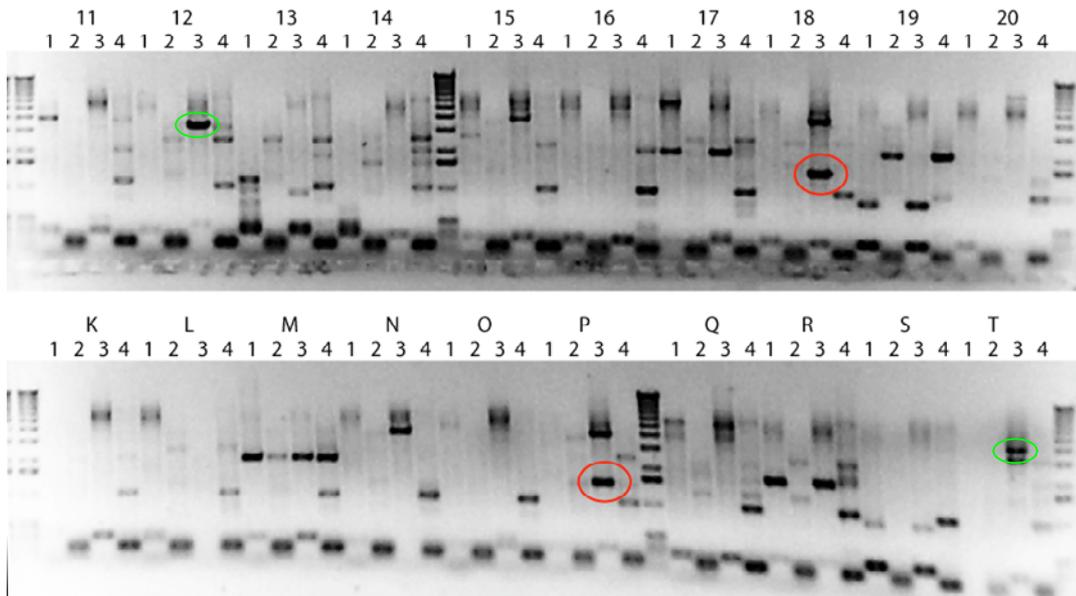
Im Primärscreen (Abb.6.6.3a) konnten zwei positive Superpools (Tausenderpools), Pool „18P“ (rot) und Pool „12T“ (grün) identifiziert werden. Der Nummernpool „18“ zeigt mit der Primerkombination 3 ein charakteristisches Amplifikat, das in keinem anderen Nummernpool und nur in einem Buchstabenpool, dem Pool „P“ auftritt. Anhand dieser Koordinaten (18-P) wurden aus dem Poolschema (Abb.2.2) die korrespondierenden Subpools (458; 558; 658; 758; 858) identifiziert. Im Nummernpool 12 tritt mit der Primerkombination 3 ein weiteres Amplifikat auf, das in keinem weiteren Nummernpool zu sehen ist. Für dieses Amplifikat ergibt sich der Pool „T“ als korrespondierender Buchstabenpool. Anhand dieser Koordinaten (12-T) wurden ebenfalls die entsprechenden Subpools (Hunderterpools) (492; 592; 692; 792; 892) identifiziert und im Sekundärscreen (Abb.6.6.3b) weiter analysiert.

Für die Sekundärscreens der Superpools „18P“ und „12T“ wurde jeweils die Primerkombination 3 verwendet. Zum Größenvergleich der Amplifikate der Subpools mit denen der Superpools wurden Nummernpools als Kontrolle verwendet. In beiden Fällen konnte das Amplifikat des Primärscreens in jeweils einem Subpool identifiziert werden. Das 1,6 kb große Amplifikat des Pools „18“ (rot) wurde im Subpool „558“, das 3,5 kb große Amplifikat des Pools „12“ (grün) im Subpool „592“ identifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden reamplifiziert und sequenziert. Anhand des Sequenzergebnisses konnte eine Insertion im *MAPK*-Gen eindeutig nachgewiesen werden. Die Sequenzergebnisse der erhaltenen PCR-Fragmente, sind in 6.6 gezeigt. Die Analyse der Sequenz zeigt den Übergang zwischen der genomischen Sequenz des *MAPK*-Gens und der inserierten T-DNA.

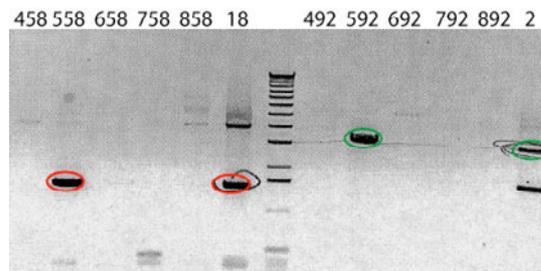
Nach Erhalt des positiven Sequenzergebnisses sind die entsprechenden Einzellinien des identifizierten Hunderterpools ausgelegt worden, die präparierten DNAs wurden, wie in 2.2.5 beschrieben, gepoolt und zur PCR-Analyse der Einzellinien eingesetzt. Im Screen der Einzellinien des Hunderterpools 558 (Abb.6.6.4c) ergab sich wiederum ein eindeutiges Ergebnis. Der Nummernpool „1“ und der Buchstabenpool „J“ zeigen beide die spezifische Amplifikation des 1,6 kb-Fragments. Damit kann die

Einzellinie 55.760 der Konz-T-DNA Population als Träger einer T-DNA-Insertion im *MAPK*-Gen identifiziert werden.

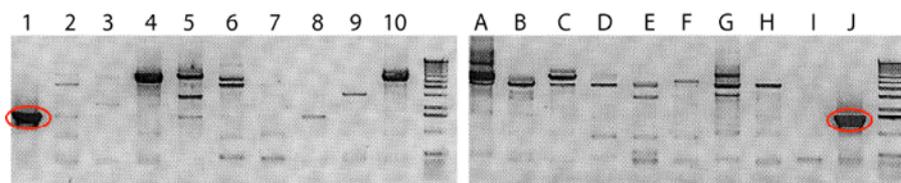
a) *MAPK* Primärscreen



b) *MAPK* Sekundärscreen:



c) *MAPK* Einzelpoolscreens:



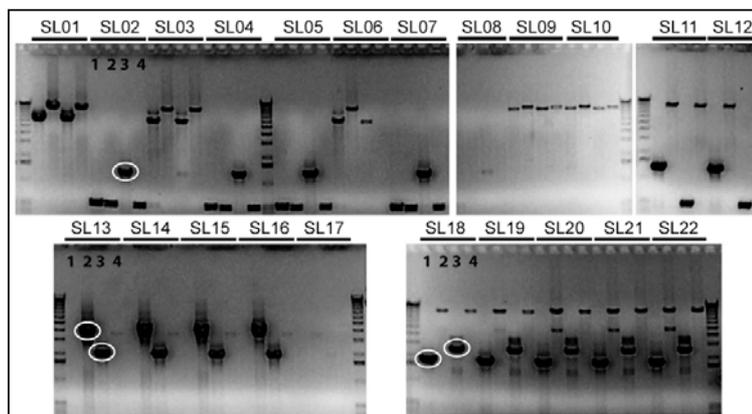
**Abb. 6.5.3: Identifikation einer T-DNA-Insertion im *MAPK*-Gen.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Primärscreens (a), des Sekundärscreens (b) und der Einzelpoolscreens (c) bei der Durchmusterung der Konz-T-DNA-Population, die zur Identifikation einer Insertion im *MAPK*-Gen führten. Für die PCR-Analysen sind die *MAPK*-genspezifischen Primer „ML28-S“ und „ML29-AS“ sowie die T-DNA-spezifischen Primer „Fish1“ und „Fish2“ verwendet worden.

## 6.6 Ergebnis des Einzelpflanzen-Screenings der SALK-T-DNA-Linien

Die erhaltenen Einzelpflanzen der *SALK*-T-DNA-Linien *OBP1* (N530489), *OBP3* (N040837) sowie *IAP1* (N5333864, N515099) wurden durch eine PCR-Analyse charakterisiert.

Für die *iap1-2* und *iap1-3*-Linien wurden vier bzw. zwei Einzelpflanzen, SL02, SL04, SL05, SL07 sowie SL11 und SL12 gefunden, die eine T-DNA-Insertion im *IAP1*-Gen tragen. Für die *obp1-1* bzw.

*obp3-1*-Linien wurden vier bzw. fünf Einzelpflanzen identifiziert, die eine T-DNA-Insertion im *OBP1* bzw. *OBP3*-Gen tragen. Die Linien SL02 (*iap1-2*), SL13 (*obp1-1*), SL18 (*obp3-1*) und SL08 (*Col* WT) wurden durch eine genomische Southern-Blot-Analyse weiter charakterisiert. Zuvor konnte die Identität der erhaltenen PCR-Fragmente durch eine Sequenzierung sichergestellt werden. Für die Linie SL02 ergab die Wiederholung der PCR-Analyse auch mit der 1. Primerkombination (AS+LB) ein PCR-Fragment. Das Fragment, das mit der 3. Primerkombination generiert wurde, hat eine Sequenzierung bestätigt. Für die Linie SL11 konnte anhand der Sequenzierung nur ein Fragment bestätigt werden. Für die *OBP*-Linien ist jeweils die Identität beider PCR-Fragmente bestätigt worden. Die Sequenzierungen wurden mit T-DNA-spezifischen Oligonucleotiden durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen war darauf ausgelegt, klar den Übergang zwischen der T-DNA-Sequenz im „border“-Bereich und der flankierenden, genomischen DNA des entsprechenden Gens zu zeigen. Die Linie SL08 ergab keine Amplifikate mit T-DNA-spezifischen Oligonucleotiden. Mit Primern – spezifisch für den Wildtyp-Locus – ergaben sich dagegen die erwarteten Amplifikate (Daten nicht gezeigt). Nachdem die Identität der Linie SL08 auch durch einen Southern-Blot bestätigt wurde, ist sie für spätere Analysen als Wildtyp-Kontrolle verwendet worden.



**Abb. 6.6.1: PCR-Analyse der SALK-Einzelpflanzen.** Die Abbildung zeigt die PCR-Analyse der *iap1*-SALK-Linien N533864 (SL01 bis SL07) und N515099 (SL08 bis SL12), der *obp1*-SALK-Linie N530489 (SL13 bis SL17) sowie der *obp3*-SALK-Linie N040837 (SL18 bis SL22). Es wurden die Primerkombinationen aus genspezifischen (S, AS) und T-DNA-spezifischen Primern (LB, RB): 1. S+LB, 2. S+RB, 3. AS+LB, 4. AS+RB eingesetzt.

## 6.7 Grenz-Sequenzen der T-DNA-Insertionen

Bei dem PCR-Screening wurden die Übergänge zwischen den inserierten T-DNAs und der flankierenden, genomischen DNA mit Kombinationen aus genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonucleotiden amplifiziert. Die Amplifikate wurden sequenziert. Im Folgenden sind alle relevanten Sequenzerggebnisse der verwendeten T-DNA-Allele gezeigt. Dabei wurden alle Fragmente mit T-DNA-spezifischen Oligonucleotiden (Fish1, Fish2, SLLB) sequenziert. Die identifizierten T-DNA-Sequenzen sind rot, die Gensequenzen gelb hinterlegt. Aus Platzgründen wurden die Gensequenzen beschnitten. In der Regel haben die Sequenzerggebnisse 200 bp bis 400 bp genomischer Sequenz ergeben. Die Identität der Sequenzen wurde mit dem Programm „blast“ überprüft. Wenn zwischen der T-DNA und der genomischen DNA einzelne Basenpaare (*filler*-DNA, Koncz *et al.*, 1994) eingefügt wurden, sind diese grau hinterlegt. Basenpaare, die sowohl zur T-DNA, als auch zur

genomischen DNA gehören können, sind grün hinterlegt. Es ist jeweils der Genname, der *A. thaliana* BAC-Klon und das mutante Allel angegeben.

*IAP1* (At1g10650, BAC\_F20B24):

*iap1-1*, #101 (A174):

```
<IAP1, (#101) FIAPLE1, Fish2
1 CCCAAGCGGC CGGAGAACCT GCGTGCAATC CATCTTGTTT AATCCAAGCT
51 AGCTTGGCCG GATCCGAAAC TATCAGTGTT TCAAACCAAT TGATACAACA
101 CGGTTGGCCG TAGAGTTTTT GTTGTGTTGCT TGTGGGAGAT TTGCCPTTAA
151 GACATTAACC ACAGACTCAT TGTACTTTGC TCTGTAGT

<IAP1, (#101) FIAP2, Fish1
1 GATCGTGAAG TTTCTCATCT AAGCCCCCAT TTGGACGTGA ATGTAGACAC
51 GTCGAAATAA AGATTTCGGA ATTAGAATAA TTTGTTTATT GCTTTCGCC
151 ATAAATACGA CGGATCGTAA TTTGTCGTTT TATCAAAATG TACTTTCATT
201 TTATAATAAC GCTGCGGACA TCTACATTTT TGAATTGAAA AAAAAATGGT
251 AATTACTCTT TCTTTTCTC CATATGACC ATCATACTCA TTGCTGATCC
300 ATGTAAGATT CCCGACATG AAGCCATTTA CAATTTAAAC AACCAACAGT
351 TGATAGCTGC TGCAGATCAA GGCAAAGAAG GTTTTGAGGA CAGCGAAATA
401 GATGATGCAG CTTTCATCATA CATCGA
```

*iap1-2*, N533864 (SL02):

```
<IAP1, (SL02/04) SLLB, P3
1 TGTNCCCCTC TCACTGGTGA AAAGAAAAAC CACCCAGTA CATTAAAAAC
51 GTCGCAATG TGTATTAAAG TTGTCGCAA TTGTTTATC ACTGTTGATC
101 CAGTAAACTA CTTTGTAAAC GATAACCTCG TTCCAATGAT CCGCCCTAAC

<IAP1, (SL02), SLLB
1 NCNGTTGCC GTCTCACTGG TGNAAGAA AAACCACCC AGTACATTAA
51 AACGTCGCC AATGTGTTAT TAAGTTGCT AAGCGCAAT TTGTATTGTT
101 TGTACAGAC AAAGATTCTA AGTTTCTTAA TGATGTTAG TTTACGACGA
```

*iap1-3*, N515099 (SL11):

```
<IAP1, (SL11/12), SLLB, P1
1 CCCGTCTCAC TGGTGAAAAG AAAAACCACC CCAGNTACAT TAAAAACGTC
51 CGCAATGTGT TATTAAGTTG TCTAAGCGTC AATTTGTTTA CACCACAATA
101 TATTTGTTTA CCCGTCAATA TATCCTCTGA TGAATCCCCA TGTGTTGTTT
151 GTTATGTTG TTTGGATCGA TGTATGATGA AGCTGCATCA TCTATTTCCG
201 TGCTCCAAA ACCTTCTTTG CCTTGATCTG CAGCAGCTAT CACACTGTTG
251 TTGTGTGACA TTGCTTGTG GAGATTGCCC TTTAAGACAT TAACCACAGA
```

*IAP2* (At1g60610, BAC\_F8A5):

*iap2-1*, #65.800 (C2A):

```
<IAP2, (#65.800), S+Fish1 (MLB2)
1 CNNNNNNNNN NNNATNNTNA NANNGATATA TTCAATTGNA AATGGCTNCA
51 TGANTGGNGA CACGTCNAAA TAAAGATTTC CGAATTAGAA TAATTTGTTT
101 ATTGCTTTTC CCTATAAATA CGACGGATCG TAATTGTCG TTTTATCAAA
151 ATGTACTTTC ATTTTATAAT AACGTCGGG ACATCTACAT TTTTGAATTG
201 AAAAAAATT GGTAATTACT CTTTCTTTT CTCCATATTG ACCATCATA
251 TCATTGCTGA TCCATGTAGA TTTCCCGGAC ATGAAGCCAT TTACAATTGG
301 ATATGTAAGC AAAAACATAC GCTTGTGAGA TAAAATTAAT ACCCGGAATT

<IAP2, (#65.800), Fish1 (KC2A)
1 GGATCGTGAA GTTTCTCATC TAAGCCCCCA TTGGACGTG NAATGTAGAC
51 ACGTCGAAAT AAAGATTTC GAATTAGAAT AATTTGTTTA TTGCTTTCG
101 CTATAAATAC GACGGATCGT AATTTGTCGT TTTATCAAAA TGACTTTCA
151 TTTTATAATA ACGTCGCGA CATCTACAT TTTGAATTGA AAAAAAATTG
201 GTAATTACT TTTCTTTTC TCCATATTGA CCATCATACT CATGCTGAT
251 CCAATGATAT TTCCCGGACA TGAAGCCAT AATTTATCCA TGTGTTGAA
301 ATTTCTCTCT CTTGGAACAG GCAGATCAA TGCGGAAAG TGTGAGAGAT
```

*iap2-2*, N649179 (7901ff):

<IAP2, (SL7901), SLLB (M3-K)  
 1 CCTGTNCCC GTCTCACTGG TGAAAAAGAA AAAACCACCC CAGTACATTA  
 51 AAAACGTCCG CAATGTGTTA TTAAGTTGTC TAAGCGTCAA TTTGTTTACA  
 101 CCACAATAATA TCCCGTCAAT TTACCTTTAA GGCATTAACC ACAGATTCAT  
 151 TGTATTTTGC TTTGTAATGC CAGTTCTGAG CTTCCTACTGC CACTTGTTTT

<IAP2, (SL7901) SLLB (M4)  
 1 CCTGTNCCC TCTCACTGGT GNAAAAGAAA AAACCACCCC AGTACATTAA  
 51 AAACGTCCGC AATGTGTTAT TAAGTTGCT AAGCGTCAAT TTTGTTTACAC  
 101 CACAACAATG CAGTAGGAGG AGGAGTTGCT GATCATCATC AAATGAAAGA  
 151 AGGGTTTGGG GATAGTGAGA TTGATGACGA AGCAGCTTCT TACAATTACT

*iap2-3* (7781ff):

<IAP2, (SL7781), SLLB (M1-K)  
 1 TGCCCGTCTC ACTGGTGAAG AGAAAAACCA CCCAGTTAC ATTAAAAACG  
 51 FCCGCAATGT GTTATTAAGT TGTCTAAGCG TCAATTTGTC AATGTCATCA  
 101 ATCTCACTAT CCCCAAACCC TTCTTTCATF TGATGATGAT CAGCAACTCC

*MAPK1* (At5g41990, BAC\_MJC20):

*mapk1-1*, #55.760 (F11B):

<MAPK1, (#55760), AS+ Fish1 (MAD3)  
 1 NGATCGTGAA GTTCTCATC TAAGCCCCA TTTGGACGTG NAATGTAGAC  
 51 ACGTCGAAAT AAAGATTTCC GAATTAGAA AATTTGTTTA TTGCTTTCG  
 101 CTATAAATAC GACGGATCGT AATTGTCTGT TTTATCAAAA TGTACTTTCA  
 151 TTTTATAATA ACGGTGCGGA CATCTACATT TGTATGAAGA GGAATACAAT  
 201 GAGCTGTGCG ACATCTATTC TTTTGGCATG TGTATGTTGG AGATGGTAAC

*OBP1* (AT4g22540, BAC\_F7K2):

*obp1-2*, #17.076 (B84):

<OBP1, (#17076), S+Fish1 (FrA1)  
 1 GCGNAAGTTT CTCATCTAAG CCCCATTGG GACGTGNAAT GTAGACACGT  
 51 CGAAATAAAG ATTTCCGAAT TAGAATAATT TGTTTATTGC TTTCCGCTAT  
 101 AAATACGACG GATCGTAATT TGTCGTTTTA TCAAATGTA CTTTCATTTT  
 151 ATAATAACGC TGCCGACATC TACATTTTTG AATTGAAAAA AAATTGGTAA  
 201 TTACTCTTTC TTTTCTCCA TATTGACCAT CATACTCATF GCTGATCCAT  
 251 GTAGATTTCC CGGACATGAA GCCAACAAAG CAAATCAAAG CAAGCACATG  
 301 CAAAGGCAAG AATCACCAAA GAACAAATTG TCAAAGTGT CCAAAATTCA

<OBP1, (#17076), Fish1 (KB84)  
 1 GGCATCGTGA AGTTTCTCAT CTAAGCCCCC ATTTGGACGT GNAATGTAGA  
 51 CACGTCGAAA TAAAGATTTT CGAATTAGAA TAATTTGTTT ATGCTTTTCG  
 101 CCTATAAATA CGACGGATCG TAATTTGTCG TTTTATCAAA ATGACTTTTC  
 151 ATTTTATAAT AACGCTGCGG ACATCTACAT TTTTGAATTG AAAAAAAT  
 201 GGTAATTACT CTTTCTTTTT CTCCATATTG ACCATCATA CATTGCTGA  
 251 FCCATGTTC AATGTTAAAA TGGGTATACG CTTTAACTT TTTTATTGTC  
 301 ATCTTTTACT TTGGATTTCT CTTTAGCTAA GAAGTCTAGC TAACTATATC

*obp1-1*, N530489 (SL13):

<OBP1, (SL13/14), SLLB, P3  
 1 TNCCCGTCTC ACTGGGTGAA AAGAAAAACC ACCCCAGTAC ATTAAAAACG  
 51 TCCGCAATGT GTTATTAAGT TGTCTAAGCG TCAATTTGTT TACACCACAA  
 101 TATATCTCTGT TTATCTTATA TTGACTTAAA GCCTATTGGA TAATCAGGGG  
 151 AATGGTCTCT TAAGAGCCTT AAATGTTGCT GCTTTTGC GG TCTCTGGATA

<OBP1, (SL13), Fish2  
 1 CCAAGCGGCC GGAGAACCCT CGTGCAATCC ATCTTGTTC AATCATGCGAA  
 51 ACGATCCAGA TCCGCTGCAG ATTTATTGGA TTGAGAGTGA ATATGAGACT  
 101 CTAATTGGAT ACCGAGGGGA ATTTATGGAA CGTCAGTGG AATTTTGA  
 151 CAAGAAATAT TTGCTAGCTG ATAGTGACCT TAGGCGACTT TTGAACGCGC  
 201 AATAATGGTT TCTGACGTAT GTGCTTAGCT CATTAAACTC CAGAAACCCG  
 251 CCGCTGAGTG GCTCCTCAA CGTTGCGGTT CTGTCAGTTC CAAACGTAAA  
 301 ACGGCTTCTC CCGCTCATC GGCGGGGTC ATAACGTGAC TCCCTTAAATA  
 351 AGATAAGTAA GAGACTTTGG TGTCACTTAC AGATTTTCCA TGTTCATATG

*OBP2* (At4g12460, BAC\_T1P17):*obp2-1*, #5.451 (D7I):

&lt;OBP2, (#5.451) S+Fish1 (MAD5)

1	NGGATCGTGA	AGTTTCTCAT	CTAAGCCCC	ATTTGGACGT	GNAATGTAGA
51	CACGTCGAAA	TAAAGATTTC	CGAATTAGAA	TAATTTGTTT	ATTGCTTTCG
101	CCTATAAATA	CGACGGATCG	TAATTTGTCG	TTTTATCAAA	ATGACTTTC
151	ATTTTATAAT	AACGCTGCGG	ACATCTACAT	TTTTGAATTG	AAAAAAAAAT
201	GGTAATTACT	CTTTCTTTT	CTCCATATTG	ACCATCATA	TCATTGCTGA
251	TCCATGTTTC	ATTTTTTTTA	AATCCGGATA	CGAGTGAAGC	TGAGTGTCAA
301	CTACATGCAT	ATTAACATGT	TTAGACTTTA	GAGTACTACA	GAGCTGCTCC

&lt;OBP2, (#5.451), AS+Fish1 (O2D1)

1	GTGAAGTTTC	TCATCTAAGC	CCCCATTTGG	ACGTGNAATG	TAGACACGTC
51	GAAATAAAGA	TTTCCGAATT	AGAATAATTT	GTTTATGCTC	TTCCGCTATA
101	AATACGACGG	ATCGTAATTT	GTCGTTTTAT	CAAAATGTAC	TTTCATTTTA
151	TAATAACGCT	GCGGACATCT	ACATTTTTGA	ATTGAAAAAA	AATTGGTAAT
201	TACTCTTCT	TTTTCTCCAT	ATTGACCATC	ATACTATTG	CTGATCCATG
251	TAGATTTCCC	GGACATGAAG	CCATTTACAT	GTAGAAAAAA	AATTATGAGA
301	ATCTTTTCTT	AAGAAGTTTG	GCATATAATT	CGTTAGGGTA	TTGTACTCTC

*obp2-2*, #7.572 (E-):

&lt;OBP2, (#7.572), AS+Fish1 (MAD6)

1	GATCGTGAAG	TTTCTCATCT	AAGCCCCCAT	TTGGACGTGN	AATGTAGACA
51	CGTCGAAATA	AAGATTCCG	AATTAGAATA	ATTTGTTTAT	TGCTTTCGCC
101	TATAAATACG	ACGGATCGTA	ATTTGTCGTT	TTATCAAAAT	GTACTTTCAT
151	TTTATAAATA	CGCTGCGGAC	ATCTACATTT	TTGAATTGAA	AAAAAATTGG
201	TAATFACTCT	TTCTTTTTCT	CCATATTGAC	CATCACTACT	ATTGCTGATC
251	CATGTAGATT	TCCCGGACAT	GAAGCCATTT	ACAATTAAAT	AATGGAGTGT
301	AGCTGTGTTG	GAGCTGAAGG	CCTCCTCTTG	GAGAAATCT	AGCCATATAT

&lt;OBP2, (#7.572), S-Fish1 (O2D2)

1	NNNCGGATCG	TGAAGTTTCT	CATCTAAGCC	CCCATTGGA	CGTGNAATGT
51	AGACACGTCG	AAATAAAGAT	TTCCGAATTA	GAATAATTTG	TTTATTGCTT
101	TCGCCTATAA	ATACGACGGA	TCGTAATTTG	TCGTTTTATC	AAAAATGACT
151	TTCAATTTAT	AATAACGCTG	CGGACATCTA	CATTTTTGAA	TTGAAAAAAA
201	ATATGTAATT	ACTCTTCTT	TTTCTCCATA	TTGACCATCA	TACTCATTCG
251	TGATCCATGT	AGATTTCCCG	GACATGAAGC	CATTTACAA	TGATTATTTT
301	CTACCGACTA	GCTACACCTA	CCATTCACCA	ATCATGTAGA	AACTCCACTA

*OBP3* (At4g08180, BAC\_T12G13):*obp3-1*, N040837 (SL18):

&lt;OBP3, (SL18/19), SLLB, P1

1	TTNCCCGTCT	CACTGGTGNA	AAAGAAAAAC	CACCCAGTA	CATTA AAAAC
51	GTCCGCAATG	TGTTATTAAG	TTGTCTAAGC	GTCAATTTGT	TTACACCACA
101	ATACATTGTC	AATTTGACAA	ATTTGTTTAG	TATTGGATCC	GCTGATGCAA
151	TTTGTTTGCT	AGGCTCAAGA	ATGGGAGGCT	TGGTAACTCA	CCACTGAACT
201	TCTCGTGTCT	TAATTCACCG	GAACATCCAT	TATCAGCCTG	TCTTTGACTT

&lt;OBP3, (SL18), SLLB

1	CTGTTGCCCG	TCTCACTGCT	GNA AAAGAAA	AACCACCCCA	GTACATTAAA
51	AAACGTCGCA	ATGTGTTATT	AAGTTGCTTA	AGCGTCAATT	TGTTTCATTT
101	TACCTGTATT	TTGATTCGAG	TTTGCAATTG	ACTTGTTTAA	TATTTATCTC

*OBP4* (At2g31020, BAC\_F7F1):*obp4-1*, N568577 (SL7821ff):

&lt;OBP4, (SL7821), SLLB (M7-K)

1	ANTCCNGTTC	CCGTCNCACT	CGTGAAAAGA	AAAACCACCC	CAGCTACATT
51	AAAAACGTC	GCAATGTGTT	ATTAAGTTGT	CTAAGCGTCA	ATTTGTTTAC
101	ACCACAATAT	ATCCGACAT	GCCACAATCA	TAGGATGATG	ACTCACCTGA
151	AAATATAATT	TACAAGAGAA	TGATATCTTC	ACCAAACTA	ATGAGTAAAT

<OBP4, (SL7821), Fish2 (M8-F2)  
 1 GACAGATTGT CGTTCCCGCC TTCAGTTTAA ACTATCAGTG TTTTACACA  
 51 ATGTGTTATT AAGTTGTCGG TCATTTTGGG GAGATAGCAA CTTAAAAAGC  
 101 AAATTTTGGG GTCGATCAAT TCAACTTGAT CCTATGGTT TGTGACTTT

*obp4-2*, N632547 (SL7841ff):

<OBP4, (SL7841), SLLB (M5-K)  
 1 CCCTGTNCCC GTCTCACTGG TGAAAAAGAA AAACCACCCC AGTACATTAA  
 51 AAACGTCCGC AATGTGTTAT TAAGTTGTCT AAGCGTCAAT TTGTTTACAC  
 101 CACAAAATCT GTTCCAAAAA AGTAAATAAT TTTTTTTCAC TGACAAAACC  
 151 AATAGAGAAA GTTGATCAAA CCTTGAGATG AACTTCGCCG AATGGCTTGC

<OBP4, (SL7841), SLLB (M6-K)  
 1 CCTGTGCCCG TCTACTGGTG AAAAGAAAAA CACCCAGTA CATTAAAAAC  
 51 GTCCGCAATG TGTTATTAAG TTGTCTAAGC GTCAATGTGT TATTGTTTAC  
 101 TACTTATCGC GCCGATATTT TTTACTGGTA AAAACTCTTA CCGCTTTTAA

*OBP5* (At2g31030, BAC\_F7F1):

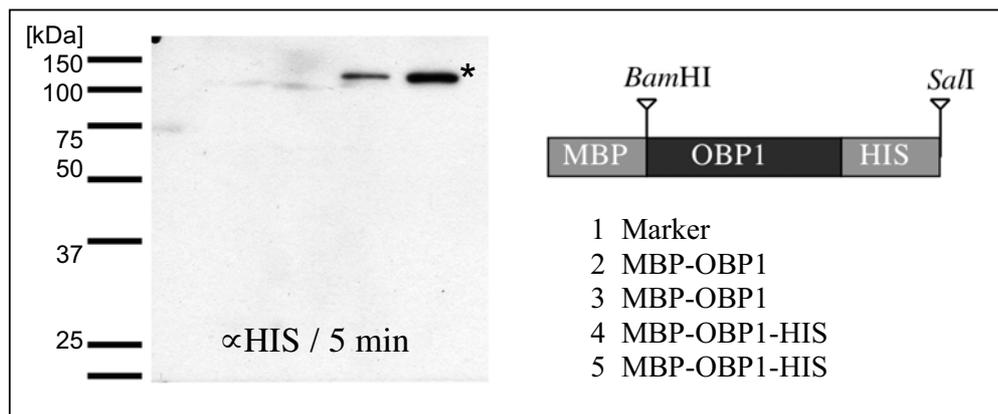
*obp5-1*, N610343 (SL7861ff):

<OBP5, (SL7861), SLLB (M9-K)  
 1 AGACCTGTGC CCGTCTCACN GGTGAAAAG AAAAACCACC CCAGTACATT  
 51 AAAACGTCC GCAATGTGTT ATTAAGTTGT CTAAGCGTCA ATTTGTTTAC  
 101 ACCCAATAT ATCCTTCAGC CTTGTAAGC TTCTTGTTC TAAGCAAAAG  
 151 CAGAGTTATA AGCCCAAAGA CAATAATAA AAATGGAAGC TAGAGTAATT

<OBP5, (SL7861), Fish2 (M10-F2)  
 1 AGGACAGATT GTCGTTCCCG CCTTCAGTTT AAACATCAG TGTGTTGACAT  
 51 GTGNAATGTT AATTAATGGT CAAATCACGA ACATATATGC ATGCAAAAAC  
 101 TTTAAATGGA CCACCAGATC GATTGGTTT TGTGGAACA ATAAAGTTGA

## 6.8 Reinigung des MBP-OBP1-HIS-Fusionsproteins

Das *A. thaliana* OBP1-Protein wurde in *E. coli* exprimiert und gereinigt um Antikörper herzustellen und um *in vitro* Bindungsexperimente mit markierten Steroiden und Brassinosteroid durchführen zu können.



**Abb.6.8.1** **Reinigung des MBP-OBP1-HIS-Fusionsproteins aus *E. coli*.** Das *At*OBP1-Protein wurde in den Vektor pMAL (NEB) kloniert und zur Expression in *E. coli* eingesetzt. Das Fusionsprotein (\*) wurde über Nickel-NTA-Säulen gereinigt und mittels einem HIS-Antikörper in der geeigneten Western-Blot-Analyse detektiert. Der HIS-TAG wurde über Oligonucleotide bei der Herstellung des Konstruktes eingefügt.

*Et hätt noch emmer joot jejange.*

(rheinische Redensart)

# D a n k s a g u n g

(*a c k n o w l e d g e m e n t s*)

Die experimentellen Arbeiten meiner Dissertation wurden in der Zeit von Januar 2002 bis Juli 2005 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, in der Abteilung „Entwicklungsbiologie der Pflanzen“, unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. George Coupland durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. George Coupland möchte ich mich recht herzlich für die Betreuung, die Übernahme des Gutachtens und die Möglichkeit, in seiner Abteilung unter optimalen Bedingungen arbeiten zu können, bedanken.

Herrn Prof. Dr. U.I. Flügge danke ich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Csaba Koncz für die Unterstützung und den gewährten Freiraum, den er mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zugestanden hat. Darüber hinaus bedanke ich mich für den überlassenen Labor- bzw. Gewächshausarbeitsplatz sowie unzählige Seminare und Diskussionen, die wesentlich zur vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Elmon Schmelzer und Riaz Bath möchte ich Danke sagen für die Einarbeitung in die confocale Laser-scanning Mikroskopie und die wertvolle Unterstützung, nicht zuletzt für das regelmäßige Umbauen des Confocals.

Bei allen Mitgliedern und „Gästen“ der Arbeitsgruppe Koncz möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Bei den „ehemaligen“ Post-Docs Gabino Rios, Frank Breuer, Tatjana Kleinow, Jochen Winter und Luca Eckstein bedanke ich mich vor allem für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit. An Zsuzsa Koncz geht mein Dank besonders für die überlassenen Hefe-Zwei-Hybrid-Daten und die gute Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Neben der Familie Koncz möchte ich mich auch bei meinen ungarischen Kollegen Dori, Iza, Gergö und Misi dafür bedanken, daß ich in „*little Hungary*“ bei Köln arbeiten konnte.

Bei Sabine, Andrea und Ingrid muss ich mich für die alltäglichen Kleinigkeiten im Labor und im Gewächshausalltag bedanken: „Ähm, Sabine hast Du schon..., kannst Du mal eben..., bestell doch bitte auch..., hast du das auch gestern gesehen...?“ Und: „Ach, Ingrid, ich brauch doch noch ein paar Töpfe..., mach mal lieber so 15 bis 30..., ich ernte die bestimmt noch heute ab...“ „Auwei, die schon wieder“, mit wem, wenn nicht mit Roswitha konnte man sich so schön kabbeln? Danke an das ganze

Küchenteam Roswitha, Regine und Hanni. Auch bei Guido Jach möchte ich mich für die ein oder andere Unterhaltung bedanken – nicht jeder hat seinen persönlichen GFP-Beauftragten. Ebenso danke ich Ian, dem besten *coffee-dealer* des Institutes und all denen, die zur guten mittäglichen Unterhaltung in der Kantine beigetragen haben.

Bei Vijaya und Kenneth möchte ich mich für alles bedanken, jetzt sind wir wieder ein Trio. *Thanks Vijaya, for giving me the opportunity to work close to a princess. Thanks Kenneth, for „living together“ – you can't thank somebody for being a friend. (...)*

Bei Herrn Dr. Burkhard Schultz möchte ich mich für die Bereitstellung verschiedener *A. thaliana*-Linien bedanken... – war nur ein Witz! Es stimmt natürlich, aber so einfach kommst Du mir auch nicht weg. Wenn die Kommunikation über den großen Teich auch schwer fällt, Danke und überhaupt und so. Natürlich kann ich mich hier auch bei Renate Schmidt bedanken, trotz vergleichbarer Kommunikationsschwächen war Dein email-Informationsdienst doch unbezahlbar. Ich hoffe, daß Du in dieser Arbeit keine „illegale Kinderbeschäftigung“ findest...

„Na, was Neues zu Hören? Kennst schon...? Und sonst so...? Wo ist denn der Kurze...?“ Danke auch an Anja aus der Nachbarschaft. Ach ja, und natürlich auch Danke an Andreas Eckhoff für die Unterstützung. Wann gehen wir wieder auf Dienstfahrt?

So, jetzt kommen wir endlich zu meinem „alten“ Freund... (oh, ich wollte das nicht wieder tun). Also zum „Verrückten“, ähm „Ver-rückten“ – ich meine so was wie „ver-zogen“ oder besser gesagt „telefon-nah“ – wie auch immer, Dierk, für Dich gilt das Gleiche wie für Ken. Auch wenn Telefon und *email* doch sehr distanziert sind, Du weißt selbst, was Du angerichtet und möglich gemacht hast, Danke.

Um das Seitenlimit meiner Arbeit nicht zu überschreiten, endet die Danksagung hier. Die entscheidenden Menschen wissen ohnehin, was sie zu meiner Arbeit, und noch viel wichtiger, zu meinem Leben neben dem Parallel-Universum „Wissenschaft“ beigetragen haben. Deshalb Danke an meine Familie und Zweitfamilie, meine Eltern und meine Freundin Simone.

# L e b e n s l a u f

Name, Vorname: Lafos, Marcel  
Geburtsdatum: 17.10.1974  
Geburtsort: Frechen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dagmar Lafos, geb. Wagner  
Hans Peter Lafos  
Anschrift: Zum Mühlenfeld 21  
50127 Bergheim

## Schulbildung:

1981 – 1985 Burgschule, Gemeinschaftsgrundschule in Frechen  
1985 – 1991 Arthur-Koepchen-Realschule in Brauweiler  
1991 – 1994 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Pulheim  
31.05.1994 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

## Studium:

10/1994 – 02/2001 Studium der Biologie an der Universität zu Köln im Studiengang Biologie-Diplom, mit den Studienfächern Botanik, Genetik und Biochemie.  
Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Köln.  
Titel: „Funktionelle Analyse des TWISTED DWARF-Proteins aus *Arabidopsis thaliana*“.  
03/2001 bis 05/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Dr. Burkhard Schulz am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Köln.  
06/2001 bis 12/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Dr. Burkhard Schulz am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen – ZMBP, Tübingen.  
01/2002 bis 01/2006 Promotion an der Universität zu Köln.  
Das Thema der Dissertation ist “Komplementationsstudien der *cpd*-Mutante und Analyse der CPD-Interaktionspartner mittels reverser Genetik”. Die experimentellen Arbeiten wurden in der Abteilung von Prof. Dr. George Coupland am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Csaba Koncz durchgeführt.

Bergheim, Oktober 2005

Marcel Lafos

## Erklärung

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

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. George Coupland betreut worden.

### Teilpublikationen:

#### **Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes**

Rios G., Lossow A., Hertel B., Breuer F., Schaefer S., Broich M., Kleinow T., Jasik J., Winter J., Ferrando A., Farras R., Panicot M., Henriques R., Mariaux JB., Oberschall A., Molnar G., Berendzen K., Shukla V., Lafos M., Koncz Z., Redei GP., Schell J. and Koncz C.,

Plant Journal (2002) 32, 243–253

Köln den 26. Oktober 2005

Marcel Lafos