

Interaktionsanalyse von CDKA;1 und anderen Zellzyklusregulatoren aus *Arabidopsis thaliana*

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Stefan René Pusch
aus Karlsruhe

Köln, 2008

Berichterstatter: P.D. Dr. Arp Schnittger
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung 17.11.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	8
Abstract	9
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Der Zellzyklus.....	12
1.1.1 Die Rolle von CDKA;1 im Zellzyklus	14
1.1.2 Aufbau der CDKA;1	16
1.1.3 Regulation von CDKA;1	18
1.1.4 Weitere Kontrollmechanismen des Zellzyklus	19
1.2 Protein-Protein Interaktionen.....	20
1.2.1 Das Split-Ubiquitin System	21
1.2.2 Das „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC) System	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Biologisches Material	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Lösungen.....	28
2.1.4 Medien	31
2.1.5 Methoden	33
3 Ergebnisse	40
3.1 Etablierung des BiFC Systems	40

3.2	Differenzierung zwischen Substratbindung und stabilerer Interaktion im BiFC System	44
3.2.1	Interaktion der CDKA;1 Varianten mit bekannten Substraten.....	44
3.2.2	Interaktion der CDKA;1 Varianten mit Proteinen aus dem CDK/CYCLIN Komplex.....	45
3.3	Auswertung eines Split-Ubiquitin Screens mit CDKA;1	46
3.3.1	Sortierung der im Screen gefundenen cDNAs nach verschiedenen Kriterien	47
3.3.1.1	Vollständigkeit der cDNA	47
3.3.1.2	Lage des Gens im Leseraster des Vektors	47
3.3.1.3	Häufigkeit der cDNA im Screen.....	48
3.3.1.4	Zellzyklusabhängige Expression der Interaktoren.....	48
3.3.1.5	Auffällige Häufung von Proteinen einer bestimmten funktionellen Gruppe (BINGO-Analyse).....	49
3.3.1.6	Anzahl der möglichen Phosphorylierungs-Motiven für CDKA;1 und Bindungs-Motiven für CYCB1;2.....	52
3.3.1.7	Vergleich mit anderen Screens von CDKA;1 bzw. deren Homologe in anderen Organismen	53
3.3.2	Auswahl der cDNAs	54
3.3.2.1	Proteine des Glutathion-Stoffwechsels.....	54
3.3.2.2	Proteine der Metallothionin-Familie.....	54
3.3.2.3	Proteine des Lipid-Stoffwechsels	55
3.3.2.4	Proteine mit F-Box Motiv.....	55
3.3.2.5	Bekannte Substrate von CDKA;1	55
3.3.2.6	Häufig im Screen gefundene Proteine	56
3.3.2.7	Proteine des Pyrovat Metabolismuses	56

3.3.2.8	Membranproteine	56
3.3.2.9	Einzelne Proteine	56
3.3.3	Lokalisierung der Proteine in Tabak (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	58
3.3.4	Auswertung der Interaktionen im BiFC System.....	60
3.3.4.1	Proteine des Glutathion Stoffwechsels	61
3.3.4.2	Proteine der Metallothionin Familie	62
3.3.4.3	Proteine des Lipid Stoffwechsels.....	62
3.3.4.4	Proteine mit F-Box Motiv.....	63
3.3.4.5	Bekannte Substrate von CDKA;1	64
3.3.4.6	Häufig im Screen gefundene Proteine	65
3.3.4.7	Proteine des Pyrovat Metabolismus	66
3.3.4.8	Membranproteine	66
3.3.4.9	Einzelne Proteine	67
3.3.4.10	Zusammenfassung	67
3.3.5	Weiterführende Analysen von gefundenen Interaktoren	68
3.3.5.1	Weiterführende Experimente mit SDP1	68
3.3.5.2	Weiterführende Experimente mit RAN1	71
3.4	Untersuchung einiger für den Zellzyklus relevanter Proteine	74
3.4.1	KRPs (kip related proteins).....	74
3.4.2	CYCB1;2 (Cyclin B 1;2)	78
3.4.3	CKS1 und CKS2 (cyclin dependent kinase subunit)	83
3.4.4	B-Typ CDKs	85
3.4.5	Weitere CDKs.....	87
3.4.6	Weitere CDKA;1 Varianten.....	89
3.4.7	WEE1	90

3.5	Zellzyklus Marker.....	92
3.5.1	Theoretischer Aufbau des Zellzyklus Markers.....	92
3.5.2	Möglichen Kandidaten für den Zellzyklus Marker.....	93
3.5.2.1	G ₁ -Phase.....	93
3.5.2.2	S-Phase.....	93
3.5.2.3	G ₂ -phase.....	94
3.5.2.4	M-Phase	94
3.5.3	Aufbau des Zellzyklus Markers.....	95
3.5.3.1	Erstellte Konstrukte	96
3.5.4	Verhalten der Konstrukte <i>in planta</i>	99
3.5.4.1	Test der Spezifität der Zellzyklus Marker	102
4	Diskussion.....	104
4.1	Vor- und Nachteile von „split-two-hybrid“ Systemen bei der Untersuchung von Zellzyklus-Genen.....	104
4.1.1	Das Split-Ubiquitin System	104
4.1.2	Das BiFC System.....	106
4.1.3	Arbeiten mit Zellzyklusproteinen	107
4.2	CDKA;1 Interaktoren aus Split-Ubiquitin Screen	110
4.2.1	Proteine des Glutathionstoffwechsels.....	110
4.2.2	Proteine der Metallothionin-Familie.....	111
4.2.3	Proteine des Lipid Stoffwechsels.....	113
4.2.4	Proteine mit F-Box Motiv	114
4.2.5	Bekannte Substrate von CDKA;1	115
4.2.6	Häufig im Screen gefundene Proteine	115
4.2.7	Proteine des Pyrovat Metabolismus.....	116

4.2.8	Membranproteine	116
4.2.9	Einzelne Proteine	117
4.3	Interaktionsanalyse der Zellzyklusproteine	121
4.3.1	KRPs	121
4.3.2	CYCB1;2	124
4.3.3	CKS1 und CKS2	125
4.3.4	B-Typ CDKs	126
4.3.5	D-Typ CDKs und CDKF;1	127
4.3.6	CDKA;1 Varianten	128
4.3.7	WEE1	129
4.4	Zellzyklus Marker	130
4.5	Ausblick	130
4.5.1	Technische Möglichkeiten	130
4.5.2	CDKA;1 Interaktionen	130
4.5.3	Zellzyklus Marker	131
	Literaturverzeichnis	132
	Danksagung	138
	Anhang	139
	Erklärung	155
	Lebenslauf	156

Zusammenfassung

Der Zellzyklus ist für alle Lebewesen von zentraler Bedeutung und obliegt einer strengen Regulation. Zum einen muss sichergestellt werden, dass in der S-Phase die DNA exakt repliziert wird. Zum anderen ist es wichtig, dass die replizierten Chromosomen gleichmäßig in der Mitose auf die sich bildenden Tochterzellen verteilt werden. Darüber hinaus wird der Zellzyklus von entwicklungsspezifischen und umweltabhängigen Faktoren kontrolliert, die bestimmen, ob noch mehr Zellen gebildet werden. So wird der Zellzyklus insbesondere am Übergang in die S-Phase und am Eintritt in und Austritt aus der Mitose reguliert. Zentrale Regulatoren sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Diese phosphorylieren eine Vielzahl anderer Proteine, die dadurch aktiviert oder inaktiviert werden und damit ein Voranschreiten im Zellzyklus bedingen. In Pflanzen ist allerdings sehr wenig über die möglichen Substrate von CDKs bekannt.

So war das Hauptziel dieser Arbeit, Interaktionen aus einem Split-Ubiquitin Screen mit CDKA;1 aus *Arabidopsis thaliana* zu verifizieren und weiter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde ein „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC) System genutzt. Für die genaue Untersuchung der CDKA;1 wurden verschiedene CDKA;1 Varianten erstellt, die die unterschiedlichen Phosphorylierungs-Zustände der CDKA;1 imitieren sollten. Wie sich herausstellte, haben diese Varianten unterschiedliche Affinitäten zu *bona fide* Substraten von der CDKA;1 homologen CDC2, CDC28 und Cdk1. Dies ermöglichte es unter Zuhilfenahme des BiFC-Systems, zwischen der Interaktion eines CDKA;1 Substrates und eines Bindungspartners zu unterscheiden. So konnten aus den noch unbekanntenen Interaktionen des Split-Ubiquitin Screens mindestens drei neue mögliche Substrate von CDKA;1 identifiziert werden. Insgesamt wurden 27 Interaktoren aus dem Split-Ubiquitin Screen getestet, wovon 19 Interaktionen *in planta* bestätigt werden konnten.

Darüber hinaus wurden auch Interaktionen von CDKA;1 und anderer CDKs (CDKBs, CDKDs und CDKF;1) mit weiteren Zellzyklus-Regulatoren analysiert, bzw. weitere Interaktionen von anderen Zellzyklus-Regulatoren untersucht.

Viele Interaktionen im Zellzyklus sind Zellzyklusphasen-spezifisch. Deshalb und auch für weitere Untersuchungen des Zellzyklus in Pflanzen wurden im letzten Teil der Arbeit Marker entwickelt, um die vier Phasen des Zellzyklus in lebenden Zellen sichtbar zu machen. Diese Marker basieren auf den vier fluoreszierenden Proteinen CFP, GFP, YFP und RFP. Für jede Zellzyklus-Phase wurde mindestens ein Konstrukt erstellt, das eines dieser fluoreszierenden Proteine enthält. Diese Marker konnten schon in *Arabidopsis thaliana* gebracht werden und stehen nun für eine *in vivo* Analyse bereit.

Abstract

The cell cycle is of fundamental importance for all living organisms and needs to be tightly controlled. On the one hand, the DNA has to be exactly replicated in the S-phase. On the other hand, the replicated chromosomes have to be equally distributed in to the two newly forming daughter cells in mitosis. In addition, the cell cycle is also regulated by developmental and environmental factors that control the number and size of cells. The cell cycle is particularly controlled at the transition into S-phase and at the start and end of mitosis. The main regulators are the cyclin-dependent kinases (CDKs). They phosphorylate a large number of other proteins, which are then activated or inactivated and promote the progression through the cell cycle. In plants, however, there is only very little known about CDK-substrates.

The main aim of this thesis was the verification and further characterization of interactors of CDKA;1 from *Arabidopsis thaliana*. These interactors were previously found in a split-ubiquitin screen and were analysed here using a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system. For further analyses of CDKA;1, several CDKA;1 variants were constructed that mimicked the different states of phosphorylation. These different variants displayed different affinities for *bona fide* substrates of the CDKA;1 homologs CDC2, CDC28 and Cdk1. Exploiting this behaviour, the BiFC system was used to distinguish putative substrates of CDKA;1 from other interacting partners. By this way, at least three new substrates could be identified among the interactors found by the split-ubiquitin screen. A total of 27 interactors from the split-ubiquitin screen were tested, the interaction could be confirmed for 19 of them *in planta*.

Furthermore interactions of CDKA;1 and other CDKs (CDKBs, CDKDs and CDKF;1) with different other cell cycle regulators were analysed. In addition, interactions of other cell cycle regulators were characterized.

Often, interactions during the cell cycle are cell cycle phase specific. For that reason as well as to have a tool for further studies in hand, a marker system for cell cycle phases in living cells was established. This marker is based upon four fluorescent proteins (CFP, GFP, YFP and RFP) and for every cell cycle phase one construct was created that fluoresces in a different colour. These markers are transformed into *Arabidopsis thaliana* plants and are now ready for *in vivo* analysis.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
µM, mM, M	Mikromolar, Millimolar, Molar; 1M entspricht 1mol/l
5-FOA	5-Fluororotsäure
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA, durch reverse Transkription erhaltene DNA
CDKA;1 (DE)	CDKA;1 mit Phosphomimikry an Position 14 und 15
CDKA;1 (T161D)	CDKA;1 mit Phosphomimikry an Position 161
CDKA;1 (T161V)	CDKA;1 die sich an Position 161 nicht phosphorylieren lässt
CDKA;1 (VF)	CDKA;1 die sich an den Positionen 14 und 15 nicht phosphorylieren lässt
CDS	coding sequence; für ein Gen codierender DNA Abschnitt
CFP	cyan fluorescent protein
C-terminal	am Carboxyterminus eines Proteins
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
Cu	Kupfer
Cub	C-terminaler Teil des Ubiquitins
CuSO ₄	Kupfersulfat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNDPs	Desoxyribonucleinsäurediphosphate
dNTPs	Desoxyribonucleinsäuretriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOA	5-Fluororotsäure haltiges SD-Medium
GFP	green fluorescent protein
H	Histidin
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton, Molekulargewichts Einheit für Proteine
LB	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithium Acetat
M	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mol	Stoffmenge, entspricht 6,02214x10 ²³ Molekülen
mRNA	Messenger-RNA
MS	Murashige and Skoog
MW	molekular weight; Molekulargewicht in g/mol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm, µM, mm	Nanometer, Mikrometer, Millimeter
N-terminal	am Aminotermius eines Proteins
N-Terminus	Aminotermius eines Proteins
Nub	N-terminaler Teil des Ubiquitins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm

PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RFP	red fluorescent protein
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
SD	synthetic drop-out media, Selektionsmedium
sec	Sekunden
ssDNA	single stranded DNA; Einzelsträngige DNA
Std.	Stunde
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
U	Uracil
UBP	Ubiquitin Protease
UTR	untranslated region; Region eines Gens, die nicht translatiert wird
W	Tryptophan
w/v	weight per volume; Gewichtprozent
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
YFP	yellow fluorescent protein
YPAD	yeast extract-peptone-dextrose plus adenine medium

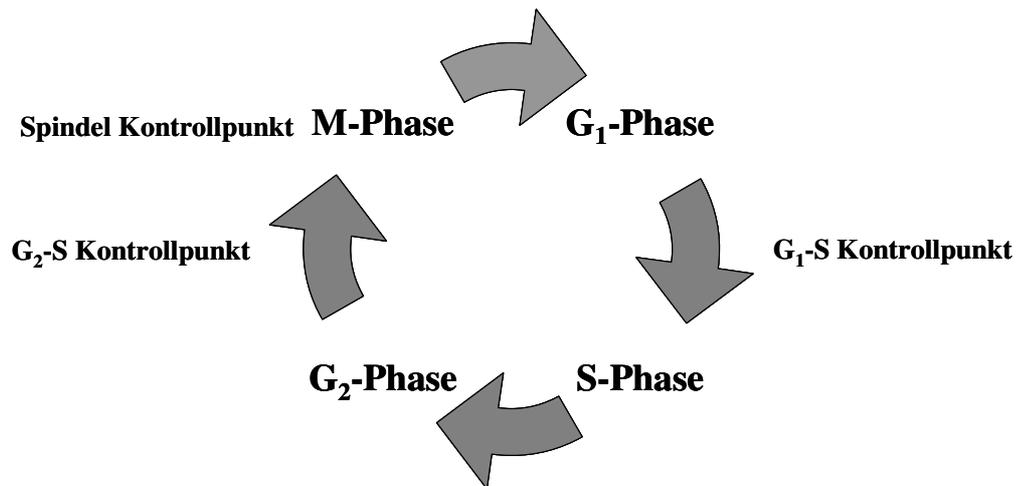
1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist für alle Lebewesen von zentraler Bedeutung. Bei einzelligen Lebewesen dient der Zellzyklus der Vermehrung, bei mehrzelligen Organismen ist der Zellzyklus auch ein wichtiger Prozess des Wachstums. Es gibt gerade bei mehrzelligen Organismen aber nicht nur einen Zellzyklus, sondern eine Vielzahl verschiedener Varianten, z.B. die Meiose, die bei der Gametenbildung wichtig ist, oder auch Zellzyklen, die völlig unabhängig von der Zellteilung sind. Bei diesen Zellzyklen wird nur die DNA repliziert, ohne dass eine Zellteilung durchgeführt wird (Endoreplikation).

Am häufigsten aber ist der Zellteilungszyklus, der sich in vier Phasen gliedern lässt. Die vier Phasen sind die G_1 -Phase (1. Gap-Phase), die S-Phase (Synthese-Phase), in der die Zelle ihre Chromosomen dupliziert, die G_2 -Phase (2. Gap-Phase) und die M-Phase (Mitose-Phase), in der die Chromosomen auf die Tochterzellen aufgeteilt werden. Die G_1 - und G_2 -Phasen stellen Ruhephasen der Zelle in Bezug auf den Zellzyklus dar, in der sie sich auf die weiteren Schritte vorbereitet. Es existiert aber noch eine weitere dieser Ruhephasen, die G_0 -Phase. In diese tritt die Zelle ein, wenn sie keine Zellteilungen mehr durchführen möchte oder kann. Dies ist meist der Fall bei ausdifferenzierten Zellen. Unter bestimmten Umständen ist es einigen Zellen aber auch möglich, von der G_0 -Phase wieder in den regulären Zellzyklus einzusteigen.

a)



b)

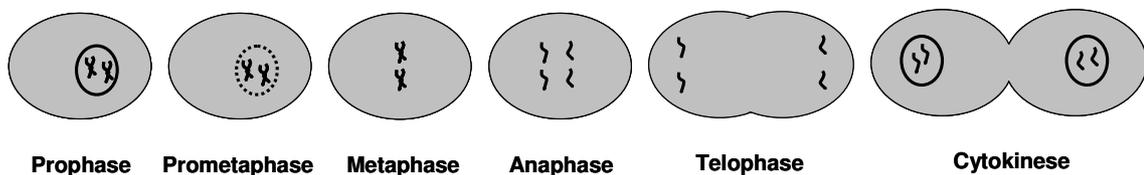


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Zellzyklus: a) Zellzyklus mit den drei Kontrollpunkten, b) einzelne Phasen der M-Phase und anschließende Cytokinese

Eine Zellteilung ist ein essentieller Prozess für jede Zelle, der genau reguliert werden muss. Deshalb gibt es eine Vielzahl von Kontrollpunkten, an der die Zelle überprüft, ob sie die Zellteilung fortführen kann oder nicht. Drei prominente Kontrollpunkte sind erstens kurz vor dem Eintritt in die S-Phase (G₁-S Kontrollpunkt), zweitens unmittelbar vor der M-Phase (G₂-M Kontrollpunkt) und drittens in der M-Phase, wo der Eintritt in die Anaphase reguliert wird (Spindel-Kontrollpunkt). Am G₁-S Kontrollpunkt überprüft die Zelle, ob sie über genügend Ressourcen verfügt, um eine Zellteilung durchführen zu können. Der nächste Kontrollpunkt - der G₂-M Kontrollpunkt - dient dazu zu überprüfen, ob die Chromosomen ordnungsgemäß verdoppelt worden sind. Und am Spindel-Kontrollpunkt wird schließlich noch überprüft, ob sich die Chromosomen richtig angeordnet haben, um gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt zu werden. Sind an einem Kontrollpunkt nicht alle Voraussetzungen erfüllt, so arretiert der Zellzyklus an dieser Stelle und die Zelle versucht alle Voraussetzungen herzustellen. Der Zellzyklus geht erst dann weiter, wenn alle Voraussetzungen erfüllt sind. Falls dieser Zustand nicht erreicht werden kann, kommt es meist zu einem kontrollierten Zelltod.

1.1.1 Die Rolle von CDKA;1 im Zellzyklus

Die wichtigsten Zellzyklusregulatoren sind die Cyclin-abhängigen Kinasen („cyclin dependent kinases“, CDKs). Diese Kinasen phosphorylieren andere Proteine und sorgen damit für eine Veränderung an diesen Proteinen, die dadurch entweder aktiviert oder inaktiviert werden, was wiederum ein Fortschreiten im Zellzyklus bedingt. In *Arabidopsis thaliana* gibt es mindestens 14 CDKs.

Über die CDKA;1 aus *A. thaliana* ist nicht so viel bekannt wie über ihre Homologen aus anderen Organismen. Die Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit unter den CDKs ist aber so hoch, dass die Erkenntnisse der homologen CDKs wahrscheinlich auch für CDKA;1 gelten.

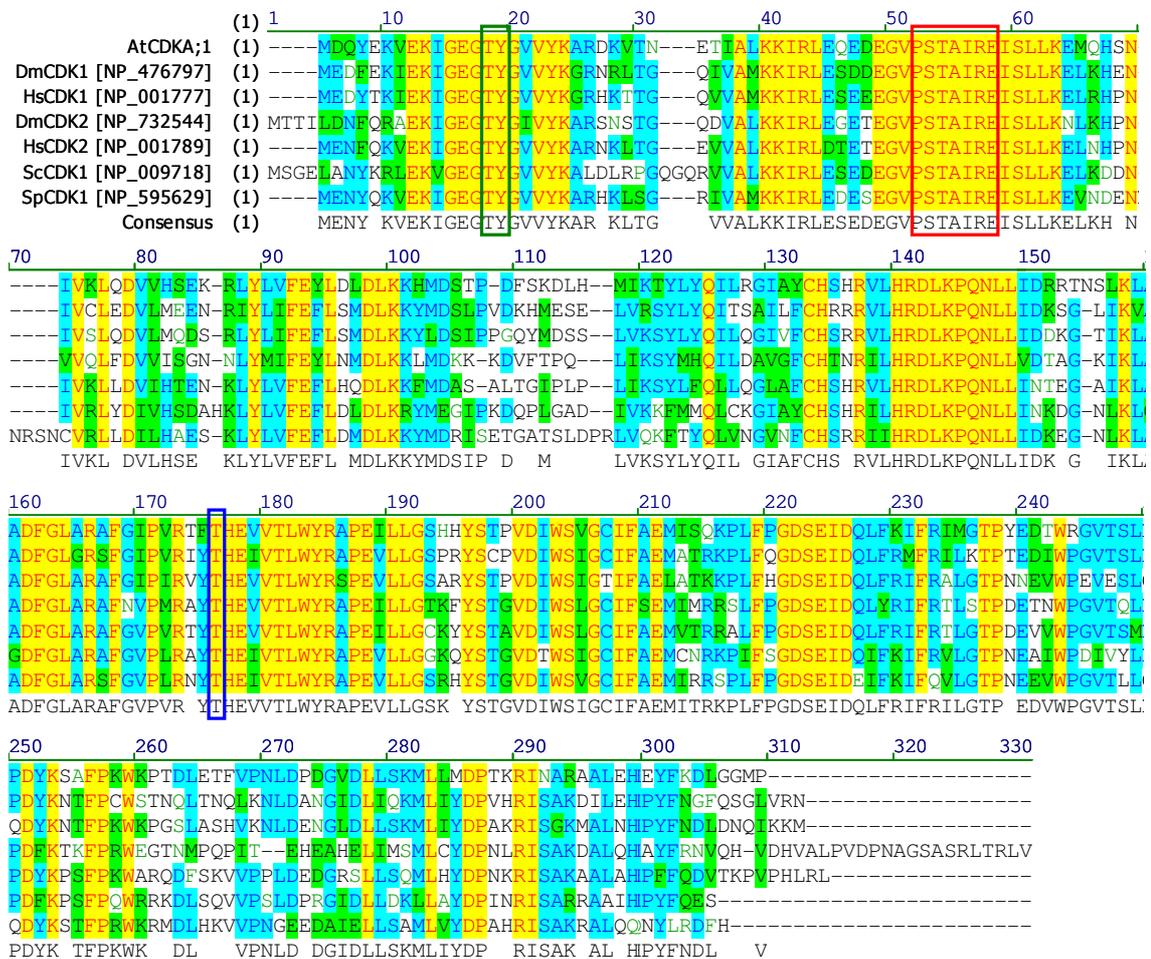


Abbildung 1.2: Aminosäuresequenz-Vergleich der CDKs des Menschen (*Homo sapiens*; HsCDK1 und HsCDK2), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*; DmCDK1 und DmCDK2) und der Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*; ScCDK1 und *Schizosaccharomyces pombe*; SpCDK1) mit CDKA;1 aus *Arabidopsis thaliana*; gut zu erkennen sind die konservierten Aminosäuren Threonin und Tyrosin an denen phosphoryliert wird um CDK zu deaktivieren (grüne Box), die PSTAIRE-Sequenz (rote Box) und das Threonin, das für Aktivierung von CDK phosphoryliert werden muss (blaue Box)

Die CDKs sind in allen drei prominenten Kontrollpunkten des Zellzyklus involviert. Am G₁-S Kontrollpunkt ist bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), dem glatten Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und dem Menschen (*Homo sapiens*) ein CDK-CYCE

Komplex aktiv (Morgan 2007). In *A.thaliana* übernimmt dies ein CDKA;1-CYCD Komplex (Oakenfull AE 2002). Ein CDK-CYCA und CDK-CYCB Komplex ist bei bei *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. sapiens* am G₂-M Kontrollpunkt aktiv (Morgan 2007). Der Spindel-Kontrollpunkt wird indirekt durch den CDK-CYCB Komplex kontrolliert, indem er den „anaphase-promoting complex / cyclosome“ (APC/C) aktiviert (Morgan 2007). Dieser wiederum sorgt für den Abbau der Proteine, die die Schwesterchromatiden zusammenhalten. Die Trennung der Schwesterchromatiden kann damit erfolgen und die M-Phase voranschreiten. Zudem sorgt der APC/C auch dafür, dass die mitotischen Cycline abgebaut werden und so die CDK Aktivität sinkt (Morgan 2007).

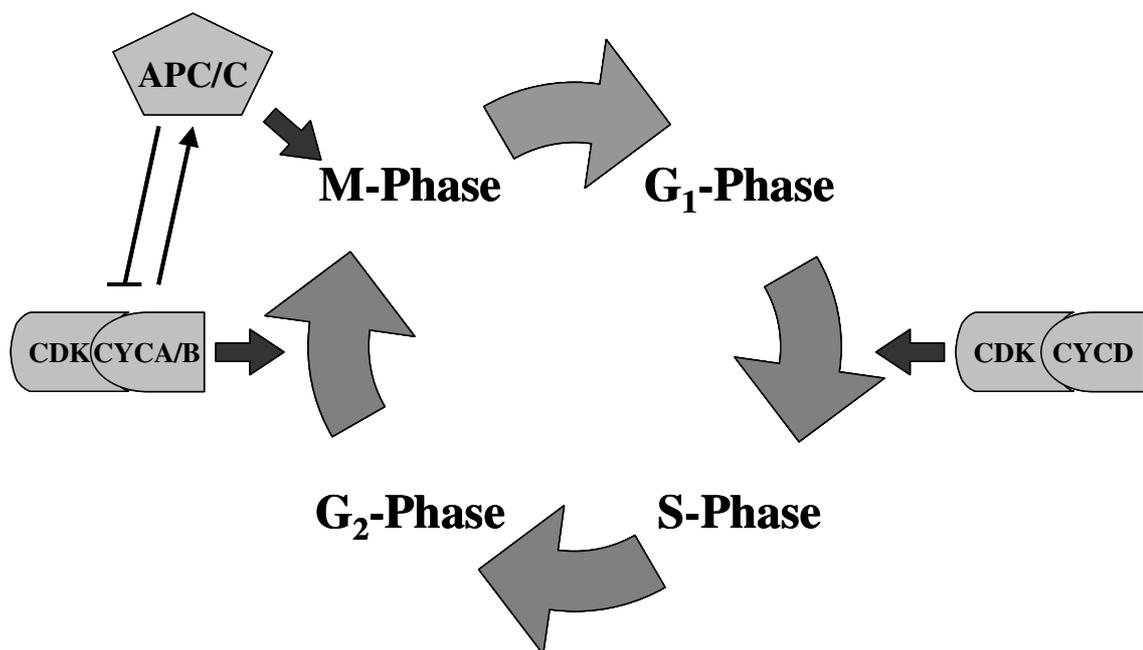


Abbildung 1.3: CDK-Cyclin Komplexe im Zellzyklus von *A. thaliana*

1.1.2 Aufbau der CDKA;1

Um zu verstehen, wie CDKs funktionieren, muss man wissen, wie ihre Struktur aufgebaut ist. Die Struktur wurde im Detail für die menschliche Cdk2 durch röntgenkristallographische Untersuchung aufgeklärt. Ein Hauptmerkmal der CDKs ist die erste α -Helix ($\alpha 1$), die die PSTAIRE Sequenz beinhaltet, deshalb auch PSTAIRE Helix genannt (Morgan 2007). In *A. thaliana* ist CDKA;1 die einzige CDK, die die PSTAIRE Signatur besitzt (Sequenzvergleich aller 14 bekannten CDKs aus *A. thaliana*). Alle anderen CDKs aus *A. thaliana* haben in dieser α -Helix eine leicht veränderte Sequenz, zum Beispiel besitzen die B1-Typ CDKs die Signatur PPTALRE. Die PSTAIRE Helix ist deshalb so wichtig, da sie den katalytisch aktiven Abschnitt der CDK abdeckt. Bindet nun ein Cyclin, so interagiert die PSTAIRE Helix mit dem Cyclin und verändert seine Position. Dies öffnet den katalytisch aktiven Abschnitt der CDKs und sorgt für die richtige Positionierung des ATPs (Morgan 2007).

Eine weitere wichtige Domäne der CDKs ist der „T-loop“ und die kurze α -Helix (L12) direkt davor. Die α -Helix (L12) trägt zu den notwendigen Konformationsänderungen der CDK bei, indem sie ihre Struktur zu einem β -Faltblatt ändert, wenn die CDK an das Cyclin bindet. Der „T-loop“ besitzt keine sekundären Strukturmerkmale und liegt im inaktiven Zustand der CDK vor dem katalytisch aktiven Abschnitt der CDK. Die durch die Bindung des Cyclin-Partners hervorgerufenen Konformationsänderungen sorgen dafür, dass dieser „T-loop“ den katalytisch aktiven Abschnitt der CDK freigibt (Morgan 2007). Damit der CDK-Cyclin Komplex voll funktionstüchtig wird, muss aber noch ein Threonin (T160, oder eine analoge Aminosäure, z.B. in CDKA;1 T161) in dem „T-loop“ phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung verändert der „T-loop“ abermals seine Position und sorgt für eine noch stärkere Bindung zu dem Cyclin-Partner. Diese Phosphorylierung sorgt zudem noch für eine bessere Substraterkennung und Substratbindung (Morgan 2007).

Die CDKs sind dazu in der Lage ein bestimmtes Phosphorylierungsmotiv zu erkennen. Dieses lautet S/T-P-X-R/K, wobei Serin (S) und Threonin (T) austauschbar sind, das X für irgendeine Aminosäure steht und Arginin (R) und Lysin (K) wiederum austauschbar sind. Die negative Ladung der Phosphatgruppe am Threonin (T160) im „T-loop“ interagiert mit der positiven Ladung der Aminosäuren Arginin oder Lysin im Substrat und stabilisiert somit die Bindung des Substrats (Morgan 2007).

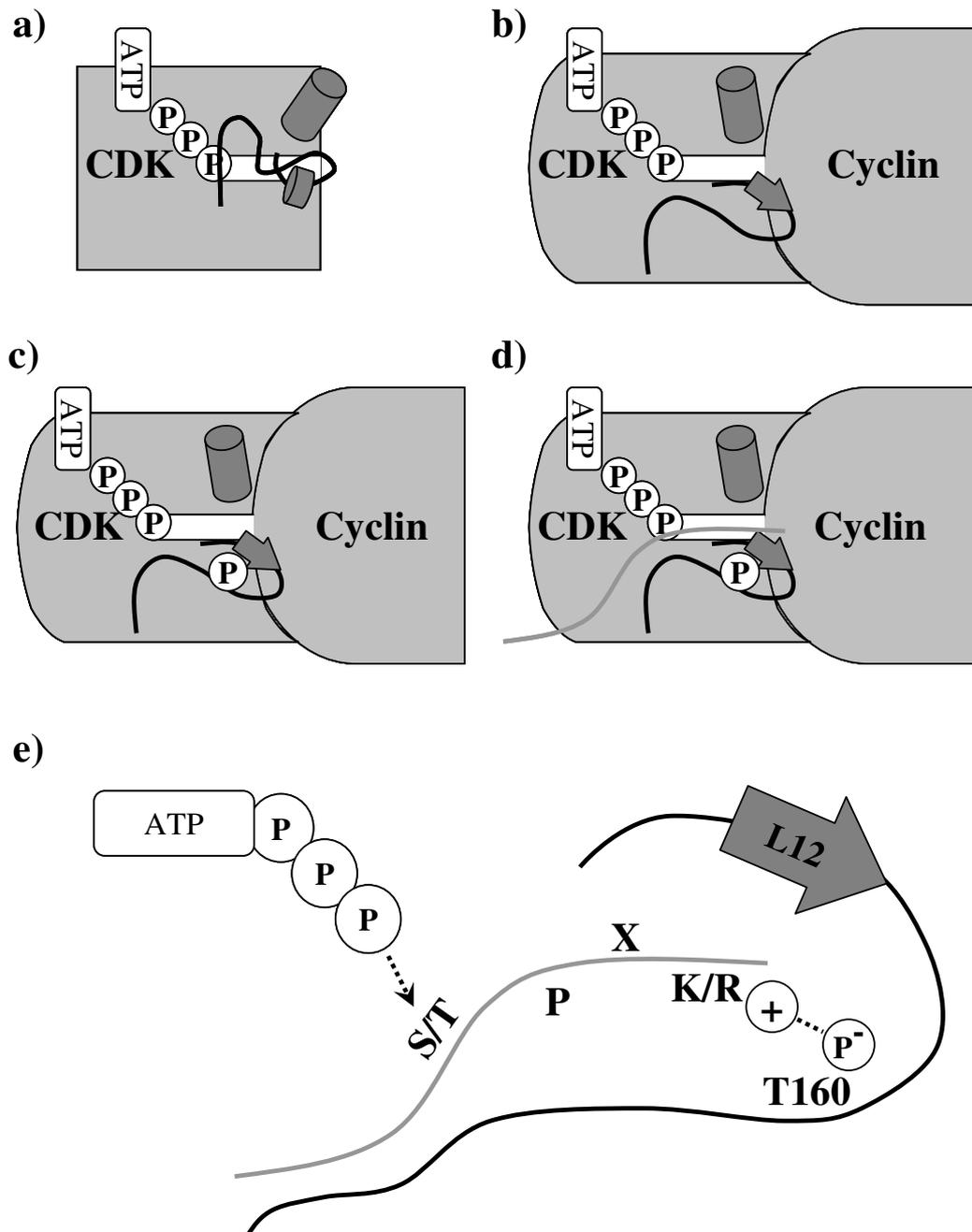


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des CDK-Cyclin Komplexes: a) inaktive CDK ohne Cyclin-Partner; b) CDK mit gebundenem Cyclin-Partner, PSTAIRE Helix (oberer dunkelgrauer Zylinder) hat die Position verändert und die α -Helix L12 hat die β -Faltblattstruktur angenommen (kleiner dunkelgrauer Zylinder ist zu dunkelgrauem Pfeil geworden); c) aktiver CDK-Cyclin Komplex mit phosphoryliertem T160 im „T-loop“; d) aktiver CDK-Cyclin Komplex mit gebundenem Substrat (hellgraue Linie); e) schematische Darstellung des Phosphorylierungsmotives eines Substrates und dessen Wechselwirkung mit dem phosphorylierten T160 und dem ATP

1.1.3 Regulation von CDKA;1

Die CDKs phosphorylieren andere Proteine und ändern damit deren Aktivität und/oder ihre Stabilität und/oder ihre Lokalisierung. Welche Proteine phosphoryliert werden, wird durch mehrere Faktoren bestimmt. Eine Möglichkeit ist ein Phosphorylierungsmotiv, das von den CDKs erkannt wird. Das Motiv S/T-P-X-R/K ist nur das optimale Phosphorylierungsmotiv, denn die CDKs können auch ein kleineres Motiv (S/T-P) erkennen und phosphorylieren (Rudner AD 2000). Es gibt allerdings auch Hinweise, dass Proteine phosphoryliert werden können, die noch nicht einmal die kurze Konsensussequenz haben (Ubersax JA 2003)(RPL36aB in der vorliegenden Arbeit). Eine weitere Möglichkeit, die Substrate der CDKs zu verändern, ist über die Bindung des Cyclin-Partners gegeben. Der Cyclin-Partner besitzt ein Bindungs-Motiv für andere Proteine. Durch seine Struktur und dieses Bindungs-Motiv kann der Cyclin-Partner Einfluss nehmen, welche Proteine phosphoryliert werden. Dieses Motiv lautet R-X-L, X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure (Morgan 2007). Durch eine andere Protein-Protein Interaktion der CDKs zum Beispiel mit „cyclin-dependent kinase subunit 1“ (CKS1) kann die Affinität zu schon phosphorylierten Substraten erhöht werden (Morgan 2007).

Da es aber nicht nur wichtig ist, welche Proteine die CDKs phosphorylieren, sondern auch, wann dies genau passiert, werden die CDKs selbst streng reguliert. Dies könnte durch die Kontrolle der Expression der CDKs reguliert werden. In *A. thaliana* ist dies für CDKA;1 nicht der Fall, sie wird während des Zellzyklus konstitutiv exprimiert (Menges M 2005). Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der CDKs zu regulieren, ist das Angebot der Cyclin-Partner zu regulieren. Einige Cycline können aufgrund ihrer Zellzyklus-spezifischen Expression unterschieden werden. Die meisten D-Typ Cyline sind spezifisch in der G₁- und S-Phase exprimiert. Die meisten A- und B-Typ Cyline sind in der G₂- und M-Phase exprimiert (Menges M 2005). Es ist aber auch möglich, den CDK-Cyclin Komplex zu inhibieren. Dies übernimmt eine Gruppe von Proteinen, die als „CDK inhibitor proteins“ (CKIs) bekannt ist. Sie besteht aus diversen unterschiedlichen Familien von Proteinen, die eine Vielzahl von Namen haben, so z.B. die drei Familien der menschlichen CKIs Cip, Kip und INK4 (Morgan 2007). In *A. thaliana* sind sie bekannt unter dem Namen „kip related proteins“ (KRPs) bzw. „inhibitors/interactors of cyclin-dependent-kinase“ (ICKs) (De Veylder L 2001). Auch die CDKs selbst werden modifiziert, um ihre Aktivität zu kontrollieren. Es gibt im „T-loop“ ein Threonin (T160), das - wenn es phosphoryliert wurde - für eine deutlich höhere Aktivität des CDK-Cyclin Komplexes sorgt. Diese Phosphorylierung wird durch eine „CDK-activating kinase“ (CAK), die meist auch eine CDK ist, durchgeführt (Morgan 2007). Das Threonin des „T-loop“ befindet sich in CDKA;1 an Position 161 (T161). An den Aminosäuren 14 Threonin (T14) und 15 Tyrosin (Y15) werden die CDKs in Hefe (*S.pombe*), Fruchtfliege (*D. melanogaster*) und Wirbeltieren phosphoryliert, um sie zu deaktivieren. Diese Phosphorylierungen werden in einigen Organismen (*S. pombe*, *D. melanogaster* und Wirbeltieren) durch zwei Kinasen vorgenommen, WEE1 und MYT1, wobei erstere nur die Position 15 phosphoryliert.

MYT1 hingegen phosphoryliert an beiden Positionen (Morgan 2007). Andere Organismen wie die Hefe (*S. cerevisiae*) besitzen nur Homologe von WEE1 (Morgan 2007), dazu gehört auch *A. thaliana*. Um diese Phosphorylierungen wieder zu entfernen und die CDKs zu aktivieren, gibt es CDC25, eine „dual-specificity“ Phosphatase. Ob es für dieses Protein ein Homolog in *A. thaliana* gibt, ist bisher noch nicht geklärt. Es existiert ein Protein, das gewisse Sequenzähnlichkeiten aufweist (Landrieu I 2004). Dieses hat auch die Aktivität einer „dual-specificity“ Phosphatase und kann die CDK-Aktivität *in vitro* beeinflussen (Landrieu I 2004). Ein Nachweis *in vivo* steht noch aus. Es wird aber auch spekuliert, ob die Funktion der CDC25 in *A. thaliana* überhaupt notwendig ist oder ob dies durch einen anderen Mechanismus übernommen wurde (Boudolf V 2006).

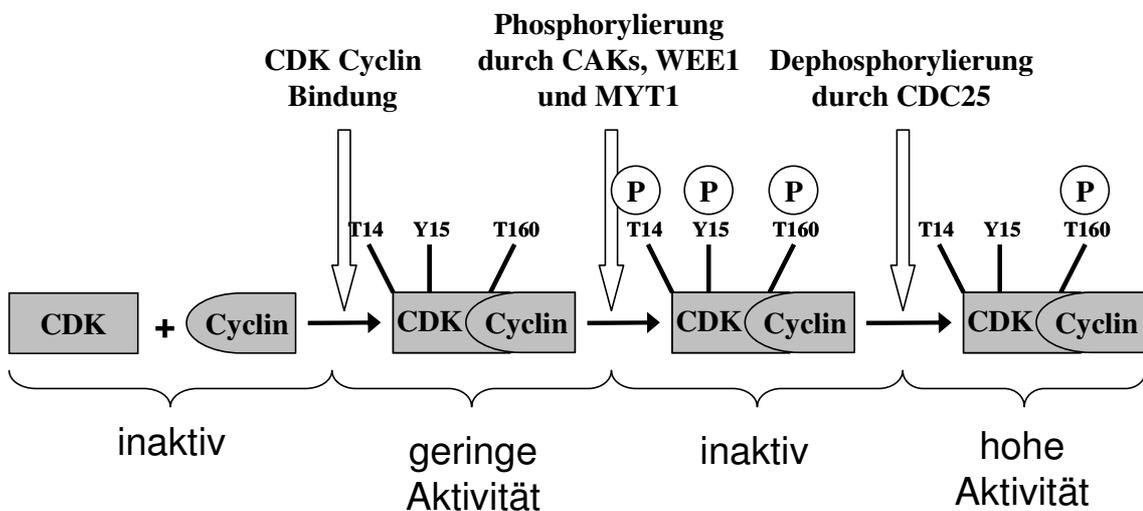


Abbildung 1.5: schematische Darstellung der Aktivierung des CDK-Cyclin Komplexes

1.1.4 Weitere Kontrollmechanismen des Zellzyklus

Die Aktivität des CDK-Cyclin Komplexes ist wohl der wichtigste Kontrollmechanismus des Zellzyklus. Doch könnte dieser nicht richtig funktionieren, wenn der Proteinabbau nicht wäre, denn einige der von dem CDK-Cyclin Komplex phosphorylierten Proteine werden durch diese Phosphorylierung für den Proteinabbau markiert. Aber auch die CDKs selbst werden durch den Proteinabbau reguliert. Dieser reguliert nämlich das Angebot der Cyclin-Partner für die CDKs und die CKIs (Morgan 2007). Das Signal, welches Proteine dem Proteinabbau im Proteasom zuführt, ist das Anbringen von mehreren kleinen Proteinen, den Ubiquitinen, an das abzubauenende Protein. Dieser Prozess, auch Ubiquitinierung genannt, wird von Multiprotein-Komplexen, den Ubiquitin-Protein Ligasen (E3 Enzymen), durchgeführt. Die für den Zellzyklus wichtigsten Ubiquitin-Protein Ligasen sind der SCF-Komplex und der „anaphase-promoting complex or cyclosome“ (APC/C) (Morgan 2007).

Der SCF-Komplex besteht aus drei Proteinen, diese sind im menschlichen Organismus Skp1, Cull1 und Rbx1 (Morgan 2007). Dieser Proteinkomplex ist während des Zellzyklus stets aktiv, weshalb die Spezifität des SCF-Komplexes reguliert werden

muss. Dies wird durch die F-Box Proteine erreicht. Sie erkennen Proteine, die für den Proteinabbau bestimmt sind. Diese sind meist durch CDKs phosphorylierte Proteine, so z.B. das CKI aus *S. pombe* (Sic1) oder auch das für die Initiierung der Replication wichtige CDC6 in *S. cerevisiae* (Morgan 2007). Durch eine Interaktion dieser F-Box Proteine mit Skp1 wird dann die Ubiquitinierung, des von dem F-Box Protein gebundenen Proteins, eingeleitet.

Der APC/C ist deutlich größer als SCF-Komplex und besteht aus 11-13 Proteinen. Seine Aktivität wird ebenfalls von Proteinen reguliert, die an ihn binden. Die für den Zellzyklus wichtigsten sind in Säugetieren CDC20 und Cdh1 (Morgan 2007). Der APC/C mit CDC20 als Interaktionspartner sorgt unter anderem für den Abbau von Cyclinen gegen Ende der M-Phase und somit für die Inaktivierung der CDKs (Morgan 2007). Für die Erkennung ihrer Substrate sind zwei Aminosäuresequenz-Motive von Bedeutung, das „destruction box“ Motiv und die KEN-Box. Diese Motive alleine reichen aber in der Regel nicht aus, um die Proteine zu ubiquitinieren (Morgan 2007).

1.2 Protein-Protein Interaktionen

Ob zwei Proteine einen funktionellen Zusammenhang besitzen, kann man mit verschiedenen Experimenten klären. Auf genetischer Ebene kann man Mutanten dieser Gene kombinieren und deren Phänotyp analysieren. Diese Versuche können Aufschluss geben, ob die Proteine sich in einem Stoffwechselweg oder einem Signalpfad befinden. Auch über die Lage zueinander in einem dieser Regulationswege können diese Experimente Auskunft geben. Doch dieser Ansatz verrät nicht, wie die Proteine miteinander interagieren oder ob sie eventuell sogar in einem Komplex vorliegen. Um dies zu klären, gibt es einige andere Möglichkeiten, z. B. die röntgenkristallographische Untersuchung der Proteine (Ramachandran GN 1965). Dazu müssen die Proteine aufgereinigt und kristallisiert werden. Diese Analysemethode ist sehr arbeits-, zeit- und kostenaufwendig, doch kann sie eine Auflösung bis auf atomare Ebene liefern. Eine relativ schnelle Methode, um zu testen, ob Proteine miteinander interagieren, sind so genannte „two-hybrid“ Systeme. Mit diesen Systemen ist es möglich, Protein-Protein Interaktionen *in vivo* in den unterschiedlichsten Organismen nachzuweisen. Das bekannteste „two-hybrid“ System ist das „yeast two-hybrid“ System (Fields S 1989). Dieses erlaubt das Durchmustern von cDNA-Banken und die Genom/Proteom- weite Identifizierung von Interaktoren mit einem gegebenen Zielprotein.

Dieses System besteht aus zwei Teilen eines Transkriptionsfaktors, dem DNA bindenden Teil und dem transkriptionsaktivierenden Teil. Diese Teile werden jeweils an eines der zu testenden Proteine fusioniert. Interagieren die Proteine nun miteinander, sorgt der so komplimentierte Transkriptionsfaktor für die Transkription eines Reporters (Causier B 2002). Durch den Reporter kann dann selektiert werden, zum Beispiel durch eine Farbreaktion (GUS) oder durch die Selektion auf eine Aminosäureinsuffizienz des verwendeten Hefestammes (Causier B 2002).

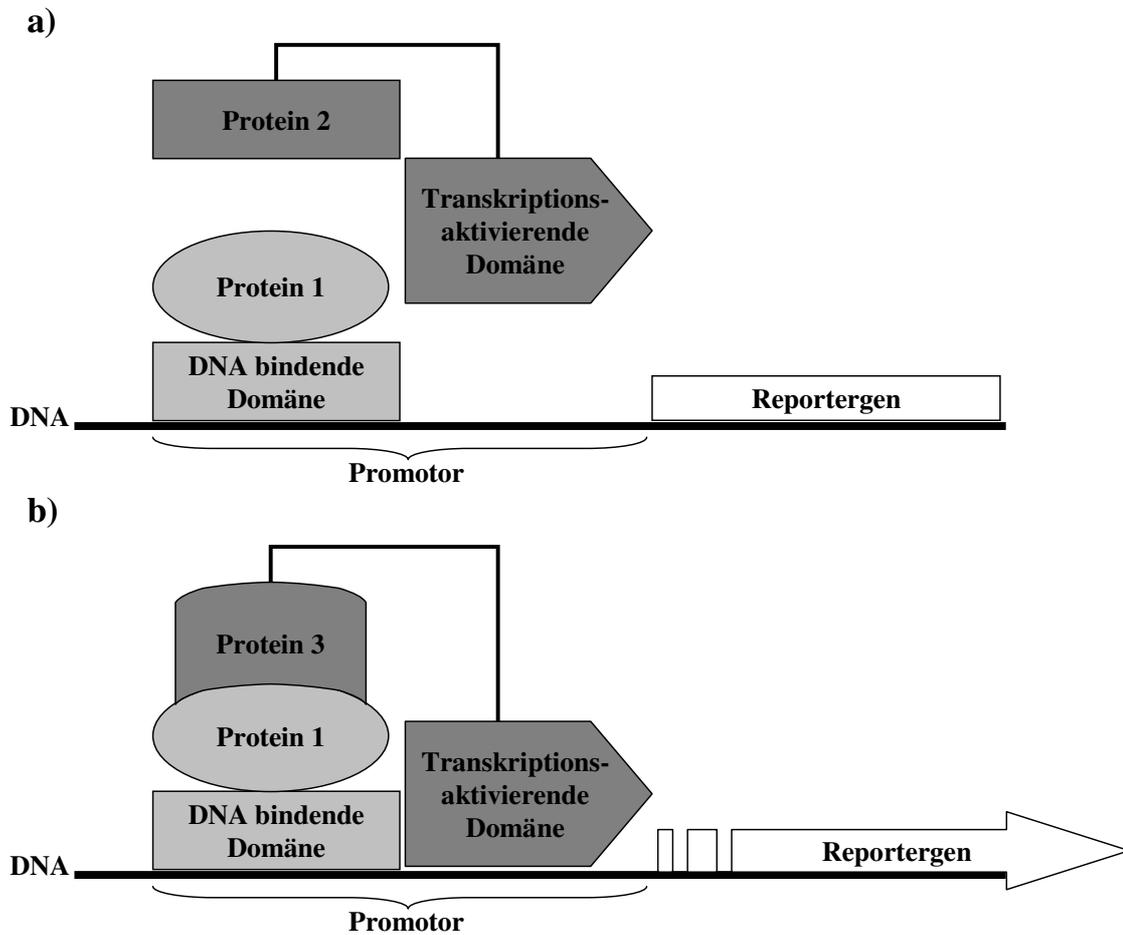


Abbildung 1.6: schematische Darstellung des „yeast two-hybrid“ Systems: a) Protein 1 interagiert nicht mit Protein 2, das Reporter gen wird nicht exprimiert, b) Protein 1 interagiert mit Protein 3, das Reporter gen wird exprimiert

1.2.1 Das Split-Ubiquitin System

Eine andere Variante des „yeast two-hybrid“ Systems ist das Split-Ubiquitin System (Johnsson N 1994). Mit diesem System ist es möglich, Interaktionen von Membranproteinen nachzuweisen (Wittke S 1999). Der Nachweis solcher Interaktionen war mit dem klassischen „yeast two-hybrid“ System nur bedingt möglich, da die Interaktionen hierfür im Kern stattfinden müssen. In dem Split-Ubiquitin System ist dies nicht der Fall. Die Interaktionen müssen sich nur dort abspielen, wo auch die Ubiquitinprotease (UBP) der Hefe vorliegt, denn auf der Funktion dieses Proteins baut das System auf. In dem Split-Ubiquitin System wird an jedes zu testende Protein eine Hälfte eines Ubiquitins (C-terminale Hälfte, Cub; N-terminale Hälfte, Nub) fusioniert. An einer der C-terminalen Hälfte (Cub) des Ubiquitins befindet sich noch ein Reporter, der mit einem starken Abbausignal versehen ist. Interagieren die beiden Proteine miteinander, so kommen die Hälften des Ubiquitins in räumliche Nähe und das Ubiquitin kann sich wieder zusammensetzen. Nur dieses vollständige Ubiquitin wird

von der UBP erkannt und der Reporter abgespalten (Johnsson N 1994). Das Abbausignal am Reporter sorgt dann dafür, dass der Reporter degradiert wird. Bei Hefekolonien mit interagierenden Proteinen wird also auf das Fehlen des Reporters selektiert und nicht auf das Vorhandensein, wie bei dem klassischen „yeast two-hybrid“ System.

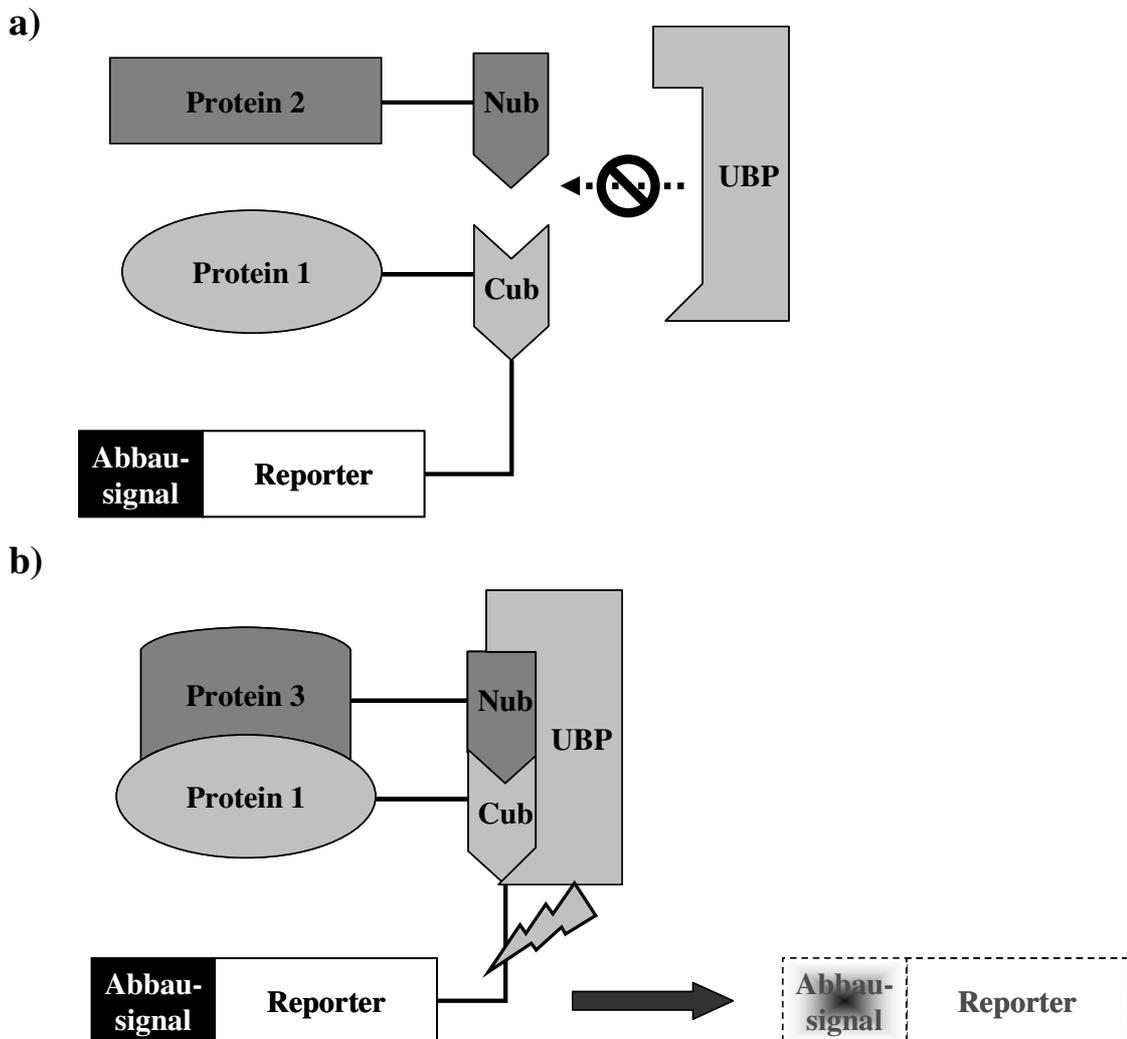


Abbildung 1.7: schematische Darstellung des Split-Ubiquitin Systems: a) Protein 1 interagiert nicht mit Protein 2, somit kann die UBP das Ubiquitin nicht erkennen und den Reporter nicht abtrennen, b) Protein 1 interagiert mit Protein 3, die UBP kann das Ubiquitin erkennen und den Reporter abschneiden, was zur Degradation des Reporters führt

1.2.2 Das „Bimolecular Fluorescence Complementation“ (BiFC) System

Das BiFC System ist ebenfalls ein „two-hybrid“ System. In diesem System werden die Hälften eines fluoreszierenden Proteins an die zu testenden Proteine fusioniert. Interagieren die Proteine miteinander, so kommen die beiden Hälften in räumliche Nähe und können wieder ein vollständiges und funktionelles Protein rekonstituieren. In diesem System dient die wiederhergestellte Fluoreszenz als Reporter (Hu C-D 2002).

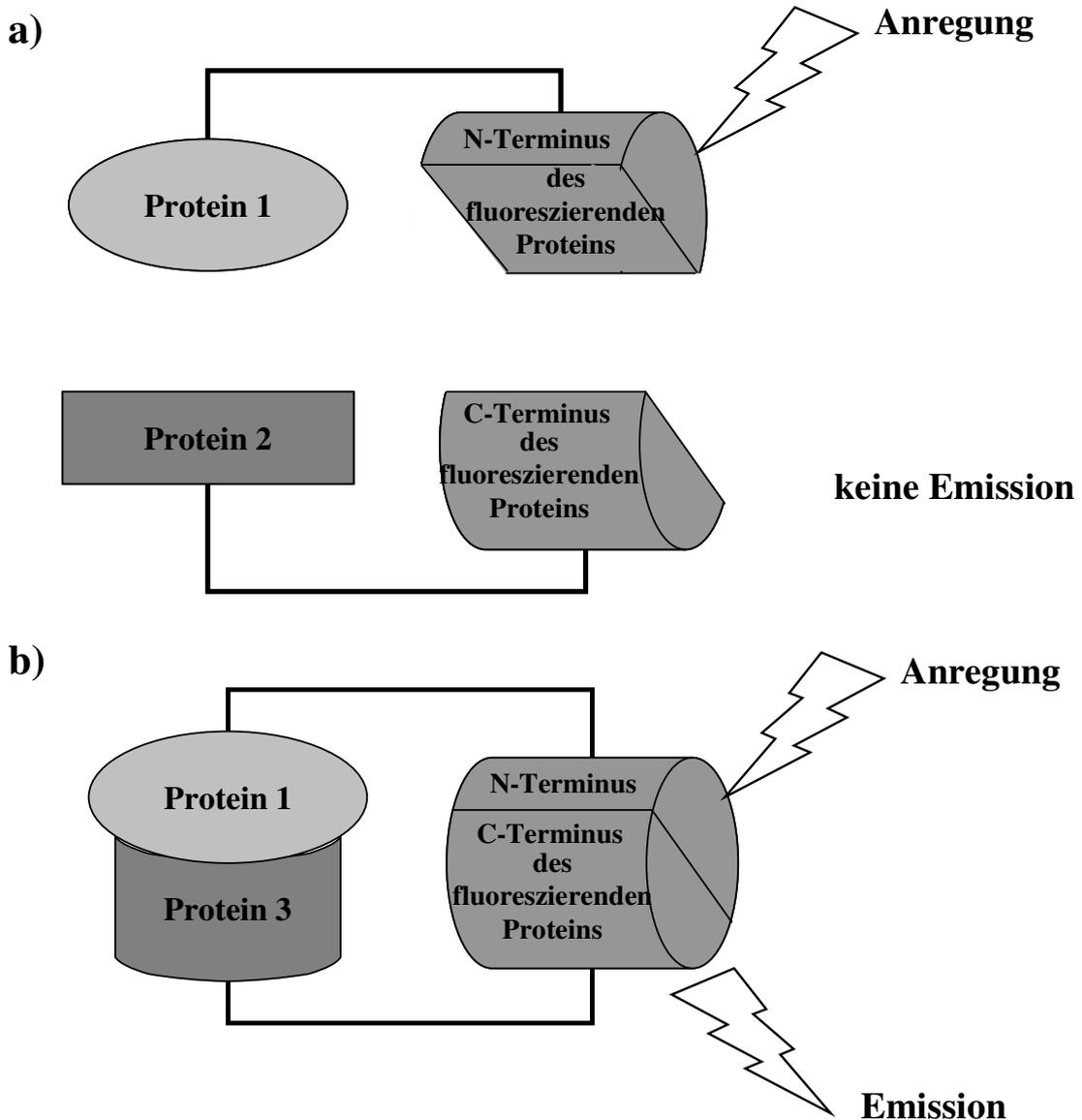


Abbildung 1.8: schematische Darstellung des BiFC-Systems: a) Protein 1 interagiert nicht mit Protein 2, die Anregung führt zu keiner Emission; b) Protein 1 interagiert mit Protein 3, die Hälften des fluoreszierenden Proteins werden wieder vereint und können angeregt werden um Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren

Es gibt mehrere Vorteile dieses Systems. So kann es in fast allen Organismen durchgeführt werden, so z.B. im Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) (Shyu YJ 2008), in der Hefe (*S. cerevisiae*) (Cole KC 2007), in Pflanzen wie Tabak (Yano A 2006) und *A. thaliana* (Bracha-Drori K 2004). In all diesen Organismen ist auch die Durchführung der Experimente im lebenden Organismus möglich. Durch die optische Detektion der Interaktionssignale kann auch der Ort der Interaktion festgestellt werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die Funktionen der wichtigsten Zellzyklus-Regulatoren in Pflanzen anhand des Modellsystems *A. thaliana* zu bekommen. Ein besonderes Augenmerk war dabei auf CDKA;1 gerichtet, als zentraler Regulator des Zellzyklus. Zu diesem Zweck sollten drei Themen bearbeitet werden. Im ersten Teil sollte ein System zur Überprüfung von Interaktionen von Proteinen aus *A. thaliana* etabliert werden. Als zweites sollten mit diesem System einige gefundene Interaktionen mit CDKA;1 weiter untersucht werden. Und als drittes sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die vier Phasen des Zellzyklus in der lebenden Pflanzenzelle zu unterscheiden.

Zur Erfüllung des ersten Teils dieser Arbeit, wurde entschieden, ein BiFC System für Pflanzen zu etablieren. Das BiFC System wurde zwar schon in Pflanzen getestet (Bracha-Drori K 2004), doch funktionieren diese nicht optimal. Es sollte nun ein BiFC System erstellt werden, das gut in Pflanzen funktioniert und eventuell sogar für stabile Transformationen in Pflanzen genutzt werden kann. Das BiFC System sollte anschließend dazu verwendet werden, einige aus anderen Interaktionssystemen bekannte Interaktionen von Proteinen aus *A. thaliana* zu verifizieren, bekannte Interaktionen aus anderen Organismen mit den homologen Proteinen aus *A. thaliana* zu überprüfen und Interaktionsanalysen von Proteinen des Zellzyklus durchzuführen.

Mit dem im ersten Teil dieser Arbeit erstellten BiFC System sollten im zweiten Teil dieser Arbeit einige in einem Split-Ubiquitin Screen gefundene Interaktoren von CDKA;1 weiter untersucht werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit bestand darin, einen Zellzyklus-Marker zu schaffen, der in lebenden Zellen funktioniert. Dieser sollte die Möglichkeit eröffnen, stets die Phase des Zellzyklus erkennen zu können, in der sich die Zelle gerade befindet. Mit diesem Marker sollte es möglich sein, den Verlauf des Zellzyklus in einer normalen Zelle mit dem einer Zelle, in der ein Zellzyklus-Gen mutiert worden ist, zu vergleichen. Bei vielen Mutanten von Zellzyklus-Genen ist nämlich kein direkter Effekt zu sehen. Es könnte aber sein, dass das Ausschalten eines Gens zur Verzögerung in einer Phase des Zellzyklus führt, die aber durch eine Beschleunigung in den anderen Phasen wieder kompensiert wird. Solche Effekte sollten mit dem Zellzyklus-Marker messbar sein. Eine weitere Anwendung wäre die Kombination mit dem BiFC System. Diese Kombination sollte es möglich machen, Veränderungen von Interaktionen im Verlauf des Zellzyklus darzustellen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Bakterienstämme

Als ccdB-resistentes Bakterium wurde der *Escherichia coli* Stamm DB3.1 benutzt, für alle anderen Arbeiten mit *E. coli* wurde der Stamm DH5 α von Invitrogen verwendet.

Für die Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde der Stamm GV3101 pMP90RK verwendet. Der andere *A. tumefaciens* Stamm, der zum Einsatz kam, ist 19K. Dieser Stamm trägt ein Plasmid mit dem viralen Gen p19.

Alle erstellten Konstrukte in *E. coli* und *A. tumefaciens* sind im Anhang in Tabelle B zu finden.

Hefestamm

Für alle Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Stamm JD53 verwendet. Dieser Stamm weist folgende Eigenschaften auf: MATa *his3- Δ 200 leu2-3112 lys2-801 trp1- Δ 63 ura3-52*.

Pflanzen

Für die meisten Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* wurde der Ökotyp Col-0 verwendet. In einigen Fällen wurde die Linie sdp1-3 (Eastmond 2006) verwendet. Auch diese Linie befindet sich in dem Ökotyp Col-0. Alle erstellten Pflanzenlinien sind im Anhang in Tabelle C zu finden.

Für die Arbeiten mit Tabak wurden 6 Wochen alte Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* verwendet.

Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

- pDONR201 von Invitrogen; Kanamycin-Resistenz
- pMet von Laurent Deslandes (MPIZ-Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, Methionin-Promotor und *HIS3*-Gen für Hefe-Selektion

- NuI von Laurent Deslandes (MPIZ-Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, Kupfer-Promotor und *TRP1*-Gen für Hefe-Selektion
- NuA entspricht dem NuI Vektor, mit einem Aminosäureaustausch (I13A) im Ubiquitin
- CKZ von Laurent Deslandes (MPIZ-Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, Kupfer-Promotor und *TRP1*-Gen für Hefe-Selektion
- CKZ-A entspricht dem CKZ Vektor, mit einem Aminosäureaustausch (I13A) im Ubiquitin
- pAM-PAT von Marc Jakoby (MPIZ-Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, 35S Promotor und BASTA Resistenz für die Selektion in Pflanzen
- pEXSG-YFP und pENSG-YFP von Marcel Wiermer (MPIZ-Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, 35S Promotor, dient dazu, C- bzw. N-terminale YFP Fusionen zu erstellen
- pBA_{TL}-RFP von Bastian Welter (Uni Köln); GatewayTM-Kassette, Ampecilin-Resistenz, 35S Promotor, dient dazu, eine C-terminale RFP Fusionen zu erstellen
- pGEM-T® von Promega; Ampecilin-Resistenz, Blau-Weiß Selektion, dient zum Klonieren der Promotoren

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Gefäße

Bei allen Reaktionsgefäßen, die verwendet wurden, handelte es sich um die handelsüblichen Ausführungen.

Chemikalien

Für die Arbeiten mit *E. coli*, *A. tumefaciens*, *A. thaliana* und *N. benthamiana* wurden die standardmäßigen Laborchemikalien verwendet. Die Chemikalien waren alle von pro analyse Qualitätsstandard und wurden über Roth, Merck oder Sigma bezogen.

Da *S. cerevisiae* empfindlich auf Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums und besonders der Transformationslösungen reagierte, wurden hier alle für *S. cerevisiae* verwendeten Chemikalien einzeln aufgelistet.

Tabelle 2.1: Chemikalien für *S. cerevisiae* Lösungen und Medien

Chemikalie	Reinheit	Firma
Adenine (6-Aminopurine)	min. 99%	Sigma
Adenine (6-Aminopurine) Hemisulfat Salt	min. 99%	Sigma
D(+)-Glucose	wasserfrei, für biochemische Zwecke	Merck
Desoxyribonucleine Acid	Sodium Salt from Salmon Testes	Sigma
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids		Becton
Dimethylsulfoxid	min. 99,5% zur Synthese	ROTH
Ethylenediaminetetraacetic acid Ferric-Sodium Salt		Sigma
5-Fluoroorotic Acid	min. 98% (HPLC)	Fermentas
Kupfersulfat Pentahydrat	min. 99%	Sigma
L-Argenine	Biotechnology Performance Certified	Sigma
L-Histidin (L- α -Amino-b-[4-imidazolyl] propionic acid)	min. 99%	Sigma
L-Isoleucin	min. 98% (TLC)	Sigma
L-Leucin	für biochemische Zwecke	Merck
L-Lysine (L-2,6-Diaminohaxanoic acid)	min. 98% (TLC)	Sigma
L-Methionine	für biochemische Zwecke	Merck
L-Phenylalanin	für biochemische Zwecke	Merck
L-Threonin	für biochemische Zwecke	Merck
L-Tryptophane	min. 98% (TLC)	Sigma
Polyethylene Glycol, Molekulargewicht 3350	wichtig!! Bestellnummer P-3640	Sigma
Ultra Pure™ Tris		Invitrogen
Uracil (2,4-Dihydroxypyrimidine)	min. 99%	Sigma

Für alle Platten wurde Agar-Agar (granuliert, gereinigt und frei von Hemmstoffen) von Merck verwendet.

DNA-Marker, DNA-Leiter und Oligonukleotide

Als Ladepuffer wurde Orange Loading Dye Solution von der Firma Fermentas verwendet. Die DNA-Leiter war eine 1kb Leiter von Invitrogen. Alle Oligonukleotide sind in Tabelle A im Anhang zu finden.

Enzyme

Die verwendeten DNA-Polymerasen waren:

- Expand High Fidelity PCR System (HiFi) von Roche
- Isis™ DNA Polymerase von Qbiogene
- KOD Hot Start DNA Polymerase von Novagen
- TaKaRa Taq™ von Takara Bio Inc.
- Taq wurde von Marc Jakoby und Doris Falkenhan bereitgestellt

Die Restriktionsendonucleasen wurden von der Firma Fermentas bezogen.

Alle Enzyme und Puffer, mit denen GatewayTM Klonierungen durchgeführt wurden, stammten von Invitrogen.

Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika lieferten die Firma Duchefa (Kanamycin, Ampicilin, und Rifampicin) und Roth (Chloramphenicol).

2.1.3 Lösungen

Alle Lösungen, bei denen keine Angabe zur Lagerungstemperatur steht, können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

20x SD

67g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids wurden in 500 ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

100x Aminosäure-Stock

1,2g Leucin

0,4g Arginin

1,2g Isoleucin

0,8g Lysin

1,2g Phenylalanin

1,0g Threonine

wurden in 200 ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

100x Methionin-Stock

0,2g Methionin wurden in 200ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

100x Tryptophan

0,8g Tryptophan wurden in 200 ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

100x Histidin

0,2g Histidin wurden in 200 ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

1% Uracil

2,0g Uracil wurden in 200ml 0,1M Natronlauge gelöst und steril filtriert.

1% Adenin

2,0g Adenin wurden in 200ml 0,1M Natronlauge gelöst und steril filtriert.

40% Glucose

80g D-Glucose wurden in 200ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

1000x Kupfersulfat-Lösung

5g Kupfersulfat Pentahydrat wurden in 200ml H₂O_{dd} gelöst und steril filtriert.

10x TE-Puffer

Es wurde eine Lösung von 100mM Tris und 10mM EDTA in H₂O_{dd} erstellt. Mit HCl wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde dann steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Heringsspermien-DNA (2mg/ml)

200mg Heringsspermien-DNA wurden in 100ml sterilem TE-Puffer gelöst und 2-3 Stunden mit dem Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde in Portionen aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die für den Versuch notwendige Menge einmal für 5min auf 100°C erhitzt und mittels eines Eisbades abgekühlt. Die ssDNA kann danach wieder eingefroren und anschließend nochmals verwendet werden, doch verringert sich dabei die Transformationseffizienz.

10x LiAc-Puffer

6,6g LiAc wurden in 100ml H₂O_{dd} (1M LiAc-Lösung) gelöst und steril filtriert. Die Lösung bei 4°C aufbewahren.

50% Polyethylenglykol-Lösung (PEG 50% w/v)

50g PEG MW 3350 (von Sigma; P3640) wurden in 35ml H₂O_{dd} gegeben und mindestens 30min oder bis zur vollständigen Lösung gerührt. Danach wurde die Lösung in einen Messzylinder umgefüllt und auf genau 100ml mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Die viskose Lösung wurde dann steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Beim Ansetzen dieser Lösung war die Genauigkeit sehr wichtig, da schon eine geringe Abweichung der PEG-Konzentration große Auswirkungen auf die Transformationseffizienz hatte.

Agar-Agar für FOA-Platten

10g Agar-Agar wurden in 250ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

10x Taq-Polymerase Puffer

100mM TRIS/HCl pH 8,3

500mM KCl

15mM MgCl₂

wurden zusammengegeben. Der Puffer wurde in je 1ml Portionen aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

50% Glycerin

50ml Glycerin wurden mit sterilem H₂O_{dd} auf 100ml aufgefüllt und steril filtriert.

1M MES Puffer

19,5g 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure in 100ml H₂O_{dd} lösen. Den pH Wert mit 1M KOH Lösung auf einen pH von 5,6 einstellen. Den Puffer steril filtrieren und bei Raumtemperatur dunkel lagern.

3M MgCl₂

28,56g in 100ml H₂O_{dd} lösen und steril filtrieren.

150mM Acetosyringon

0,294g 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenon in 10ml DMF (N,N-Dimethylformamid). Die Lösung dunkel bei -20°C lagern.

Infiltrationspuffer

500µl 1M MES Puffer

167µl 3M MgCl₂

50µl 150mM Acetosyringon

Mit sterilem H₂O_{dd} auf 50ml auffüllen. Diesen Puffer erst kurz vor Gebrauch zusammenstellen.

2.1.4 Medien

YPAD (YPD plus Adenin)

6g Hefe-Extrakt

12g Pepton

12g Glucose

60mg Adenin Hemisulfat

wurden in 600ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert. Für das Plattenmedium wurden noch 10g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

SD (Synthetic Drop-Out)

25ml 20x SD

5ml 100x Aminosäure-Stock

1ml 1% Adenin

5ml 100x Methionin (entspricht einer Endkonzentration von 70µM) [M]

5ml 100x Tryptophan [W]

5ml 100x Histidin [H]

2ml 1% Uracil [U]

0,5ml 1000x Kupfersulfat-Lösung [Cu]

wurden mit H₂O_{dd} auf 475ml aufgefüllt und zum Autoklavieren gegeben. Für das Plattenmedium wurden noch 10g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurden noch 25ml 40% Glucose hinzugegeben.

In dem oben aufgeführten Rezept sind die Mengen für alle möglichen Reagenzien angegeben. In den meisten Fällen wurden diese allerdings nicht alle gebraucht, je nach Verwendungszweck wurden einige weggelassen. Welche Stoffe enthalten sind, wurde stets durch eine Abkürzung wie SD -H -W +U -M -Cu angegeben. Dies bedeutet, dass die Platte weder Histidin, Tryptophan, Methionin noch Kupfersulfat enthält, aber Uracil zugefügt wurde.

FOA

Dieses Medium besteht aus den gleichen Substanzen wie das SD Medium, doch wurden hier die 25ml 40% Glucose direkt zugefügt und mit sterilem H₂O_{dd} auf 250ml aufgefüllt. Zu diesem Gemisch wurden 0,5g 5-FOA gegeben und bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das 5-FOA vollständig gelöst hatte. Es war sehr wichtig, dass die Lösung nur sehr vorsichtig auf 50°C erwärmt wurde, da 5-FOA temperatursensitiv ist. Das Agar-Agar für FOA-Platten wurde geschmolzen und ebenfalls auf eine Temperatur von 50°C gebracht. Die beiden Lösungen wurden gemischt und möglichst schnell in Platten gegossen, da das Gemisch schnell erstarrte.

Auch hier wurden je nach Verwendungszweck verschiedene Lösungen weggelassen. Es gelten die gleichen angegebenen Abkürzungen wie bei dem SD-Medium.

LB

10g Pepton

5g Hefe Extrakt

10g NaCl

wurden in 1L H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert. Für das Plattenmedium wurden noch 16g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

YEB

5g Fleisch Extrakt

5g Pepton

1g Hefe Extrakt

5g Succrose

2 ml 1M MgSO₄

wurden in 1L H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert. Für das Plattenmedium wurden noch 16g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Vor der Verwendung bzw. dem Gießen der Platten wurden noch die gewünschten Antibiotika zugesetzt. Diese wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet:

Carbenicillin	100µg/l
Chloramphenicol	34µg/l
Kanamycin	50µg/l
Rifampicin	50µg/l

MS Medium (1/2 MS)

2,16g Murashige and Skoog Basal Salt Mixture

5g Saccharose

Mit H₂O_{dd} auf 1 Liter auffüllen. Den pH Wert mit 1M KOH auf einen Wert von pH 5,6 einstellen und autoklavieren. Falls das Medium zum Gießen von Platten verwendet werden soll, müssen noch 8g Phytagar vor dem Autoklavieren hinzugefügt werden.

2.1.5 Methoden

Arbeiten mit *E. coli* und *A. tumefaciens*

Bei allen Arbeiten mit *E.coli* und *A.tumefaciens* wurden Standard-Labormethoden verwendet. Für die Plasmidextraktion wurde das Plasmid Miniprep Kit von PreqLab bzw. Macherey-Nagel benutzt. Es wurden elektrokompetente Bakterien für die Transformation verwendet.

Arbeiten mit *A. thaliana* und *N. benthamina*

Die Pflanzen wurden in Standard Pflanz Erde aufgezogen. Die Selektion auf Erde erfolgte stets mit BASTA®-Lösung (1:1000 verdünnte Arbeitslösung), die auf die Pflanzen gesprüht wurde. Die Gabe von Zellzyklus-Inhibitoren erfolgte bei Pflanzen, die in flüssigem MS-Medium aufgezogen wurden. Die Samen der von *A. thaliana* wurden mit Chlorgas sterilisiert, bevor sie auf MS-Platten oder in flüssiges MS-Medium gegeben wurden.

GUS-Färbung

Die Färbung wurde durchgeführt, wie in Sessions et al. (1999) beschrieben.

PCR für Gateway™

Die PCR-Protokolle wurden nach den Vorgaben des Herstellers der Polymerasen durchgeführt und den eingesetzten Primern entsprechend angepasst. Für die Erstellung der Gateway™ Konstrukte wurde eine besondere PCR-Methode verwendet. Die genspezifische Primer in Anhang 1 besitzen nur einen Teil der notwendigen AttB-Erkennungsequenz. Deshalb muss eine zweite PCR mit einem Aliquot der ersten PCR als Template durchgeführt werden. Dabei wurden Primer eingesetzt, die aus der vollständigen AttB-Sequenz bestanden. Dieses Verfahren wurde verwendet, um unnötig lange Primer zu vermeiden.

PCR für Promotoren

Um die Promotoren zu klonieren, wurde nur HiFi verwendet. Nur sie produziert die A-Überhänge, die notwendig sind, um die Promotoren in pGEM-T® zu klonieren. Das PCR-Protokoll wurde nach den Vorgaben des Herstellers der Polymerasen durchgeführt und den eingesetzten Primern entsprechend angepasst.

PCR für Aminosäureaustausch

Die Primer für dieses Verfahren wurden so erstellt, dass sie eine Restriktionstelle schufen oder eliminierten. Dazu wurde das Programm Silent (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=silent>) verwendet. Bei kleinen Genen (<1kb) wurde die Methodik der „direct site mutagenesis“ verwendet. Bei größeren Genen wurden immer zwei Teilstücke in einer ersten PCR produziert, die dann in einer zweiten PCR miteinander verbunden wurden.

BP- und LR-Reaktionen

Mit der BP-Reaktion wurden die PCR-Produkte in pDONR201 rekombiniert. In diesem Vektor wurden die PCR-Produkte sequenziert um zu überprüfen, ob bei der PCR keine Fehler entstanden waren. Waren die Sequenzen richtig, so wurden die Gene über die LR-Reaktion aus pDONR201 in einen der Zielvektoren transferiert. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Restriktionsverdau

Die erstellten Vektoren wurden über einen Restriktionsverdau überprüft, der Aufschluss darüber geben sollte, ob das erwünschte Gen sich im Vektor befindet. Der Verdau für Plasmid aus *E.coli* wurde stets mit 2µl DNA und 0,2µl der Restriktionsendonukleasen und evtl. noch 0,2µl einer weiteren Restriktionsendonuklease angesetzt. Es wurde der von dem Hersteller vorgeschriebene Puffer verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 20µl mit sterilem H₂O_{dd} aufgefüllt. Bei Plasmid aus *A.tumefaciens* wurde je 0,5µl der benötigten Restriktionsendonukleasen verwendet und ein Reaktionsansatz von 40µl erstellt. Dabei wurde nur der benötigte Puffer zugegeben und mit der DNA auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Verdau wurden 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert.

Gelelektrophorese

Alle PCRs und Verdau wurden über eine Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde, falls nicht anders angegeben, ein 0,8% Agarosegel verwendet. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Als Längenmarker wurde eine 1kb Leiter mit aufgetragen.

Einfaches Transformationsprotokoll für Hefe

Am 1.Tag wurden 50ml Flüssigmedium (YPAD) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 220rpm inkubiert.

Am 2.Tag wurden 300ml Flüssigmedium (YPAD) mit 30ml der Übernachtskultur versetzt und bei 30°C und 220rpm wachsen gelassen, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht hatten (ca. 1,5 Stunden). Die Zellen wurden durch 15min Zentrifugation bei 4500rpm und 4°C geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden vorsichtig in 100ml sterilem H₂O_{dd} resuspendiert und erneut 15min mit 4500rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 2ml frisch erstelltem LiAc-Puffer resuspendiert und in Portionen von je 100µl aufgeteilt. Diese wurden dann entweder direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Kompetenz nahm jedoch durch das Einfrieren stark ab.

Für die Transformation wurden 10µl ssDNA zu den 100µl kompetenten Hefezellen gegeben. Dann wurden 600µl frisch erstellter Transformations-Puffer und ein oder zwei Vektoren (maximal 1µg DNA) zugegeben. Die Zellen wurden im Transformations-Puffer gründlich resuspendiert. Das Gemisch wurde für 30min bei 30°C inkubiert. Nun wurden 70µl DMSO hinzugegeben und für weitere 15min im Thermocycler mit 800rpm bei 42°C inkubiert. Die Proben wurden herausgenommen und für ca. 3min in ein Eisbad gestellt. Danach wurde kurz bei maximal 4500rpm und nicht länger als 10sec zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 100µl oder weniger TE-Puffer vorsichtig resuspendiert und auf Selektions-Platten (SD-H+W oder SD-H-W) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C so lange inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Dies war meist nach 2 Tagen der Fall.

Alternativ kann das DMSO weggelassen werden, dafür muss aber die Inkubation bei 42°C auf 30min verlängert werden.

Diese Methode der Transformation eignete sich nicht für die Transformation einer cDNA-Bibliothek, da die Effizienz hierfür nicht ausreichend war. Die Effizienz reichte jedoch aus, um eine co-Transformation von zwei Vektoren durchzuführen. Dieses Protokoll eignete sich daher sehr gut, um Growth-Assays zu erstellen. Die Vorteile dieses Protokolls liegen in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit.

Growth-Assay

Für den Growth-Assay wurden folgende Platten (120x120 mm) benötigt:

- SD – H – W + U – M – Cu Kontrolle
- SD – H – W – U – M – Cu SD-Platten
- SD – H – W – U – M + Cu
- FOA – H – W + U – M – Cu FOA-Platten
- FOA – H – W + U – M + Cu

Die zu verwendende Methionin-Konzentration wurde vorher bestimmt (siehe 1.2.10 Promotortest für den bait-Vektor). Die Platten wurden auf der Rückseite gekennzeichnet und folgendermaßen aufgeteilt:

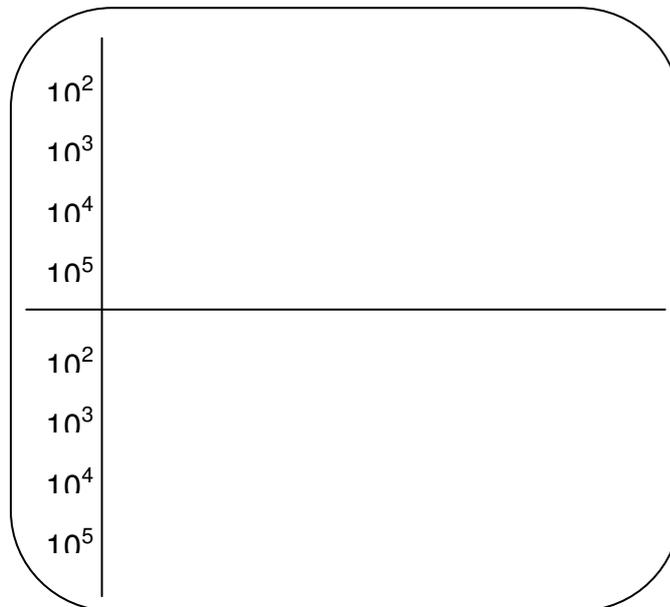


Abbildung 2.1: Beschriftung der Growth-Assay Platte

Das Gießen der Platten und die Erstellung der Verdünnungen wurde nach Möglichkeit unter der Sterilbank ausgeführt.

Der nächste Arbeitsschritt bestand darin, Verdünnungen von den zu testenden Hefen zu erstellen. Von möglichst frischen Hefekolonien wurde eine Impföse voll in jeweils 1ml H_2O_{dd} gegeben. Vortexen, bis die Hefe vollkommen resuspendiert war. Eine 1:5 Verdünnung mit H_2O_{dd} wurde in Küvetten erstellt und die optische Dichte bei 600nm Wellenlänge (OD_{600}) bestimmt. Nun wurde die Verdünnung, die für eine $OD_{600}=1$ (ca. 10^5 Zellen/ml) notwendig ist, ausgerechnet. Es wurde mit H_2O_{dd} verdünnt. 220 μ l der

Material und Methoden

Verdünnungen wurden in eine 96-Well Platte gegeben. Die darunter liegenden drei Reihen wurden mit je 180µl H₂O_{dd} gefüllt.

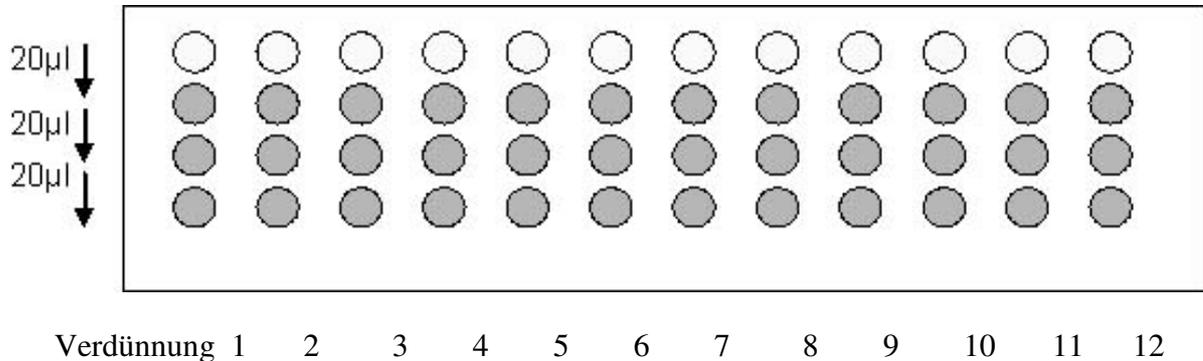


Abbildung 2.2: Verdünnungsreihe für den Growth-Assay

Jeweils 20µl von der obersten Reihe wurden in die zweite Reihe pipettiert. Es wurde gut gemischt und 20µl der zweiten Reihe in die dritte Reihe gegeben. Das Gleiche wurde auch für die vierte Reihe durchgeführt. Die Reihen sollten nun die folgenden Konzentrationen an Zellen pro ml enthalten:

- 1. Reihe 10^5
- 2. Reihe 10^4
- 3. Reihe 10^3
- 4. Reihe 10^2

Anfangen von der niedrigsten Konzentration (4. Reihe), wurden nun jeweils 3,75µl auf die Platten gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass die Beschriftung der Platte eingehalten und die Verdünnung 1 markiert wurde, um spätere Verwechslungen auszuschließen. Die Tropfen wurden auf die Platten gegeben und für 10min zum Einziehen stehen gelassen. Danach wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 30°C ca. 2 Tage inkubiert. Die FOA-Platten können unter Umständen 1-2 Tage länger brauchen, um zu wachsen.

Transformation von *A. thaliana* Pflanzen

Die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurde mit Agrobakterien durchgeführt. Dazu wurden die Agrobakterien von dem Dauerstock auf YEP Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 28°C für zwei Tage inkubiert. Von diesen Platten wurden dann je 8 ml flüssiges YEB Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft. Dieses wurde dann für zwei Tage bei 28°C im Roller inkubiert. Danach wurden 500 ml flüssiges YEB Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit dieser Kultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 28°C in einem Schüttler (max. 240 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden kurz vor der Transformation der Pflanzen noch 25g Saccharose und 100 µl Silvet hinzugefügt. Die zu transformierenden

Pflanzen wurden dann mit den Blüten zuerst in die Kultur getaucht und ca. 30 sec darin belassen. Danach wurden die Pflanzen in eine Pflanzschale gelegt und abgedeckt. Am darauf folgenden Tag wurde die Abdeckung entfernt und die Pflanzen aufgerichtet.

Tabak Infiltration

Am 1. Tag für jedes zu überprüfende Paar an Kandidaten möglichst eine 6 Wochen alte Tabakpflanze bereitstellen und für stabile Umweltbedingungen sorgen. Außerdem die gewünschten Interaktoren in den respektiven Vektoren von einem *A.tumefaciens* Dauerstock in je 50µl steriles H₂O_{dd} picken und auf einer YEB Platte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattieren. Für die BiFC Vektoren (pSYC und pSYN) sind dies Carbenicillin, Kanamycin und Rifampicin. Für den 19K Stamm sind dies Kanamycin und Rifampicin. Eine Petrischale (94 mm Durchmesser) ist ausreichend für 6 Reagenzgläser. Für jede zu überprüfende Interaktion benötigt man drei Reagenzgläser. Eines für jeden Interaktor und eines für 19K. Die Platten werden 2 Tage bei 28°C inkubiert. Am dritten Tag die Tabakpflanzen gut wässern. Von dem Bakterienrasen auf den Platten wird ein etwa erbsengroßer Klumpen *A.tumefaciens* in je 8ml flüssiges YEB in einem Reagenzglas gepickt und vorsichtig durch Vortexen resuspendiert. Diese Reagenzgläser werden in einem Roller bei 28°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Flüssigkulturen der zu testenden Kandidaten in einem Falcon Reaktionsgefäß gemischt. Die Kulturen von 19K werden separat behandelt, können aber zusammengefasst werden. Die Kulturen werden bei 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und die Pellets in je 400µl Infiltrationspuffer aufgenommen. Bei 19K kann das Pellet in der entsprechenden Menge Infiltrationspuffer aufgenommen werden. Die Pellets werden dann vorsichtig resuspendiert. Von der Bakteriensuspension 5µl abnehmen, mit 995µl H₂O_{dd} mischen und die Optische Dichte bei 600nm bestimmen. Diese sollte um einen Wert von 0,5 liegen. Anschließend die Bakteriensuspensionen für zwei Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubieren. Nach der Inkubationszeit werden die Bakteriensuspension der zu testenden Kandidaten mit 500µl der Bakteriensuspension von 19K gemischt. Das Gemisch in einer kleinen Spritze (1ml Luer Lock von B+D) aufnehmen und vorsichtig in die Unterseite eines Blattes injizieren. Das Blatt sollte eine glatte Oberfläche und einen runden Rand besitzen. Bei 6 Wochen alten Tabakpflanzen sind dies in der Regel Blatt 3 und 4. Nach 5 Tagen kann ein infiltriertes Stück des Blattes herausgeschnitten werden und unter dem Mikroskop analysiert werden.

Fluoreszenzquantifizierung

Für die Quantifizierung wurde eine Fläche, meist der Zellkern, in einem einzelnen Bild ausgewählt. Mit dem frei zugänglichen Programm Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde dann anschließend die durchschnittliche Pixelintensität dieser Fläche gemessen. Dies wurde für jede Messreihe mit mindestens 10 Flächen durchgeführt. Der daraus resultierende Mittelwert ist als eine Messung anzusehen. Für die endgültigen Daten wurden mindestens drei solcher Messungen durchgeführt. Um die Messungen

untereinander vergleichbar zu machen wurde, die Fluoreszenzintensität von der Messung für CDKA;1 als 100% gesetzt und die restlichen Werte angeglichen. In den Abbildungen sind jeweils der Mittelwert dieser drei Messungen und die Standardabweichung dargestellt.

Bildbearbeitung

Alle Platten wurden eingescannt und mit Photoshop von Adobe bearbeitet. Um die Banden und Kolonien besser sichtbar zu machen, wurden alle Bilder invertiert und deren Kontraste verstärkt.

Alle mikroskopischen Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS CLSM System und den entsprechenden Filtern erstellt. Die Nachbearbeitung wurde mit Photoshop von Adobe durchgeführt.

Bilder von Pflanzen wurden mit der Kamera EOS DIGITAL 400D von Canon erstellt und mit Photoshop von Adobe bearbeitet.

Internet Recherchen

Alle wichtigen Daten über Lokalisation, Funktion und Proteinfamilien von Genen aus *A. thaliana* wurden auf der Internetseite von „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>) recherchiert.

Alle Publikationen, die Sequenzen der cDNAs und alle Daten zu Proteinen, die nicht aus *A. thaliana* stammen, wurden auf den Internetseiten des „National Center for Biotechnical Information“ (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) recherchiert.

Die Expression von Genen wurde mit Hilfe des eFP Browsers auf der Internetseite von „The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics“ (BAR; <http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter D 2007) und des Genvestigators der ETH Zürich (<https://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp>) recherchiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des BiFC Systems

Für das BiFC System wurden vier GatewayTM kompatible Vektoren, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harter (Universität Köln/ZMBP Tübingen) bereitgestellt wurden, verwendet. Diese Vektoren sind pSPYCE und pSPYNE, in denen die beiden Hälften von dem „yellow fluorescent protein“ (YFP) jeweils am C-terminalen Teil des Proteins fusioniert werden, und pE-SPYCE und pE-SPYNE, in denen die beiden Hälften von YFP jeweils am N-terminalen Ende fusioniert werden. Die BiFC-Vektoren wurden zuerst mit den Proteinen CDKA;1 und CKS1, welche eine sehr starke Interaktion zeigen, getestet. Die beiden Proteine wurden in der in Tabelle 3.1 zu entnehmenden Kombinationen getestet.

Tabelle 3.1: Test der möglichen BiFC Kombinationsmöglichkeiten: -- keine Interaktion, + Interaktion

		Vektor			
		pSPYCE	pSPYNE	pE-SPYCE	pE-SPYNE
Vektor	Protein	CKS1	CKS1	CKS1	CKS1
pSPYCE	CDKA;1	--	+	--	--
pSPYNE	CDKA;1	+	--	--	--
pE-SPYCE	CDKA;1	--	--	--	--
pE-SPYNE	CDKA;1	--	--	--	--

Die Kombinationen aus den beiden C-terminalen Fusionen (pSPYCE und pSPYNE) war allerdings die einzige Kombination, in der ein Signal zu erkennen war. Um eventuelle schwache Signale besser erkennen zu können, wurden die Versuche mit dem Agrobakterienstamm 19K wiederholt. Dieser Stamm besitzt einen Vektor, auf dem sich das virale Gen für p19 befindet. Das Protein p19 verhindert das Abschalten („post-transcriptional gene silencing“, PTGS) von Genen in Pflanzen und erhöht sogar die Expression um bis zu mehr als das 50fache (Voinnety O 2003). Diese Wiederholung führte allerdings zu denselben Ergebnissen.

Um die Möglichkeit zu eröffnen, stabile Transformationen mit den BiFC Konstrukten zu erstellen, wurde die GatewayTM Kasette aus den beiden Vektoren (pSPYCE und pSPYNE) in zwei andere Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern gesetzt. Die Gateway-Kasette von pSPYCE wurde mit den Restriktionsenzymen SdaI/AvaIII in

pATGUS (BASTA-Resistenz) gesetzt, der daraus entstandene Vektor ist pSYC. Die Gateway-Kassette von pSPYNE wurde mit den Restriktionsenzymen SapI/SacI in pBENDER (Kanamycin-Resistenz) gesetzt, der daraus entstandene Vektor ist pSYN. Die in Tabelle 3.1 gezeigten Kombinationen mit pSPYCE und pSPYNE wurden mit den neuen Vektoren pSYC und pSYN nochmals getestet. Die Proteine in pSYC und pSYN zeigten die gleichen Interaktionen wie in pSPYCE und pSPYNE. Zudem waren die Signale stärker und über die Zeit gesehen auch stabiler.

Weitere Tests sollten nun zeigen, wie zuverlässig das System ist und unter welchen Bedingungen es funktioniert. Um Hintergrundsignale auszuschließen, wurden die Vektoren ohne eingebrachtes Gen getestet. Die leeren Vektoren führten zu keinem Signal. Auch die Verwendung von 19K und die Kombination von leeren Vektoren mit solchen, die ein Gen inseriert haben, führten zu keinerlei Signalen. Als Negativkontrollen wurde β -Glucuronidase (GUS) und „red fluorescent protein“ (mRFP, Monomere Form) getestet. Beide Proteine führten weder mit leeren Vektoren noch mit anderen Proteinen (CDKA;1, CKS1, KRP1, CFP, u.a.) zu einem Signal. Verwendete man allerdings in beiden Vektoren GUS, kam es zu einem Signal. Dies bedeutet, dass das hier verwendete GUS aus *E. coli* in Pflanzenzellen vermutlich die gleichen tetrameren Komplexe bilden kann wie in *E. coli* (Kim DH 1995). GUS wurde für alle weiteren Experimente als Negativkontrolle verwendet, denn mit ihm ist es möglich die Effizienz der Infiltration zeigt. (Bild 3.1, F)

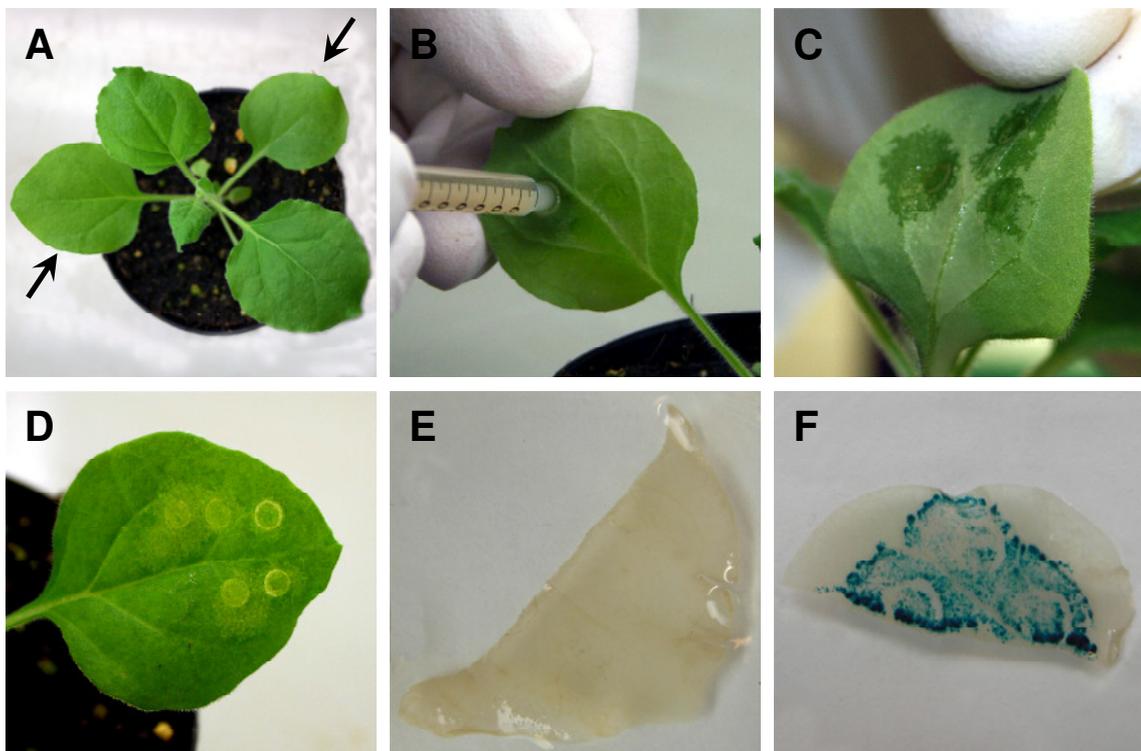


Abbildung 3.1: Tabakinfiltration: (A) 6 Wochen alte Tabakpflanze (*N. benthamiana*), die Pfeile markieren die Blätter, die optimal zum Infiltrieren geeignet sind; (B) Infiltration über die Unterseite des Blattes; (C) und (D) infiltrierte Stellen von unten gesehen erscheinen sie dunkler (C) und von der Oberseite etwas heller bzw. durchscheinender (D); (E) und (F) Blattstücke nach der GUS Färbung, (E) ist mit CDKA;1 in pSYC und CKS1 in pSYN infiltrierte worden und (F) mit CDKA;1 in pSYC und GUS in pSYN

Nun galt es noch das Infiltrations-Protokoll zu optimieren. Hierfür wurden für ein Paar interagierender Proteine (CDKA;1 und CKS1) in dem Protokoll jeweils einzelne Parameter verändert. Einige der veränderten Parameter sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Parameter des Infiltrations-Protokolls, die mit unterschiedlichen Werten getestet wurden

Parameter	Varianz	Optimum
Inkubationszeit auf Platte	1-4 Tage	2 Tage
Inkubationszeit in Flüssigmedium	1-3 Tage	1 Tag (über Nacht)
Menge des Flüssigmediums	5-10 ml/Probe	8 ml/Probe
Zeitpunkt der Zugabe von 19K	vor der Zentrifugation/ nach Aufnahme im Puffer/ kurz vor der Infiltration	kurz vor der Infiltration
optische Dichte (OD600) der Bakteriensuspension	0,1-1,0	0,3
Inkubationszeit im Infiltrationspuffer	2-5 Std.	2 Std.
Alter der Tabakpflanzen	4-12 Wochen	6 Wochen
Zeitpunkt der Messung nach Infiltration	1-10 Tage	3 Tage ohne 19K, 5 Tage mit 19K

Das optimierte Protokoll findet sich im Kapitel Material und Methoden unter Methoden. Andere Parameter, die einen Einfluss auf die Infiltrationseffizienz und die Signalstärke haben, lassen sich nicht so einfach verändern oder darstellen. So ist die Wahl der zu infiltrierenden Blätter sehr wichtig und auch der Zustand der ganzen Pflanze. Aus Erfahrungswerten resultieren folgende Dinge, die zu beachten sind:

- die Pflanzen sollten drei Tage vor der Infiltration unter stabilen Bedingungen gehalten werden, am besten in einer Klimakammer, und dort auch bis zur Auswertung bleiben.
- einen Tag vor der Infiltration sollten die Pflanzen gut gewässert werden, da dies die Injektion der Bakteriensuspension deutlich erleichtert.
- es sollten immer die Blätter zur Injektion herangezogen werden, die einen runden Rand und eine glatte Blattoberfläche besitzen, meist ist dies Blatt 3 und 4 bei 6 Wochen alten Pflanzen (Bild 3.1, A).

- niemals schon verwundete oder nicht normal gewachsene Blätter nehmen, da dort sehr viel Autofluoreszenz ist und in einigen Fällen die Infiltration gar nicht funktioniert.
- auf keinen Fall sollten die Pflanzen kurz vor der Infiltration oder direkt nach der Infiltration mit Pestiziden oder Fungiziden behandelt werden. Dies führt in den meisten Fällen zum totalen Verlust aller Signale oder etwas seltener zu stark störender Autofluoreszenz.

Alle BiFC Experimente dieser Arbeit wurden unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren durchgeführt. Bei allen Experimenten wurde immer eine positiv Kontrolle (CDKA;1 und CKS1) verwendet und alle verwendeten Proteine wurden mit GUS auf unerwünschte falsch positive Interaktionen untersucht.

3.2 Differenzierung zwischen Substratbindung und stabilerer Interaktion im BiFC System

Die unterschiedliche Aktivität der verschiedenen CDKA;1 Varianten konnten in einem Kinaseassay gezeigt werden (Dissmeyer N 2007). In Interaktionsstudien der CDKA;1 Varianten mit anderen Proteinen konnte ebenfalls ein Unterschied in der Signalstärke zwischen den Varianten gesehen werden. Dies lässt die Hypothese zu, dass mit dem BiFC System eine Differenzierung zwischen der relativ schwachen Interaktion der Kinase mit ihrem Substrat und einer Interaktion der Kinase mit z.B. einem Partner in einem Komplex möglich ist. Da die Varianz aber auch an der Stabilität bzw. Menge der Proteine liegen kann, wurden zuerst Versuche durchgeführt um dies auszuschließen. Die CDKA;1 Varianten wurden in den Vektor pEXSG-YFP gebracht. In diesem Vektor wird das Protein C-terminal mit einem vollständigen YFP fusioniert. Diese Konstrukte wurden dann ebenfalls in Agrobakterien transformiert und nach dem gleichen Protokoll wie für die BiFC Analysen in Tabak injiziert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden gemessen und erbrachten die in Bild 3.2 angegebenen Ergebnisse.

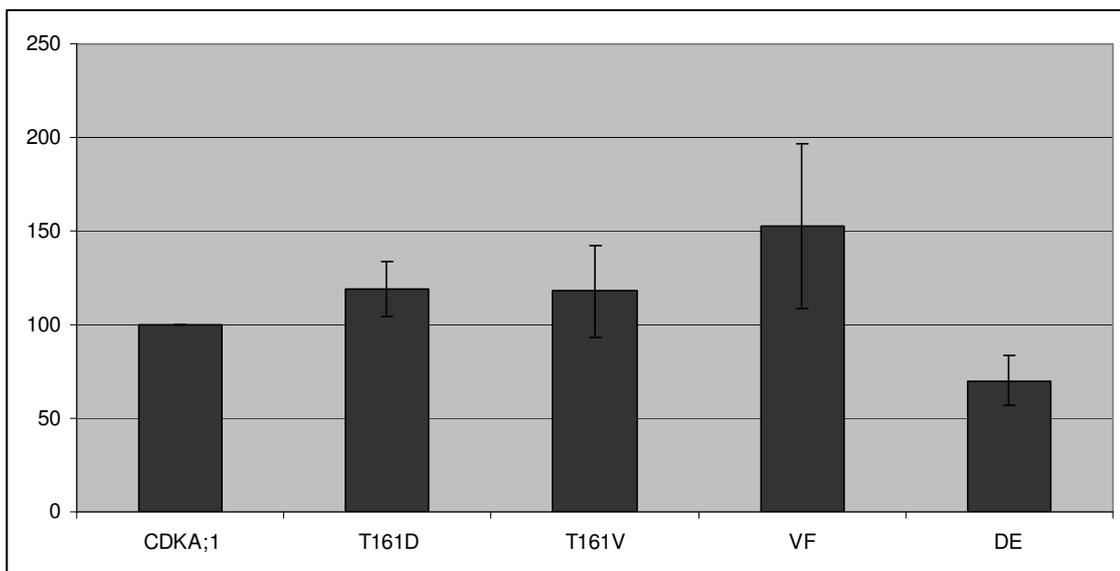


Abbildung 3.2: Fluoreszenz Quantifizierung der Signale der YFP Fusionskonstrukte

Zu sehen ist, dass die Varianten T161D und T161V etwa in gleicher Menge vorliegen wie CDKA;1. Die Variante VF scheint durch den Aminosäureaustausch stabilisiert worden zu sein, die Variante DE hingegen destabilisiert. Diese Abweichungen müssen bei den Auswertungen der Interaktionen mit anderen Proteinen bedacht werden.

3.2.1 Interaktion der CDKA;1 Varianten mit bekannten Substraten

Um das Verhalten der CDKA;1 Varianten gegenüber Substraten zu testen, wurden zwei Proteine ausgewählt, die schon als CDKA;1 Substrate bekannt waren. Die Wahl fiel auf

CDT1 und CDC6 (Morgan 2007). Zusätzlich wurden noch Histon H1.1 (At1g06760) verwendet, da dies in der biochemischen Analyse der Kinaseaktivität als Substrat dient (Dissmeyer N 2007). Diese Proteine wurden nun in einem BiFC Versuch mit den CDKA;1 Varianten zusammen getestet. Die Quantifizierungen der Signale ergaben die in Bild 3.3 zusammengefassten Messwerte.

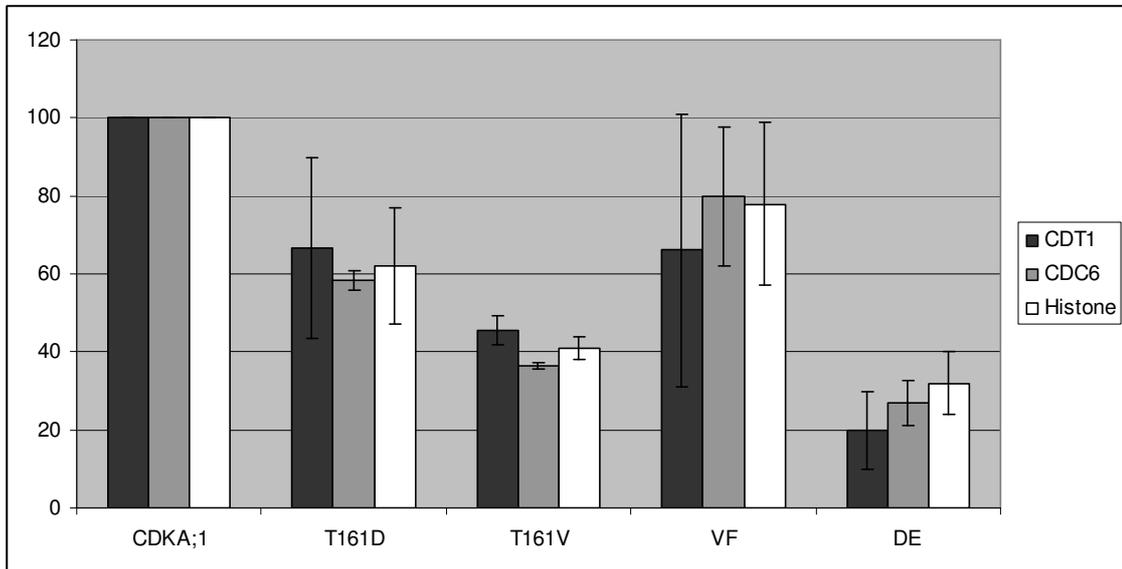


Abbildung 3.3: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen von CDT1, CDC6 und Histon H1.1 mit den CDKA;1 Varianten

Es ist sehr schön zu sehen, dass es von CDKA;1 zu T161D zu T161V einen Abfall der Signalstärke gibt. Bei den beiden anderen Varianten sind ihre von der unveränderten CDKA;1 abweichenden Proteinmengen mit einzubeziehen. Somit wäre die Aktivität der Variante VF etwas geringer als in Bild 3.3 zu sehen, die von DE hingegen etwas höher. Insgesamt ist aber ein Unterschied der Substratinteraktion zwischen den CDKA;1 Varianten messbar.

3.2.2 Interaktion der CDKA;1 Varianten mit Proteinen aus dem CDK/CYCLIN Komplex

Es ist nicht bekannt, wie sich die CDKA;1 Varianten gegenüber anderen Proteinen verhalten. Deshalb galt es nun auch solche Interaktionen zu untersuchen, bei denen die CDKA;1 Varianten eine stabilere Verbindung eingehen. Hierzu wurden zwei verschiedene Cycline CYCB1;2 (At5g06150) und CYCD3;1 (At4g34160) verwendet. Bei CYCB1;2 handelt es sich um ein Cyclin der M-Phase und es sollte deshalb mit CDKA;1 interagieren. CYCD3;1 ist ein Cyclin der S-Phase und mit ihm sind schon Interaktionen mit CDKA;1 nachgewiesen (Healy JMS 2001). Ein weiteres Protein sollte CKS1 (At2g27960) sein. Es wurde als Interaktor von CDKA;1 identifiziert (De Veylder L 1997) schon dazu verwendet CDKA;1 aufzureinigen (Landrieu I 2004) und sollte deshalb eine starke Bindung zu CDKA;1 haben.

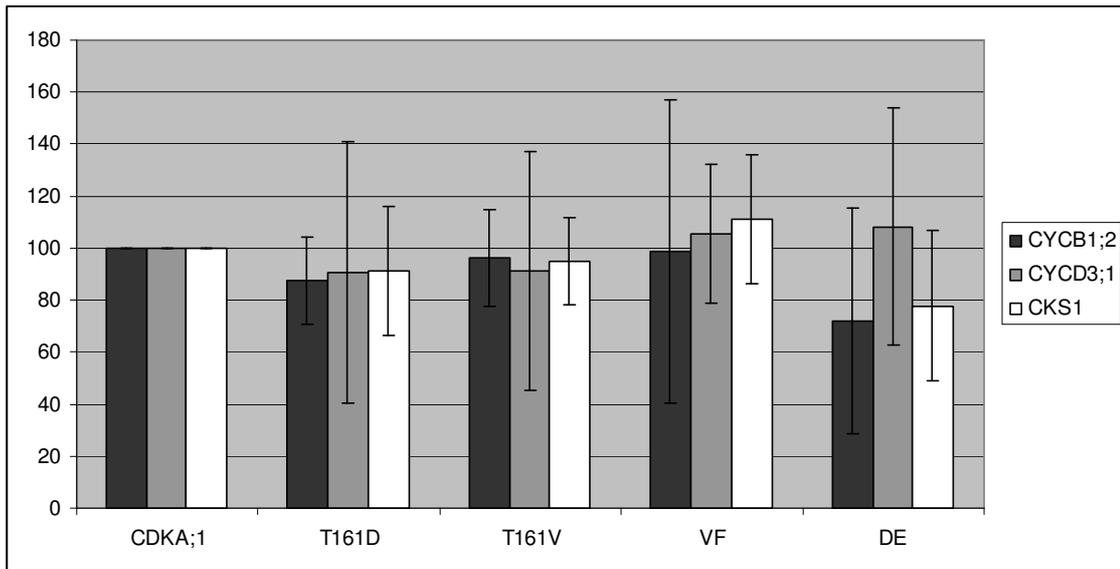


Abbildung 3.4: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen von CYCB1;2, CYCD3;1 und CKS1 mit den CDKA;1 Varianten

Gut zu erkennen ist, dass T161D und T161V kaum von CDKA;1 abweichen. Berücksichtigt man die Abweichungen in den Proteinmengen der Varianten VF und DE, so entsprechen die Werte auch denen von CDKA;1. Einzig die Interaktion von CYCD3;1 mit CDKA;1 (DE) ist überraschend hoch. Signifikanztests zeigen aber, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten der CDKA;1 Varianten existieren. Das hier verwendete BiFC System ist also dazu geeignet, einen Unterschied zwischen Substraten und anderen Interaktionspartnern von CDKA;1 zu detektieren.

Bei allen bisher durchgeführten Messungen wurde die Fluoreszenzintensität in den Kernen gemessen. Es wurde aber auch getestet, ob diese Ergebnisse mit der Fluoreszenz aus dem Zytoplasma reproduzierbar sind. Dies ist der Fall, wobei die gemessenen Fluoreszenzintensitäten etwas geringer sind. Die Tendenzen sind aber die gleichen wie bei den Messungen im Kern. Bei der späteren Umrechnung und Kombination der drei Messreihen können keine Unterschiede zwischen einer Messung im Kern und einer Messung im Zytoplasma mehr festgestellt werden.

3.3 Auswertung eines Split-Ubiquitin Screens mit CDKA;1

Das etablierte BiFC System sollte auch dazu dienen, einige in einen Split-Ubiquitin Screen gefundene Interaktoren von CDKA;1 zu verifizieren. Der Screen war Teil meiner Diplomarbeit (Pusch, 2004) und wurde mit CDKA;1 gegen eine cDNA Bibliothek durchgeführt. Er führte zu 672 Kolonien. Nach diversen Verfahren zur Reduktion von falsch positiven und Ausschluss der doppelt vorliegenden Proteine blieben 185 unterschiedliche Kandidaten übrig.

Tabelle 3.3: Bilanz des Screens mit CDKA;1

	Anzahl	Prozent
abgesammelte positive Kolonien	672	100,0
nach erneutem Ausplattieren nicht gewachsen	336	50,0
durch Testverdau als mehrfach vorliegend identifiziert	77	11,5
nach der Gap-Repair Transformation negativ	16	2,4
nach dem Sequenzieren mehrfach vorliegend	58	8,6
gefundene unterschiedliche Interaktoren	185	27,5

Da es nicht möglich war, von allen gefunden Proteinen die cDNA zu klonieren, um die Interaktion im BiFC System zu testen, musste eine Auswahl getroffen werden.

3.3.1 Sortierung der im Screen gefundenen cDNAs nach verschiedenen Kriterien

Um aus der großen Menge eine Auswahl für weitere Untersuchungen zu bestimmen, wurden die Interaktoren nach bestimmten Gesichtspunkten sortiert und in Kategorien eingeteilt. Die folgenden Abschnitte erläutern, nach welchen Kriterien die gefundenen Interaktoren sortiert wurden.

3.3.1.1 Vollständigkeit der cDNA

Das wichtigste Kriterium für die Auswahl aus diesem Screen war die Vollständigkeit des Gens. In dem Screen waren einige cDNAs vorhanden, die nur einen sehr kleinen Teil des Gens repräsentieren bzw. manchmal sogar nur ein UTR („untranslated region“). Die cDNAs, bei denen dies der Fall war, wurden ausgeschlossen. Das Minimum hierbei wurde auf 50 Basenpaare festgelegt. Durch diese Einschränkung wurde die Liste auf 144 Interaktoren reduziert.

3.3.1.2 Lage des Gens im Leseraster des Vektors

Die übrig gebliebenen 144 Interaktoren wurden in zwei Kategorien unterteilt. Als Auswahlkriterium hierfür wurde die Position des Gens im Leseraster des Vektors verwendet. Nur solche cDNAs, deren Leseraster mit dem des Vektors übereinstimmt, sollten zu funktionellen Fusionsproteinen führen. Dazu ist aber anzumerken, dass Hefe in der Lage ist unterschiedliche Leseraster zu kompensieren, wenn dies ihrem Überleben förderlich ist (persönliche Kommunikation von Filipa Santos). In die erste Kategorie wurden nur cDNAs aufgenommen die im Leseraster und mindestens 200 bp lang waren und solche, die nicht im Leseraster des Vektors lagen, aber vollständig vorlagen. In die zweite Kategorie kamen die Gene, die nicht vollständig und nicht im Leseraster waren oder zwar im Leseraster waren, aber über weniger als 200 bp lang waren. Der ersten Kategorie wurden so 76 Gene und der zweiten Kategorie 68 Gene zugeteilt. Die Gene in der ersten Kategorie haben die größte Wahrscheinlichkeit von Relevanz zu sein, da ihre komplette Sequenz vorliegt bzw. der vorliegende Teil so groß ist, dass wichtige Motive erhalten geblieben sein könnten. Bei der zweiten Kategorie ist

dies eher unwahrscheinlich. Selbst wenn die vorhandenen Teilstücke des Gens funktionelle Motive enthalten, ist wahrscheinlich, dass das daraus resultierende Proteinstück sich nicht richtig faltet.

3.3.1.3 Häufigkeit der cDNA im Screen

Ein weiteres Kriterium, nach dem gut sortiert werden kann, ist die Häufigkeit, mit der eine spezifische cDNA im Screen vorkommt. Die Häufigkeit, in der eine cDNA gefunden wird, hängt zum einen von ihrer Häufigkeit in der verwendeten cDNA-Bibliothek ab, zum anderen kann es aber auch ein Hinweis auf die Relevanz der gefundenen Interaktion sein. Die 10 häufigsten gefundenen cDNAs sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Die häufigsten cDNAs im Screen

Locus	Protein	Anzahl
At3g52590	ubiquitin extension protein 1 (UBQ1) / 60S ribosomal protein L40 (RPL40B)	22
At3g09630	60S ribosomal protein L4/L1	10
At5g38410	putative ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3b precursor	10
At4g33865	40S ribosomal protein S29 (RPS29C)	6
At5g02380	metallothionein protein 2B (MT-2B)	5
At5g18940	Mo25 family protein	5
At1g10590	DNA-binding protein-related	4
At4g10340	putative chlorophyll a/b-binding protein	4
At1g15690	vacuolar H ⁺ - pyrophosphatase (AVP-3)	2
At1g25275	expressed protein	2

Die häufigsten cDNAs codieren für ribosomale Proteine oder Proteine der Photosynthese. Deren cDNAs liegen überdurchschnittlich oft in der cDNA-Bibliothek vor, da diese Proteine ständig gebraucht werden und somit ihr Expressionslevel sehr hoch liegt. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ist davon auszugehen, dass die meisten davon falsch positive Interaktionen sind. Von größerem Interesse sind die cDNAs, von denen bekannt ist, dass sie nicht über ein so extrem hohes Expressionslevel verfügen.

3.3.1.4 Zellzyklusabhängige Expression der Interaktoren

Dieser Screen wurde mit CDKA;1, einem der wichtigsten Proteine des Zellzyklus, durchgeführt. Es kann also erwartet werden, dass auch einige seiner Interaktoren eine Rolle im Zellzyklus spielen. Ein Hinweis darauf, ob ein Protein eine Rolle im

Zellzyklus spielt, könnte an seiner Expression zu erkennen sein. Ist diese zellzyklus-spezifisch, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass auch das Protein eine Rolle im Zellzyklus spielt. Dank der Experimente von Menges *et al.* (2002) mit synchronisierten *A. thaliana* Zellkulturen ist es möglich, die gefundenen Interaktoren nach ihrer Expression im Zellzyklus einzuordnen.

Tabelle 3.5: Zellzyklus-spezifisch exprimierte Gene des Screen

Locus	Protein	Phase
At2g44460	glycosyl hydrolase family 1 protein	G1
At3g15353	metallothionein-like protein (MT3)	G1
At2g31570	glutathione peroxidase	S
At3g12500	basic endochitinase	S
At3g52850	vacuol sorting factor	S
At4g02520	glutathione S-transferase	G2
At2g46690	auxin-responsive family protein	M
At3g09390	metallothionein protein, putative (MT2A)	M
At4g23800	putative 98b protein / high mobility group (HMG1/2) family protein	M
At5g38410	putative ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3b precursor	M

Alle anderen cDNAs des Screens sind entweder nicht in den Experimenten von Menges *et al.* (2002) untersucht worden oder nicht spezifisch exprimiert.

3.3.1.5 Auffällige Häufung von Proteinen einer bestimmten funktionellen Gruppe (BINGO-Analyse)

Ein weiterer Hinweis auf Interaktionen von Relevanz könnte das überdurchschnittlich hohe Auffinden von Proteinen einer funktionellen Gruppe sein. Im Laufe des Zellzyklus muss immer wieder Einfluss auf bestimmte Prozesse genommen werden. Dies geschieht häufig durch Interaktion eines Proteins des Prozesses mit dem CDKA;1 Komplexes oder durch Phosphorylierung des Proteins durch diesen. Mit dem hier verwendeten Programm BINGO 2.0 ist es nun möglich, eine signifikante Häufung von Proteinen eines speziellen biologischen Prozesses zu finden. Das Programm vergleicht dafür die Anzahl der gefundenen Gene mit der Gesamtzahl der Gene, die für diesen Prozess zuständig sind. Für die Analyse wurden die Locus Nummern der gefundenen Gene des Screens eingegeben und der Organismus (*Arabidosis thaliana*) ausgewählt. Alle anderen Parameter des Programms wurden wie voreingestellt belassen. Das Programm ordnet die Locus Nummern ihren biologischen Prozessen in dem gewählten Organismus zu und stellt die Daten in einer Grafik dar (Abbildung 3.5). Zudem berechnet es noch,

ob die gefundenen Proteine dieses Prozesses signifikant überrepräsentiert sind. Dieses stellt das Programm dann farblich dar. Je dunkler ein Knoten ist, desto stärker sind diese Proteine überrepräsentiert. Eine starke Überrepräsentation wäre ein Hinweis darauf, dass dieser Prozess möglicherweise durch den CDKA;1 Komplex reguliert wird.

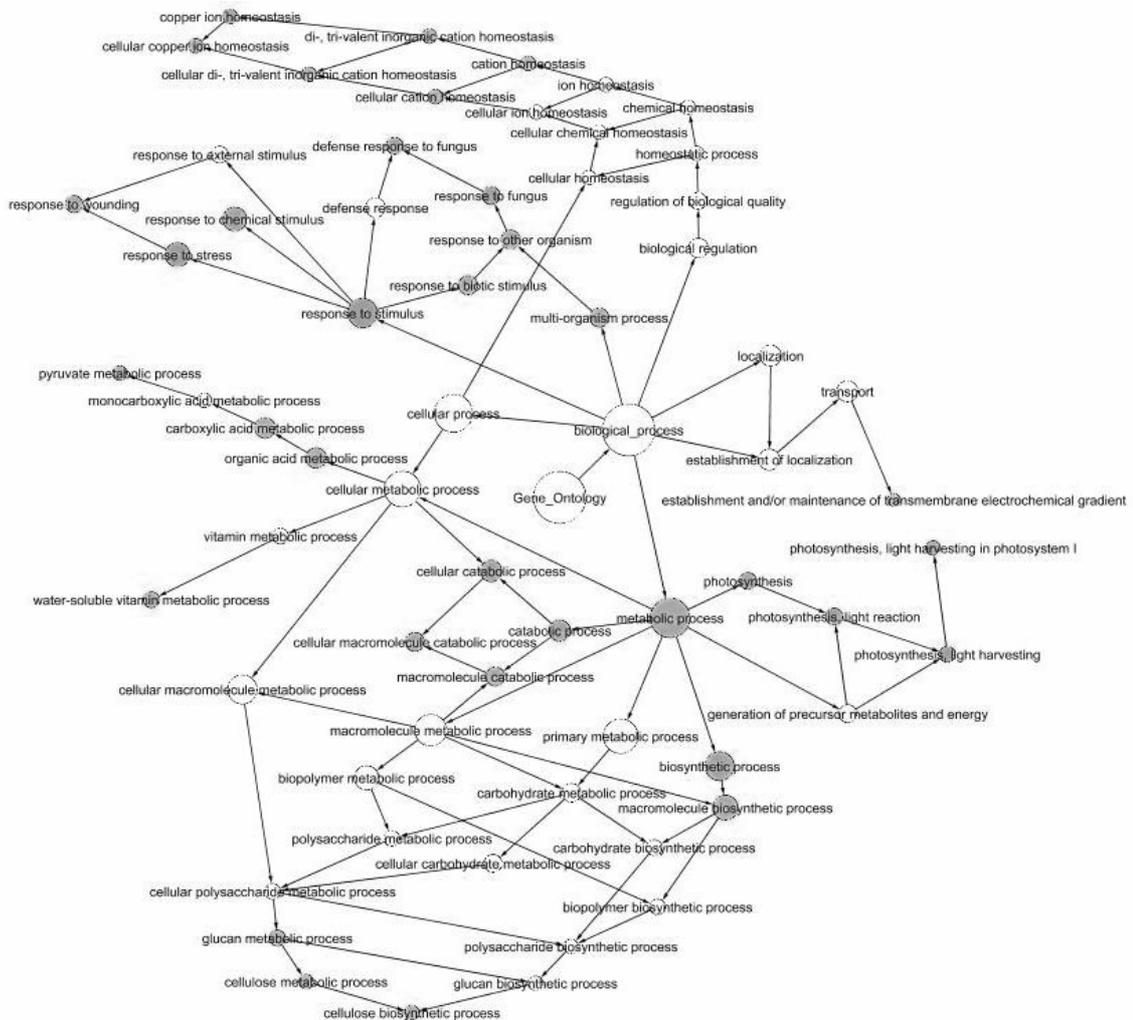


Abbildung 3.5: graphische Darstellung der BINGO Daten

Jeder abgebildete Knoten entspricht einem oder mehreren Genen des beschriebenen Prozesses. Die Größe der Knoten korreliert mit der Anzahl der von ihnen enthaltenen Gene. Je weiter außen sich die Knoten befinden, desto spezifischer ist dieser Prozess eingegrenzt und desto weniger Gene sind enthalten. Für die weitere Analyse sind die Knoten von Interesse, die am dunkelsten sind und am weitesten außen liegen. Einige dieser Knoten und die Gene, die sie repräsentieren, sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Gene von acht Knoten der BINGO Analyse

biologischer Prozess	Locus	Protein
cellulose biosynthese	AT5G16510	reversible glycosylated polypeptide
	AT5G64740	cellulose synthase, catalytic subunit
pyrovat metabolic process	AT1G13440	Glycin-3-aldehyd-3-phosphat dehydrogenase
	AT5G62790	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)
water soluble vitamin metabolic process	AT3G52930	fructose-bisphosphate aldolase
	AT3G02870	putative myo-inositol monophosphatase
	AT5G54770	thiazol biosynthese enzym
establishment and/or maintenace of electrochemical gradient	AT1G15690	vacuolar H ⁺ - pyrophosphatase (AVP-3)
light harvesting complex 1	AT3G61470	putative Lhca2 protein
	AT1G08380	photosystem I subunit O
response to wounding	AT3G12500	basic endochitinase
	AT2G37040	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)
	AT5G08790	no apical meristem (NAM) family protein / histone H1/H5 family protein
	AT1G76930	proline-rich extensin-like family protein / atExt4
defense response to wounding	AT4G12470	pEARLI 1-like protein
	AT3G12500	basic endochitinase
	AT2G37130	putative peroxidase ATP2a
	AT5G45110	regulatory protein NPR1-like; transcription factor inhibitor I kappa B-like
cellular copper ion homeostase	AT3G15353	metallothionein-like protein (MT3)
	AT3G09390	metallothionein protein, putative (MT2A)

3.3.1.6 Anzahl der möglichen Phosphorylierungs-Motiven für CDKA;1 und Bindungs-Motiven für CYCB1;2

Bei diesem Screen sind im Vergleich zu anderen „yeast two hybrid“ Screens mit CDKA;1 sehr viele Interaktionen gefunden worden. Eine Erklärung dafür wäre, dass mit dem Split-Ubiquitin System auch Enzym-Substrat Interaktionen gefunden wurden. Der CDKA;1 Komplex phosphoryliert sehr viele unterschiedliche Substrate (Ubersax JA 2003). Es stellt sich nun die Frage, ob das Split-Ubiquitin System sensitiv genug ist, um auch die nicht so langlebigen und schwächeren Enzym-Substrat Interaktionen zu detektieren. Dazu wurden bekannte Substrate (CDT1 und CDC6) in dem Split-Ubiquitin System getestet. Die Substrate wurden in beiden möglichen Vektoren (NuI und CKZ) in den Hefe-Stamm JD53 mit CDKA;1 in pMet transformiert und anschließend in einer Verdünnungsreihe auf verschiedenen selektiven Platten getestet. Als Positivkontrolle wurden die Interaktionspartner CDKA;1 und CKS verwendet, als Negativkontrolle wurde der leeren CKZ Vektor verwendet.

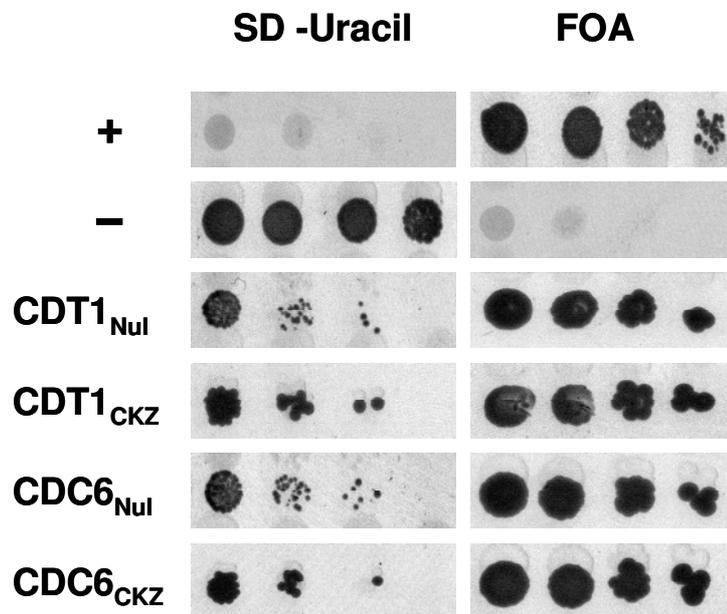


Abbildung 3.6: Wachstumsversuch von CDKA;1 in pMet mit CDT1 und CDC6 in NuI und CKZ: (+) Positivkontrolle mit CDKA;1 in pMet und CKS in NuI; (-) Negativkontrolle mit CDKA;1 in pMet und leerem CKZ Vektor

Dieser Versuch zeigt, dass es mit dem Split-Ubiquitin System möglich ist, Interaktionen einer Kinase mit ihren Substraten nachzuweisen. Es ist sogar nur ein geringer Wachstumsunterschied zwischen dem Interaktor CKS1 und den Substraten CDT1 und CDC6 zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass auch Substrate mit einer nicht so hohen Bindungsaffinität wie die getesteten als gefundene Interaktoren in Frage kommen.

Ein Hinweis auf ein mögliches Substrat von CDKA;1 ist das Vorhandensein eines Phosphorylierungs-Motives. Das Phosphorylierungs-Motiv für CDKA;1 ist S/T-P-X-K/R. CDKA;1 phosphoryliert auch dann, wenn nur S/T-P als Motiv vorliegt. Ein

weiterer Hinweis auf ein mögliches Substrat von CDKA;1 könnte auch das Vorliegen eines Bindungs-Motives für CYCB1;2 sein. Das Bindungs-Motiv für CYCB1;2 ist R-X-L. Die gefundenen Interaktoren des Screens wurden mit Hilfe von Maren Heese („Plant Computational Biology“ Gruppe am Max Planck Institut für Züchtungsforschung) nun nach diesen Motiven durchsucht (kleiner Auszug in Tabelle 3.6, komplette Tabelle im Anhang).

Tabelle 3.7: Proteine des Screens mit den meisten vollständigen Phosphorylierungs-Motiven für CDKA;1

Locus	Protein	S/T-P-X-K/R	S/T-P	R-X-L
AT1G23860	9G8-like splicing factor / SRZ-21	4	10	1
AT5G45510	leucine-rich repeat family protein	4	6	9
AT2G23700	expressed protein	2	16	5
AT3G55270	MAP kinase phosphatase (MKP1)	2	12	1
AT3G26510	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	2	6	1
AT2G17033	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2	5	3
AT2G31060	elongation factor protein	2	5	3
AT2G45180	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2	5	0
AT3G05060	putative SAR DNA-binding protein-1	2	4	4
AT4G30270	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase precursor	2	2	0

3.3.1.7 Vergleich mit anderen Screens von CDKA;1 bzw. deren Homologe in anderen Organismen

Mit den CDKA;1-Homologen anderer Organismen sind schon diverse Screens durchgeführt worden. Am häufigsten mit CDC28 aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Ein veröffentlichter Screen ist aber in Bezug auf den vorliegenden Screen sehr interessant, da in diesem Screen gezielt nach Substraten der CDC28 gesucht wurde. In dem Screen wurde die ATP-Bindungstasche der CDC28 so vergrößert, dass sie ein größeres, radioaktiv markiertes ATP-Derivat (γ -³²P-N₆-Benzyl-ATP) verwenden kann. Dieses Derivat konnte dann dafür verwendet werden, die mit diesem, durch Antikörper erkennbaren, Derivat phosphorylierten Proteine aufzureinigen und zu bestimmen. Für die gefundenen Interaktoren wurden deshalb die Homologen Proteine in Hefe gesucht und mit der Liste aus der Publikation verglichen (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.8: Übereinstimmende Proteine des Screens mit den Hefehomologen aus Übersax et al.

Locus	Protein	Homologe in Übersax et al.
At4g14320	60S ribosomal protein L36a/L44 (RPL36aB)	YNL162W
At4g30270	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase precursor	YEL040W
At3g07160	glycosyl transferase family 48 protein	YLR342W
At5g02500	DnaK-type molecular chaperone hsc70.1	YAL005C
At5g04040	patatin-related	YKR089C, YOR081C
At5g45510	leucine-rich repeat family protein	YIL106W

3.3.2 Auswahl der cDNAs

Die in Kapitel 1.3.1 durchgeführten Sortierungen der cDNAs erleichtern nun die Auswahl einiger Kandidaten. Die Kandidaten für weitere Untersuchungen wurden aus den cDNAs ausgewählt, die in den unterschiedlichen Sortierungen möglichst hoch rangierten. Einige interessante cDNAs konnten leider nicht verwendet werden, da es sie weder bei RIKEN (www.brc.riken.jp) noch bei einer anderen cDNA Bank zu bestellen gab, und alle Versuche gescheitert sind, sie selbst zu klonieren.

3.3.2.1 Proteine des Glutathion-Stoffwechsels

Diese Proteine sind wegen ihrer Häufung in der BINGO-Analyse aufgefallen. Drei Proteine sind in der Gruppe der Proteine zu finden, die auf einen chemischen Stimulus reagieren. Dies sind GSTF9 (At2g30860), GSTF10 (At2g30870) und GSTF2 (At4g02520), alle sind je zweimal im Screen gefunden worden und gehören noch zur gleichen Familie. Das vierte Protein, GPX2 (At2g31570), ist mit aufgenommen worden, da es mit Glutathion zu tun hat und zellzyklus-spezifisch in der S-Phase exprimiert ist. Von den drei anderen Proteinen ist nur GSTF2 zellzyklus-spezifisch in der G2-Phase exprimiert. Alle Proteine besitzen Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1.

3.3.2.2 Proteine der Metallothionin-Familie

Diese Gruppe ist ebenfalls durch die BINGO Analyse aufgefallen. Die Gruppe der Proteine, die für die Kupfer Ionen Homeostase zuständig ist, umfasst zwei Proteine, MT2A (At3g09390) und MT3 (At3g15353). MT3 konnte leider nicht kloniert werden, aber es konnte noch ein weiteres Protein dieser Familie gefunden werden. Das Protein MT2B (At5g02380) gehört ebenfalls zur Gruppe der Metallothionine. Es ist leider in der BINGO Analyse nicht aufgetaucht, da dessen biologische Funktion noch nicht in der Datenbank, die zum Vergleich hinzugezogen wurde, eingetragen ist. Deshalb wurde es in der Analyse nicht berücksichtigt. Zusätzlich zu den oben genannten Gründen

punkten beide Proteine noch in anderen Kategorien. MT2A ist zellzyklus-spezifisch in der M-Phase exprimiert. MT2B ist fünfmal im Screen zu finden.

3.3.2.3 Proteine des Lipid-Stoffwechsels

Aufgrund einer Beobachtung (persönliche Kommunikation mit Nico Dissmeyer) an homozygot mutanten *cdka;1^{-/-}* Pflanzen, die partiell durch die unter dem endogenen Promotor exprimierte Variante CDKA;1 (T161D) gerettet werden, wurde SDP1 (At5g04040) als Kandidat ausgewählt. Die CDKA;1 (T161D) Pflanzen keimen langsamer auf MS-Platten ohne Saccharose. Mit Saccharose ist dieser Phänotyp nicht zu sehen. Einen ähnlichen Phänotyp haben auch Pflanzen, in denen das Protein SDP1 fehlt (Eastmond 2006). SDP1 mutante Pflanzen keimen schlechter, da die eingelagerten Speicher-Lipide bei der Keimung nicht mobilisiert werden können. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass SDP1 von CDKA;1 phosphoryliert werden muss, bevor es aktiv wird. Nach Rücksprache mit Prof. Dr. Eastmond wurden alle Proteine des Screens näher untersucht, die mit der Lipid Mobilisierung und Verstoffwechslung zu tun haben. Diese sind LOX1 (At1g55020), SDP1 (At5g04040) und zwei unbekannte Proteine (At2g45180, At5g05960), die zu der Familie der „protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)“ Proteine gehören. LOX1 und SDP1 sind noch in jeweils einer anderen Kategorie hoch platziert. LOX1 wurde zweimal im Screen gefunden und für SDP1 wurden gleich zwei Homologe in dem Hefe Screen von Uebersax *et al.* (2003) gefunden.

3.3.2.4 Proteine mit F-Box Motiv

Im Screen befanden sich zwei Proteine, die ein F-Box Motiv aufweisen. F-Box Proteine sind bekannt, dass sie für den spezifischen Abbau von Proteinen sorgen. Dies ist gerade für den Zellzyklus sehr wichtig. Die F-Box Proteine sind LKP2 (At1g51550) und MDH9.4 (At5g42350). Beide Proteine sind aber außerdem noch in jeweils einer Kategorie aufgefallen. LKP2 ist in der BINGO Analyse in einer signifikanten Gruppe zu finden und MDH9.4 ist zweimal im Screen gefunden worden.

3.3.2.5 Bekannte Substrate von CDKA;1

In dieser Gruppe befinden sich fünf Proteine, deren Homologe in Hefe als Substrate der CDC28 identifiziert worden sind. Zudem sind sie noch in folgenden Kategorien aufgefallen. Zwei der Proteine, RPL36aB (At4g14320) und MERI5B (At4g30270), sind jeweils zweimal im Screen gefunden worden. Drei der Proteine, RPL36aB, HSC70.1 (At5g02500) und MCF19.18 (At5g45510), sind auch noch in signifikanten Gruppen der BINGO Analyse zu finden. Das fünfte Protein GSL10 (At3g07160) fällt in keiner weiteren Kategorie auf. Bei dem Protein RPL36aB ist noch anzumerken, dass es weder in *A. thaliana*, noch in *S. cerevisiae* Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1 bzw. CDC28 aufweist, obwohl es als Substrat identifiziert worden ist. Auch die Bindungs-Motive für Cyclin fehlen in beiden Homologen. Alle anderen Proteine besitzen zumindest Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1.

3.3.2.6 Häufig im Screen gefundene Proteine

Die zwei Proteine, ein unbekanntes Protein (At1g10590) und MXI10.13 (At5g38410), dieser Gruppe wurden als Repräsentanten für die häufig im Screen gefundenen Proteine gewählt. Sie wurden rein zufällig ausgewählt. Eines, das sehr häufig (≥ 10) gefunden wurde, und eines, das häufig (> 2) gefunden wurde.

3.3.2.7 Proteine des Pyrovat Metabolismuses

Diese Proteine, GAPC-2 (At1g13440) und DXR (At5g62790), wurden ausgewählt, da sie eine signifikante Gruppe in der BINGO Analyse darstellen. Außerdem ist GAPC-2 zweimal im Screen gefunden worden.

3.3.2.8 Membranproteine

Das Split-Ubiquitin System wurde entwickelt, um auch Interaktionen von Membranproteinen nachzuweisen. Deshalb wurden die beiden unbekannt Proteine (At1g25275 und At2g37200) gewählt. Das Protein (At1g25275) ist ein Protein des Endomembransystems, also sollte es im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi und den Vesikeln zu finden sein. Das Protein (At2g37200) ist ein Membranprotein und sollte in der Plasmamembran oder der Membran der Vakuole zu finden sein. Mit diesen Proteinen sollte gezeigt werden, ob das BiFC System in der Lage ist, ebenfalls Interaktionen von Membranproteinen nachzuweisen. Beide Proteine geben recht gute Kandidaten ab, da sie beide zweimal im Screen gefunden worden sind.

3.3.2.9 Einzelne Proteine

Die vier Proteine dieser letzten Gruppe wurden aus den unterschiedlichsten Gründen gewählt.

Das Protein UBC35 (At1g78870) wurde gewählt, weil es ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und somit für den Abbau von Proteinen zuständig ist. Der Proteinabbau spielt wiederum im Zellzyklus eine wichtige Rolle und ist für seinen geordneten Ablauf essentiell. Es ist in dieser Funktion auch in der BINGO Analyse in der signifikanten Gruppe der Proteine aufgetaucht, die für Abbauprozesse zuständig sind.

MQK4.26 (At5g16510) ist genommen worden, da es in der BINGO Analyse in einer der signifikanten Gruppen auftaucht, die unter den oben genannten Proteinen noch nicht vertreten ist.

Die GTPase RAN1 (At5g20010) wurde gewählt, weil sie ein regulatorisches Protein des Kern-Imports und Exports ist. Sie regelt den Transport von Proteinen und RNA. Kernlokalisierung ist für einige Proteine des Zellzyklus sehr wichtig, da sie nur im Kern ihre Funktion ausführen können.

Das Protein HOS15 (At5g67320) ist wegen seines WD40-Motives interessant. Das WD40-Motiv ist in vielen Proteinen zu finden, die als Plattform für den Aufbau eines Multi-Protein Komplexes dienen. Das WD40-Motiv dient dabei als Ort der Protein-Protein Interaktion.

Die ausgewählten Proteine sind zur Übersicht in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Kandidaten für den Test im BiFC System und ihre Ergebnisse in den oben genannten Kategorien 3.3.1. x siehe Tabellenkopf

Locus	.2	.3	.4	.5	S/T-P-X-K/R	S/T-P	R-X-L	.7
At1g10590	1	4		--	0	0	0	
At1g13440	1	1		pyrovat metabolic process	0	0	0	
At1g25275	1	2			0	0	0	
At1g51550	2	1		water soluble vitamin metabolic process	0	4	4	
At1g55020	1	2		--	0	4	3	
At1g78870	1	1		cellular catabolic process	0	3	2	
At2g30860	1	2		response to chemical stimulus	1	1	1	
At2g30870	1	2		response to chemical stimulus	1	1	1	
At2g31570	2	1	S	--	0	4	0	
At2g37200	1	2		--	0	1	1	
At2g45180	1	1		--	2	5	0	
At3g07160	2	1		--	0	6	12	YLR342W
At3g09390	1	1	M	cellular copper ion homeostase	0	0	0	
At4g02520	1	2	G2	respose to chemical stimulus	1	1	1	
At4g14320	1	2		macromolecule biosynthetic process	0	0	0	YNL162W
At4g30270	1	2		--	2	2	0	YEL040W
At5g02380	1	5		--	0	0	0	
At5g02500	2	1	--	response to stress	0	2	3	YAL005C

At5g04040	1	1		cellular catabolic process	1	8	11	YKR089C, YOR081C
At5g05960	1	1		--	0	0	0	
At5g16510	1	1		cellulose biosynthese	0	1	1	
At5g20010	1	2		--	0	1	3	
At5g38410	1	10	M	metabolic process	0	4	0	
At5g42350	2	2		--	0	3	4	
At5g45510	2	1		response to stimulus	4	6	9	YIL106W
At5g62790	2	1		pyrovat metabolic process	0	2	0	
At5g67320	1	1		--	0	0	0	

3.3.3 Lokalisierung der Proteine in Tabak (*Nicotiana benthamiana*)

Das BiFC System hat den großen Vorteil, die Interaktionen in dem Kompartiment sichtbar zu machen, in dem sie stattfinden. Es ist also für dieses System wichtig zu wissen, wo die einzelnen Proteine lokalisiert sind. Die Lokalisierung der meisten hier verwendeten Proteine ist zwar bekannt, doch muss überprüft werden, ob diese Lokalisierung auch noch in Tabak dieselbe ist. Hierfür wurden die cDNAs in einen Vektor (pEXSG-YFP) kloniert, indem ein YFP C-terminal mit dem Protein fusioniert wurde. Dieses Konstrukt wurde dann in Agrobakterien transformiert und in Tabakblätter injiziert. Die Lokalisation wurde dann mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops sichtbar gemacht. Zur Überprüfung wurde die Lokalisierung in der Datenbank der TAIR-Homepage (www.arabidopsis.org) recherchiert.

Tabelle 3.10: Lokalisierung der YFP-Fusionsproteine; -- kein Signal, ((+)) sehr schwaches Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal, ++ starkes Signal

Locus	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
At1g10590	Endomembran-System	+	+	--	
At1g13440	Zytoplasma	+	(+)	--	
At1g25275	Endomembran-System	+	--	--	
At1g51550	Chloroplast	+	+	--	
At1g55020	unbekannt	+	(+)	--	schwaches Signal
At1g78870	Zytoplasma	+	+	--	
At2g30860	Zytoplasma	+	+	--	
At2g30870	Zytoplasma	+	+	--	
At2g31570	Zytoplasma	+	+	--	
At2g37200	membrangebunden	+	--	--	viele kleine Punkte im Zytoplasma
At2g45180	Chloroplast	+	(+)	--	schwaches Signal; z.T. auch im Kern zu finden
At3g07160	membrangebunden	+	--	--	
At3g09390	unbekannt	+	+	--	
At4g02520	membrangebunden	+	+	--	
At4g14320	Ribosom	(+)	+	++	
At4g30270	Zytoplasma	+	--	--	
At5g02380	unbekannt	+	+	--	
At5g02500	Zytoplasma	+	(+)	--	
At5g04040	Ölkörper, Zytoplasma	+	--	--	
At5g05960	Endomembran-System	+	((+))	--	sehr schwaches Signal; z.T. auch im Kern zu finden
At5g16510	Golgi, Zellwand	+	((+))	--	

At5g20010	Kern, Zytoplasma	(+)	+	+	z.T. starkes Signal im Nucleolus
At5g38410	Chloroplast	--	--	--	Signal in den Chloroplasten, z.T. sublokalisiert in Punkten
At5g42350	unbekannt	+	+	--	
At5g45510	unbekannt	+	--	--	
At5g62790	Chloroplast	--	--	--	Signal in den Chloroplasten
At5g67320	Kern, Zytoplasma	+	(+)	--	

Zwei Proteine (At1g51550 und At2g45180) weichen völlig von ihrer Lokalisierung ab und sind statt in den Chloroplasten im Zytoplasma und im Kern zu finden. Die Proteine (At1g10590, At1g25275 und At5g05960), die sich eigentlich im endomembranen System aufhalten sollten, sind frei im Zytoplasma zu finden. Es gibt keine Anzeichen für eine Konzentrierung im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi oder Vesikeln. Zudem sind At1g10590 und weniger stark auch At5g05960 auch im Kern zu finden. Dort allerdings auch nicht in oder an der Kernmembran. Die membrangebundenen Proteine (At2g37200, At3g07160 und At4g02520) verhalten sich ebenfalls anders als erwartet. Alle sind im Zytoplasma zu finden und At4g02520 auch noch im Kern. Keines der drei Proteine zeigt ein stärkeres Signal an irgendeiner Membran. Bei At3g07160 ist dies damit zu erklären, dass es nicht möglich war, die vollständige cDNA (~6 kb) zu klonieren. Es wurde nur der Teil der cDNA verwendet, der im Split-Ubiquitin Screen eine Interaktion hervorgerufen hat. Das daraus resultierende Protein besitzt keine Motive, die zu Verankerung in der Membran nötig wären.

Alle anderen Proteine sind so lokalisiert, wie es in der TAIR Datenbank angegeben ist.

3.3.4 Auswertung der Interaktionen im BiFC System

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der BiFC Versuche mit den ausgewählten Interaktoren aufgeführt. Alle Versuche wurden immer parallel mit je einer Positivkontrolle (CDKA;1 in pSYC und CKS1 in pSYN) und einer Negativkontrolle (verwendeter Interaktor in pSYN und GUS in pSYC) durchgeführt. Die CDKA;1 Varianten sind alle sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern und auch schwach im Nucleolus lokalisiert. Die Messungen werden für die Analyse mit den Messungen von CDC6 für Substrate (Abbildung 3.3) und mit der Messung von CYCB1;2 für Interaktionen (Abbildung 3.4) verglichen. Falls Interaktionen nicht nachweisbar waren, so wurden sie mehrfach in Tabak wiederholt. Blieben die Wiederholungen ohne Erfolg, so wurden die gleichen Versuche in *A. thaliana* Blättern durchgeführt. Zu der

Durchführung dieser Experimente in *A. thaliana* Blättern ist anzumerken, dass diese seltener zum Erfolg führen. Die Blätter sterben sehr häufig ab und wenn Signale vorhanden sind, so sind diese nur sehr schlecht auszuwerten. Man kann aber so ausschließen, dass die Versuche nicht funktioniert haben, weil sich die Proteine nicht in dem richtigen Organismus befunden haben.

3.3.4.1 Proteine des Glutathion Stoffwechsels

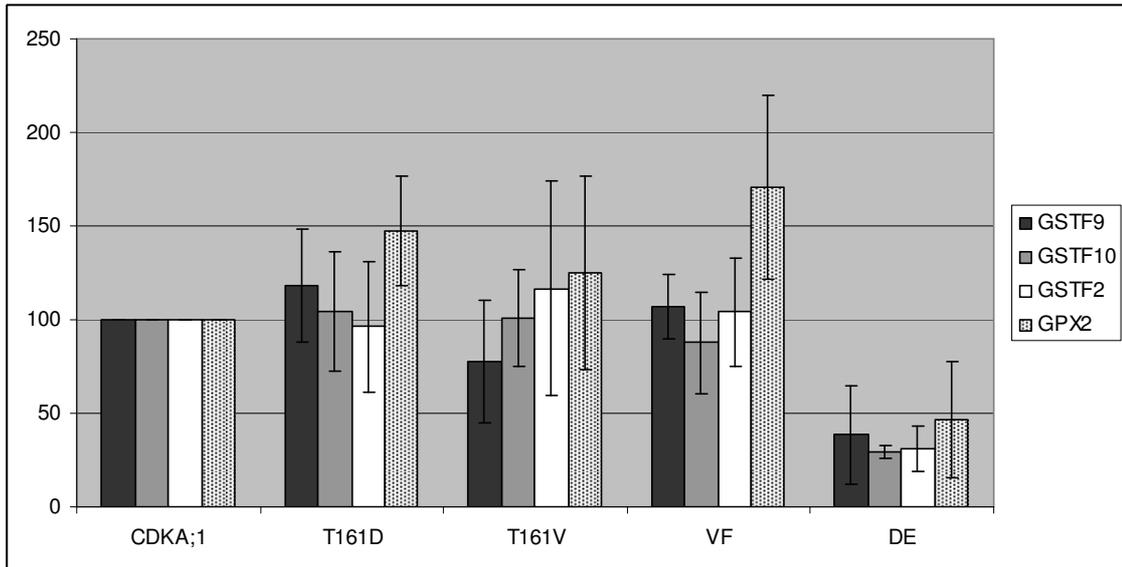


Abbildung 3.7: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit GSTF9 (At2g30860), GSTF10 (At2g30870), GSTF2 (At4g02520) und GPX2 (At2g31570)

GSTF2, GSTF9 und GSTF10 zeigen keine Hinweise darauf, dass es sich um mögliche Substrate handeln könnte. Die Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten von denen der gemessenen Interaktoren (Abbildung 3.4) sind nicht signifikant. Die drei Proteine sind also als Interaktoren einzustufen und nicht als mögliche Substrate. GPX2 zeigt mit allen veränderten CDKA;1 Varianten eine stärkere Interaktion, aber auch diese sind nicht signifikant abweichend. Auch dieses Protein ist kein mögliches Substrat von CDKA;1, sondern ein Interaktor.

3.3.4.2 Proteine der Metallothionin Familie

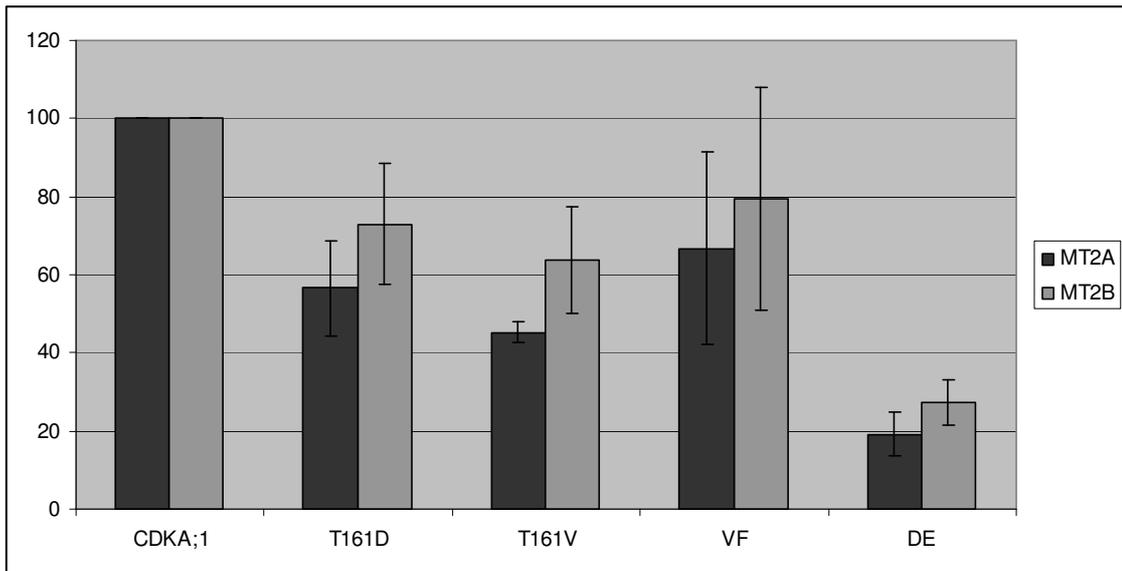


Abbildung 3.8: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit MT2A (At3g09390) und MT2B (At5g02380)

Bei beiden Proteinen deuten die Messwerte darauf hin, dass es sich um Substrate von CDKA;1 handeln könnte. Deutlich zu erkennen ist der Abfall der Werte von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (V). Wobei bei MT2B die Fluoreszenzintensitäten im Allgemeinen etwas höher sind als bei MT2A. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MT2B eine höhere Affinität zu CDKA;1 hat als MT2A. Beide Proteine haben aber keine Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1 und auch keine Bindungsmotive für CYCB1;2, was ihrer Funktion als Substrat eigentlich widerspricht.

3.3.4.3 Proteine des Lipid Stoffwechsels

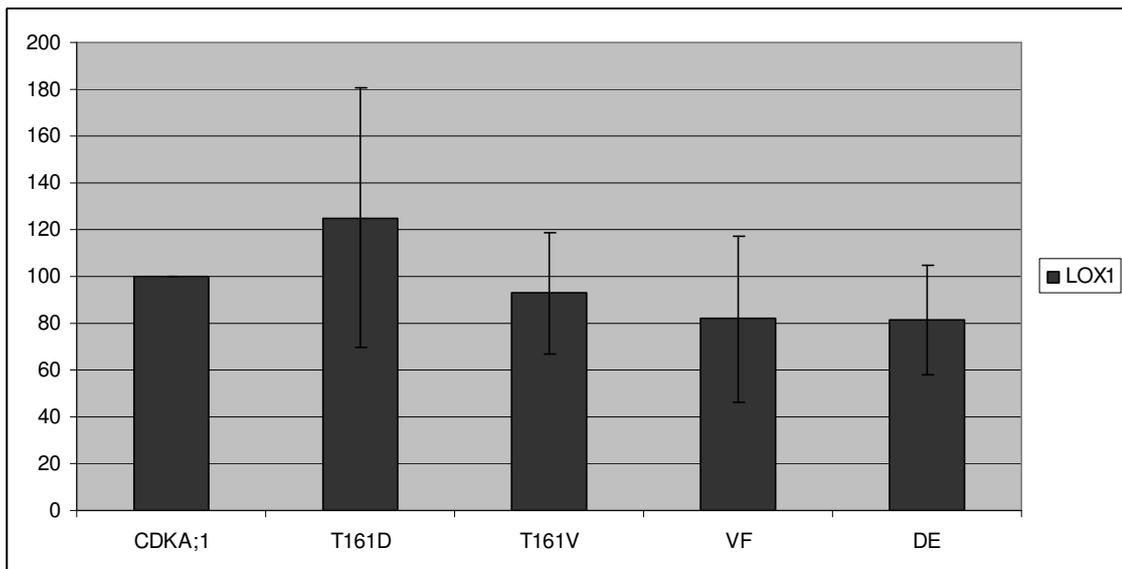


Abbildung 3.9: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit LOX1 (At1g55020)

Aus dieser Gruppe war es nur bei den Interaktionen mit LOX1 möglich, eine Quantifizierung der BiFC Signale zu erstellen. Die Messwerte deuten auf einen Interaktor hin. SDP1 zeigt eine sehr schwache Interaktion mit CDKA;1 und CDKA;1 (VF). Bei allen anderen CDKA;1 Varianten sind keine Signale mehr zu erkennen. Das Protein sollte sich eigentlich wie ein Substrat verhalten, es besitzt Phosphorylierungsmotive für CDKA;1 und es sind in dem Screen von Ubersax *et al.* (2003) zwei Homologe von SDP1 gefunden worden. Das gezeigte Verhalten könnte auf ein Substrat hindeuten, das eine sehr geringe Affinität zu CDKA;1 aufweist, sodass diese mit dem BiFC System nicht nachzuweisen ist. Die anderen beiden Proteine (At2g45180 und At5g05960) zeigen keine Interaktion mit den CDKA;1 Varianten. Beide befinden sich vollständig in den Chloroplasten und dort ist eine Interaktion mit den CDKA;1 Varianten nicht möglich. Um sicherzustellen, dass die Proteine sich in ihrem Ursprungsorganismus gleich verhalten, wurden die Versuche in *A. thaliana* Blättern wiederholt. Auch in *A. thaliana* sind beide Proteine nur in den Chloroplasten zu finden und zeigen dementsprechend auch keine Interaktion mit den CDKA;1 Varianten.

3.3.4.4 Proteine mit F-Box Motiv

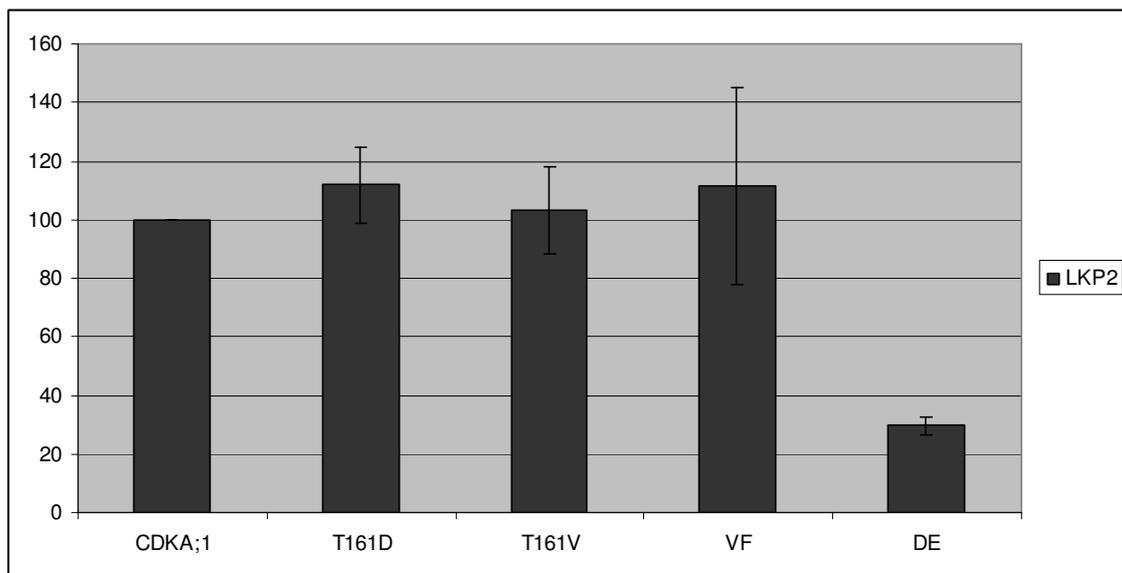


Abbildung 3.10: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit LKP2 (At1g51550)

Beide Proteine zeigten Interaktionen mit den CDKA;1 Varianten, doch waren sie bei MDH9.4 leider zu schwach um sie zu quantifizieren. Die Messwerte von LKP2 weisen auf ein Interaktor von CDKA;1 hin.

3.3.4.5 Bekannte Substrate von CDKA;1

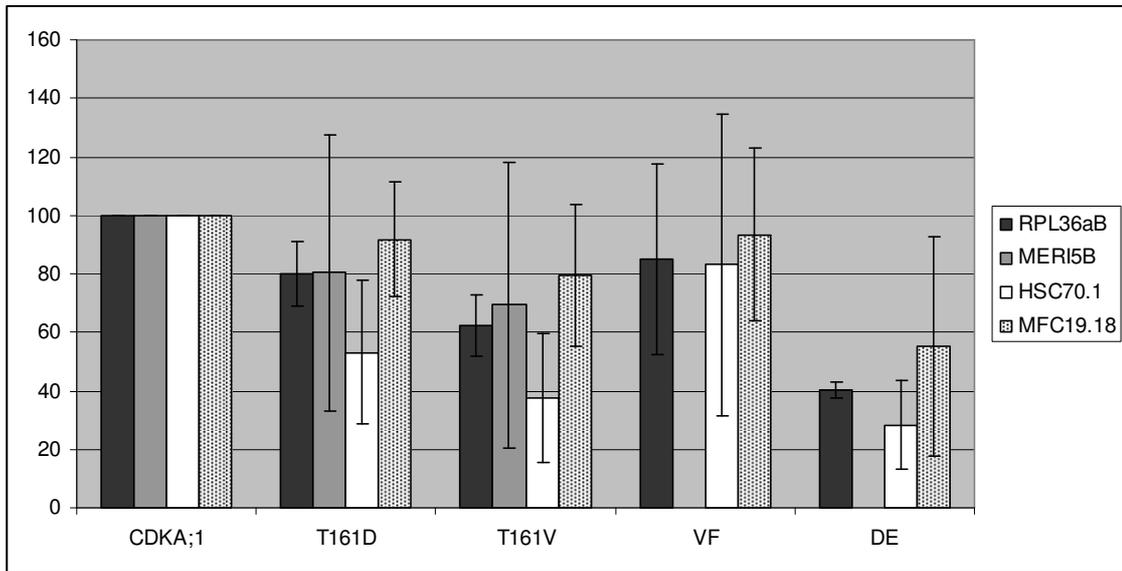


Abbildung 3.11: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit RPL36aB (At5g14320), MERI5B (At4g30270), HSC70.1 (At5g02500) und MFC19.18 (At5g45510)

Die Interaktion von GSL10 (At3g07160) konnte im BiFC System nicht bestätigt werden. Dies kann nicht an der Lokalisierung des Proteins liegen, da es zusammen mit CDKA;1 im Zytoplasma vorliegt. Wie zu erwarten, deuten die Messwerte bei den verbleibenden vier Proteinen auf Substrate hin, wobei für MERI5B keine Messwerte für die CDKA;1 Varianten CDKA;1 (VF) und (DE) ermittelt werden konnten, da es keine Signale gab. Die Proteine scheinen unterschiedliche Affinität zu CDKA;1 zu haben und könnten wie folgt nach absteigender Affinität sortiert werden:

$$\text{MFC19.18} > \text{MERI5B} > \text{RPL35aB} > \text{HSC70.1}$$

Damit konnten hier bekannte Substratinteraktionen zwischen CDC28/Cdk1 und ihren Zielproteinen (Ubersax JA 2003) mit dem *A. thaliana* Homolog CDKA;1 auch nachgewiesen werden.

3.3.4.6 Häufig im Screen gefundene Proteine

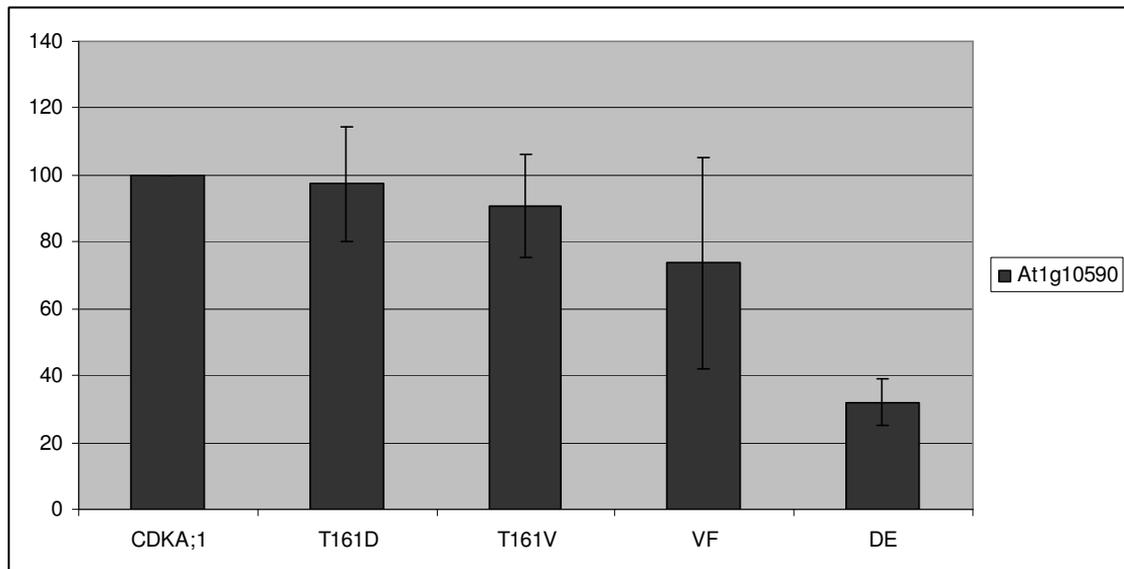


Abbildung 3.12: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit einem unbekanntem Protein (At1g10590)

MXI10.13 zeigt keine Interaktion mit den CDKA;1 Varianten. Dies liegt wahrscheinlich an seiner Lokalisierung. Es ist nur in den Chloroplasten zu finden und somit ist keine Interaktion mit CDKA;1 möglich. Eine Wiederholung der Lokalisierungs- und Interaktionsversuche in Blättern von *A. thaliana* führten zu den gleichen Ergebnissen. Die Messdaten für das unbekannte Protein (At1g10590) sind nicht eindeutig. Es gibt einen Abfall der Fluoreszenzstärke von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (T161V) doch ist dieser nur sehr gering und nicht aussagekräftig. Der niedrige Wert für CDKA;1 (DE) weist auf ein Substrat hin. Insgesamt kann aber keine Aussage getroffen werden, ob es sich um ein mögliches Substrat oder einen Interaktor handelt.

3.3.4.7 Proteine des Pyrovat Metabolismus

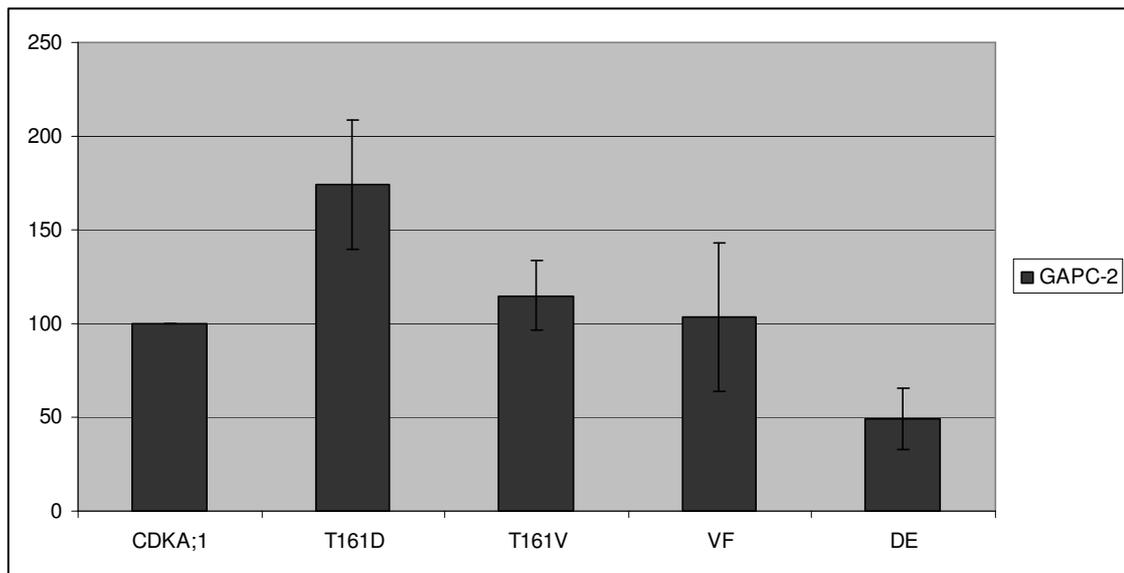


Abbildung 3.13: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit GIPC-2 (At1g13440)

Von den beiden Proteinen dieser Gruppe zeigt nur GIPC-2 Interaktionen mit den CDKA;1 Varianten. Das Verhalten von GIPC-2 deutet auf einen Interaktor hin, wobei der Messwert für die Interaktion mit CDKA;1 (T161D) signifikant erhöht ist. Dieses Verhalten ist sonst bei keinem anderen Interaktor zu erkennen. Dass DXR (At5g62790) keine Interaktionen mit den CDKA;1 Varianten zeigt, könnte durch seine Lokalisierung in den Chloroplasten bedingt sein. Die gleichen Versuche wurden mit DXR in *A. thaliana* Blättern wiederholt. DXR ist in *A. thaliana* ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert und interagiert nicht mit den CDKA;1 Varianten.

3.3.4.8 Membranproteine

Beide Proteine zeigen keinerlei Interaktion mit den CDKA;1 Varianten. Das Protein (At1g25275) befindet sich allerdings im Zytoplasma und somit im gleichen Kompartiment wie die CDKA;1 Varianten. Das Protein (At2g37200) befindet sich nur in kleinen Punkten im Zytoplasma und somit wahrscheinlich nicht im gleichen Kompartiment wie die CDKA;1 Varianten. Was diese Punkte darstellen, konnte leider nicht geklärt werden. Chloroplasten und Vakuolen konnten als Ort der Lokalisierung jedoch ausgeschlossen werden. Die Experimente wurden für beide Proteine in *A. thaliana* Blättern wiederholt. Beide Proteine zeigten aber dieselbe Lokalisierung wie auch schon in Tabak und eine Interaktion mit den CDKA;1 Varianten konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

3.3.4.9 Einzelne Proteine

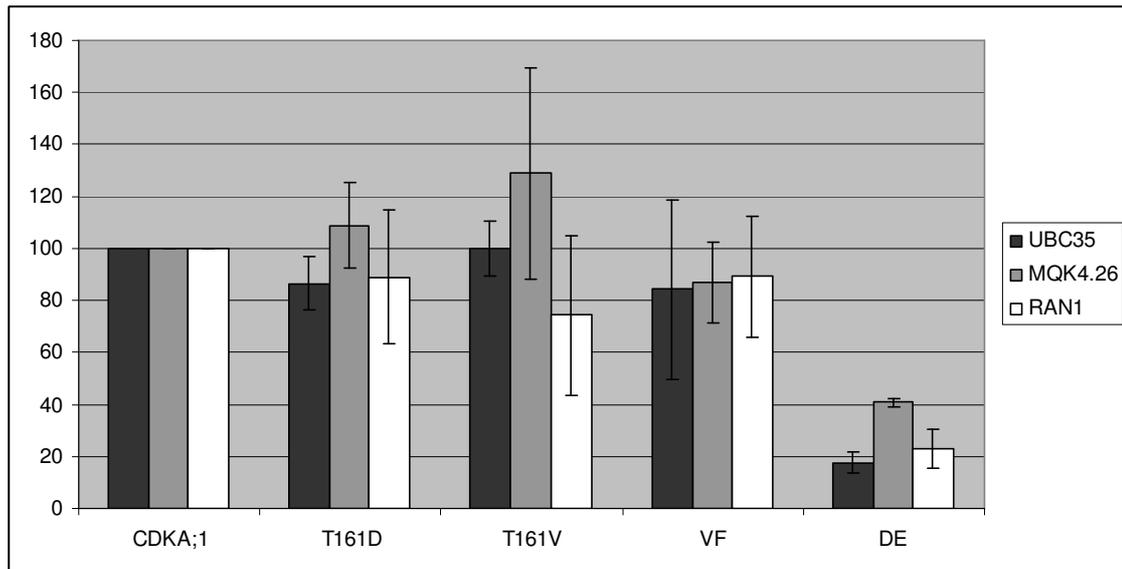


Abbildung 3.14: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit UBC35 (At1g78870), MQK4.26 (At5g16510) und RAN1 (At5g20010)

Aus dieser Gruppe interagierte HOS15 (At5g67320) nicht mit den CDKA;1 Varianten. Das Muster der Fluoreszenzintensitäten für UBC35 und MQK4.26 ist weder mit denen eines Substrates, noch mit denen eines Interaktors vergleichbar. Auf einen Interaktor weisen die Werte von CDKA;1 (T161V) und CDKA;1 (VF) hin. Die Werte von CDKA;1 (DE) sind stark erniedrigt, was sonst nur der Fall bei einem Substrat ist. Bei diesen Proteinen ist also nicht möglich, sie den Interaktoren oder Substraten von CDKA;1 zuzuordnen. RAN1 hingegen verhält sich wie ein Substrat. Die Messwerte für CDKA;1 (T161D) und (T161V) sind sehr hoch, aber man sieht trotzdem den Abfall der Signalstärken von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (T161V). Auch der niedrige Messwert für CDKA;1 (DE) ist ein Indiz für ein Substrat.

3.3.4.10 Zusammenfassung

Von den 27 getesteten Interaktoren der CDKA;1 konnten 19 Interaktionen bestätigt werden. Davon konnten 7 Proteine als mögliche Interaktoren und weiter 7 als mögliche Substrate identifiziert werden. Bei drei der bestätigten Interaktionen konnte keine eindeutige Zuordnung zu den Interaktoren oder Substraten von CDKA;1 getroffen werden und mit den übrigen zwei Interaktionen konnten keine Messungen durchgeführt werden, weil sie Signale zu schwach waren. Nur für 8 Proteinen konnte im BiFC System keine Interaktion mit CDKA;1 mehr festgestellt werden. Dies lag bei fünf davon wahrscheinlich an ihrer Lokalisation, bei den restlichen drei handelt es sich wahrscheinlich um falsch positive Interaktionen des Split-Ubiquitin Systems. Von besonderem Interesse sind nun die Substrate, die bisher noch nicht als solche identifiziert worden sind. Dies sind die beiden MT Proteine und RAN1. Auch von Interesse ist die Interaktion von CDKA;1 mit SDP1, da für diese Interaktion weitere Hinweise darauf hindeuten, dass sie von Bedeutung ist.

3.3.5 Weiterführende Analysen von gefundenen Interaktoren

Zwei gefundene Interaktoren waren von besonderem Interesse. Zum einen SDP1, da es einen direkten Zusammenhang von Keimung und Zellzyklus darstellen könnte und zum anderen RAN1, da es ein mögliches Substrat ist.

3.3.5.1 Weiterführende Experimente mit SDP1

SDP1 (At5g04040) hat in der BiFC Analyse nur Interaktion mit CDKA;1 und CDKA;1 (VF) gezeigt. Dies spricht eher für ein Substrat als für einen Interaktor. Die im Kapitel 3.3.2.3 beschriebene Beobachtung lässt die Hypothese zu, dass SDP1 von CDKA;1 phosphoryliert werden muss um aktiv werden zu können. Eine Möglichkeit um herauszufinden, ob SDP1 phosphoryliert werden muss, ist die gezielte Veränderung der Phosphorylierungs-Motive. Um herauszufinden, welche der möglichen Phosphorylierungs-Motive am wichtigsten sind, wurde die Aminosäuresequenz von SDP1 mit den homologen Proteinen anderer Pflanzen (Reis, *Oryza sativa*; Gestutzter Schneckenklee, *Medicago truncatula* und Kleines Blasenmützenmoos, *Physcomitrella patens*) verglichen.



Abbildung 3.15: Vergleich der Aminosäuresequenzen von SDP1 Homologen aus *A. thaliana* (At), *Medicago truncatula* (Mt), *Oryza sativa* (Os) und *Physcomitrella patens* (Pp): die rote Box markiert das vollständige Phosphorylierungs-Motiv für CDKA;1, die grüne Box die minimalen Phosphorylierungsmotive für CDKA;1 und die blauen Boxen markieren die Bindungsmotive für Cyclin

Es konnten zwei Sequenzmotive gefunden werden, die bei allen Homologen zu finden waren. Die anderen Motive sind nicht bei allen Proteinen gleich und somit wohl auch nicht von so großer Wichtigkeit. Die beiden Motive liegen in einer stark konservierten Region der Proteine und das einzige vollständige Phosphorylierungs-Motiv für CDKA;1, das in SDP1 zu finden ist, befindet sich unter ihnen. Nun galt es als nächstes, diese Motive zu verändern, um eine Phosphorylierung durch CDKA;1 an diesen Stellen zu verhindern. Es wurden zwei verschiedene Veränderungen durchgeführt. Das Serin der Motive wurde durch Asparaginsäure ersetzt, was eine Phosphomimikry bewirken sollte. Dabei sollte die negative Ladung der Asparaginsäure die negativ geladene Phosphatgruppe simulieren, die dort sonst angebracht würde. Das daraus resultierende Protein sollte der Hypothese zufolge konstitutiv aktiv sein. Der genau gegenteilige Effekt sollte mit dem Austausch des Serins gegen ein Alanin erreicht werden. Alanin kann nicht phosphoryliert werden und trägt auch keine negative Ladung. Diese SDP1 Variante sollte somit konstitutiv inaktiv sein. Beide Aminosäuren, Asparaginsäure und Alanin, lassen sich nicht durch CDKA;1 phosphorylieren. Beide Varianten des Aminosäureaustausches wurden bei beiden Motiven durchgeführt. Zudem wurden noch jeweils die Kombinationen eines Typus erstellt.

Tabelle 3.11: erstellte SDP1 Varianten

Name der SDP1 Variante	veränderte Phosphorylierungs-Motive	
	S/T-P-X-K/R	S/T-P
SDP1 (DPRK)	S351D	--
SDP1 (DP)	--	S366D
SDP1 (2DP)	S351D	S366D
SDP1 (APRK)	S351A	--
SDP1 (AP)	--	S366A
SDP1 (2AP)	S351A	S366A

Diese Konstrukte wurden dann ebenfalls auf ihre Lokalisierung hin untersucht und im BiFC System getestet. Die Lokalisierung keines der Konstrukte zeigte einen Unterschied zu der von SDP1.

Tabelle 3.12: Interaktionen der SDP1 Varianten mit den CDKA;1 Varianten; -- kein Signal, ((+)) sehr schwaches Signal, (+) schwaches Signal

SDP1 Variante	CDKA;1 Varianten				
	CDKA;1	T161D	T161V	VF	DE
SDP1	((+))	--	--	((+))	--
SDP1 (DPRK)	--	--	--	--	--
SDP1 (DP)	--	--	--	--	--
SDP1 (2DP)	--	--	--	--	--
SDP1 (APRK)	(+)	(+)	((+))	(+)	--
SDP1 (AP)	(+)	(+)	--	(+)	--
SDP1 (2AP)	(+)	(+)	((+))	(+)	--

Keine der SDP1 Varianten, bei denen eine Phosphomimikry erstellt wurde, interagierten mit den CDKA;1 Varianten. Auch nicht mit CDKA;1 und CDKA;1 (VF), bei denen mit SDP1 eine Interaktion gesehen werden konnte. Die Dephospho Varianten von SDP1 zeigten schwache Interaktionen mit CDKA;1, CDKA;1 (T161D), CDKA;1 (VF) und teilweise auch mit CDKA;1 (T161V), aber nicht mit CDKA;1 (DE). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei SDP1 um ein Substrat von CDKA;1 handelt. Um dies weiter zu untermauern, wurden die SDP1 Varianten unter dem CDKA;1 Promotor (Nowack MK 2006) in *sdp1* Pflanzen (Linie *sdp1-3*) und Col-0 Pflanzen transformiert. Die Phosphomimikry Varianten könnten in der Lage sein, den *sdp1* Phänotypen zu retten, die Dephospho Varianten sollten dazu nicht in der Lage sein. Die Pflanzen befinden sich alle in T2 und müssen noch analysiert werden.

3.3.5.2 Weiterführende Experimente mit RAN1

Für weitere Experimente mit RAN1 wurden die konstitutiv aktive Form RAN1 (GTP) und die konstitutiv inaktive Form RAN1 (GDP) von P.D. Dr. Thomas Merkle (Universität Bielefeld, Center for Biotechnology) bereitgestellt. Für RAN1 (GTP) wurde die Aminosäure 22, ein Glycin durch ein Valin ersetzt. Für die RAN1 (GDP) wurde die Aminosäure 27, ein Threonin, durch ein Asparagin ersetzt. Zudem wurden noch zwei weitere Proteine der RAN GTPase Familie, RAN2 (At5g20020) und RAN3 (At5g55190), von ihm bereitgestellt. Alle Proteine wurden auf ihre Lokalisation getestet und im BiFC System gemessen.

Tabelle 3.13: Lokalisierung der RAN Proteine; -- kein Signal, ((+)) sehr schwaches Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal, ++ starkes Signal

Locus	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
At5g20010	Kern, Zytoplasma	(+)	+	+	z.T. starkes Signal im Nucleolus
At5g20010 (GTP)	Kern, Zytoplasma	(+)	+	+	z.T. Signal im Nucleolus, aber etwas schwächer als bei RAN1
At5g20010 (GDP)	Kern, Zytoplasma	(+)	+	+	z.T. Signal im Nucleolus, aber etwas schwächer als bei RAN1
At5g20020	Kern, Zytoplasma	(+)	+	+	z.T. starkes Signal im Nucleolus
At5g55190	unbekannt	+	+	--	C-terminale Fusionen ergeben kein Signal!!

RAN1 (GTP) und RAN1 (GDP) besitzen die gleiche Lokalisierung, wie RAN1, wobei das Signal im Nucleolus etwas schwächer ist als bei RAN1. RAN2 verhält sich genau wie RAN1. Bei RAN3 hingegen ist kein Signal zu erkennen, wenn das YFP C-terminal an RAN3 fusioniert wird. Deshalb wurde RAN3 in einen anderen Vektor (pENSG-YFP) kloniert, in dem das YFP N-terminal an das Protein fusioniert wird. In dieser Fusionsrichtung konnte ein Signal im Zytoplasma und im Kern festgestellt werden. Die Lokalisierung im Nucleolus, wie sie bei einigen Nuclei mit RAN1 und RAN2 beobachtet wurde, konnte nicht gefunden werden.

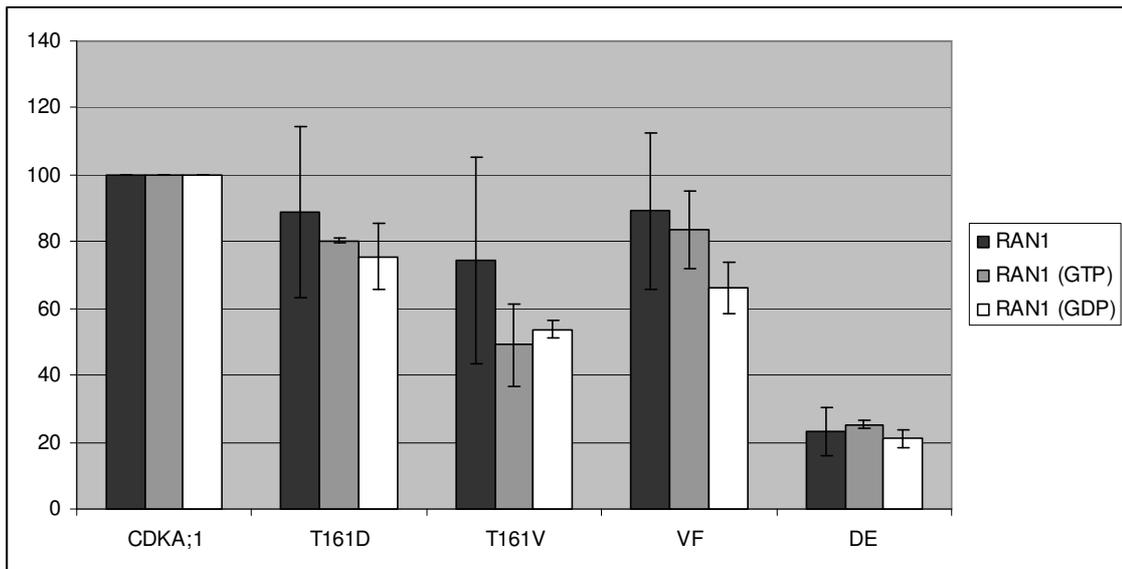


Abbildung 3.16: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit RAN1 (At5g20010), RAN1 (GTP) und RAN1 (GDP)

RAN1 (GTP) und RAN1 (GDP) verhalten sich nicht anders als RAN1. RAN1 ist also sowohl in aktivierter wie inaktiver Form ein mögliches Substrat von CDKA;1.

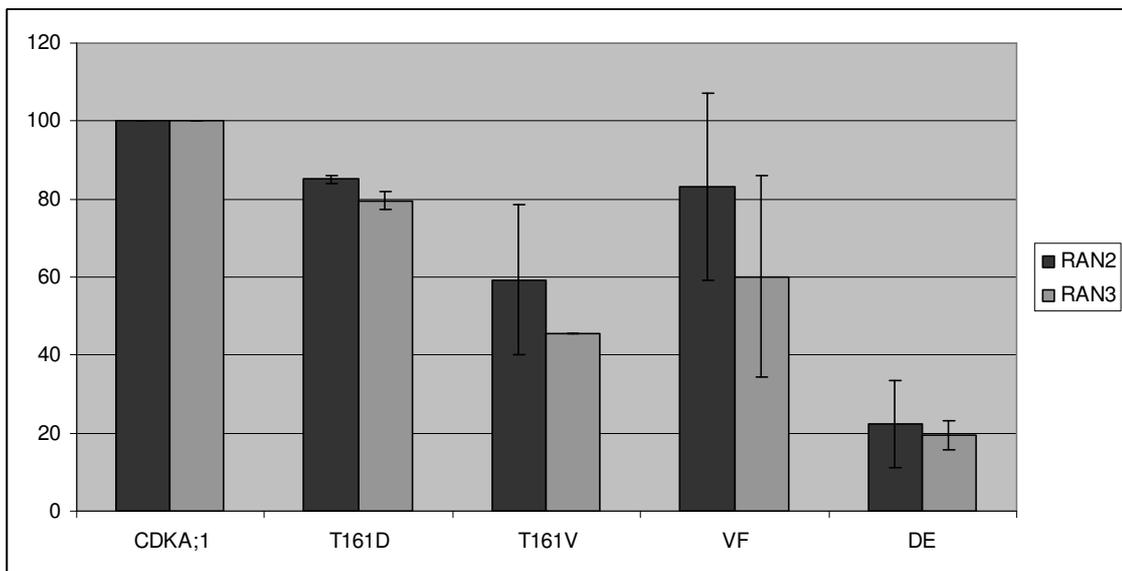


Abbildung 3.17: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit RAN2 (At5g20020) und RAN3 (At5g55190)

RAN2 und RAN3 sind mögliche Substrate von CDKA;1. Die Messwerte für die Interaktion mit CDKA;1 (T161D) sind zwar signifikant erhöht, aber der Abfall der Fluoreszenzstärke von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (T161V) ist gegeben. Zudem weisen die Werte für CDKA;1 (T161V) und die für CDKA;1 (DE) auf ein Substrat hin. Alle hier getesteten Proteine der RAN GTPase Familie verhalten sich wie Substrate von CDKA;1. Ein Sequenzvergleich der Proteine ergab ein minimales

Phosphorylierungs-Motiv für CDKA;1 bei Aminosäure 182-183, T-P bei RAN1 und S-P bei RAN2 und RAN3. Außerdem existieren drei konservierte Bindungsmotive für CYCB1;2 bei Aminosäure 32-34 (R-H-L), 109-111 (R-D-L) und 169-171 (R-K-L).

3.4 Untersuchung einiger für den Zellzyklus relevanter Proteine

In diesem Kapitel sind alle Ergebnisse zusammengefasst, die mit Proteinen des Zellzyklus erhoben wurden. Bei den meisten Proteinen geschah dies in Kollaboration mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Arp Schnittger. In allen Experimenten wurden die Interaktionen mit anderen Proteinen untersucht. Es ging aber auch um andere Daten wie die Lokalisation verschiedener Konstrukte.

3.4.1 KRPs (kip related proteins)

Diese Proteine sind bekannt dafür, als Inhibitor von Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) zu fungieren. Es sollte im speziellen KRP1 (At2g23430), aber auch ein weiteres Protein dieser Familie, KRP2 (At3g50630), getestet werden. In den durchgeführten Versuchen sollten einige Domänen von KRP1 näher untersucht werden. Des Weiteren sollte ein mögliches Motiv, das für die Kernlokalisierung (nuclear localisation signal, NLS) von KRP1 zuständig sein soll, getestet werden. Für die Untersuchung der Domänen von KRP1 wurden drei Konstrukte von Dr. Christina Weinl (Universität Köln, Lehrstuhl für Botanik III/ Universität Innsbruck, Medizinische Biochemie) erstellt: KRP1¹⁻¹⁰⁸, KRP1¹⁻¹⁵² und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹. Die hochgestellten Zahlen geben die Aminosäuren an, aus denen diese Stücke bestehen. Das NLS wurde zerstört, in dem die Lysine an den Positionen 84 und 86 durch Alanine (K84/86A) ausgetauscht wurden. Dieses Konstrukt wurde von Dr. Marc Jakoby (Universität Köln, Lehrstuhl für Botanik III) bereitgestellt. Für die KRP1 Konstrukte und KRP2 wurden ihre Lokalisierungen getestet. Auch die Lokalisation der Proteine, mit denen die KRPs getestet werden sollten, wurde festgestellt.

Tabelle 3.14: Lokalisierung der KRP1 Varianten und von KRP2; -- kein Signal, ((+)) sehr schwaches Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal, ++ starkes Signal

Gen	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
KRP1	Kern	--	+	--	z.T. subnucleare Lokalisierung
KRP1 ¹⁻¹⁰⁸	unbekannt	--	+	--	viel stärkeres Signal als KRP1, subnucleare Lokalisierung
KRP1 ¹⁻¹⁵²	unbekannt	((+))	+	--	z.T. subnucleare Lokalisierung
KRP1 ¹⁰⁹⁻¹⁹¹	unbekannt	+	+	--	viel stärkeres Signal als KRP1
KRP1 ^(K84/86A)	unbekannt	+	++	--	z.T. subnucleare Lokalisierung
KRP2	Kern	(+)	++	--	
SKP2.1	SCF ubiquitin ligase complex	+	+	--	
SKP2.2	unbekannt	+	+	--	
AJH1	Signalosom	+	+	(+)	
E2Fc	Kern, Nucleolus	+	+	--	z.T. subnucleare Lokalisierung

Bei den Versuchen zur Lokalisierung der KRP1 Varianten fiel auf, dass bei KRP1¹⁻¹⁰⁸ und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ stärkere Signale gesehen werden konnten als bei KRP1 selbst. KRP1¹⁻¹⁵² und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ konnten beide im Zytoplasma gefunden werden, wobei KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ das deutlich stärkere Signal lieferte. Für KRP1^(K84/86A) konnte ein schwaches Signal im Zytoplasma gesehen werden. Ein viel stärkeres Signal war aber immer noch im Kern zu finden. Bei KRP2 konnte ein schwaches Signal im Zytoplasma und ein stärkeres Signal im Kern gefunden werden.

Die Mutation des NLS Motivs von KRP1 reichten nicht aus, um eine Kernlokalisierung von KRP1 zu verhindern. Deshalb wurden ein weiterer Versuch unternommen dies zu erreichen. Dazu wurden KRP1 und die Variante KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ mit einem Proteinstück aus Clavata 1 (CLV1, At1g75820) und YFP fusioniert. Das Proteinstück aus CLV1 (TM erstellt von Sebastian Marquardt) ist ein Teil des Proteins, das in der Membran

verankert ist und so das ganze Konstrukt in der Plasmamembran verankern sollte. YFP ist für den Nachweis in der Zelle gedacht. Die Konstrukte wurden dann unter dem „glabra 2“ (GL2) Promotor und dem „too many mouth“ (TMM) Promotor in Col-0 Pflanzen transformiert. Die Analyse der Pflanzen ergab die in Tabelle 3.13 zusammengefassten Daten.

Tabelle 3.15: Lokalisierung von KRP1 und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ ohne und mit TM

Konstrukt	Lokalisierung	
	ohne TM	mit TM
YFP:KRP1	Kern	Kernmembran
YFP:KRP1 ¹⁰⁹⁻¹⁹¹	Zytoplasma und Kern	Plasma- und Kernmembran

Um festzustellen, wie zuverlässig das BiFC System für KRP1 ist, wurden versucht, schon bekannte Interaktionen der KRP1 Konstrukte zu replizieren. Dies sind die Interaktionen mit CDKA;1 und CYCD3,1 (Wang H 1998). Des Weiteren sollten Interaktionen der KRP1 Konstrukte mit anderen Proteinen, die mit CDKA;1 interagieren (CKS1, und CYCB1;2), getestet werden. Auch die Interaktionen der KRP1 Konstrukte und KRP2 mit verschiedenen Proteinen (SKP2.1, SKP2.2 und AJH1), die möglicherweise für den Abbau der KRPs verantwortlich sind, sollten getestet werden.

Tabelle 3.16: Interaktionsanalyse der KRP1 Konstrukte und KRP2 mit CDKA;1, CKS1, CYCB1;2, CYCD3;1, SKP2.1, SKP2.2, AJH1 und GUS; -- keine Interaktion, ((+)) sehr schwache Interaktion, (+) schwache Interaktion, + Interaktion, ? keine Aussage möglich

	KRP1	KRP1 ¹⁻¹⁰⁸	KRP1 ¹⁻¹⁵²	KRP1 ¹⁰⁹⁻¹⁹¹	KRP1 ^(K84/86A)	KRP2
CDKA;1	+	+	((+))	+	+	+
CKS1	+	+	--	+	+	+
CYCB1;2	+	+	--	+	+	?
CYCD3;1	+	+	(+)	+	+	?
SKP2.1	--	+	--	--	--	--
SKP2.2	+	+	--	+	+	+
AJH1	+	+	+	+	+	+
GUS	--	+	--	--	--	--

Die Negativkontrolle mit GUS ergab bei KRP1¹⁻¹⁰⁸ eine Interaktion. Auch bei weiteren Interaktionstests mit der zweiten Negativkontrolle RFP und KRP1¹⁻¹⁰⁸ zeigte sich, dass KRP1¹⁻¹⁰⁸ unspezifisch mit anderen Proteinen interagiert. Deshalb wurde es bei BiFC Experimenten nicht mehr verwendet. Die bekannten Interaktionen der KRP1 Konstrukte

mit CDKA;1 und CYCD3;1 (Wang H 1998) konnten im BiFC System repliziert werden. Zudem konnte noch eine Interaktion von KRP1¹⁻¹⁵² mit CDKA;1 nachgewiesen werden. Sie war jedoch extrem schwach. Diese Interaktion konnte von Wang *et al.* (1998) nicht gezeigt werden. KRP1 zeigte Interaktionen mit allen Interaktionspartnern von CDKA;1, so auch KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ und KRP1^(K84/86A). Mit KRP2 konnten Interaktionen mit CDKA;1 und CKS1 gezeigt werden. Die Experimente mit CYCB1;2 und CYCD3;1 konnten nicht ausgewertet werden, da es dort zu einem Absterben der Zellen kam. Die sterbenden Zellen haben eine starke Autofluoreszenz, welche es unmöglich machte, die eventuell vorhandenen Signale sicher zu erkennen. Deshalb kann für diese Experimente keine Aussage getroffen werden.

Es wurden noch weitere Interaktionsstudien mit KRP1 durchgeführt, diesmal mit dem Ziel, den Abbau von KRP1 besser zu verstehen. Es ist bekannt, dass das KRP1 Homolog p27 aus Menschen (*H. sapiens*) vom SCF-Komplex abgebaut wird. Dieser Abbau wird über Skp2 vermittelt (Tsvetkov LM 1999). Deshalb wurden die Interaktionen von KRP1 mit den zwei Homologen von Skp2, SKP2.1 (AT1g21410) und SKP2.2 (AT1g77000), aus *A. thaliana* getestet. Als Positivkontrolle für die Versuche wurde ein Protein (E2Fc; AT1g47870) verwendet, von dem bekannt ist, dass es durch den SCF-Komplex dem Proteinabbau zugeführt wird (del Pozo JC 2002). Alle drei Proteine sind sowohl im Zytoplasma wie auch im Kern lokalisiert, wobei bei E2Fc jedoch im Kern noch eine Sublokalisierung in kleinen helleren Punkten zu sehen ist. Bei SKP2.2 konnte die Lokalisierung nicht mit einer C-terminalen YFP Fusion nachgewiesen werden, sondern nur mit der N-terminalen Fusion. Auch in den Interaktionstests konnte nie eine Interaktion von SKP2.2 nachgewiesen werden, wenn es sich in dem pSYN Vektor befand. Das Stück von YFP, das sich in pSYN befindet, ist 155 Aminosäuren lang, jenes in pSYC nur 84 Aminosäuren. SKP2.2 scheint also sehr empfindlich gegenüber der Länge C-terminalen Fusionen zu sein. Nur für SKP2.2 konnte die erwartete Interaktion mit E2Fc nachgewiesen werden. Die Interaktionsversuche ergaben, dass nur KRP1 und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹, nicht aber KRP1¹⁻¹⁵², mit SKP2.2 interagieren. Es konnten nur eine Interaktion mit SKP2.1 gefunden werden, die mit KRP1¹⁻¹⁰⁸. Diese ist aber nicht zu werten, da KRP1¹⁻¹⁰⁸ im BiFC System unspezifisch reagiert. Das Interessante an den Interaktionen war, dass sie nur im Zytoplasma zu sehen waren. Für KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ ist dies nichts Ungewöhnliches, da es auch sonst dort zu finden ist. Aber KRP1 ist sonst nur im Kern zu finden und zeigt auch mit keinem anderen Protein, welches im Zytoplasma zu finden ist, dort eine Interaktion.

Ein weiterer Abbauweg von p27 wird über JAB1 vermittelt. JAB1 ist ein Protein des COP9 Signalosoms und vermittelt in menschlichen Zellen den Export und den Abbau von p27 (Tomoda K 2002). In *A. thaliana* existieren zwei Homologe Proteine von JAB1, AJH1 und AJH2 (Kwok SF 1998). Um herauszufinden, ob dieser Abbauweg konserviert ist, wurden die Interaktionen der KRP1 Konstrukte und KRP2 mit AJH1 getestet. Alle KRP1 Konstrukte und KRP2 interagieren mit AJH1. Die Interaktionen sind dort zu finden, wo die entsprechenden KRP1 Konstrukte oder KRP2 lokalisiert sind.

Die Möglichkeit der Fluoreszenz-Quantifizierung im BiFC System erlaubte es, das Verhalten der KRP1 Konstrukte und das von KRP2 gegenüber den CDKA;1 Varianten zu testen. Es wurden nur die KRP1 Konstrukte (KRP1, KRP1¹⁻¹⁵² und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹) und KRP2 getestet.

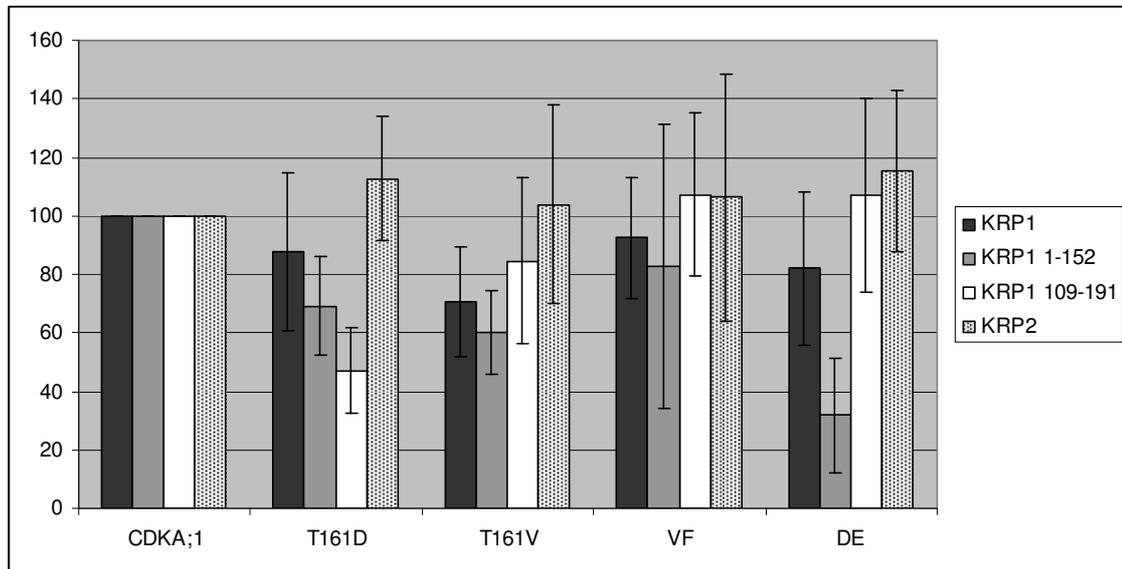


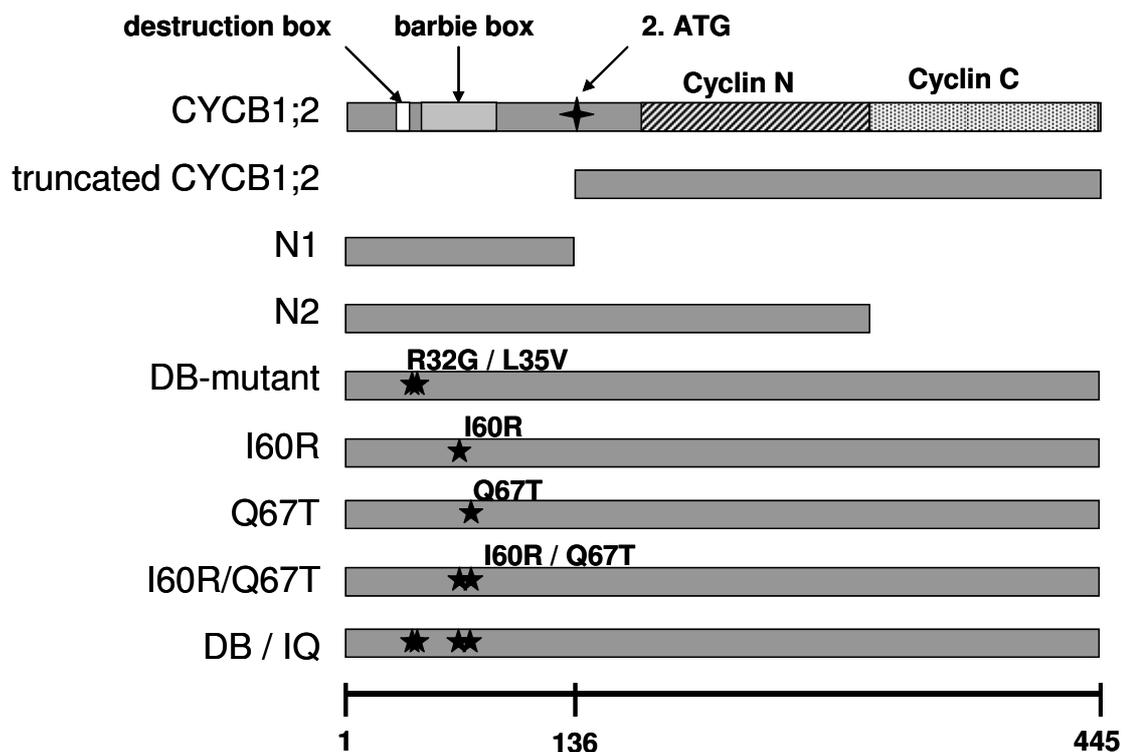
Abbildung 3.18: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit KRP1 (At2g23430), KRP1¹⁻¹⁵², KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ und KRP2 (At3g50630)

Wenn man die Messwerte für CDKA;1 (T161D) und CDKA;1 (T161V) betrachtet, so verhalten sich KRP1 und KRP1¹⁻¹⁵² wie mögliche Substrate. Eine große Differenz gibt es allerdings bei den Messwerten für CDKA;1 (DE). Dort verhält sich nur noch KRP1¹⁻¹⁵² wie ein mögliches Substrat, KRP1 hingegen wie ein Interaktor. Bei KRP1¹⁻¹⁵² handelt es sich also offensichtlich um ein mögliches Substrat von CDKA;1. Für KRP1 kann keine Aussage getroffen werden. KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ zeigt ein sehr ungewöhnliches Muster. Es gibt einen starken Abfall von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D), dann aber wiederum einen Anstieg der Messwerte von CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (T161V) zu CDKA;1 (VF). Die Messwerte für CDKA;1 (VF) und CDKA;1 (DE) sind auf einem Level. Dieses Verhalten passt weder zu einem Interaktor noch zu einem Substrat. KRP2 hat für alle CDKA;1 Varianten etwa den gleichen Level, was auf einen Interaktor hindeutet.

3.4.2 CYCB1;2 (Cyclin B 1;2)

Ohne Cyclin kann CDKA;1 seine Funktion als Kinase nicht ausführen. CYCB1;2 ist ein Cyclin, das für den G2-M Übergang wichtig ist. In Kollaboration mit Farshad Rootbarkelari sollten die Interaktionsdomänen für CDKA;1 und die Motive, die für den Abbau von CYCB1;2 zuständig sind, näher analysiert werden. Hierfür wurden neun Konstrukte erstellt. Als erstes das vollständige CYCB1;2. Als zweites eine verkürzte Variante (truncated CYCB1;2), die ab einem zweiten Methionin (zweites mögliches

Startcodon im Leseraster) beginnt. Dieser Variante fehlen die Abbausignale der „destruction box“ und der „barbie box“, wodurch das Protein deutlich stabiler wird. Die dritte Variante (N1) besteht aus dem Stück, dass bei dem truncated CYCB1;2 zu dem vollständigen CYCB1;2 fehlt. Die vierte Variante (N2) beginnt beim 1. Startcodon und endet mit dem Ende des N-terminalen Teils der Cyclin Box (Cyclin N). Bei der fünften Variante (DB-mutant) ist das „destruction box“ Motiv durch gezielte Aminosäureaustausche (R32G / L35V) funktionsunfähig gemacht worden. Die Varianten sechs bis acht stellen den Versuch dar, das „Barbie-box“ Motiv funktionsunfähig zu machen. Dazu wurde bei der sechsten Variante (I60R) die Aminosäure 60, ein Isoleucin, durch ein Arginin ersetzt. Bei der siebten Variante (Q67T) wurde die Aminosäure 67, ein Glutamin, durch ein Threonin ersetzt. Die achte Variante kombiniert die beiden Aminosäureaustausche der beiden vorangegangenen Varianten. In der letzten Variante wurden die Aminosäureaustausche der DB-mutant und der I60R/Q67T Varianten kombiniert. Alle Varianten wurden auf ihre Lokalisation überprüft. Die Interaktion gegenüber CDKA;1, KRP1, KRP1¹⁻¹⁵², KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ und



CKS1 getestet.

Abbildung 3.19: CYCB1;2 Varianten; der unten angegebene Maßstab entspricht der Länge in Aminosäuren

Tabelle 3.17: Lokalisierung der CYCB1;2 Varianten; -- kein Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal, ++ starkes Signal

Konstrukt	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
CYCB1;2	Kern	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett
truncated CYCB1;2	unbekannt	+	+	--	
DB- mutant	unbekannt	+	+	--	starkes Signal am Cytoskelett
N1	unbekannt	+	++	--	starkes Signal am Cytoskelett
N2	unbekannt	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett
I60R	unbekannt	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett
Q67T	unbekannt	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett
I60R / Q67T	unbekannt	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett
DB / IQ	unbekannt	+	(+)	--	starkes Signal am Cytoskelett

Alle CYCB1;2 Varianten sind sowohl im Zytoplasma wie auch im Kern lokalisiert und weichen damit von der Lokalisierung, die in der TAIR Datenbank hinterlegt ist, ab. Einzig die Stärke des Signals, das sich im Kern befindet, variiert zwischen den Varianten. Alle CYCB1;2 Varianten außer truncated CYCB1;2 sind stark mit dem Zytoskelett assoziiert.

Bei den Interaktionsanalysen zeigte die Variante N1 eine Interaktion mit der Negativkontrolle (GUS). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass N1 falsch negative Interaktionen zeigen wird. Dies konnte bestätigt werden, denn es zeigte mit allen Proteinen eine Interaktion mit denen die anderen CYCB1;2 Varianten keine Interaktion zeigten und auch eine Interaktion mit der zweiten negativ Kontrolle RFP. Die Variante N1 ist damit für die Interaktionsanalyse im BiFC System unbrauchbar. Die restlichen CYCB1;2 Varianten zeigten keine Interaktion mit GUS. In der Interaktionsanalyse mit

den anderen CYCB1;2 Varianten verhielten sich alle gleich. Sie zeigten Interaktionen mit KRP1, KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ und CKS1. Eine Interaktion mit KRP1¹⁻¹⁵² konnte mit keiner CYCB1;2 Variante nachgewiesen werden.

Tabelle 3.18: Interaktionsanalyse der CYCB1;2 Varianten mit CDKA;1, KRP1, KRP1¹⁻¹⁵², KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹, CKS1 und GUS; -- keine Interaktion, + Interaktion

	CYCB1;2	truncated CYCB1;2	DB- mutant	N1	N2	I60R	Q67T	I60R / Q67T	DB / IQ
CDKA;1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KRP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KRP1 ¹⁻¹⁵²	--	--	--	+	--	--	--	--	--
KRP1 ¹⁰⁹⁻¹⁹¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CKS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GUS	--	--	--	+	--	--	--	--	--

In einem weiteren Experiment sollte der Abbau von CYCB1;2 näher untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die Proteine CCS52A1 (At4g22910), CCS52A2 (At4g117262) und CCS52B (At5g13840) mit den CYCB1;2 Varianten (CYCB1;2, truncated CYCB1;2, DB-mutant, I60R, Q67T, I60R/Q67T und DB/IQ) interagieren. Die CCS52 Proteine sind Teil des „anaphase-promoting complex/cyclosome“ (APC/C) (Fülöp K 2005). Dieser Komplex ist essentiell für den Abbau von B-Typ Cyclinen in anderen Organismen. Als erstes wurde die Lokalisierung der CCS52 Proteine getestet.

Tabelle 3.19: Lokalisierung der CCS52 Proteinen; + normales Signal, ++ starkes Signal

Gen	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
CCS52A1	Zytoplasma, Kern	+	++	+	subnucleare Lokalisierung
CCS52A2	Zytoplasma, Kern	+	+	++	
CCS52B	Zytoplasma, Kern	+	++	+	

Theoretisch wäre eine Interaktion mit den CYCB1;2 Varianten möglich, da sie sich in denselben Kompartimenten wie die CCS52 Proteine aufhalten. Es konnte aber keine Interaktion zwischen den CYCB1;2 Varianten und den CCS52 Proteinen nachgewiesen

werden. Auch die Wiederholung der Interaktionstests in *A. thaliana* Blättern führte zu keinen Ergebnissen. Entweder gibt es keine Interaktion zwischen den CCS52 Proteinen und CYCB1;2 oder diese ist mit dem BiFC System nicht nachzuweisen.

Es konnte aber auf genetischer Ebene einen Zusammenhang mit CCS52A1 nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation mit Farshad Rootbarkelari; MPIZ Köln, AG Coupland). Deshalb wurde mit einer anderen Methode versucht, diesen Zusammenhang nachzuweisen. Die CCS52A Proteine wurden in einen Vektor (pBAtTL-RFP) kloniert, in dem sie C-terminal mit einem RFP fusioniert werden. Die CYCB1;2 Varianten wurden in eine Vektor (pEXSG-YFP) kloniert, indem sie C-terminal mit einem YFP fusioniert wurden. Beide Vektoren wurden in Agrobakterien transformiert und in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt in Tabakblätter injiziert. Als Kontrolle wurden die CYCB1;2 Varianten, auch in einem 1 zu 1 Verhältnis, mit CDKA;1 in pBAtTL-RFP gemischt und injiziert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden so gemessen, dass man alle Messergebnisse eines CCS52A Proteins miteinander vergleichen kann. Wenn die CCS52A Proteine für den Abbau von CYCB1;2 zuständig sind, so sollten die Fluoreszenzstärke des mit den CYCB1;2 Varianten fusionierten YFPs bei der Kombination mit einem CCS52 Protein niedriger sein, als die mit der CDKA;1 Kontrolle. Außerdem ist es möglich, eine Co-Lokalisation von der CCS52A Proteine mit den CYCB1;2 Konstrukten nachzuweisen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wurde die Fluoreszenzstärke des YFPs bei der Kombination von CYCB1;2 mit CDKA;1 als 100% gesetzt.

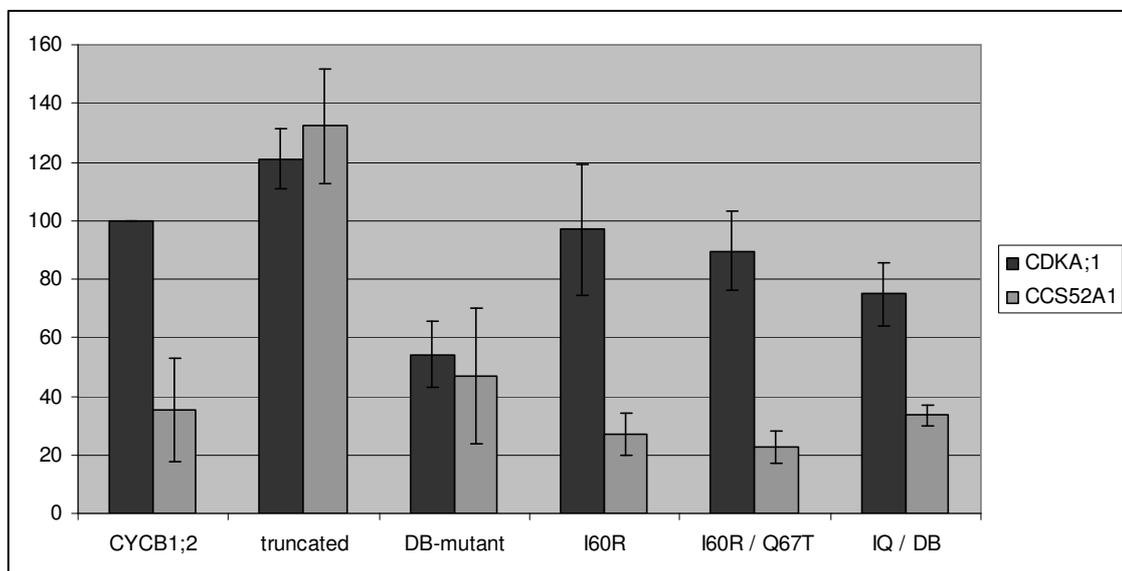


Abbildung 3.20: Fluoreszenzquantifizierung der Signale von CDKA;1 und CCS52A1 jeweils in Kombination mit einer Auswahl der CYCB1;2 Varianten

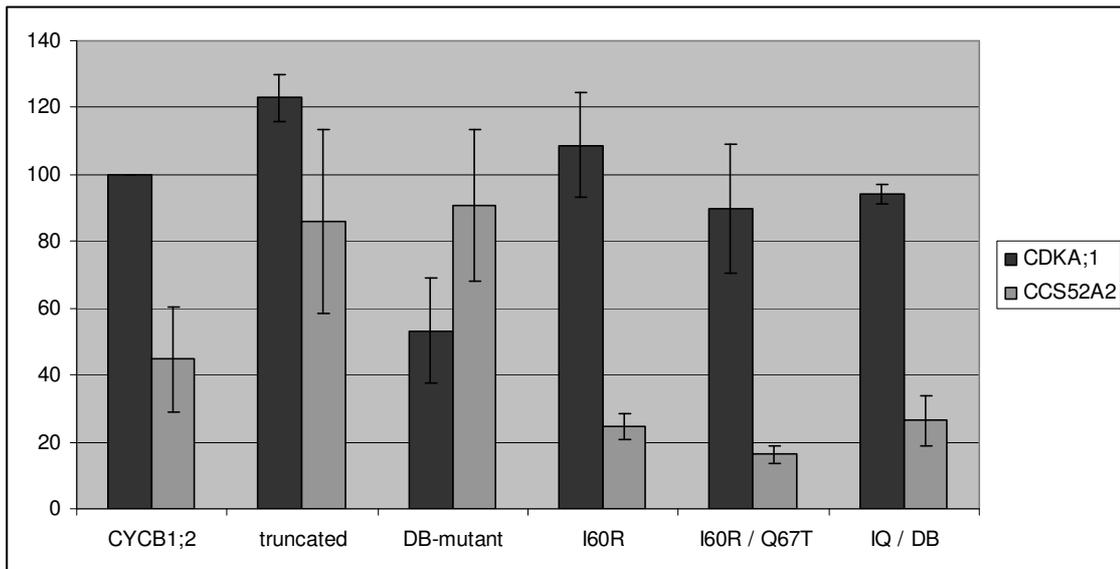


Abbildung 3.21: Fluoreszenzquantifizierung der Signale von CDKA;1 und CCS52A2 jeweils in Kombination mit einer Auswahl der CYCB1;2 Varianten

Diese Versuche zeigten dass alle verwendeten CYCB1;2 Varianten, außer der DB-mutant Variante, etwa in gleicher Menge vorliegen. Die DB-mutant Variante scheint destabilisiert zu sein. Die Co-Lokalisation der CYCB1;2 Konstrukte und der CCS52A Proteine konnte bei allen CYCB1;2 Konstrukten gefunden werden. Es gab aber keinen Unterschied zwischen den Signalen der Lokalisation der CYCB1;2 Konstrukte und der Lokalisation der Signale, wenn die CYCB1;2 Konstrukte zusammen mit den CCS52A Proteinen zusammen exprimiert wurden.

Wenn man die Fluoreszenzintensität von der Kombination CDKA;1 und CYCB1;2 mit der Kombination von CCS52A1 oder CCS52A2 und CYCB1;2 vergleicht, ist ein deutlicher Abfall (ca. 60%) zu erkennen. Dieser Abfall ist bei den Kombinationen mit truncated CYCB1;2 und der DB-mutant CYCB1;2 nicht mehr zu erkennen. Das Gegenteil ist sogar der Fall bei der Kombination von CCS52A2 mit DB-mutant CYCB1;2. Bei dieser Kombination scheint die CYCB1;2 Variante sogar noch stabilisiert worden zu sein. Bei den restlichen CYCB1;2 Varianten ist stets ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensitäten von der Kombination mit CDKA;1 zu den Kombinationen mit den CCS52A Proteinen.

3.4.3 CKS1 und CKS2 (cyclin dependent kinase subunit)

Weil diese kleinen Proteine eine sehr starke Bindung zu CDKA;1 haben, werden sie häufig verwendet um CDKA;1 aufzureinigen. In den hier durchgeführten Versuchen sollten nun beide Proteine dieser Familie, CKS1 (AT2g27960) und CKS2 (At2g27970), getestet werden. Zudem wurde in CKS1 ein Motiv verändert, das die Bindung mit CDKA;1 herstellt (Sitry D 2002). Dazu wurde die Aminosäure 61, eine Glutaminsäure, gegen ein Glutamin (E61Q) ausgetauscht (Konstrukt erhalten von Dr. Mark Jakoby; Universität Köln, Lehrstuhl für Botanik III). Alle drei Proteine weisen dieselbe Lokalisation im Zytoplasma und im Kern auf und interagieren dort auch mit allen

CDKA;1 Varianten. Für CKS1 und CKS2 wurden zudem noch Fluoreszenzintensitäts-Quantifizierungen durchgeführt.

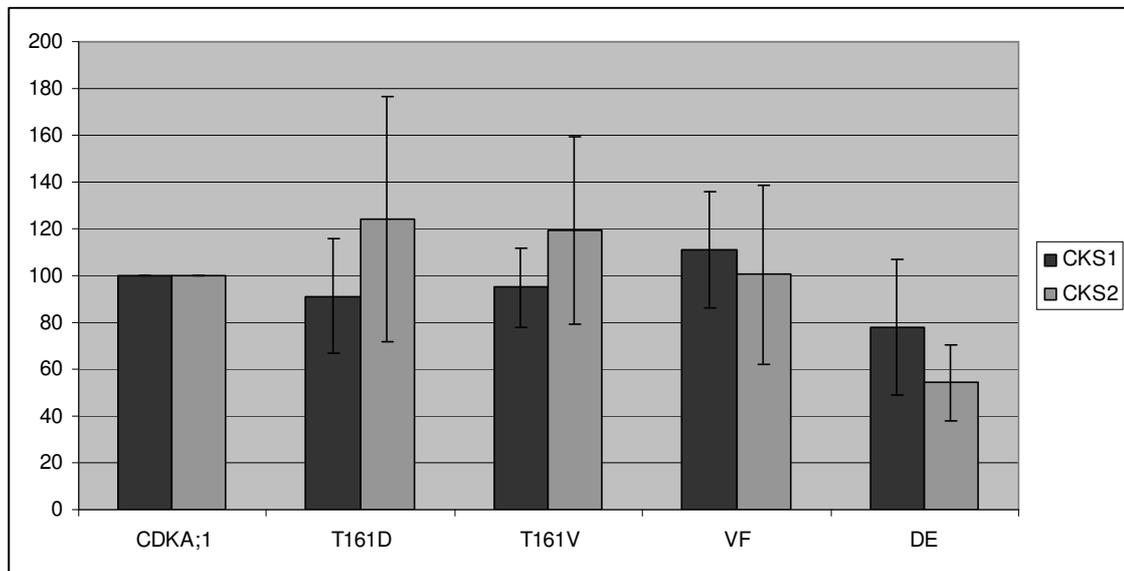


Abbildung 3.22: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit CKS1 (At2g27960) und CKS2 (At2g27970)

Beide Proteine verhalten sich wie Interaktoren. CKS2 zeigt stärkere Schwankungen in den Fluoreszenzintensitäten wie CKS1, doch zeigt sonst keine Unterschiede zu CKS1.

3.4.4 B-Typ CDKs

Die Familie der B-Typ CDKs umfasst vier Proteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden. Die B1-Typ CDKs umfassen CDKB1;1 (At3g54180) und CDKB1;2 (At2g38620), die B2-Typ CDKs beinhalten CDKB2;1 (At1g76540) und CDKB2;2 (At1g20930). Die B1-Typ CDKs weisen die höhere Ähnlichkeit mit CDKA;1 auf. Für alle Vertreter der Familie wurden deren Lokalisation und Interaktionsverhalten gegenüber den CDKA;1 Varianten getestet.

Tabelle 3.20: Lokalisierung der CDKBs; -- kein Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal

Gen	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
CDKB1;1	unbekannt	+	+	--	
CDKB1;2	Zytoplasma, Kern	+	+	--	
CDKB2;1	Zytoplasma, Kern	+	+	--	
CDKB2;2	unbekannt	(+)	(+)	--	schwaches Signal im Vergleich zu den anderen CDKBs

Alle CDKBs sind, wie auch CDKA;1, sowohl im Zytoplasma, wie auch im Kern zu finden. Die Signale von CDKB1;1, CDKB1;2 und CDKB2;1 sind etwa gleich stark wie die von CDKA;1. Die Signale von CDKB2;2 hingegen fallen deutlich schwächer aus.

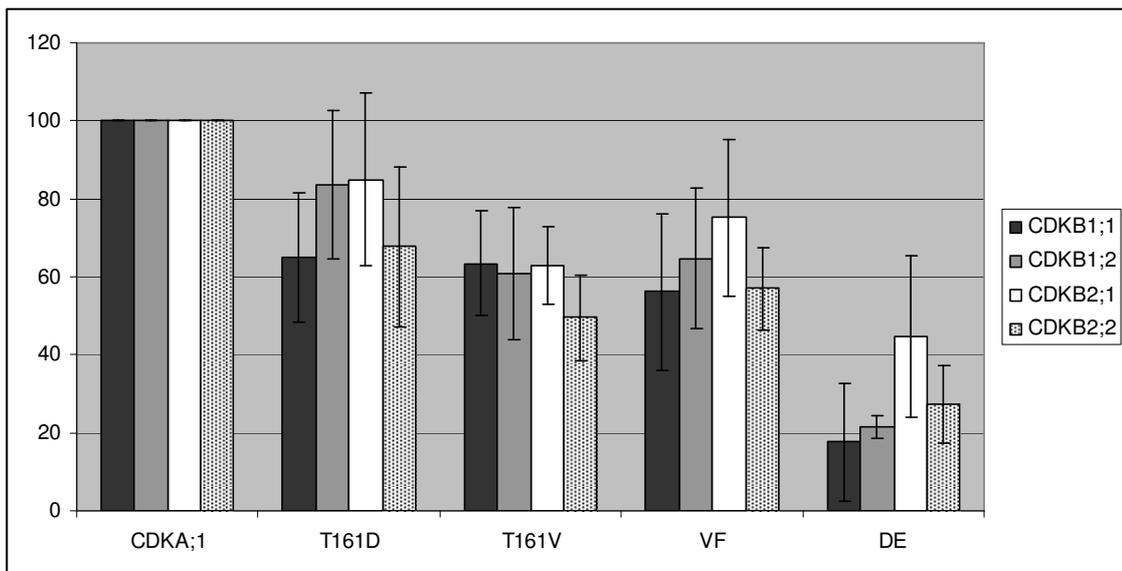


Abbildung 3.23: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit CDKB1;1 (At3g54180), CDKB1;2 (At2g38620), CDKB2;1 (At1g76540) und CDKB2;2 (At1g20930)

CDKB1;1 zeigt einen Abfall der Fluoreszenzstärke von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D), bleibt dann für CDKA;1 (T161V) und CDKA;1 (VF) auf diesem Level und fällt erst wieder bei der Interaktion mit CDKA;1 (DE) ab. Es kann also nicht genau eingegrenzt werden, ob es sich um ein mögliches Substrat oder einen möglichen Interaktor handelt. CDKB1;2 weist einen relativ hohen Wert für CDKA;1 (DE) auf und hat auch sonst sehr hohe Messwerte, verhält sich aber eher wie ein mögliches Substrat, denn wie ein Interaktor. Mit CDKB2;1 verhält es sich ähnlich. Nur der Messwert für die Interaktion mit CDKA;1 (DE) liegt hier niedriger und deutet damit deutlicher auf ein mögliches Substrat hin. Das Muster für CDKB2;2 weist eindeutig auf ein mögliches Substrat hin.

Die B-Typ CDKs weisen von allen CDKs die höchste Homologie zu CDKA;1 auf. Nun stellt sich die Frage, ob sie teilweise auch dessen Funktion übernehmen können. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, wurden die Interaktionen der B-Typ CDKs mit einigen Proteinen des CDKA;1 Komplexes getestet. Zudem wurden noch zwei bekannte Substrate (CDT1 und CDC6) von CDKA;1 getestet. Alle Interaktionstest wurden jeweils in beiden Vektoren durchgeführt, d.h. die CDKs einmal in pSYC gegen alle anderen Proteine in pSYN und umgekehrt. Die Ergebnisse waren in beiden Kombinationen reproduzierbar. Alle B-Typ CDKs zeigen mit der negativ Kontrolle GUS keine Interaktion. Sie interagieren alle mit CKS1. Die beiden B1-Typ CDKs interagieren mit CYCH;1 und nur CDKB1;2 interagiert mit CDT1.

Tabelle 3.21: Interaktionen von CDKA;1 und den B-Typ CDKs mit CKS1, CKS2, KRP1, KRP2, CYCB1;2, CYCD3;1, CYCH1, CDT1, CDC6 und GUS; -- keine Interaktion, + Interaktion

	CDKA;1	CDKB1;1	CDKB1;2	CDKB2;1	CDKB2;2
CKS1	+	+	+	+	+
CKS2	+	--	--	--	--
KRP1	+	--	--	--	--
KRP2	+	--	--	--	--
CYCB1;2	+	--	--	--	--
CYCD3;1	+	--	--	--	--
CYCH1	+	+	+	--	--
CDT1	+	--	+	--	--
CDC6	+	--	--	--	--
GUS	--	--	--	--	--

3.4.5 Weitere CDKs

In der Pflanze existieren neben der CDKA;1 und den vier B-Typ CDKs noch mindestens sieben weitere CDKs. Zwei C-Typ CDKs, drei D-Typ CDKs und jeweils eine E- und F-Typ CDK. Die CDKs, die davon als CDK aktivierende Kinase fungieren können, sollten hier näher untersucht werden. Dies sind die D-Typ CDKs, mit den drei Mitgliedern CDKD;1 (AT1g73690), CDKD;2 (AT1g66750) und CDKD;3(AT1g18040), und CDKF,1 (AT4g28980).

Tabelle 3.22: Lokalisierung der CDKDs und CDKF;1; -- kein Signal, (+) schwaches Signal, + normales Signal

Gen	Lokalisierung laut TAIR Datenbank	Lokalisierung			Bemerkung
		Zytoplasma	Kern	Nucleolus	
CDKD;1	Kern	--	+	--	z.T. sehr starkes punktförmiges Signal im Kern, nicht der Nucleolus
CDKD;2	Zytoplasma, Kern	(+)	+	--	z.T. sehr starkes punktförmiges Signal im Kern, nicht der Nucleolus
CDKD;3	Kern	--	+	--	
CDKF;1	Zytoplasma, Kern	+	+	--	

Alle Proteine sind genau dort lokalisiert, wo sie laut TAIR Datenbank auch sein sollten. Auffällig waren die selten auftretenden Lokalisierungen von CDKD;1 und CDKD;2 in einem punktförmigen starken Signals im Kern. Dieses Signal entsprach nicht dem Nucleolus, dieser konnte stets separat im Kern gefunden werden. Die Interaktionen mit CDKA;1, KRP1, KRP2, CKS1, CKS2, CYCB1;2, CYCD3;1 und CYCH;1 sollten untersucht werden. Die Interaktionen wurden jeweils in beiden Vektoren getestet, d.h. die CDKs einmal in pSYC gegen alle anderen Proteine in pSYN und umgekehrt. Die Interaktionen waren in beiden Kombinationen reproduzierbar.

Tabelle 3.23: Interaktionen von CDKA;1 und den D-Typ CDKs und CDKF;1 mit CDKA;1, CKS1, CKS2, KRP1, KRP2, CYCB1;2, CYCD3;1, CYCH;1, CDT1, CDC6 und GUS; -- keine Interaktion, (+) schwache Interaktion, + Interaktion

	CDKA;1	CDKD;1	CDKD;2	CDKD;3	CDKF;1
CDKA;1	+	+	+	+	+
CKS1	+	--	--	--	+
CKS2	+	--	--	--	+
KRP1	+	--	--	--	--
KRP2	+	--	--	--	--
CYCB1;2	+	--	--	+	--
CYCD3;1	+	--	--	--	--
CYCH1	+	+	+	+	(+)
CDT1	+	+	--	--	--
CDC6	+	+	+	--	--
GUS	--	--	--	--	--

3.4.6 Weitere CDKA;1 Varianten

In Kooperation mit Nico Dissmeyer wurden die schon oben genannten CDKA;1 Varianten (T161D, T161V, VF und DE) erstellt und getestet. Daneben wurden noch zwei weitere Varianten von CDKA;1 getestet. Eine Variante, bei der die PSTAIRE Domäne durch Alanine ersetzt ist, CDKA;1 („PSTAIRE dead“, Pstd.) und eine andere, bei der eine Aminosäure ausgetauscht worden ist, die wichtig ist für die ATP Bindung CDKA;1 (D146N). Der Austausch führt zu einer dominant-negativen Varianten (Hemerlyl A 1995). Beide Varianten haben dieselbe Lokalisierung wie CDKA;1. Alle Interaktionstest wurden jeweils in beiden Vektoren durchgeführt, d.h. die CDKA;1 Varianten einmal in pSYC gegen alle anderen Proteine in pSYN und umgekehrt. Alle Interaktionen bis auf die mit CYCD3;1 waren in beiden Kombinationen reproduzierbar. Die Interaktionen mit CYCD3;1 konnten nicht reproduziert werden, wenn sich CYCD3;1 in pSYC befand. Um einen besseren Vergleich zu haben, wurden die Interaktionen von CDKA;1, CDKA;1 (T161D) und CDKA;1 (DE) in Abbildung 3.16 übernommen.

Tabelle 3.24: Interaktionen von CDKA;1, CDKA;1 (T161D), CDKA;1 (DE), CDKA;1 (Pstd.) und CDKA;1 (D146N) mit CKS1, CKS2, KRP1, KRP2, CYCB1;2, CYCD3;1, CYCH;1, CDT1, CDC6 und GUS; -- keine Interaktion, (+) schwache Interaktion, + Interaktion

	CDKA;1	T161D	DE	Pstd.	D146N
CKS1	+	+	+	+	+
CKS2	+	+	+	+	--
KRP1	+	+	+	--	+
KRP2	+	+	+	--	+
CYCB1;2	+	+	+	--	+
CYCD3;1	+	+	+	--	+
CYCH1	+	+	+	+	+
CDT1	+	+	(+)	--	+
CDC6	+	+	(+)	--	--
GUS	--	--	--	--	--

Beide CDKA;1 Varianten zeigten keine Interaktion mit der Negativkontrolle GUS. CDKA;1 (Pstd.) interagiert nur mit den beiden CKS Proteinen und CYCH;1. Mit CDKA;1 (D146N) konnten fast alle Interaktionen von CDKA;1 repliziert werden, nur die Interaktionen mit CKS2 und CDC6 konnten nicht gezeigt werden.

3.4.7 WEE1

Dieses Protein ist eine Kinase, die die inhibitorischen Phosphorylierungen an CDKs an hochkonservierten Stellen im „P-loop“ katalysiert. Hier sollte ihr Verhalten gegenüber den CDKA;1 Varianten getestet werden. Die Lokalisationstests ergaben, dass WEE1 nur im Kern zu finden ist. Im Kern ist es aber sehr unterschiedlich lokalisiert. In einigen Zellen ist es fast ausschließlich im Nucleolus, in anderen zeigen sich kleine Punkte im ganzen Kern und in wieder anderen ist es homogen im ganzen Kern verteilt. Einer Interaktion mit den CDKA;1 Varianten steht aber nichts im Weg, da CDKA;1 auch immer im Kern zu finden ist.

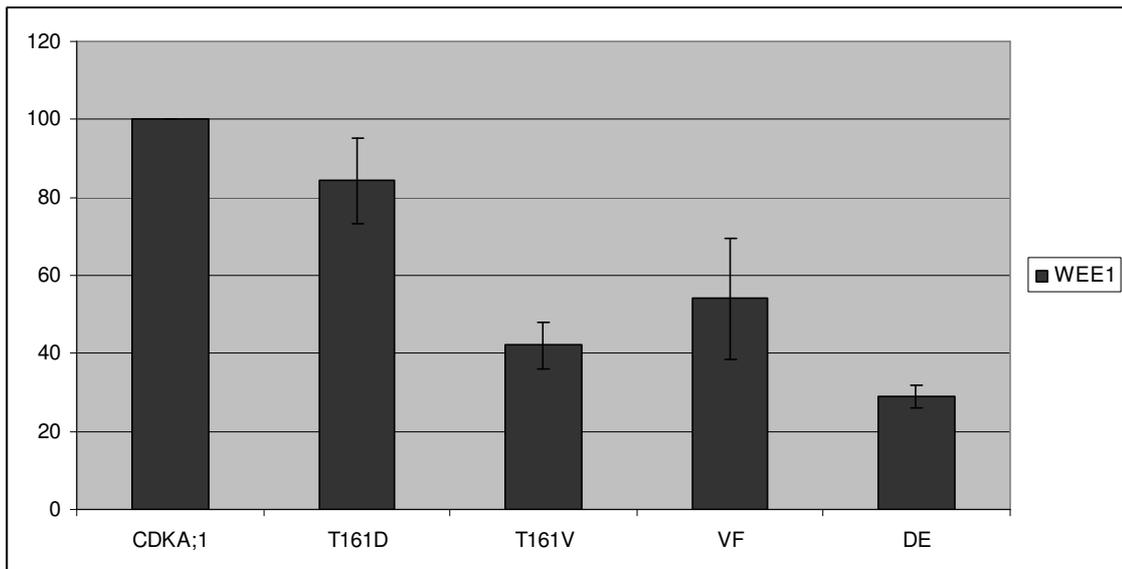


Abbildung 3.24: Fluoreszenz Quantifizierung der BiFC Interaktionen der CDKA;1 Varianten mit WEE1 (At1g02970)

Der Abfall der Fluoreszenzintensitäten von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161D) zu CDKA;1 (T161V) und der niedrige Messwert für CDKA;1 (DE) weisen auf ein Substrat hin. Zwei Messwerte werfen aber leichte Zweifel auf, der Wert von CDKA;1 (T161D) ist etwas zu hoch und der Wert für CDKA;1 (VF) etwas zu niedrig. Trotzdem würde man WEE1 als Substrat von CDKA;1 einordnen.

Nachdem die Interaktionen von WEE1 mit den CDKA;1 Varianten getestet wurden, sollten nun auch noch die Interaktionen mit den anderen CDKs und den beiden übrigen CDKA;1 Varianten überprüft werden. Die Interaktionen wurden jeweils in beiden Vektoren getestet, d.h. die CDKs einmal in pSYC gegen alle anderen Proteine in pSYN und umgekehrt. Die Interaktionen waren in beiden Kombinationen reproduzierbar.

Tabelle 3.25: Interaktionen von WEE1 mit CDKA;1 (Pstd.), CDKA;1 (D146N), CDKBs, CDKDs, CDKF;1 und GUS; -- keine Interaktion, + Interaktion

	WEE1
CDKA;1 (Pstd.)	--
CDKA;1 (D146N)	+
CDKB1;1	--
CDKB1;2	+
CDKB2;1	--
CDKB2;2	--
CDKD;1	+
CDKD;2	+
CDKD;3	+
CDKF;1	--
GUS	--

CDKA;1 (Pstd.) interagiert nicht mit WEE1. WEE1 interagiert mit CDKA;1 (D146N). Von den B-Typ CDKs interagiert nur CDKB1;2 mit WEE1. Alle D-Typ CDKs interagieren mit WEE1, aber nicht CDKF;1.

3.5 Zellzyklus Marker

Für eine Vielzahl von Experimenten wäre es von Vorteil zu wissen, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle befindet. Es gibt einige Methoden, die Zellzyklus-Phase, in der eine Zelle sich befindet, zu ermitteln. Ein Marker jedoch, der in lebenden Pflanzenzellen alle Zellzyklusphasen markiert, ist bisher noch nicht darunter. In diesem Kapitel geht es darum, einen solchen Zellzyklus Marker in lebenden Pflanzenzellen zu etablieren.

3.5.1 Theoretischer Aufbau des Zellzyklus Markers

Es sollte versucht werden, für jede Phase des Zellzyklus mindestens ein Protein zu finden, das nur in dieser Phase in der Zelle vorliegt. Dieses Protein sollte dann mit einem der vier fluoreszierenden Proteine (CFP, GFP, RFP, YFP) fusioniert werden und so die entsprechende Phase markieren. Jedes Protein sollte am Ende seiner Phase zusammen mit dem fusionierten fluoreszierenden Protein abgebaut werden. Dabei

wurde die Abfolge so gewählt, dass nicht YFP und GFP aufeinander folgen, da sie schlecht voneinander zu unterscheiden sind.

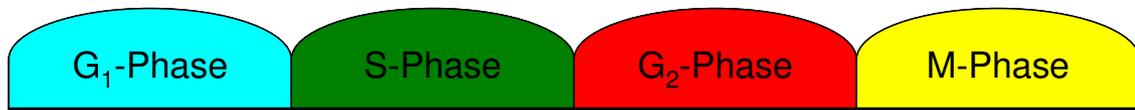


Abbildung 3.25: schematische Darstellung des möglichen Aufbaus des Zellzyklus Markers

3.5.2 Möglichen Kandidaten für den Zellzyklus Marker

Für den Aufbau des Zellzyklus Markers wurde nun in der Literatur nach Markern in anderen Organismen gesucht. Außerdem wurde in den Veröffentlichungen von Menges *et al.* (2002) über zellzyklus-spezifische Expression von Genen in *A. thaliana* nach Genen gesucht, die als Zellzyklus Marker in Frage kommen. Dabei ist aber zu beachten, dass die Expressionsdauer eines Gens nicht gleichbedeutend mit der Lebensdauer des daraus resultierenden Proteins ist. Es muss also auch die Lebensdauer des Proteins miteinbezogen werden, wenn der Zellzyklus Marker richtig funktionieren soll.

3.5.2.1 G₁-Phase

Laut Menges *et al.* (2002) gibt es einige Gene, die in der G₁-Phase exprimiert werden. Es konnte aber bei keinem dieser Gene sicher recherchiert werden, ob das daraus resultierende Protein zur S-Phase wieder abgebaut wird. Deshalb gibt es für diese Phase keinen Kandidaten.

3.5.2.2 S-Phase

Für diese Phase konnten einige Kandidaten gefunden werden. Die Kandidaten sind PCNA1, PCNA2, Histon H4, CDT1 und CDC6.

Für PCNA konnte schon ein funktionierender Zellzyklus Marker in der Literatur gefunden werden. Dieser Marker wurde erfolgreich in Maus Myoblasten getestet. Es war sogar möglich, die unterschiedlichen Stadien der S-Phase zu differenzieren, da PCNA in den verschiedenen Stadien unterschiedlich lokalisiert ist (Leonhardt H 2000). Bei diesem PCNA handelte es sich um das menschliche PCNA, wovon nur eines existiert, *A. thaliana* hingegen besitzt zwei homologe Proteine, PCNA1 (At1g07370) und PCNA2 (At2g29570).

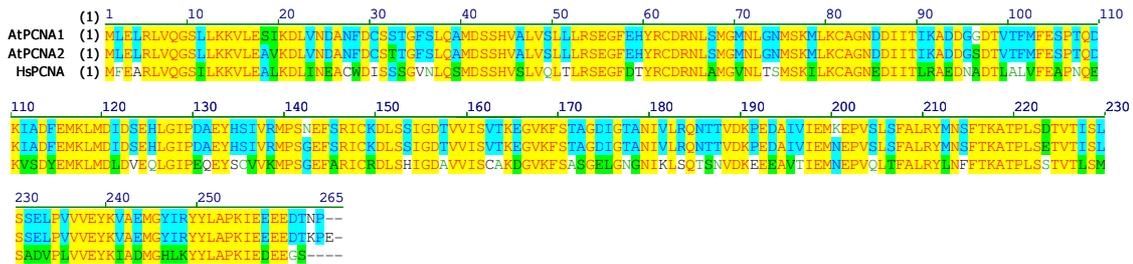


Abbildung 3.26: Aminosäuresequenz-Vergleich des menschlichen PCNA (HsPCNA) und der beiden Homologen aus *A. thaliana* (AtPCNA1 und AtPCNA2)

Das Homolog mit der höchsten Übereinstimmung (66% identische Aminosäuren) zu dem menschlichen PCNA ist PCNA2. Zur Sicherheit wurde aber auch noch das zweite Homolog, PCNA1, verwendet. Das Konstrukt wurde genauso aufgebaut, wie es für das Konstrukt in Leonhardt *et al.* (2000) beschrieben ist. Die Expression von beiden PCNAs ist in allen Teilen der Pflanze zu finden, besonders in proliferierendem Gewebe. Für PCNA2 konnte auch eine S-Phase spezifische Expression festgestellt werden (Menges M 2002).

Die Expression von Histonen wird häufig als Marker für die S-Phase verwendet. Auch in Menges *et al.* (2002) sind einige Histone S-Phase spezifisch exprimiert. Für Histone H4 aus *A. thaliana* wurde ein funktioneller Promotor schon erfolgreich kloniert (Chaboute ME 1987). Dieser ist auch in allen Teilen der Pflanze exprimiert, mit Expressionsmaxima in proliferierendem Gewebe (Chaubet N 1996).

CDT1 und CDC6 werden für den Start der Replikation benötigt und dann zügig abgebaut (Morgan 2007). Die Expression von beiden ist in allen Teilen der Pflanze zu finden, mit Expressionsmaxima in den Meristemen. Sie konnten leider nicht unter den zellzyklus-spezifisch exprimierten Genen gefunden werden. Für den Promotor von CDC6 ist schon ein funktionelle Version bekannt (Castellano M 2001), die auch exakt so für das Konstrukt verwendet wurde.

3.5.2.3 G₂-phase

Wie schon für die G₁-Phase konnten für die G₂-Phase Gene gefunden werden, die phasenspezifisch exprimiert werden. Doch unter ihnen war keines, von dessen Protein bekannt ist, dass es vor der M-Phase wieder abgebaut wird. Also gibt es auch für die G₂-Phase gibt keine geeigneten Kandidaten.

3.5.2.4 M-Phase

Die bekanntesten Proteine, die sehr spezifisch nur in der M-Phase vorliegen, sind B-Typ Cycline. Es konnten sechs B-Typ Cycline identifiziert werden, die nur spezifisch in der M-Phase exprimiert werden. Darunter CYCB1;1 und CYCB1;2. Für den Zellzyklus Marker sollte Fusionsproteine mit YFP erstellt werden. Da aber bekannt ist, dass eine Überexpression von Cyclinen zu Problemen führen kann, wurde nur der N-Terminus von CYCB1;1 im Fusionskonstrukt verwendet. Dazu wurde ein genomischer Teil des CYCB1;1 Gens verwendet, der vom Startcodon bis ins dritte Exon reicht (Basenpaare

1-905). Dies entspricht dem N-Terminus von CYCB1;2 bis einschließlich der Aminosäure 150. Die Abbausignalsequenz (destruction box; DB) von CYCB1;1 ist darin enthalten und sorgt für einen Proteinabbau nach der M-Phase. Zudem ist dieses Konstrukt noch im Kern lokalisiert. An dieses Konstrukt wurde N-terminal das YFP fusioniert. Das fertige Gesamt-Konstrukt (YFP:DB^{CYCB1;1}) sollte dann unter den Promotoren von CYCB1;1 und CYCB1;2 exprimiert werden. Diese Konstrukte wurden von Nico Dissmeyer (Universität Köln, Lehrstuhl für Botanik III) angefertigt.

Eine weitere Möglichkeit die M-Phase zu identifizieren, ist das Markieren der Kernmembran. Wenn die Kernmembran im Zuge der Zellteilung aufgelöst wird, so ist dies gut zu erkennen. Eine Möglichkeit hierfür ist die Fusion von einem Membrananker, der in der Kernmembran lokalisiert ist, mit YFP. Ein solches Konstrukt ist im Zuge dieser Arbeit entdeckt worden. Die TM Konstrukte, die dazu gedacht waren, KRP1 aus dem Kern herauszuhalten, zeigen genau eine solche Lokalisierung. Da aber nicht sichergestellt werden kann, dass diese KRP1 Konstrukte keinen Einfluss auf den Zellzyklus haben, wurde ein Konstrukt erstellt, das die NLS von KRP1 enthält, aber keinen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Das Konstrukt besteht somit aus dem Membrananker TM, KRP1¹⁻¹⁵² und YFP. Exprimiert man dieses Konstrukt nun unter einem konstitutiv aktiven Promotor, so kann man das Verhalten der Kernmembran über den kompletten Zellzyklus hinweg beobachten.

3.5.3 Aufbau des Zellzyklus Markers

Bedingt durch das Fehlen von möglichen Markern für die G₁- und G₂-Phase musste von dem theoretischen Aufbau des Zellzyklus Markers abgewichen werden. Eine dieser Phasen könnte mit einem konstitutiv aktiven Promotor markiert werden, da alle anderen Phasen durch eine andere Fluoreszenz abgedeckt sein würden. Zudem hätte man mit einem konstitutiv aktiven Promotor auch eine interne Kontrolle für die Fluoreszenzstärke der anderen Marker. Der konstitutiv aktive Promotor sollte allerdings nicht zu stark sein, da sonst die Zelle eventuell durch das Genprodukt gestört wird. Die Wahl fiel somit auf einen Ubiquitin-Promotor (pUBC10). Dieser ist ubiquitär exprimiert und hat keine so hohe Expressionsstärke wie der sonst üblicherweise verwendete 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus. Unter diesem Promotor sollte CFP exprimiert werden, welches zur Erkennung der G₁-Phase genutzt werden sollte. Der Unterschied zu den anderen Phasen wäre dann durch das Fehlen anderer Fluoreszenzsignale zu erkennen.

Für die G₂-Phase braucht man ein Protein, das zumindest in der G₁-Phase nicht vorliegt. Es darf aber in der S- und M-Phase vorliegen, da man es dort durch das Vorhandensein der anderen Fluoreszenzsignale unterscheiden kann. Hierfür kam das schon für die Markierung der M-Phase erstellte Konstrukt mit dem N-Terminus von CYCB1;1 in Frage. Die in diesem Konstrukt enthaltene DB sorgt für einen Abbau des Proteins nach der M-Phase. Die DB sollte aber in der G₂-Phase nicht aktiv sein. Es wurde nur das YFP des Konstruktes gegen ein RFP austauschen und unter einem Promotor exprimieren der schon in der G₂-Phase aktiv ist. Die Wahl fiel hierbei auf den CDKA;1

Promotor. Er ist ubiquitär exprimiert und auch nicht so stark wie der üblicherweise verwendete 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus.

3.5.3.1 Erstellte Konstrukte

Die Promotoren von Histone H4 und CDC6 wurden exakt nach den Vorgaben in der Literatur erstellt. Der Promotor von Histone H4 entspricht dem *Ava*I Schnittstück vor dem Histone H4 Gen, das sind die Basen -935 bis -30, wenn man davon ausgeht, dass das A im Startcodon (ATG) als Nummer 0 zählt. Der Promotor von CDC6 umfasst die Basen -2252 bis +17. Der Promotor von UBQ10 wurde von Susanne Kujit in dem Vektor pGII(A+)-BAR-UBQ10 bereitgestellt und umfasst die Basen -1986 bis -1. Der PCNA1 Promotor wurde so gewählt, dass er alle Basen in 5' Richtung umfasst, bis zum nächsten Gen. Dies sind die Basen -413 bis -1. Bei dem PCNA2 Promotor sollten ebenfalls alle Basen bis zum nächsten Gen gewählt werden. Hier war jedoch zu beachten, dass sich PCNA2 komplementär im Genom liegt. Der Promotor müsste somit in 3' Richtung liegen. Bei dem in dieser Richtung folgenden Gen fiel auf, dass es erst ein kleines Exon (~100bp) und dann ein sehr großes Intron (~400 bp) besitzt. In diesem Intron könnten sich noch für den PCNA2 Promotor wichtige Motive befinden, weshalb es mit in den Promotor aufgenommen wurde. Der Promotor besteht deshalb aus den Basen +1 bis +911. Der Promotor für CDT1 wurde so gewählt, dass er alle Basen in 5' Richtung bis zu dem nächsten Gen enthält. Der Promotor umfasst somit die Basen -2746 bis -1. Der CDKA;1 Promotor wurde von Moritz Nowack zur Verfügung gestellt und die Konstrukte pCYCB1;1: YFP:DB^{CYCB1;1} und pCYCB1;2: YFP:DB^{CYCB1;1} wurden von Nico Dissmeyer bereitgestellt. Für alle Promotoren wurden Reporterkonstrukte (YFP:DB und DB:GUS:RFP) hergestellt und getestet. Dabei konnte nur mit dem Promotor von Histone H4 nie ein Signal nachgewiesen werden.

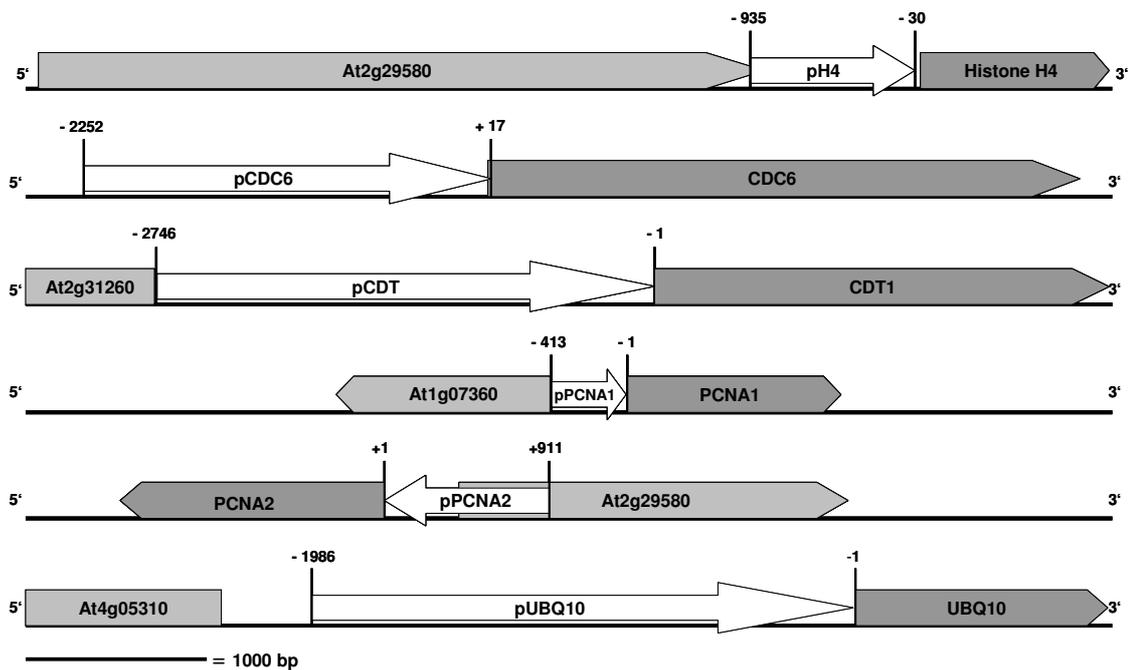


Abbildung 3.27: schematische Darstellung der klonierten Promotoren

Die PCNA Konstrukte wurden exakt so erstellt wie der funktionelle Marker aus den Mäuse-Myoblasten. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des verwendeten Linkers in Basentriplets übersetzt und zwischen GFP und den PCNA Proteinen eingefügt. Dieser Linker wurde ebenfalls für das CDT1-Konstrukt verwendet, da C-terminale Fusionen mit CDT1 nicht immer funktioniert haben. Das GFP wurde C-terminal direkt an CDC6 fusioniert, dazu musste nur das Stop-Codon von CDC6 entfernt werden. Für das TM:YFP:KRP1¹⁻¹⁵² Konstrukt wurde die TM Sequenz mit YFP ohne Stop-Codon fusioniert, dann wurde dieses Konstrukt an KRP1¹⁻¹⁵² fusioniert. Für das RFP:DB Konstrukt wurde lediglich die YFP Sequenz aus YFP:DB gegen die Sequenz von RFP ausgetauscht. Diese Konstrukte wurden dann in die Vektoren mit den entsprechenden Promotoren kloniert. Damit ergeben sich die in Abbildung 3.28 dargestellten möglichen Kombinationen von Zellzyklus Markern.

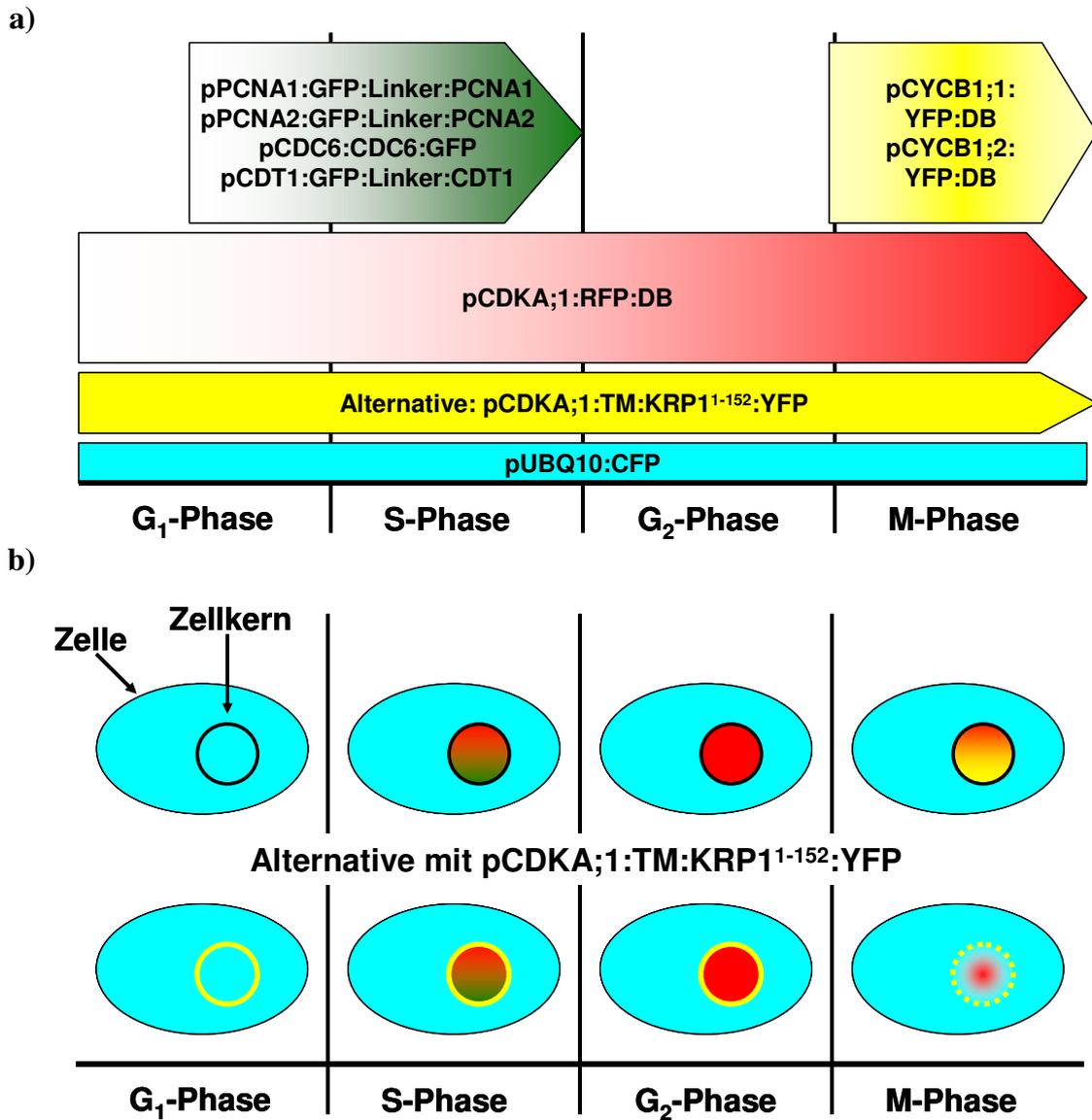


Abbildung 3.28: schematische Darstellung der möglichen Kombination von verschiedenen Zellzyklus Phasen Markern (a) und deren Verteilung in der Zelle (b)

3.5.4 Verhalten der Konstrukte *in planta*

Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die Zellzyklus Phasen Marker einzeln in *A. thaliana* (Col-0) Pflanzen transformiert und unter dem Mikroskop ausgewertet. Die beste Möglichkeit, sich teilende Zellen zu sehen, ist in der Wurzel gegeben, da dort vom Meristem ausgehend sich die Zellen in regelmäßigen Abständen teilen, oder aber sehr junge Blätter, die sich im Wachstum befinden. Für die Auswertung wurden deshalb junge Keimlinge verwendet, die auf MS-Platten angezogen wurden. Bei keiner der Linien mit den Promotoren von CDC6 oder CDT1 konnten Signale nachgewiesen werden. Auch bei dem Konstrukt TM:KRP1¹⁻¹⁵²:YFP konnte kein Signal gefunden werden. Diese Konstrukte scheinen aus unbekanntem Gründen nicht zu funktionieren. Für alle anderen Konstrukte konnten Signale detektiert werden. Eine Auswahl ist in Abbildung 3.29 zu sehen.

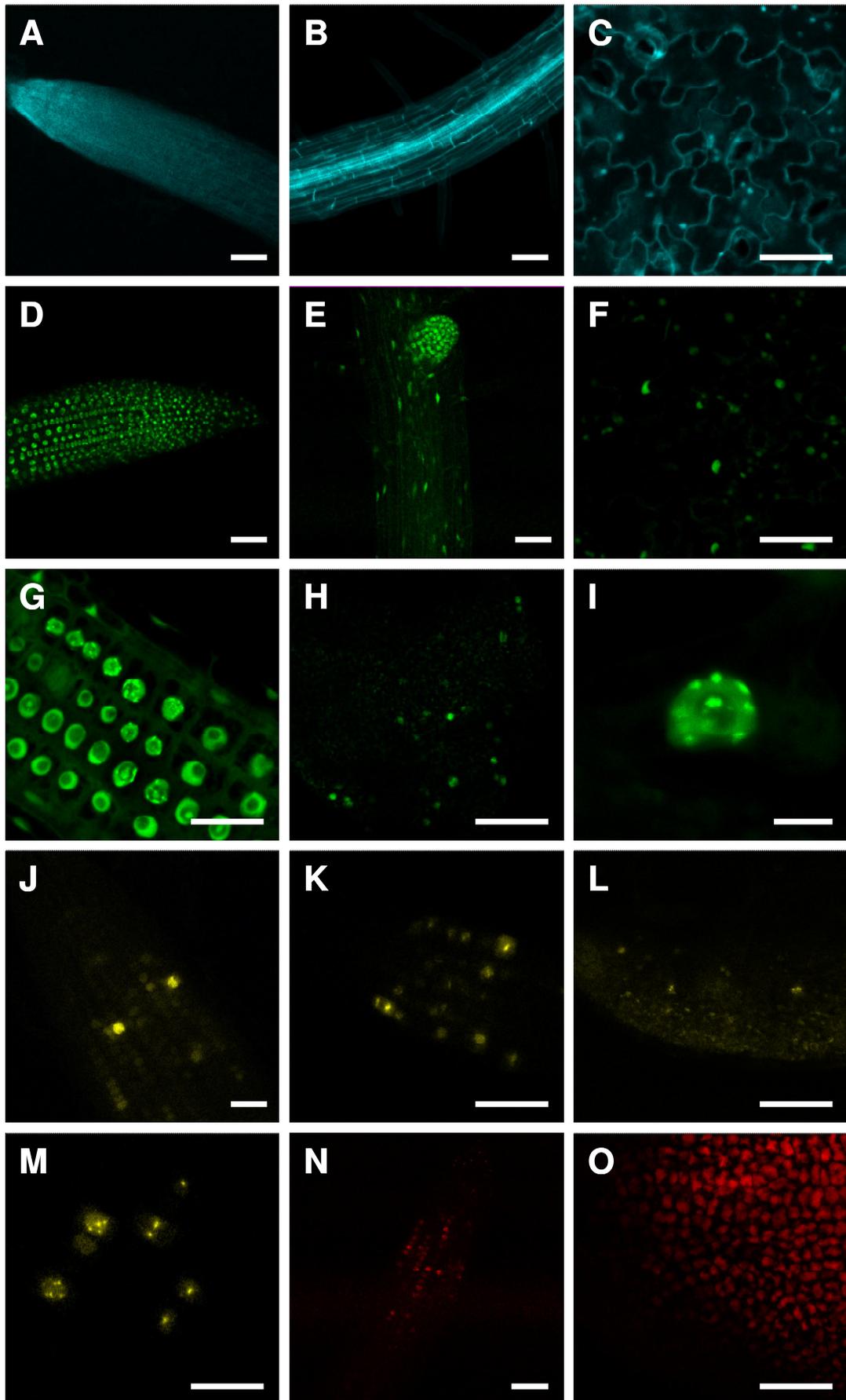


Abbildung 3.29: mikroskopische Aufnahmen von Wurzeln und jungen Blättern der Zellzyklus Markerlinien, der Balken entspricht 50 μm in A-H und J-O, in I entspricht er 10 μm : A-C pUBQ10:CFP in der Wurzelspitze (A), in der Wurzelhaarzone der Wurzel (B) und in einem jungen Blatt (C); D-G pPCNA1:GFP:Linker:PCNA1 in der Wurzelspitze (D) in der Wurzel mit entstehender Seitenwurzel (E), in einem jungen Blatt (F) und in der Teilungszone der Wurzel (G); H-I pPCNA2:GFP:Linker:PCNA2 in einem jungen Blatt (H) und in einem Trichom (I); J-M pCYCB1;1:YFP:DB in der Wurzelspitze (J), in der Wurzelhaarzone (K), in einem jungen Blatt (L) und in einer einzelnen Wurzelzellen der Teilungszone (M); N-O pCDKA;1:RFP:DB in der Wurzelspitze (N) und in einem jungen Blatt (O)

Der Marker für die G₁-Phase, pUBQ10:CFP funktioniert wie vorgesehen. Das CFP Signal ist im Zytoplasma und schwach auch im Kern zu finden (Abbildung 3.29 A-C). Von den Markern für die S-Phase funktionieren zwei nicht und pPCNA2:GFP:Linker:PCNA2 konnte nur in oberirdischen Teilen der Pflanze nachgewiesen werden (Abbildung 3.29 H). Der einzige funktionelle Marker, der in allen Teilen der Pflanze nachweisbar ist, ist pPCNA1:GFP:Linker:PCNA1 (Abbildung 3.29 D-G). Die Signale der PCNA Konstrukte sind primär im Kern zu finden, wo sie in einigen Fällen subnucleare Lokalisation aufweisen (Abbildung 3.29 G und I). Es sind aber auch sehr schwache Signale im Zytoplasma nachweisbar. Der Marker für die G₂-Phase, pCDKA;1:RFP:DB ist ebenfalls funktionstüchtig und in allen Teilen der Pflanze zu finden (Abbildung 3.29 N-O). Das Signal ist nur im Kern zu sehen. Die beiden Marker für die M-Phase sind ebenfalls in allen Teilen der Pflanze zu finden (Abbildung 3.29 J-M). Sie unterscheiden, weder in der Expressionsstärke noch in den Orten ihrer Expression voneinander. Auffällig ist, dass in deutlich weniger Zellen ein Signal zu erkennen ist als bei den anderen Markern. In einigen Zellen ist eine subnucleare Lokalisierung zu erkennen (Abbildung 3.29 M).

Da der Marker mit PCNA2 nicht in allen Zellen exprimiert wurde, wurde das Konstrukt unter den CDKA;1 Promotor kloniert und erneut in Pflanzen transformiert. Die Auswertung dieser Pflanzen ergab, dass sich das Signal nun in allen Teilen der Pflanze nachweisen ließ (Abbildung 3.30 A-D). Es war jetzt vergleichbar mit pPCNA1:GFP:Linker:PCNA1.

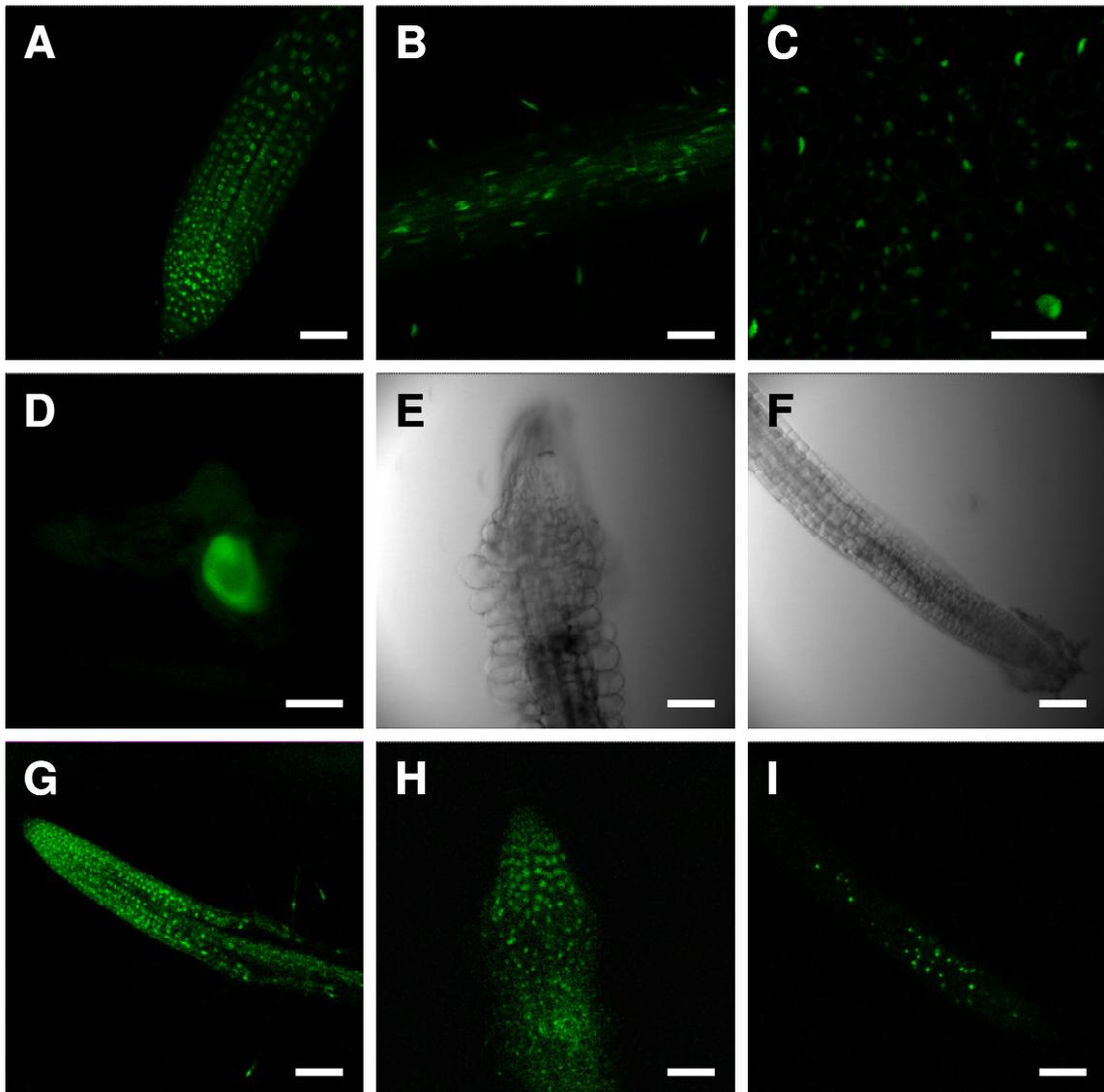


Abbildung 3.30: mikroskopische Aufnahmen von Wurzeln und jungen Blättern einer Zellzyklus Markerlinie (A-D) und Aufnahmen der Wurzelspitzen von Experimenten mit Zellzyklus-Inhibitoren (E-I), der Balken entspricht 50 μm in A-C und E-I, in D entspricht er 10 μm : A-I pCDKA;1:GFP:Linker:PCNA2 in der Wurzelspitze (A), in der Wurzelhaarzone (B), in einem jungen Blatt (C) und in einem Trichom (D); hier Beispielhaft für alle anderen Zellzyklus Marker dargestellt pPCNA1:GFP:Linker:PCNA2 in der Kontrolle mit DMF (G), mit HU (H) und mit Oryzalin (I); Durchlichtbilder der behandelten Wurzelspitzen mit HU (E) und Oryzalin (F)

3.5.4.1 Test der Spezifität der Zellzyklus Marker

Nun galt es noch zu überprüfen, ob die Zellzyklus-Marker auch wirklich nur in der Phase des Zellzyklus vorzufinden sind, in der sie auch eingeschaltet sein sollten. Um dies zu bewerkstelligen, müssen die Zellen in der entsprechenden Phase angehalten werden. Dies ist über die Gabe von Zellzyklus-Inhibitoren möglich. Für die ersten Versuche sollten Hydroxy-Harnstoff („hydroxy urea“, HU), zur Arretierung der Zellen in der S-Phase, und Oryzalin (3,5-Dinitro-N',N'-dipropylsulfanilamide), zur Arretierung der Zellen in der M-Phase, eingesetzt werden. Die notwendigen Konzentrationen und

Inkubationszeiten wurden in Veröffentlichungen recherchiert (Planchais S 2000). Die vorgeschlagenen Konzentrationen (100mM HU in H₂O_{dd} und 30μM Oryzalin in DMF) und Inkubationszeiten (je 48 Std.) führten aber zu keinen klaren Ergebnissen. Die Gabe von HU führte bei allen Markern zu einem Verlust aller Signale (Abbildung 3.30 H). Die in dem Bild zu sehenden Punkte wurden überprüft und sind nachweislich kein GFP Signal, sondern Autofluoreszenz. Diese stammt nicht von Verunreinigungen auf dem Präparat, denn sie war in allen Präparaten zu finden und es konnten auch keine Fremdkörper im Durchlichtbild des Präparates gefunden werden (Abbildung 3.30 E). Die Gabe von Oryzalin führte ebenfalls bei allen Markern zu denselben Ergebnissen. Hier kam es nicht zu einem Verlust der Fluoreszenz, doch zu einem Anschwellen der Zellen (Abbildung 3.30 F) und Autofluoreszenz der Zellwände (Abbildung 3.30 I).

Die Experimente wurden mit anderen Konzentrationen (10, 50 und 100mM HU in H₂O_{dd} und 3, 15 und 30μM Oryzalin in DMF) und Inkubationszeiten (12, 16, 24, 36 und 48 Std.) wiederholt, doch bisher immer mit denselben Ergebnissen. Die mit HU behandelten Wurzeln zeigten keine echten Signale mehr, sondern nur die unspezifische Autofluoreszenz. Die mit Oryzalin behandelten Wurzeln wiesen alle die aufgeblähten Zellen und die Autofluoreszenz in deren Zellwänden auf. Die Signale der Marker blieben unverändert.

4 Diskussion

4.1 Vor- und Nachteile von „split-two-hybrid“ Systemen bei der Untersuchung von Zellzyklus-Genen

Die beiden Interaktionssysteme, Split-Ubiquitin und Split-YFP, die in dieser Arbeit genutzt wurden, machen Interaktionen sichtbar, indem sie die Rekonstitution eines Proteins aus zwei Proteinhälften nutzen. Diese Art des Nachweisens hat den Nachteil, dass die Hälften des Proteins eine Affinität zueinander haben. Diese Affinität sorgt dafür, dass die Systeme etwas empfindlicher werden für falsch positive Ergebnisse. Dazu gibt es die Problematik, die immer bei „two-hybrid“ Systemen vorhanden ist. Sie arbeiten immer mit Proteinfusionen, was dazu führen kann, dass einige Proteine nicht funktionell sind. Bei einigen ist die Orientierung, N- oder C-terminal, der Fusion von entscheidender Bedeutung, bei anderen ist es die Länge der Fusion oder sogar beides. Auch wenn die Fusionsproteine bei einer Methode funktionieren, so ist es nicht sicher, dass sie so auch im Organismus ihre Funktion richtig übernehmen können. Es ist also wichtig immer zu bedenken, dass man mit einem artifiziellen System arbeitet und die Proteine sich nicht unbedingt immer so verhalten müssen wie sie dies im eigentlichen Organismus tun würden.

4.1.1 Das Split-Ubiquitin System

Das reguläre „yeast two-hybrid“ System, mit den beiden Teilen eines Transkriptionsfaktors, diskriminiert Proteine, die nicht in den Kern gelangen können. Um diese Diskriminierung zu umgehen, wurde speziell für Membranproteine das Split-Ubiquitin System entwickelt. Bei den Arbeiten mit diesem System stellte sich heraus, dass das Split-Ubiquitin System für die Interaktionen von kernlokalisierten Proteinen nicht sonderlich gut geeignet ist. Interaktionen können zwar nachgewiesen werden, doch ist die Selektion nicht so eindeutig. Bei der Interaktion von Membranproteinen ist auf den SD-Ura Platten kein Wachstum und auf den FOA Platten normales Wachstum zu erkennen. Dies ist nicht so für die Interaktion von kernlokalisierten Proteinen, diese zeigen ein, im Vergleich zu der Kontrollplatte, verlangsamtes Wachstum sowohl auf FOA Platten als auch SD-Ura Platten. Dies lässt die Hypothese zu, dass die Interaktionen nicht richtig nachgewiesen werden, d.h. der Reporter wird nur zu einem Teil vom Ubiquitin abgetrennt und abgebaut. Die restliche Menge an Reporter genügt der Hefe, um auf SD-Ura Platten zu wachsen und ist wiederum gering genug, um auf FOA Platten zu überleben. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Aktivität der UBPs im Kern geringer ist als die im Zytoplasma.

Eine Besonderheit dieses Systems wurde durch die Auswertung des Screens mit CDKA;1 gefunden. Da in diesem Screen sehr viele Interaktoren nachgewiesen werden

konnten, war es nötig, diese nach bestimmten Kriterien zu sortieren. Dafür wurden die Ergebnisse des Screens unter anderem mit einer Liste von CDKA;1 Substraten verglichen. Es konnten einige Substrate auch in dem Split-Ubiquitin Screen gefunden werden. Deshalb wurde mit bekannten Substraten von CDKA;1 überprüft, ob der Nachweis von Substraten im Split-Ubiquitin System möglich ist. Es war möglich die Interaktion von CDKA;1 mit einigen Substraten nachzuweisen. Dies ist wahrscheinlich durch die hohe Affinität der Ubiquitinhälften zueinander, welche sonst ein Nachteil des Systems darstellt, möglich. Die Problematik der Affinität der Ubiquitinhälften untereinander war schon bekannt, als das System erstellt wurde. Deshalb wurde schon von Beginn an nach einer Möglichkeit gesucht, die Empfindlichkeit des Systems zu variieren. Die Möglichkeit, die gefunden wurde, besteht aus einem Austausch einer einzelnen Aminosäure in der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (Nub). Dazu muss nur die Aminosäure Isoleucin an Position 13 verändert werden, dies bewirkt schon eine Veränderung der Affinität der beiden Ubiquitinhälften zueinander. Je nachdem, durch welche Aminosäure das Isoleucin ausgetauscht wird, kann die Affinität der Ubiquitinhälften untereinander stark variiert werden (Johnsson N 1994). Für diese Arbeit wurde eine Variante verwendet, bei der das Isoleucin durch ein Alanin ersetzt (I13A) wurde. Dies sollte die hohe Empfindlichkeit des Systems auf eine mittlere Empfindlichkeit reduzieren. Durch Tests konnte gezeigt werden, dass diese Reduktion ausreicht, um die Interaktion von CDKA;1 mit ihren Substraten nicht mehr nachweisen zu können. Die hohe Empfindlichkeit des Systems ermöglicht also das Auffinden von Substraten der CDKA;1.

Bei diesem System wird Hefe als Organismus verwendet, in dem die Interaktionen getestet werden. Dies hat einige Vorteile, aber auch Nachteile. Von Vorteil ist, dass die Arbeiten mit Hefe sehr einfach und Platz sparend sind. Die Methoden zur Transformation sind besonders effektiv, weshalb sie auch in 96 Reaktionsgefäßplatten durchgeführt werden können, was das Testen vieler Interaktionen nebeneinander vereinfacht. Für die vorliegende Arbeit stellt die Verwendung von Hefe aber auch ein Nachteil dar, denn es wurde mit pflanzlichen Genen gearbeitet. Bei der Expression von organismusfremden Genen kann nicht sichergestellt werden, dass alle Gene richtig abgelesen werden und die daraus resultierenden Proteine richtig gefaltet und modifiziert werden. Dies kann zu einigen Problemen führen.

Während der Verifizierung der gefundenen Interaktionen mit dem BiFC System hat sich herausgestellt, dass aber auch die Lokalisation der Proteine von entscheidender Bedeutung ist. Alle überprüften Proteine, die in Hefe mit CDKA;1 interagiert haben, aber in Pflanzen in den Chloroplasten zu finden sind, zeigen keine Interaktion mit CDKA;1 mehr, wenn sie in einem pflanzlichen System getestet werden. Die Hefe besitzt keine Chloroplasten und die Proteine liegen deshalb wahrscheinlich in einem anderen Kompartiment vor und können deshalb mit CDKA;1 in Kontakt kommen, womit sie dann eine falsch positive Interaktion zeigen. Das Split-Ubiquitin System ist also gut, um einen Screen durchzuführen, aber die gefundenen Interaktionen sollten auf jeden Fall noch mit anderen Methoden verifiziert werden.

4.1.2 Das BiFC System

Von Vorteil ist, dass das System in einem pflanzlichen Organismus durchgeführt werden kann. Leider stellte sich die Transformation von *A. thaliana* als zu ineffektiv heraus, weshalb mit Tabak (*N. benthamiana*) gearbeitet wurde. Die Möglichkeit die Interaktion optisch darzustellen ist ein großer Vorteil des Systems. Die Interaktionen können an der Stelle in der Zelle nachgewiesen werden, an der sie auch stattfinden. Wegen der aufwendigen Transformation und dem Platzbedarf der Pflanzen ist es in diesem System nur bedingt möglich, große Mengen an Interaktionen zu testen.

Wie auch schon die beiden Hälften des Ubiquitins, haben auch die beiden Hälften des fluoreszierenden Protein, eine gewisse Affinität zueinander. Dies kann, wie auch schon im Split-Ubiquitin System, zu falsch positiven Interaktionen führen. Für das BiFC System gibt es leider keine bekannten Modifizierungen um diese Affinität abzuschwächen. Durch diese hohe Empfindlichkeit ist es aber ebenfalls möglich, die Interaktion von CDKA;1 mit ihren Substraten nachzuweisen. Mit dem BiFC System ist es sogar möglich, zwischen einem Substrat und einer stärkeren Interaktion zu differenzieren. Dies ist Mittels der Varianten der CDKA;1, welche alle eine unterschiedliche Kinaseaktivität haben, möglich. Durch Quantifizierung der Signalstärke der Interaktionen konnte ein Unterschied im Verhalten von Substraten und Interaktoren aufgezeigt werden. Diese Differenzierung ist aber rein qualitativ, man kann also nur sagen, ob es sich um ein mögliches Substrat handelt oder nicht. Quantitative Aussagen, zum Beispiel über die Wechselzahl und andere Enzym-Substrat spezifische Werte, sind mit dieser Messmethode nicht möglich. Es fehlen interne Kontrollen und es gibt zu viele variable Faktoren. Einige davon sind:

- *A. tumefaciens* inseriert seine T-DNA rein zufällig im Genom, das inserierte Konstrukt kann so unter die Kontrolle anderer Promotoren geraten
- die inserierte T-DNA kann öfter auch in Wiederholungen vorliegen, was Auswirkungen auf die Menge des Konstrukts in der Zelle hat
- die Expression des Konstrukts kann unterdrückt („silencing“) werden
- die Laserstärke an dem verwendeten Mikroskop konnte nicht immer auf denselben Wert eingestellt werden, was eine immer gleiche Anregung verhindert
- die beiden Hälften des fluoreszierenden Proteins bleiben eine gewisse Zeit zusammen, was zum Beispiel die Messung der Wechselzahl verfälschen würde

Eine quantitative Aussage zu Substrat-Enzym Interaktionen ist bisher nur im tierischen System mit der „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) Methode möglich (Riddle SM 2006; Yudushkin IA 2007). Diese hier vorgestellte Methode funktioniert bisher nur mit CDKA;1, weil es dort Varianten mit unterschiedlich starker Kinaseaktivität gibt. Für andere Kinasen wäre es zwar möglich, einen Unterschied in den Signalstärken zwischen einem Interaktor und einem Substrat zu messen, doch ist der Übergang hier fließend und somit keine Aussage möglich. Wie und ob diese

Methode auch für andere Enzym-Substrat Interaktionen verwendet werden kann, ist also fraglich.

4.1.3 Arbeiten mit Zellzyklusproteinen

Da der Zellzyklus so wichtig für das Überleben der Zelle bzw. des ganzen Organismus ist, sind seine Proteine hoch konserviert. Wie schon bei dem Sequenzvergleich von CDKA;1 aus *A. thaliana* mit CDKs aus vier anderen Organismen zu sehen ist (Abbildung 1.2), so sind auch die anderen Proteine des Zellzyklus ähnlich hoch konserviert. CDKA;1 benötigt einen Cyclin Partner um mit Substraten zu interagieren. Dieser Cyclin Partner kommt bei den Experimenten aus dem jeweiligen Organismus, in dem die Interaktion nachgewiesen wird. Dies führt aber auch dazu, dass der CDKA;1-Cyclin Komplex nicht dem des eigentlichen Organismus entspricht und somit eventuelle andere Interaktionen aufweist, wie der eigentliche CDKA;1-Cyclin Komplex.

Wegen dieser hohen Sequenzähnlichkeiten der Zellzyklusproteine ist auch die Funktionalität der verwendeten CDKA;1 Varianten zu überdenken. Es kann davon ausgegangen werden, dass sowohl Homologe der CAKs, wie auch von WEE1 und/oder MYT1 in Tabak (*N. bethamiana*) zu finden sind. Leider ist es nicht möglich nach solchen Homologen zu suchen, da das Genom von *N. benthamiana* noch nicht sequenziert ist. Die homologen Proteine könnten auch die eingebrachte CDKA;1 aus *A. thaliana* phosphorylieren. Ob die Phosphorylierungen stattfinden, ist nicht geklärt, doch könnte mit ihnen das Verhalten der CDKA;1 Varianten erklärt werden. Um das Verhalten zu erklären, wird davon ausgegangen, dass die Phosphomimikry nur teilweise funktioniert und nur die echte Phosphorylierung den maximalen Effekt hat. Es gibt für jede CDKA;1 Variante vier mögliche Versionen der Phosphorylierungen. Die erste Version hätte keine Phosphorylierung, die zweite entspricht der maximalen Phosphorylierung an allen drei Phosphorylierungs-Stellen, die dritte wäre nur an den inaktivierenden Positionen (T14 und Y15) phosphoryliert und die vierte Version hätte nur die Phosphorylierung an der aktivierenden Position (T161). Mit diesen Annahmen wären die Aktivitätsniveaus der CDKA;1 Varianten zu erklären.

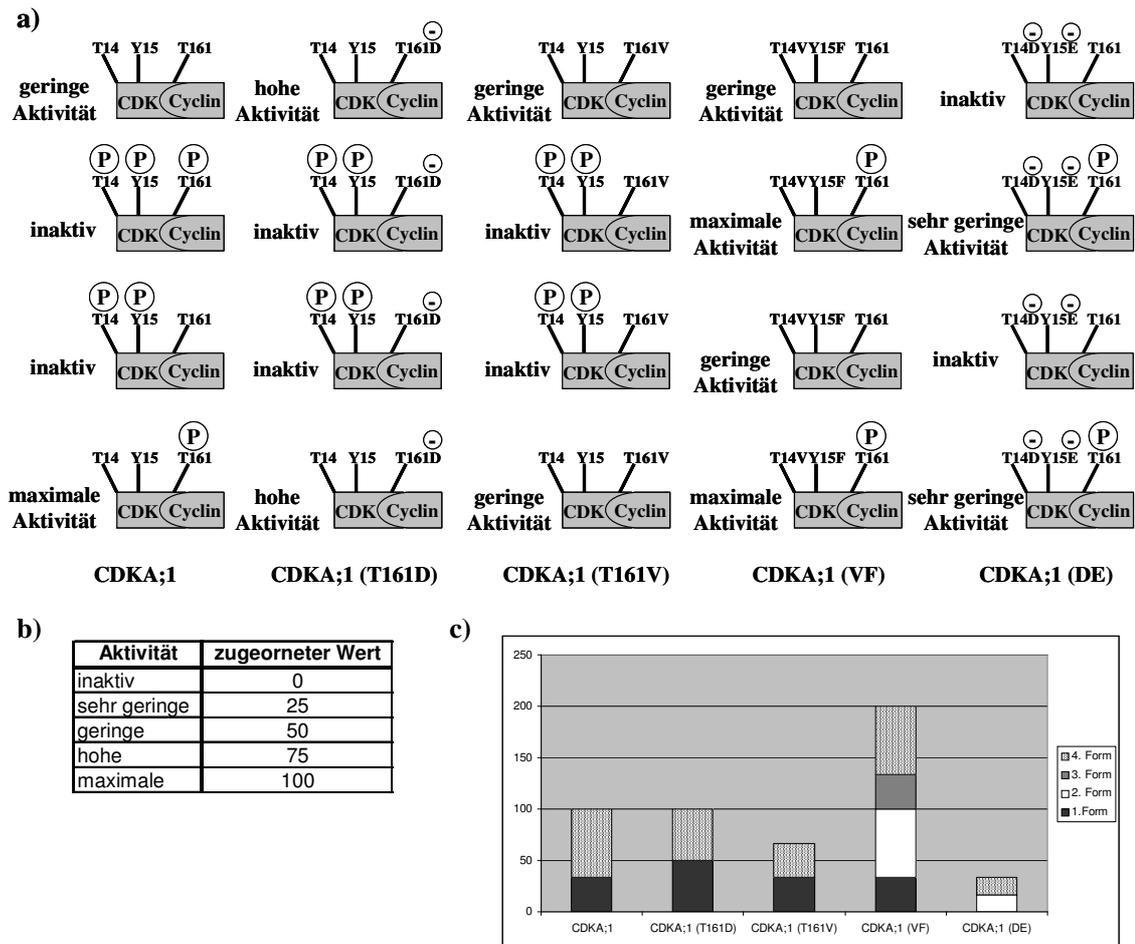


Abbildung 4.1: hypothetische Aktivitäten der verschiedenen CDKA;1 Varianten in ihren unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen: a) die drei möglichen Formen der Phosphorylierungen jeder CDKA;1 Variante; b) Werte für die verschiedenen Aktivitäten der CDKA;1 Varianten; c) graphische Darstellung der hypothetischen Aktivitäten der CDKA;1 Varianten mit CDKA;1=100% als Richtwert

Der Werte für die Aktivität der CDKA;1 Varianten stellt die Summe aus allen vier möglichen Kombinationen von Phosphorylierungen dar. Für CDKA;1 ist dies somit die Summe von einer Form mit geringer Aktivität (keine Phosphorylierung), zwei inaktiven Formen (T14, Y15, T161 phosphoryliert und T14, Y15 phosphoryliert) und einer Form mit maximaler Aktivität (nur T161 phosphoryliert). Bei CDKA;1 (T161D) werden die Werte zwei inaktiven Formen und zwei Formen mit hoher Aktivität zusammen addiert. Die beiden Formen haben deshalb nicht die maximale Aktivität, da die aktivierende Phosphorylierung durch eine Phosphomimikry ersetzt ist. Bei CDKA;1 (T161V) haben zwei Formen eine geringe Aktivität und zwei Formen sind inaktiv. Die Formen mit geringer Aktivität sind zu vergleichen mit der noch nicht phosphorylierten Form der CDKA;1, da die Phosphorylierung an der aktivierenden Aminosäure (T161) nicht möglich ist. Die Werte von CDKA;1 (VF) stellt die Summe aus zwei Formen mit maximaler Aktivität und zwei Formen mit geringer Aktivität dar. Die Formen mit maximaler Aktivität haben deshalb maximale Aktivität, da sie an der aktivierenden Aminosäure (T161) eine echte Phosphorylierung tragen und an den deaktivierenden

Aminosäuren nicht phosphoryliert werden können. Auch die geringe Aktivität von CDKA;1 (DE) ist mit diesen Annahmen erklärbar. Die Phosphomimikry (T14D und Y15E) ist nicht ausreichend, um die aktivierte CDKA;1, die an T161 phosphoryliert wurde, vollständig zu inhibieren (Nico Dissmeyer, persönliche Mitteilung), deshalb ist zwei Formen eine sehr geringe Aktivität zugeordnet. Um dieses Modell graphisch darstellen zu können, wurde jeder möglichen Aktivität ein entsprechender Wert zugeordnet. Mit diesen Werten wurde dann die Aktivität für jede CDKA;1 Variante errechnet. Um einen besseren Vergleich mit den realen Messungen zu haben, wurde für die graphische Darstellung die Aktivität von CDKA;1 als 100 Prozent festgesetzt und die anderen Werte angeglichen. Vergleicht man diese Darstellung (Abb. 4.1; c) mit den real gemessenen Werten (Abb. 3.3), so fällt auf dass alle Werte etwas zu hoch sind, die Tendenzen aber richtig sind. Die Abweichungen können daher kommen, dass bei dem Modell die Zellzyklus-Phasen der gemessenen Zellen nicht mit einbezogen wurden. Die Phase des Zellzyklus, in dem sich die entsprechende Zelle gerade befindet, spielt aber eine wichtige Rolle, da sie die Phosphorylierung der CDKA;1 Varianten bestimmt. Dies ist in dem Modell nicht mit einbezogen worden, da einerseits nicht bekannt ist, in welcher Phase sich die Zellen bei der Messung befanden und andererseits sie das Modell nur unnötig kompliziert machen würden. Die Experimente wurden in jungen Blättern durchgeführt, die sich noch im Wachstum befanden. Somit hat auch Zellzyklusaktivität in einigen der gemessenen Zellen stattgefunden. Es ist aber anzunehmen, dass ein Großteil der Zellen ihre Zellteilungsaktivität schon eingestellt haben und sich nur noch im Zellwachstum befanden. Die meisten gemessenen Zellen wären somit schon aus dem Zellzyklus ausgestiegen und in der G_0 -Phase. Ob die Aktivität der CDKA;1 dort noch benötigt wird und wie sie dort kontrolliert wird, ist nicht bekannt. Um den Einfluss des verwendeten Organismus herauszunehmen, müssen die Modifikationen an der CDKA;1 kombiniert werden. Eine konstitutiv aktive Form sollte an den Positionen T14 und Y15 nicht mehr phosphorylierbar sein und gleichzeitig eine Phosphomimikry an T161 besitzen (T14V, Y15F und T161D; VFD). Eine konstitutiv inaktive Form sollte an T14 und Y15 eine Phosphomimikry besitzen und an T161 nicht mehr phosphorylierbar sein (T14D, Y15E und T161V; DEV). Nur so kann ausgeschlossen werden, dass sie CDKA;1 Varianten in anderen Organismen modifiziert werden können. Wie hoch die Aktivität der konstitutiv aktiven Form ist oder ob die inaktive Form wirklich keine Aktivität mehr hat, hängt dann rein von der Effizienz der Phosphomimikry ab. Die eben genannten beiden Tripel-Mutanten wurden bereits kloniert und *in planta* auf ihre Fähigkeit, die *cdka;1*-Mutanten zu retten, getestet. Obwohl die CDKA;1-Varianten VF voll und sogar DE und T161D die Mutante partiell zu retten vermögen, konnten keine durch VFD homozygot geretteten *cdka;1* isoliert werden. Auch mit dem Konstrukt DEV ist dies – wie zu erwarten – nicht möglich gewesen. Die CDKA;1-VFD zeigt eine praktisch nicht mehr nachweisbare Kinaseaktivität, wenn sie aus *in vivo*-Material isoliert wird (Nico Dissmeyer, persönliche Kommunikation).

Der große Nachteil der hohen Sequenzähnlichkeit der Zellzyklusproteine zeigt sich unmittelbar am verwendeten Organismus. So sind die Auswertungen bei einigen Experimenten sehr schwierig oder sogar unmöglich, weil die eingebrachten Zellzyklusproteine direkten Einfluss auf den Zellzyklus des verwendeten Organismus nehmen. Im Split-Ubiquitin System war es nicht möglich mit den CYCB1;2 Varianten zu arbeiten, da die Zellen abstarben, sobald die CYCB1;2 Varianten exprimiert wurden. Bei fast allen anderen Proteinen wuchsen die Hefekolonien deutlich langsamer als die Kontrollen. Diese Problematik und die Schwierigkeiten, kernlokalisierte Interaktionen im Split-Ubiquitin System nachzuweisen, sind vielleicht ein Grund dafür, dass im Screen mit CDKA;1 die bekanntesten Interaktoren der CDKs, wie zum Beispiel Cycline, nicht gefunden wurden. Auch im BiFC System gab es Schwierigkeiten mit einigen Proteinen, so konnte bei den Interaktionstests mit KRP1 und dessen Varianten stets eine sehr hohe Zahl an toten Zellen gefunden werden. Dies war auch der Fall bei den Experimenten mit den B-Typ CDKs. Bei einer Kombination dieser beiden konnten kaum noch lebende Zellen im infiltrierten Bereich gefunden werden.

4.2 CDKA;1 Interaktoren aus Split-Ubiquitin Screen

4.2.1 Proteine des Glutathionstoffwechsels

Die drei GSTF Proteine gehören der Familie der Glutathion-S Transferasen (GSTs) an. In *A. thaliana* gibt es 47 Vertreter dieser Familie, die sich in vier Gruppen aufteilen lassen. Die Gruppen Theta (GSTT1-3) und Zeta (GSTZ1-2) haben Homologe Proteine in Säugetieren. Die beiden größeren Gruppen Phi (GSTF1-14) und Tau (GSTU1-28) sind spezifisch für Pflanzen (Wagner U 2002). Die im Screen gefundenen Proteine gehören der pflanzenspezifischen Gruppe Phi an. GSTs sind dafür verantwortlich, reaktive Substanzen seien sie nun im zelleigenen Metabolismus entstanden oder aus der Umgebung aufgenommen zu neutralisieren. Diese Substanzen würden sonst wahllos mit Zellkomponenten reagieren und so die Zelle schädigen. Alle drei im Screen gefundenen Proteine katalysieren Reaktionen bei der ein nucleophiles Zentrum einer Substanz neutralisiert wird. GSTF2 und GSTF9 verfügen außerdem noch über Aktivität einer Glutathionperoxidase (Wagner U 2002), welche reaktive Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) neutralisiert. Alle drei Proteine werden ubiquitär exprimiert, mit Expressionsmaxima in den Blättern. GSTF9 hat das höchste Expressionslevel von den drei Proteinen und zeigt zudem noch eine relativ hohe Expression in Meristemen. Die Expression aller drei Proteine ist durch abiotischen Stress induzierbar, wobei GSTF2 am stärksten und schnellsten reagiert. Es ist im Gegensatz zu GSTF10 auch durch biotischen Stress, Befall mit *Peronospora parasitica*, induzierbar (Wagner U 2002). Die Expression der GSTs überlappt sich mit der von CDKA;1, somit ist eine Interaktion *in planta* möglich.

Das vierte Protein in dieser Gruppe, GPX2, ist eine Glutathionperoxidase. Die Familie der Glutathionperoxidasen (GPXs) umfasst 8 Vertreter, die alle die Funktion haben

ROS zu neutralisieren. GPX2 und GPX4 sind nur im Cytosol zu finden, was sie zu Vertretern der Familie der GPXs macht, die nur in Photosynthese betreibenden Organismen zu finden sind. GPX2 verwendet Thioredoxin (Trx) als Elektronendonator und nicht Gluthation (Iqbal A 2006). Die Expression von GPX2 ist in allen Teilen der Pflanze zu finden, außer in trockenen Samen. Zudem ist diese Expression durch abiotischen Stress induzierbar (Rodriguez Milla MA 2003). Auch dieses Protein hat ein mit CDKA;1 überlappendes Expressionsmuster, was eine Interaktion *in planta* möglich macht.

Die Proteinfamilien, deren Vertreter hier getestet wurden, sind alle durch Stress induzierbar. Es ist bekannt, dass Stress Auswirkungen auf den Zellzyklus hat. Schäden an der DNA sind einer der bekanntesten Faktoren, warum der Zellzyklus angehalten wird (Morgan 2007). Solche Schäden können durch die reaktiven Substanzen entstehen, die von den GSTs und GPXs abgefangen werden sollen. Warum aber die GSTs und GPXs direkt mit CDKA;1 interagieren, ist damit nicht geklärt. GSTs und GPXs sind zwar stress-reguliert, aber die Reaktion der Zelle auf Stress verläuft - soweit bekannt - nicht über diese Proteine, sondern meist über eine Kaskade von Mitogen aktivierten Protein Kinasen („mitogen-activated protein kinase“, MAPK) (Mishra NS 2006; Colcombet J 2008). Ein weiterer Hinweis darauf, dass zwei der getesteten Proteine eine Rolle im Zellzyklus spielen, ist ihre Zellzyklus-Phasen spezifische Expression. GSTF2 wird in der G₂-Phase und GPX2 in der S-Phase exprimiert.

4.2.2 Proteine der Metallothionin-Familie

Diese Gruppe stellte sich als besonders interessant heraus, da alle untersuchten Proteine sich wie mögliche Substrate verhalten und bisher in dieser Funktion noch nicht aufgefallen sind. Die Gruppe umfasst zwei von eigentlich drei gefundenen Proteinen dieser Familie. Das dritte Protein, MT3 (At3g15353), konnte leider nicht kloniert werden. Bei den Metallothioninen (MTs) handelt es sich um sehr kleine Proteine (4-12 kDa), von denen in *A. thaliana* 8 Proteine existieren. Wobei MT1B als Pseudogen anzusehen ist, da es kein Cystein enthält (Cobbett C 2002). Die Cysteine sind aber typisch für diese Familie von Proteinen und sie sind essentiell für ihre Funktion. Die charakteristische Verteilung der Cysteine in den Proteinen wird als Kriterium genommen, sie in vier unterschiedliche Gruppen zu unterteilen (Cobbett C 2002).

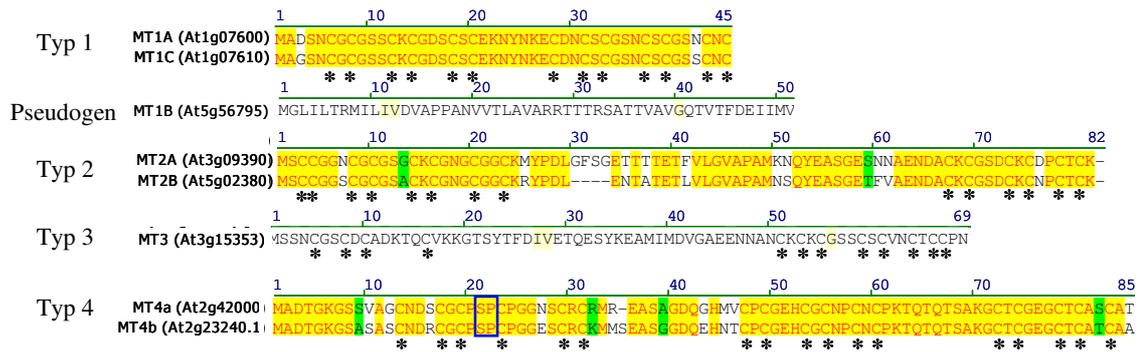


Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzen der 8 Proteine der Metallothionin Familie im Vergleich; die Sterne (*) markieren die für diese Familie typischen Cysteine, die blaue Box markiert das einzige Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1

Die im Screen gefundenen Proteine gehören dem Typ 2 (MT2A und MT2B) und dem Typ 3 (MT3) an. Keines dieser Proteine weist eine Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1 auf. Nur in der Gruppe der Typ 4 Proteine gibt es ein minimales Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1. Dies ist aber kein Grund MT2A und MT2B als Substrate auszuschließen, denn es gibt Substrate (RPL36aB; At4g14320) von CDKA;1, die ebenfalls keine Phosphorylierungsmotive besitzen (Abbildung 3.10) (Ubersax JA 2003). Die Proteine sind reich an Serinen und auch einigen Threoninen, an denen sie phosphoryliert werden könnten. Über die Funktion der MTs ist nicht viel bekannt und noch weniger über ihre Regulation. Sie bilden mit Metallionen Chelatkomplexe und binden sie so. Alle Metallionen sind, wenn sie ab einer bestimmten Konzentration frei in der Zelle vorliegen, schädlich für die Zelle. Es gibt Metallionen wie die von Kupfer (Cu^{2+}) und Zink (Zn^{2+}), die von einigen Proteinen für katalytische oder strukturelle Zwecke benötigt werden, aber auch unerwünschte Metallionen wie die von Cadmium (Cd^{2+}). In Experimenten mit Hefelinien (*S. cerevisiae*), die keine Metallionentoleranz mehr haben, konnte gezeigt werden, dass die MTs aus *A. thaliana* dazu in der Lage sind, die Toleranz für Ionen von Kupfer (Cu^{2+}), Zink (Zn^{2+}), Cadmium (Cd^{2+}) und im Fall von MT4a auch für Cobalt (Co^{2+}) wiederherzustellen (Guo W-J 2008). Um sicherzustellen, dass die gefundenen Interaktionen von CDKA;1 und MT2A bzw. MT2B auch im Organismus stattfinden können, ist es wichtig zu wissen, ob sie in den selben Organen und zur gleichen Zeit exprimiert werden. Die Expressionsanalysen von MT2A und MT2B zeigen, dass sie in fast allen Organen der Pflanze zu jedem Zeitpunkt exprimiert werden (eFP-Browser). Die Expressionsmaxima von MT2A finden sich in Pollen und Samen, wobei die höchsten Level in dem Samen 8-10 Tage nach der Befruchtung zu finden sind. Laut Promotor-Studien ist MT2A auch besonders stark in Trichomen exprimiert (Garcia-Hernandez M 1998). Bei MT2B finden sich die Expressionsmaxima in den Blättern, besonders in Blättern des Stengels und alten Blättern, die kurz vor dem Absterben sind. Die Expressionen von MT2A und MT2B überlappen sich mit der Expression von CDKA;1, was eine Interaktion der Proteine möglich macht. Die Expression von MT2A im Samen könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Protein in größeren Mengen benötigt wird, wenn sehr viele Zellteilungen anfallen. Auch die M-Phasen spezifische Expression von MT2A könnte ein Hinweis

darauf sein. In der Literatur konnten keine Hinweise auf posttranslationelle Kontrolle der MTs gefunden werden. Eine mögliche Erklärung für die Phosphorylierung durch CDKA;1 wäre, dass die Phosphorylierung für eine bessere Bindung der Metallionen sorgt. Die Phosphatgruppe trägt eine negative Ladung, die Metallionen tragen eine oder mehrere positive Ladungen. Entgegengesetzte Ladungen ziehen sich an, was bei einer Phosphorylierung durch CDKA;1 zu einer Stabilisierung der Bindung des Metallions führen könnte.

4.2.3 Proteine des Lipid Stoffwechsels

Die zwei Proteine der „protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)“ Familie befinden sich in Pflanzen in den Chloroplasten. Die Interaktion mit CDKA;1 konnte deshalb nicht nachgewiesen werden. Es existieren keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen über diese Proteine. Deshalb konnten keine weiteren Informationen über ihre Funktion oder ein möglichen Zusammenhang mit dem Zellzyklus recherchiert werden. Die Homologie zu den bekannten LTPs ist nicht hoch genug um Rückschlüsse zuzulassen.

Ein weiteres Protein aus dieser Gruppe ist LOX1. LOX1 ist eine Lipoxygenase. Ein Aminosäurevergleich mit anderen Proteinen aus *A. thaliana* hat ergeben, dass es wahrscheinlich noch fünf weitere Proteine dieser Familie gibt. LOX1 produziert Vorstufen zu wichtigen regulativen Substanzen, der Traumatinsäure und der Jasmonsäure. Traumatinsäure ist in der Reaktion der Pflanze auf mechanische Verletzungen involviert. Jasmonsäure treibt die Keimung voran und stimuliert den Zellzyklus (Melan MA 1993). LOX1 ist ubiquitär in der Pflanze exprimiert, mit Maxima in der Blüte und der Samenentwicklung. Es ist durch biotische und abiotische Faktoren induzierbar (Melan MA 1993) und spielt anscheinend eine wichtige Rolle in der Samenkeimung (Melan MA 1994). Vom Expressionsmuster her kann LOX1 auch in Pflanze mit CDKA;1 interagieren. LOX1 ist in proliferierenden Geweben, wie dem keimenden Samen, von besonderer Bedeutung und für die Produktion der Jasmonsäure notwendig. Beides hat direkt oder indirekt mit dem Zellzyklus zu tun, so ist es vorstellbar, dass CDKA;1 mit LOX1 interagiert um Einfluss auf diese Prozesse zu nehmen. Es gibt allerdings keine Hinweise darauf in der Literatur.

Das vierte und letzte Protein dieser Gruppe ist SDP1. Es konnten zwar Interaktionen mit ihm nachgewiesen werden, doch eine Quantifizierung der Signale war nicht möglich. Die Experimente mit den erstellten SDP1 Varianten geben aber Hinweise darauf, dass es sich um ein Substrat handeln könnte. Auch die Expression der erstellten SDP1 Konstrukte unter dem Promotor von CDKA;1 in *sdp1-3* Pflanzen ergaben einen Hinweis darauf, dass SDP1 phosphoryliert sein muss um aktiv sein zu können. Dieser Hinweis bestand darin, dass die *sdp1-3* Pflanzen mit den Phosphomimikry Varianten von SDP1 etwas besser keimen, als die *sdp1-3* Pflanzen mit den Dephospho Varianten von SDP1. Zudem sind die Homologen aus Hefe (*S.cerevisiae*), Tgl4p und Tgl5p, Substrate von dem CDKA;1 Homolog der Hefe (Ubersax JA 2003). Neben SDP1

existiert nur noch ein „SDP1-LIKE“ Protein in *A. thaliana*, das eine hohe Homologie mit SDP1 aufweist. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Triacylglycerine Lipasen. SDP1 ist fast ausschließlich in der späten Samenentwicklung exprimiert (Eastmond 2006). Dies ist verwunderlich, da SDP1 für den Abbau von Triacylglycerine zuständig ist und diese Reaktion wird bei der Samenreifung nicht benötigt. Im Gegenteil, hier werden die Triacylglycerine in Form von Speicherfetten erst aufgebaut. Erst bei der Samenkeimung wird der Abbau der Speicherfette zur Gewinnung von Energie benötigt. Dieser Unterschied zwischen Expression des Gens und Aktivität des Proteins lässt die Hypothese zu, das SDP1 posttranslational kontrolliert wird. Eine Möglichkeit dieser posttranslationalen Kontrolle stellt die Phosphorylierung durch CDKA;1 dar. Durch eine Phosphorylierung könnte SDP1 aktiviert werden und dann damit beginnen die Speicherfette abzubauen. CDKA;1 wird zwar in der späten Samenentwicklung nicht mehr exprimiert, doch bei der Samenkeimung sehr wohl. Diese macht eine Interaktion der beiden Proteine in Pflanze möglich. Bei den erstellten SDP1 Konstrukten in *sdp1-3* Pflanzen konnte ein leicht verbessertes Wachstum der Phosphomimikry Konstrukten beobachtet werden. Dies ist bis jetzt aber noch nicht mit experimentellen Daten belegt, es könnte aber ein weiterer Hinweis auf die Notwendigkeit der Phosphorylierung von SDP1 sein.

4.2.4 Proteine mit F-Box Motiv

Die Fluoreszenzquantifizierung für LKP2 ergab, dass es sich hierbei um einen Interaktor von CDKA;1 handelt. Die Familie zu der LKP2 gehört besteht aus drei Proteinen (ADO/LKP1/ZTL, ADO2/FKL2/LKP2 und ADO3/FKF1) die sich durch das Vorhandensein von drei bestimmten Motiven auszeichnen. Die LOV Domäne, welche typisch für Proteine ist die auf Licht („light“, L), Sauerstoff („oxygen“, O) oder Spannung („voltage“, V) reagieren können. Das F-Box Motiv, das bei Proteinen zu finden ist, die Teil des SCF Komplexes sind. Und dem dritten Motiv einer „kelch“ Domäne, welche für Protein-Protein Interaktionen bekannt ist (Yasuhara M 2004). LKP2 wurde gefunden, als nach Proteinen mit den oben genannten Motiven gesucht wurde (Schultz TF 2001). Die beiden anderen Proteine mit diesen Motiven sind wichtig für die zirkadiane Uhr in *A. thaliana* und werden in bestimmten zirkadianen Rhythmen exprimiert. Dies ist nicht der Fall bei LKP2, doch kann es trotzdem Einfluss auf die zirkadiane Uhr nehmen. Die Expression ist sehr gering, doch in allen untersuchten Teilen der Pflanze zu finden (Schultz TF 2001). Zur Lokalisation von LKP2 wurden Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse sich mit denen aus dieser Arbeit decken (Fukamatsu Y 2005). LKP2 ist im Zytoplasma und im Kern vertreten. In einem mit LKP2 durchgeführten „yeast two-hybrid“ Screen konnte eine Interaktion mit einer Serin/Threonin Kinase, wozu auch die CDKs gehören, nachgewiesen werden. Es fehlen leider nähere Angaben, um welche Kinase es sich handelt (Fukamatsu Y 2005). Eine Interaktion zwischen CDKA;1 und LKP2 könnte einen direkten Zusammenhang zwischen der zirkadianen Uhr von *A. thaliana* und dem Zellzyklus bedeuten. Viele Prozesse des Zellzyklus werden über F-Box Proteine gesteuert. Und es erscheint nur

logisch, dass Zellzyklus und Zellteilung an die wichtigste Ressource der Pflanze, das Licht, auf irgendeine Weise gekoppelt sein muss.

Mit MDH9.4 konnten Interaktionen mit CDKA;1 nachgewiesen werden, doch waren die Signale zu schwach, um sie quantifizieren zu können. MDH9.4 ist ebenfalls ein F-Box Protein und somit Teil des SCF Komplexes. Es konnten keine Informationen über dieses Protein in der Literatur gefunden werden. Das Expressionsmuster verrät, dass dieses Protein höchstwahrscheinlich eine Rolle in den Ovulen spielt, da es fast ausschließlich dort exprimiert ist.

4.2.5 Bekannte Substrate von CDKA;1

Diese Gruppe von Proteinen wurde als Kontrollgruppe für die Methode der Fluoreszenzintensitäts-Quantifizierung ausgewählt. Es handelt sich bei allen Proteinen dieser Gruppe um Proteine, deren Homologe aus Hefe (*S. cerevisiae*) schon als Substrate in einem Screen mit dem CDKA;1 Homolog aus Hefe (Cdk1), als solche identifiziert wurden (Ubersax JA 2003). Bei allen Proteinen dieser Gruppe, außer GSL10, das keine Signale zeigte konnte auch mit der Fluoreszenzquantifizierung im BiFC System gezeigt werden, dass es sich um Substrate der CDKA;1 handelt. Die Expressionsmuster aller Proteine dieser Gruppe überschneiden sich mit dem von CDKA;1, womit auch eine Interaktion in der Pflanze möglich wäre.

4.2.6 Häufig im Screen gefundene Proteine

Von den beiden Proteinen dieser Gruppe interagiert nur das unbekannte Protein (At1g10590) mit CDKA;1. MXI10.13 kann aufgrund seiner Lokalisation in den Chloroplasten nicht mit CDKA;1 interagieren. MXI10.13 ist eine kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO). Die Proteine der RuBisCO sind dafür bekannt unspezifisch in „yeast two-hybrid“ Systemen zu interagieren (Dr. Filipa Santos, persönliche Kommunikation), deshalb handelt es sich bei diesem Protein wahrscheinlich um einen falsch positiven Kandidaten.

Bei dem unbekanntem Protein (At1g10590) handelt es sich um ein relativ kleines Protein (15,6 kDa), das im Zytoplasma und dem Kern zu finden ist. Über die Funktion des Proteins ist nichts bekannt, doch besitzt es eine Domäne, die bei Proteinen zu finden ist, die DNA binden können. Ein Sequenzvergleich mit Proteinen aus *A. thaliana* und anderen Organismen hat ergeben, dass in *A. thaliana* noch vier weitere Proteine mit ähnlicher Sequenz existieren und diese Art von Proteinen pflanzenspezifisch ist. Für keines der Proteine aus *A. thaliana* oder den anderen Pflanzenspezies ist die Funktion bekannt. Was diese Proteine verbindet, ist allein ihre Aminosäuresequenz und die DNA bindende Domäne. Die Analyse der Expression erbrachte, dass die Expression am stärksten in den Meristemen und der Samenentwicklung ist. Wobei der Expressionslevel nach der Befruchtung ansteigt, bis er am sechsten Tag sein Maximum erreicht hat und dann wieder abfällt. Die Expression ist durch abiotischen und biotischen Stress induzierbar. Eine spezifische Expression in Geweben mit hoher

Zellteilungsrate ist ein Hinweis darauf, dass das Protein mit dem Zellzyklus in irgendeiner Weise verknüpft sein könnte. Wie dieser Zusammenhang zustande kommen könnte, kann allerdings nicht geklärt werden, ohne die Funktion des Proteins zu kennen.

4.2.7 Proteine des Pyrovat Metabolismus

GAPC-2 gehört zu der Familie der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen (GAPDH). Diese Familie besitzt in *A. thaliana* 7 Mitglieder, wovon die meisten in den Plastiden zu finden sind, nicht jedoch GAPC-1 und GAPC-2 sie sind zytoplasmatisch (Marri L 2004). Die GAPDHs sind Enzyme der Glykolyse und der Glykoneogenese. Sie sind zuständig für die Energiegewinnung durch den Abbau von Glukose, aber auch für den Aufbau von Glukose zur Energiespeicherung. Die Expression von GAPC-2 ist in allen Pflanzenteilen zu finden. Sie ist besonders hoch in Teilen der Pflanze, in denen keine Photosynthese stattfindet. Sie ist dort sogar zellspezifisch in Zellen ohne photosynthetische Aktivität, aber mit hohem Metabolismus zu finden (Yang Y 1993). CDKA;1 und GAPC-2 haben sich überschneidende Expressionsmuster und können also auch *in planta* miteinander interagieren. Diese Interaktion könnte einen Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und Zellzyklus darstellen. Ein wichtiger Faktor für die Entscheidung einer Zelle eine Zellteilung durchzuführen ist das Vorliegen von genügend Ressourcen. Deshalb ist eine Abstimmung zwischen Stoffwechsel und Zellzyklus notwendig. Die hier gefundene Interaktion könnte für eine solche Abstimmung zuständig sein.

Das zweite Protein dieser Gruppe, DXR, zeigte keine Interaktion mit CDKA;1, da es sich in den Chloroplasten befindet. 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktase (DXR) ist ein Protein des Methylerythritolphosphatweges, der für die Terpensynthese wichtig ist. Es konnte in der Literatur keine Information über einen möglichen Zusammenhang dieses Proteins mit dem Zellzyklus gefunden werden.

4.2.8 Membranproteine

Mit den beiden Proteinen aus dieser Gruppe sollte gezeigt werden, dass es mit dem BiFC System möglich ist, Interaktionen von Membranproteinen nachzuweisen. Dies konnte nicht gezeigt werden, da beide Proteine nicht mit CDKA;1 interagierten. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Proteine mit unbekannter Funktion. Um Näheres über diese Proteine zu erfahren, wurden ihre Aminosäuresequenzen mit den Proteinen aus *A. thaliana* und anderen Organismen verglichen. Bei At1g25275 handelt es sich um ein kleines Protein (7,8 kDa), das weder in *A. thaliana* noch in anderen Organismen ein Homolog besitzt. Auch konnten in ihm keine möglichen funktionellen Domänen gefunden werden. At2g37200 ist ein 9,2 kDa großes Protein, von dem in *A. thaliana* fünf ähnliche Proteine (>30% gleiche Aminosäuren) zu finden sind. Es sind auch diverse ähnliche Proteine in anderen Organismen zu finden, alle jedoch bisher mit unbekannter Funktion. Allen pflanzlichen Proteinen davon ist eine Domäne gemein, die

„domain of unknown function 588“ (DUF588). Diese Domäne könnte eine katalytische Funktion haben. Außerdem sind bei Proteinen, die diese Domäne besitzen, meist 3-4 transmembrane Helices zu finden. Das Expressionsmuster konnte nur für At1g25275 überprüft werden, da At2g37200 nicht in der Datenbank erfasst ist. At1g25275 ist in allen Teilen der Pflanze exprimiert und hat sein Expressionsmaximum in der Wurzelspitze.

Es gibt mehrere Gründe, warum die Interaktionen im BiFC System nicht mehr nachweisbar waren. Zum einen könnte die Lokalisation der getesteten Proteine so sein, dass CDKA;1 nicht mehr mit ihnen interagieren kann. Dies ist möglicherweise der Fall bei At2g37200. Es könnte sich einfach um falsch positive Interaktionen aus dem Split-Ubiquitin System handeln oder die Orientierung der Fusionskonstrukte ist wichtig. Im Split-Ubiquitin System war die Fusion N-terminal, im BiFC System aber stets C-terminal. Membranproteine haben eine Orientierung in der Membran. Sie können den C-Terminus auf einer Seite der Membran haben und den N-Terminus auf der anderen Seite. So kann es sein, dass die C-terminale Fusion im BiFC System nicht mehr mit CDKA;1 interagieren kann, da die Interaktion mit CDKA;1 im N-Terminus des Proteins stattfindet.

4.2.9 Einzelne Proteine

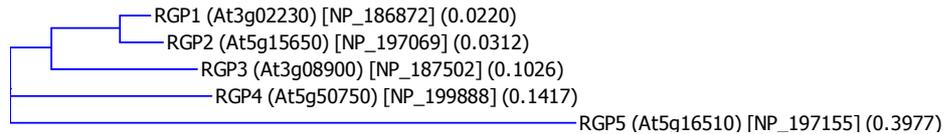
Von diesen vier Proteinen hat nur „high expression of osmotically responsive genes 15“ (HOS15) nicht mit CDKA;1 interagiert. Dies kann nicht an der Lokalisation des Proteins liegen und auch die Expressionsmuster von HOS15 und CDKA;1 überlappen sich. Eine Interaktion wäre also sowohl im BiFC System wie auch *in planta* theoretisch möglich. Es handelt sich bei dieser Interaktion wahrscheinlich um eine falsch positive Interaktion aus dem Split-Ubiquitin System.

Das Protein UBC35 zeigte ein Muster der Fluoreszenzintensitäten, das weder einem Substrat noch einem Interaktor zugeordnet werden konnte. UBC35 ist eins von 37 Vertretern der Familie der Ubiquitin konjugierenden Enzyme („ubiquitin-conjugating enzymes“, UBCs) in *A. thaliana*. Ein Großteil der, auch als E2-Enzymen bekannten, UBCs sorgt für die Ubiquitinierung von Proteinen und spielt somit eine Rolle bei der Proteindegradation. Es gibt allerdings auch eine andere Funktion von Ubiquitinierung. Diese entspricht der einer Phosphorylierung durch eine Kinase. Die Proteine ändern also ihre Aktivität und/oder ihre Stabilität und/oder ihre Lokalisierung durch die Ubiquitinierung. Für diese Art von Ubiquitinierung ist in tierischen Organismen UBC13 zuständig. Die Ubiquitinierung, die durch UBC13 vermittelt wird, spielt eine wichtige Rolle bei einem DNA-Reparatur Signalweg (Hoege C 2002). UBC35 ist eines von zwei Homologen dazu in *A. thaliana*, weshalb es auch als UBC13A bezeichnet wird (Wen R 2006). UBC35 zeigt alle Interaktionen, die auch UBC13 zeigt, und kann auch in Hefe (*S. cerevisiae*) das Fehlen von UBC13 komplementieren. Die UBC35 Expression ist in allen Teilen der Pflanze nachzuweisen und durch keinen bekannten Faktor induzierbar (Wen R 2006). Da es aber eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur spielt, ist es

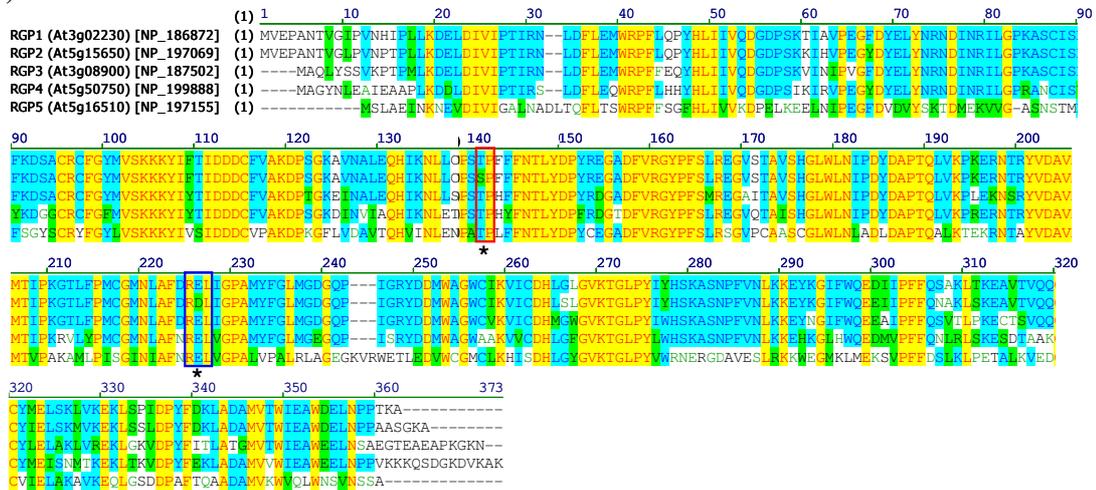
möglich, dass es posttranskriptionell aktiviert wird. Dies könnte durch eine Interaktion mit CDKA;1 geschehen. Obwohl es nicht möglich war UBC35 eindeutig als Substrat einzuordnen, so besitzt es doch drei mögliche Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1, an denen es phosphoryliert und somit aktiviert werden könnte.

Das Protein MQK4.26 konnte durch intensivere Recherche als RGP5 identifiziert werden und gehört damit zur Familie der reversibel glykolysierten Polypeptide (RGPs)

a)



b)



an. Die Familie der RGPs ist pflanzenspezifisch und hat in *A. thaliana* fünf Mitglieder.

Abbildung 4.3: die Familie der RGPs: a) phylogenetischer Baum der RGPs aus *A. thaliana*; b) Aminosäuresequenz-Vergleich der RGPs aus *A. thaliana*, die Sternchen markieren das minimale Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1 (rote Box) und das Bindungsmotiv für Cyclin (blaue Box)

Die RGPs sollen eine Funktion in der Zellwand Biosynthese haben welche genau, ist nicht bekannt. Über RGP5 konnte nichts in der Literatur gefunden werden, aber es weist eine ähnliche Expression auf wie die anderen Vertreter dieser Familie. Wie RGP1 und RGP2 (Drakakaki G 2006) ist es ebenfalls stark in proliferierenden Geweben exprimiert und hat sein Expressionsmaxima im Pollen. Die RGPs werden wahrscheinlich besonders stark in proliferierenden Geweben exprimiert, weil dort sehr viel Material für die Zellwand benötigt wird. Wenn eine pflanzliche Zelle sich teilen möchte, so muss sie sicherstellen, dass genug Material für die Zellwand der Tochterzelle vorhanden ist. Die Interaktion von RGP5 und CDKA;1 könnte einen Weg der Zelle darstellen, die Synthese der Zellwandbausteine anzuregen um sich dann teilen zu können. Obwohl RGP5 nicht eindeutig als Substrat oder Interaktor identifiziert werden konnte, so ist das

minimale Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1 und das Bindungsmotiv für Cyclin doch in allen RGP's konserviert (Abbildung 4.3).

Das im Screen gefundene RAN1 gehört zu der Großfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, von denen es in *A. thaliana* 93 Mitglieder gibt. Die Homologen aus tierischen Systemen sind gut untersucht und haben alle eine Vielzahl von Funktionen, wovon die meisten aber regulatorischer Art sind. Sie sind in Prozessen wie Zellteilung, Transmembrantransport, Zytoskelettaufbau und Organisation, Signalweiterleitung, u.v.a. involviert. Allen ist aber gemein, dass ihre Funktion eng mit der Bindung und Hydrolyse von GTP verbunden ist. Sie lassen sich durch strukturelle und funktionelle Merkmale in fünf Familien unterteilen. Diese sind die Ras, Rab, Rho, Arf und Ran Familien. Für die Ras Familie, die in tierischen Systemen für die Regulation der Zellteilung zuständig ist, gibt es keine Homologe in *A. thaliana*.

a)



b)

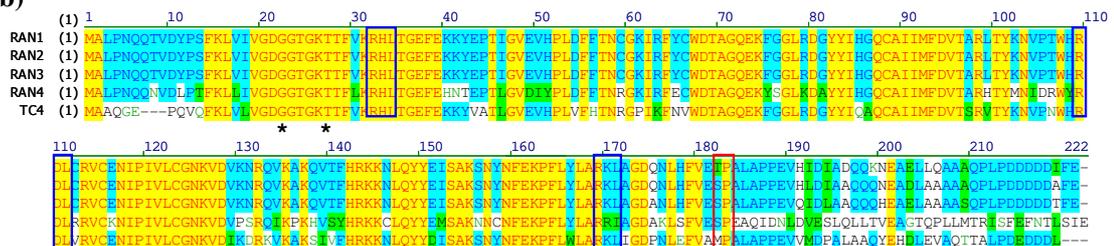


Abbildung 4.4: die Familie der RANs: a) phylogenetischer Baum der RANs aus *A. thaliana*; b) Aminosäuresequenz-Vergleich der RANs aus *A. thaliana* und dem RAN Homolog aus dem Menschen (*Homo sapiens*), die rote Box markiert das minimale Phosphorylierungsmotiv für CDKA;1, die blauen Boxen die Bindungsmotive für Cyclin und die Sternchen markieren die Aminosäuren, die ausgetauscht wurden um die GTP Variante (G19V in *H. sapiens*, G22V in *A.thaliana*) und die GDP Variante (T24N in *H. sapiens*, T27N in *A. thaliana*) von RAN1 zu erstellen

RAN1 gehört der Familie der „Ras-related nuclear proteins“ (RANs) an, welche mit vier Mitgliedern (RAN1-4) in *A. thaliana* vertreten ist (Vernoud V 2003). In tierischen Organismen haben die RANs drei Funktionen:

- Transport von RNA und Proteinen durch die Kernmembran (Görllich D 1999)
- Wiederaufbau der Kernmembran nach der Mitose (Hetzer M 2002)
- Spindelorganisation in der Mitose (Zhang C 2000)

Für diese Funktionen benötigen sie andere Proteine, mit denen sie interagieren müssen. Diese Proteine sorgen dafür, dass die RANs im Kern größtenteils in GTP gebundener Form und im Zytoplasma vorwiegend in GDP gebundener Form vorliegen. Dieser Unterschied ist für einen gerichteten Transport wichtig. Die RANs werden im Kern

durch RanGEFs mit GTP beladen. So können sie die zu exportierenden Proteine binden und ins Zytoplasma gelangen. Dort interagieren sie mit den RanBPs und RanGAPs, welche die GTPase Aktivität der RANs steigern, wodurch diese das GTP hydrolysieren und so in GDP umwandeln. Die RANs mit gebundenem GDP werden dann wieder in den Kern importiert. Dort werden sie wieder durch die RanGEFs mit GTP beladen und der Kreislauf kann wieder von vorne beginnen (Clarke PR 2001). Ob dieser Kreislauf auch so in Pflanzen funktioniert, ist noch nicht endgültig geklärt. Es konnten zwar RanBPs (Haizel T 1997) und RanGAPs (Rose A 2001) gefunden werden, doch es konnte noch kein funktionelles Homolog zu den RanGEFs in *A. thaliana* gefunden werden (Vernoud V 2003). Die RAN1 (GTP) Variante bildet im tierischen System einen stabilen Komplex mit der RanGEF (Clarke PR 2001). Wenn dies auch für die RanGEF aus *A. thaliana* gilt, so könnte die unterschiedliche Lokalisation von RAN1 und RAN1 (GTP) ein Hinweis auf eine RanGEF sein. Diese müsste sich im Kern befinden und nicht im Nucleolus, denn die Lokalisation von RAN1 (GTP) ist deutlich schwächer im Nucleolus, als die von RAN1.

Es wurden die Interaktionen von RAN1, RAN2 und RAN3 mit den CDKA;1 Varianten getestet. Alle verhalten sich wie Substrate. Auch eine Interaktion in Pflanze ist möglich, da alle ubiquitär exprimiert sind. Sie weisen fast alle dasselbe Expressionsmuster auf, nur RAN3 zeigt eine im Vergleich mit RAN1 und RAN2 geringere Expression in den Blättern. Einen deutlichen Unterschied gibt es aber in den Expressionsstärken. RAN1 ist etwa 2fach stärker exprimiert als RAN3 und etwa 20-30fach stärker als RAN2 (Haizel T 1997). Um herauszufinden, ob die Interaktionen mit RAN1 abhängig von der Bindung von GTP oder GDP sind, wurden die Interaktionstests noch mit zwei Varianten von RAN1, RAN1 (GTP) und RAN1 (GDP) durchgeführt. Es konnten aber keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten festgestellt werden. Die Phosphorylierungsmotive für CDKA;1 und die Bindungsmotive für Cyclin sind in RAN1-3 alle konserviert. Bei RAN4 ist nur das dritte Bindungsmotiv für Cyclin nicht konserviert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass sie alle Substrate der CDKA;1 sind. Wenn die Mitglieder der RAN Familie die gleiche Funktion im Zellzyklus in Pflanzen haben, die sie in Tieren haben, so ist eine Regulation durch die CDKA;1 denkbar.

4.3 Interaktionsanalyse der Zellzyklusproteine

4.3.1 KRPs

Die Untersuchung der Lokalisierung der verschiedenen KRP1 Konstrukte hat ergeben, dass KRP1 über mindestens zwei Wege verfügen muss, um in den Kern zu gelangen. Die Mutation des NLS im vorderen Teil des Proteins, sorgt zwar dafür, dass das Signal von KRP1^(K84/86A) auch im Zytoplasma zu finden ist, aber das stärkere Signal ist immer noch im Kern zu sehen. Auch die Lokalisierung von KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ bestätigt dies, da bei diesem das NLS vollständig fehlt, es aber trotzdem noch im Kern nachzuweisen ist. Es muss sich also noch ein weiteres NLS in den Aminosäuren 109-191 befinden. Durch weitere Experimente konnte diese Region auf die Aminosäuren 152-191 eingegrenzt werden. In diesem Bereich konnte allerdings kein NLS identifiziert werden, weshalb eine andere Möglichkeit des Transports in Betracht gezogen werden muss (Jakoby MJ 2006). Mit den TM-Konstrukten wurde ein weiterer Versuch unternommen KRP1 aus dem Kern herauszuhalten. Auch dieser Versuch war ein Fehlschlag. KRP1 und KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ befanden sich nun zwar nicht mehr in frei beweglicher Form im Inneren des Kerns, aber in verankerter Form in der Kernmembran. Dieser Versuch zeigte, dass das zweite NLS von KRP1, welcher Art es auch immer sein mag, ein sehr starkes Signal ist.

Die weitere Analyse von KRP1 beschäftigte sich mit den unterschiedlichen Domänen von KRP1. Diese Domänen wurden bereits in einem „yeast two-hybrid“ System mit CDKA;1 getestet (Wang H 1998). Nun ergab sich aber die Möglichkeit, sie mit der Fluoreszenzquantifizierungs-Methode auf ihr Verhalten gegenüber den CDKA;1 Varianten zu testen. Dabei stellte ich heraus, dass sich KRP1¹⁻¹⁵² wie ein Substrat verhält. KRP1 besitzt zwar keine Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1, doch es besitzt ein Bindungsmotiv für Cyclin. Dieses Motiv wird durch die Aminosäuren 85-87 (RKL) gebildet und befindet sich somit in KRP1¹⁻¹⁵². KRP1 zeigt zwar einen leichten Abfall der Signalstärke von CDKA;1 zu CDKA;1 (T161V) zu CDKA;1 (T161D), was für ein Substrat sprechen würde, doch widerspricht der hohe Wert von CDKA;1 (DE) diesem. Betrachtet man nun aber das Fluoreszenzintensitäts-Muster von KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ und kombiniert dieses mit dem von KRP1¹⁻¹⁵², so würde sich das Verhalten von KRP1 erklären lassen. Bei KRP1 handelt es sich wohl um einen Interaktor von CDKA;1, der aber anscheinend auch von CDKA;1 phosphoryliert werden kann. Von dem KRP1 Homolog p27 ist bekannt, dass es phosphoryliert wird. Die ist dann auch ein Signal für die Ubiquitinierung von p27 und dem anschließenden Abbau (Tsvetkov LM 1999).

Der nächste Teil der Analyse von KRP1 beschäftigte sich mit dem Abbau von KRP1. Dieser wird bei den Homologen von KRPs über Skp2, ein Protein des SCF Komplexes, vermittelt (Tsvetkov LM 1999). Die beiden bekannten Homologen dieses Proteins (SKP2.1 und SKP2.2) aus *A. thaliana* wurden deshalb auf ihre Interaktion mit den KRP1 Konstrukten getestet. Mit SKP2.1 konnten keine Interaktionen gezeigt werden, auch nicht mit der Positivkontrolle. Deshalb ist anzunehmen, dass SKP2.1 im BiFC

System nicht funktionell ist. SKP2.2 hingegen zeigte Interaktionen mit KPR1, KPR1¹⁰⁹⁻¹⁹¹, KRP1^(K84/86A) und KRP2. Wobei die Lokalisierung der Interaktionen von besonderem Interesse war, denn es waren immer rein zytoplasmatische Interaktionen. SKP2.2 befindet sich aber im Zytoplasma und dem Kern. Dies macht es sehr ungewöhnlich, dass nur Interaktionen im Zytoplasma nachgewiesen werden konnten, denn sonst konnten Interaktionen immer auch dort nachgewiesen werden, wo auch beide Interaktionspartner vorlagen. Zudem ist eine zytoplasmatische Lokalisierung von KRP1 bisher nicht bekannt. Auch konnte mit keinem anderen Protein eine Interaktion mit KRP1 im Zytoplasma nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass KRP1, sobald es ins Zytoplasma gelangt, durch SKP2.2 gebunden und dem Proteinabbau zugeführt wird. Das Signal wäre dann nur deshalb nachweisbar, weil zu viel SKP2.2 vorliegt und nicht alles in einem SCF-Komplex gebunden ist. Dies würde erklären, warum unter normalen Bedingungen kein Signal von KRP1 im Zytoplasma nachzuweisen ist. Die Interaktion mit KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ deutet darauf hin, dass SKP2.2 dieses KRP1 Konstrukt zwar erkennen kann, doch ein Abbau nicht oder nur in sehr geringem Maße stattfinden kann. Diese Hypothese konnte durch weitere Experimente erhärtet werden (Jakoby MJ 2006) und ist inzwischen bestätigt worden (Ren H 2008).

Ein weiterer Abbauweg des KRP1 Homologs p27 wird durch das „c-Jun activation domain binding protein 1“ (Jab1) vermittelt. Dieses Protein ist zusammen mit Exportin 1 (Crm1) auch für den Export von p27 aus dem Kern zuständig (Tomoda K 2002). Jab1 hat in *A. thaliana* zwei Homologe, die unter dem Namen „Arabidopsis Jab1 homologs 1 and 2“ (AJH1 und AJH2) bekannt sind (Kwok SF 1998). Bei den Interaktionstests mit AJH1 konnte eine Interaktion mit allen KRP1 Konstrukten und KRP2 nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass auch dieser Abbauweg in *A. thaliana* konserviert ist. Dagegen spricht, dass keine verringerte Signalstärke der KRP1 Konstrukte bei den Interaktionstests mit AJH1 festgestellt werden konnte. Es gibt aber einen weiteren Hinweis, der für die Konservierung dieses Abbauweges spricht. Der Export von KRP1 aus dem Kern entspricht wahrscheinlich dem von p27. Einen Hinweis darauf gibt die Interaktion von KRP1¹⁰⁹⁻¹⁹¹ mit dem Exportin 1 Homolog aus *A. thaliana* XPO1 (Jakoby MJ 2006). Für KRP1 kommen wahrscheinlich beide untersuchten Abbauwege in Frage.

Basierend auf den erhaltenen Daten konnte ein hypothetisches Modell für das Verhalten von KRP1 generiert werden.

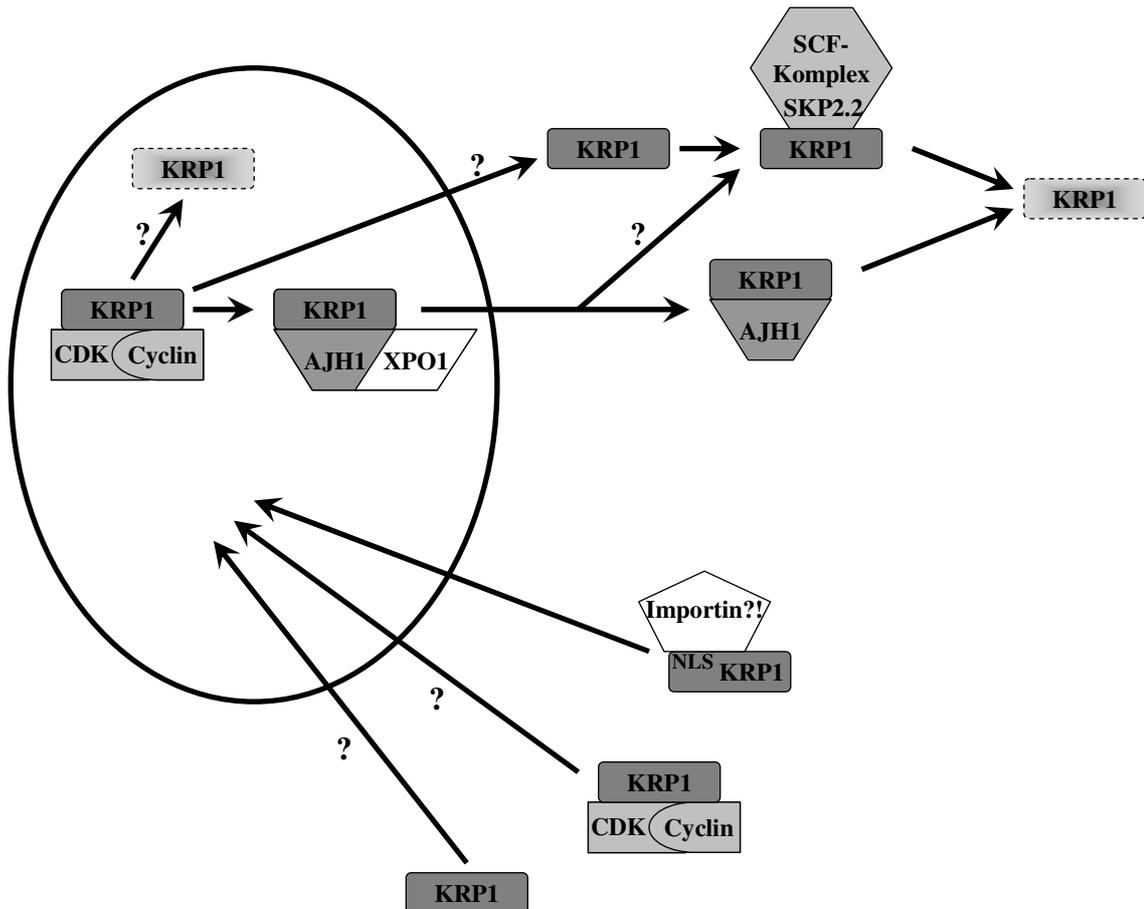


Abbildung 4.5: Hypothetisches Modell für den Kernimport, Kernexport und den Abbau von KRP1

Für den Kernimport von KRP1 gibt es drei mögliche Varianten, wovon eine über ein identifiziertes NLS vermittelt wird. An das NLS binden in der Regel Importine und dieser Komplex wird dann auf einem RAN GTPase reguliertem Weg in den Kern transportiert (Clarke PR 2001). Für KRP1 muss es allerdings noch einen anderen Weg geben, in den Kern zu gelangen. Eine Möglichkeit wäre ein noch nicht identifiziertes NLS in KRP1 selbst. Eine andere Möglichkeit wäre ein Co-Transport mit dem CDKA;1-Cyclin Komplex oder einem anderen Protein, das KRP1 binden kann. Für den Kernexport kommen zwei Möglichkeiten in Frage. Entweder es bindet AJH1 und XPO1 und wird in diesem Komplex exportiert oder es gelangt durch einen noch nicht bekannten Mechanismus aus dem Kern. Für ersteren Kernexport gibt es Hinweise. Da dieser Transport über das Exportin vermittelt wird, wäre auch er durch die RAN GTPasen reguliert (Clarke PR 2001). Die zweite Möglichkeit könnte über ein noch nicht identifiziertes „nuclear export sequence“ (NES) vermittelt werden oder durch ein bisher unbekanntes Protein. Der KRP1 Abbau im Zytoplasma wird dann durch zwei Wege bewerkstelligt. Zum einen über den SCF-Komplex, mit dem KRP1 über SKP2.2 interagieren kann, und zum anderen über AJH1. Beide Wege führen zu einer Ubiquitinierung und dem Abbau von KRP1 im 26S Proteasom. Es ist aber auch sehr wahrscheinlich, dass KRP1 im Kern selbst über einen bisher noch unbekanntem Weg abgebaut wird.

4.3.2 CYCB1;2

In den Interaktionstest mit den CYCB1;2 Varianten konnte gezeigt werden, dass die Cyclin N Domäne der Cyclin-Box von CYCB1;2 ausreichend ist um mit CDKA;1 zu interagieren. Eigentlich sollte mit CYCB1;2 N1 gezeigt werden, dass dieses nicht mehr in der Lage ist an CDKA;1 zu binden. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieses Konstrukt für die BiFC Analyse unbrauchbar war. Die Interaktion mit CDKA;1 wird auch in keiner Weise verändert, wenn die Abbausignale (DB-Box und Barbie-Box) mutiert werden. Bei den Lokalisations-Experimenten ist aufgefallen, dass alle CYCB1;2 Konstrukte, außer dem truncated CYCB1;2, mit dem Zytoskelett assoziiert waren. Das Signal für diese Lokalisierung muss sich deshalb in den Aminosäuren 1-135 befinden.

In weiteren Experimenten sollte der Abbau von CYCB1;2 näher untersucht werden. In tierischen Organismen wird CYCB am Ende der M-Phase durch den APC/C Komplex abgebaut. Der APC/C Komplex besitzt je nach Zeitpunkt im Zellzyklus unterschiedliche aktivierende Proteine. Diese aktivierenden Proteine sind Cdc20 und Cdh1. Die Motive, die für die Erkennung durch den APC/C wichtig sind, sind die „destruction box“ (DB) und die „KEN-Box“ (Morgan 2007). Für Cdc20 ist in *A. thaliana* kein Homolog bekannt, doch für Cdh1 gibt es drei homologe Proteine. Diese werden als „cell cycle switch 52“ (CCS52) Proteine bezeichnet und lassen sich in zwei Gruppen untergliedern, die CCS52A Proteine (CCS52A1 und CCS52A2) und das CCS52B Protein (Fülöp K 2005). Zwischen diesen Proteinen und den verschiedenen CYCB1;2 Konstrukten sollten die Interaktion im BiFC System gezeigt werden. Mit diesem System konnten aber keine Interaktionen der CCS52 Proteine mit den CYCB1;2 Konstrukten nachgewiesen werden, obwohl die Interaktion schon mit einem anderen System nachgewiesen werden konnten (Fülöp K 2005) und auch eine genetische Interaktion mit CCS52A1 (Dr. Farshad Rootbarkelari, persönliche Kommunikation; MPIZ Köln, AG Coupland) vorliegt. Das BiFC System erwies sich hier als unbrauchbar, weshalb eine andere Methode gesucht werden musste um diese Interaktionen darzustellen. Diese Methode bestand darin, die mit einem fluoreszierenden Protein markierten CYCB1;2 Konstrukte einmal mit den CCS52A Proteinen und einmal mit einer Kontrolle (CDKA;1) zusammen transient in Tabak (*N. benthamina*) zu exprimieren. Wenn CYCB1;2 durch eines der CCS52A Proteine dem Proteinabbau zugeführt wird, so müsste die Fluoreszenzintensität bei der Probe mit einem CCS52A Protein geringer sein, als bei der Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Methode entsprachen für die CYCB1;2 Konstrukte CYCB1;2, DB-Mutant CYCB1;2, truncated CYCB1;2, CYCB1;2 (I60R) und CYCB1;2 (IQ) den Erwartungen. Die CYCB1;2 Konstrukte DB-Mutant CYCB1;2 und truncated CYCB1;2 sollten nicht dem Proteinabbau durch die CCS52A Proteine unterliegen, da sie eine zerstörte DB oder die DB gar nicht mehr besitzen. Dies war in den Experimenten sehr deutlich zu sehen. Die CYCB1;2 Konstrukte CYCB1;2, CYCB1;2 (I60R) und CYCB1;2 (IQ) sollten dem Proteinabbau durch die CCS52A Proteine unterliegen, da sie eine funktionelle DB besitzen. Auch dies konnte in den Experimenten deutlich gesehen werden. Damit wäre gezeigt worden, dass das „Barbie-Box“ Motiv nicht für eine über CCS52A vermittelten Proteinabbau sorgt. Die Methode

wird jedoch durch die Ergebnisse mit CYCB1;2 (IQ/DB) in Frage gestellt. Bei CYC1;2 (IQ/DB) sollte kein Proteinabbau zu sehen sein, da die DB zerstört wurde. Es ist aber Proteinabbau im gleichen Maße zu erkennen, wie er bei einer funktionellen DB zu erwarten gewesen wäre. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Methode nicht funktioniert oder die vielen Mutationen im CYCB1;2 (IQ/DB) dieses Verhalten bewirken. Was hier der Fall ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

4.3.3 CKS1 und CKS2

Die Familie der „cyclin kinase subunits“ (CKS) umfasst in *A. thaliana* zwei Proteine. Diese weisen eine sehr hohe Homologie zu den beiden Vertretern der CKS Familie im Menschen (*H. sapiens*) auf. Deshalb wurde angenommen, dass die experimentellen Daten dieser Proteine auf die Homologen aus *A. thaliana* übertragbar sind. Basierend auf diesen Daten und dem Aminosäurevergleich der menschlichen mit den pflanzlichen CKS wurde CKS1^(E61Q) erstellt. CKS1^(E61Q) entspricht dem menschlichen CKS1^(E63Q), welches nur eine sehr geringe Interaktion mit HsCDK2 gezeigt hat (Sitry D 2002).

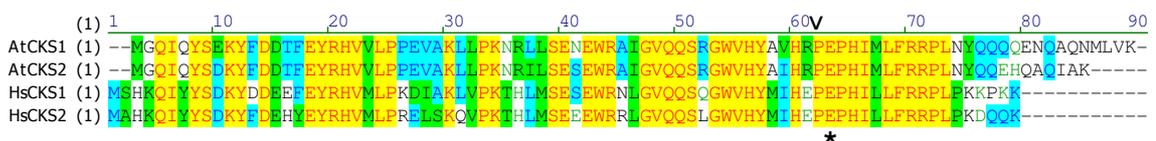


Abbildung 4.6: Aminosäuresequenz-Vergleich der CKS aus *A. thaliana* (AtCKS1 und AtCKS2) mit den beiden menschlichen CKS (HsCKS1 und HsCKS2); * markiert die Glutaminsäure, die für die Interaktion mit CDKA;1 wichtig ist; v markiert das Prolin, welches für die Interaktion mit CDKA;1 wichtig ist

Dies konnte im BiFC System nicht bestätigt werden, denn CKS1^(E61Q) interagiert genauso stark mit CDKA;1 wie CKS1 selbst. Dies bedeutet, dass die Interaktion von CDKA;1 und CKS1 in *A. thaliana* anders funktioniert oder die einzelne Mutation nicht ausreichend ist um die Interaktion zu unterbinden. Es wurde zwar die Mutation der menschlichen CKS gewählt, die die geringste Interaktion mit Cdk2 aufweist, doch es gibt noch eine weitere Position, die für die Cdk2 Interaktion wichtig ist. Dies ist das Prolin, direkt vor der Glutaminsäure (Sitry D 2002). Auch diese Aminosäure ist in CKS1 aus *A. thaliana* konserviert. Um sicherzustellen, dass die Interaktion von CDKA;1 mit CKS1 anders funktioniert wie im Menschen, sollte man diese Aminosäure auch entsprechend austauschen (P62A, in *A. thaliana* P60A) und zur Sicherheit noch eine CKS1 Variante mit beiden Mutationen erstellen. Hinweise auf weitere mögliche Interaktionsbereiche des CKS1 Proteins finden sich in den Homologen aus dem Menschen (Bourne Y 1996) und aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) (Bourne Y 2000). Wobei anzumerken ist, dass der Austausch der analogen Aminosäuren bei diesen beiden CKS1 Homologen ebenfalls zu einem Verlust der Interaktion mit den entsprechenden CDKs geführt hat. Es deutet also alles darauf hin, dass die Interaktion von CKS1 mit CDKA;1 in *A. thaliana* wahrscheinlich etwas anders funktioniert.

Beide CKS Proteine interagieren mit CDKA;1 und zeigen auch keine Unterschiede bei der Fluoreszenzintensitäts-Quantifizierung.

4.3.4 B-Typ CDKs

Die Fluoreszenzintensitäts-Quantifizierungen mit den B-Typ CDKs zeigen, dass es sich bei allen B-Typ CDKs wahrscheinlich um Substrate von CDKA;1 handelt. Auch wenn die Messwerte nicht genau mit denen eines Substrates übereinstimmen, so ist bei allen doch eine Tendenz zu erkennen, die sie als Substrate auszeichnen. Die Messwerte könnten durch die Problematik mit den B-Typ CDKs verfälscht worden sein. Die Expression der B-Typ CDKs sorgt nämlich für ein vermehrtes Absterben der infiltrierten Zellen. Wenn das Absterben der Zellen durch ein bestimmtes Expressionslevel oder eine bestimmte Proteinmenge an B-Typ CDKs verursacht wird, so würden die Zellen, bei denen dieses Expressionslevel bzw. die Proteinmenge überschritten wird, nicht mehr gemessen werden. Es würde also ungewollt auf bestimmte Zellen selektiert, was wiederum zur Verfälschung der Messwerte führen würde.

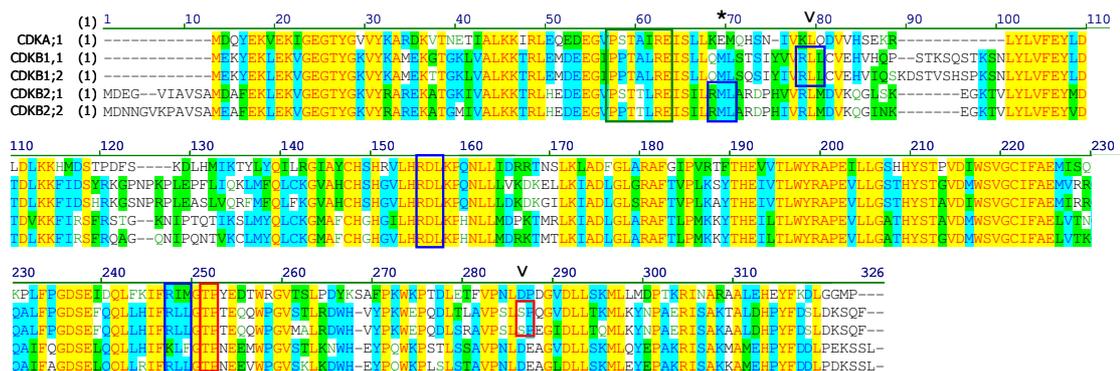


Abbildung 4.7: Aminosäuresequenz-Vergleich der B-Typ CDKS mit CDKA;1; die PSTAIRE Sequenz der CDKA;1 bzw. die Varianten der B-Typ CDKs (grüne Box); Phosphorylierungsmotive für CDKA;1 (rote Boxen); Bindungsmotive für Cyclin (blaue Boxen); v markiert die Motive, die nur bei B1-Typ CDKs zu finden waren; * markiert die Motive, die nur bei den B2-Typ CDKs zu finden waren

Der Aminosäuresequenz-Vergleich der B-Typ CDKs mit CDKA;1 zeigt die hohe Homologie dieser Proteine, doch auch die wichtigen Unterschiede. So haben die B-Typ CDKs an Stelle der PSTAIRE Sequenz eine leichte Abwandlung dieser Sequenz. Bei den beiden B1-Typ CDKs lautet diese PPTALRE, bei CDKB2;1 PSTTLRE und bei CDKB2;2 PPTTLRE. Es existieren zwei Motive, die sowohl in den B-Typ CDKs, wie auch in CDKA;1 vorhanden sind. Dies ist ein Bindungsmotiv für Cyclin (Aminosäuren 56-58 in Abbildung 4.7) und eine mögliche Phosphorylierungsstelle für CDKA;1 (Aminosäuren 252-253 in Abbildung 4.7). Es gibt ein Bindungsmotiv für Cyclin und eine mögliche Phosphorylierungsstelle für CDKA;1, die nur in B1-Typ CDKs zu finden sind (in Abbildung 4.7 mit „v“ markiert). Zudem existiert ein Bindungsmotiv für Cyclin das nur in B2-Typ CDKs zu finden ist (in Abbildung 4.7 mit „*“ markiert). Des Weiteren existiert ein Bindungsmotiv für Cyclin, das nur in B-Typ CDKs zu finden ist,

außer in CDKB2;1. Diese Motive unterstützen die Ergebnisse der Fluoreszenzintensitäts-Quantifizierung. Es könnte sich bei den B-Typ CDKs also um mögliche Substrate der CDKA;1 handeln.

Eine weitere mögliche Funktion der B-Typ CDKs könnte die Übernahme einiger Funktionen der CDKA;1 sein. Ein möglicher Hinweis hierfür ist, dass die *cdka;1* Mutante in *A. thaliana* unter bestimmten Umständen (*in vivo*-Kultur, extrem langsames Wachstum) nicht letal ist (Dr. Moritz K. Nowack, persönliche Kommunikation; Universität Köln, Lehrstuhl für Botanik III). Sie sind in ihrem Wachstum sehr eingeschränkt, doch findet noch immer Zellteilung und Differenzierung statt. Die Funktionen der CDKA;1 müssen in diesen Pflanzen von anderen Proteinen übernommen worden sein. Durch die hohe Homologie der B-Typ CDKs mit CDKA;1 liegt die Vermutung nahe, dass sie in *cdka;1* eventuell einige Funktionen der CDKA;1 übernommen haben. Um dies zu überprüfen, wurden die B-Typ CDKs mit einigen für die Funktion der CDKA;1 wichtigen Proteinen (CKS1, CKS2, KRP1, KRP2, CYCB1;2 und CYCD3;1) im BiFC System getestet. Es konnten nur Interaktionen mit CKS1 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass wenn es die B-Typ CDKs sind, die die Funktionen von CDKA;1 übernehmen, sie dies nicht mit den Interaktionspartnern von CDKA;1 tun. In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob die B-Typ CDKs mit Substraten von CDKA;1 interagieren können. Dazu wurde die Interaktion von CDT1 und CDC6 mit den B-Typ CDKs getestet. Es konnte nur zwischen CDKB1;2 und CDT1 eine Interaktion nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Phosphorylierung von CDT1 von CDKB1;2 übernommen werden könnte.

4.3.5 D-Typ CDKs und CDKF;1

Auf der Suche nach CAKs im *A. thaliana* Genom wurden vier Proteine gefunden, die eine Homologie zu CAKs haben (Shimotohno A 2004). Später stellte sich heraus, dass es sich um die drei D-Typ CDKs und CDKF;1 handelt. CDKD;2 und CDKD;3 zeigen CAK Aktivität gegenüber CDKA;1, welche durch Zugabe von CYCH;1 noch gesteigert werden kann. CDKD;1 konnte CDKA;1 nicht phosphorylieren, auch nicht nach Zugabe von CYCH;1. CDKD;1 ist entweder eine inaktive CAK oder sie besitzt andere Funktionen. CDKF;1 benötigt, wie schon CDKD;2 und CDKD;3 kein CYCH;1 um als CAK für CDKA;1 zu fungieren, doch kann die Aktivität durch Zugabe von CYCH;1 auch nicht erhöht werden. Was den Schluss zulässt, dass sie völlig CYCH;1 unabhängig ist (Shimotohno A 2004). Es sollten nun die Interaktionen dieser CDKs mit diversen anderen Proteinen des Zellzyklus überprüft werden. Als positiv Kontrolle für die D-Typ CDKs sollte die Interaktion mit CYCH;1 nachgewiesen werden. Mit allen D-Typ CDKs konnten Interaktionen mit CYCH;1 nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den bisher veröffentlichten Daten (Shimotohno A 2004). In der gleichen Veröffentlichung wurde aber auch gezeigt, dass CYCH;1 nicht mit CDKF;1 interagiert. Im BiFC System konnte diese Interaktion jedoch nachgewiesen werden. Es handelte sich um eine

schwache Interaktion, die wahrscheinlich im „yeast two-hybrid“ System nicht nachgewiesen werden konnte, und die für die Aktivität der CDKF;1 anscheinend nicht relevant ist.

Als nächstes sollten Interaktionen mit CDKA;1 und bekannten Interaktionspartnern von CDKA;1 (CKS1, CKS2, KRP1, KRP2, CYCB1;2 und CYCD3;1) untersucht werden. CYCD;3 zeigte als einziges D-Typ CDK eine Interaktion, indem es mit CYCB1;2 interagiert. CDKF;1 zeigte Interaktionen mit den beiden verwendeten CKS Proteinen. Diese Interaktionen sind bisher aus keinem anderen Organismus bekannt. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei CDKF;1 um eine CAK handelt, die zwar Homologien zu den bekannten CAKs anderer Organismen besitzt, aber auch über Domänen verfügt, die aus anderen CAKs unbekannt sind. CDKF;1 ist also eigentlich eine pflanzenspezifische CAK (Shimotombo A 2004).

Zudem sollten die Interaktionen mit einigen Substraten von CDKA;1 (CDT1 und CDC6) überprüft werden, da immer noch nicht klar ist, welche CDKs die Funktion der CDKA;1 in *cdka;1* mutanten Pflanzen übernehmen können. CDKD;1 zeigte Interaktionen mit beiden Substraten und CDKD;2 nur mit CDC6. Die Interaktion von CDKD;1 ist besonders interessant, weil CDKD;1 keine CAK Aktivität aufweist und vermutlich eine andere Funktion ausübt. Die Phosphorylierung von CDT1 und CDC6 könnte eine dieser Funktionen sein.

4.3.6 CDKA;1 Varianten

Die hier getesteten CDKA;1 Varianten sollten dazu dienen besser zu verstehen, wie CDKA;1 funktioniert. Bei CDKA;1 (Pstd.) wurde erwartet, dass sie nicht mehr mit Cyclinen interagieren und somit auch keine Substrate mehr phosphorylieren kann. CDKA;1 (D146N) sollte sich genauso verhalten wie CDKA;1, nur dass diese Variante Substrate noch binden, aber sie nicht mehr phosphorylieren kann. Der Unterschied zwischen den beiden Varianten bezüglich der Interaktionen sollte sein, dass CDKA;1 (D146N) noch mit den Substraten interagieren kann, CDKA;1 (Pstd.) hingegen nicht. Das Interaktionsschema von CDKA;1 (Pstd.) entspricht den Erwartungen. CDKA;1 (Pstd.) kann kein CYCB1;2 mehr binden und verliert somit die Fähigkeit Substrate zu binden. Außerdem scheint ein CDKA;1 Cyclin Komplex notwendig zu sein, um die Bindung von KRP1 und KRP2 zu ermöglichen, da diese beiden Proteine ebenfalls nicht mehr mit CDKA;1 (Pstd.) interagieren. CKS1 und CKS2 können beide noch mit CDKA;1 (Pstd.) interagieren, da diese Interaktion nicht von der Bindung des Cyclins abhängig ist. Interessant ist, dass CYCH;1 an CDKA;1 (Pstd.) binden kann. Für diese Interaktion gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder interagiert CDKA;1 selbst mit CYCH;1, dann aber nicht über die PSTAIR-Helix, oder diese Interaktion kommt zustande, weil CDKA;1 ein Substrat des CAK-Komplexes (CDKDs-CYCH;1 oder CDKF;1-CYCH;1) ist. Trifft die zweite Möglichkeit zu, so bedeutet dies, dass der CAK-Komplex CDKA;1 sowohl ohne Bindung an einen Cyclin-Partner, wie auch im Komplex mit dem Cyclin-Partner phosphorylieren kann. Die Interaktionen von

CDKA;1 (D146N) gleichen denen von CDKA;1, mit zwei Ausnahmen. CKS2 und CDC6 interagieren nicht mehr mit CDKA;1 (D146N). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Aminosäureaustausch eine leichte Veränderung in der tertiären Struktur der CDKA;1 bewirkt hat, so dass CKS2 und CDC6 nicht mehr interagieren können.

Die Ergebnisse von CDKA;1 (Pstd.) stützen die Hypothese aus Kapitel 4.1.3., welche besagt, dass die nachgewiesenen Interaktionen von CDKA;1 mit seinen Substraten nur deswegen möglich sind, weil CDKA;1 ein Cyclin Partner aus dem Organismus bindet, in dem die Interaktionen getestet werden.

4.3.7 WEE1

Die Interaktionsanalyse mit den CDKA;1 Varianten weist WEE1 als Substrat von CDKA;1 aus. Dafür spricht, dass WEE1 fünf Phosphorylierungs-Motive für CDKA;1 und vier Bindungs-Motive für Cyclin besitzt. Es ist aber auch eine andere Erklärung für das Muster der Fluoreszenzintensitäten möglich. Es könnte sein, dass WEE1 nur aktivierte CDKA;1, d.h. CDKA;1 (T161D), bindet, um diese womöglich an den Aminosäuren T14 und Y15 zu phosphorylieren - obwohl durch die wildtypische Existenz der CDKA;1 (VF) Variante gezeigt wurde, dass diese Reste eine sicherlich untergeordnete Rolle spielen - und dass WEE1 nur eine geringe Affinität zu der inaktiven CDKA;1 (T161V) hat. Dies könnte den großen Unterschied zwischen den Werten von CDKA;1 (T161D) und CDKA;1 (T161V) erklären. Der niedrige Wert von CDKA;1 (DE) könnten damit zu erklären sein, dass CDKA;1 (DE) an den Stellen, an denen WEE1 phosphorylieren würde, die Phosphomimikry besitzt und somit nicht mehr als Substrat in Frage kommt. Der Wert von CDKA;1 (VF) könnte so niedrig ausfallen, da sowohl die Aminosäure mutiert ist, die von WEE1 phosphoryliert wird (Y15E), wie auch die Aminosäure daneben (T14D). Dies könnte die Bindung von WEE1 mit CDKA;1 negativ beeinträchtigen und den Wert so senken. Welches Modell nun zutrifft, muss durch Phosphorylierungs-Experimente geklärt werden.

Von den anderen überprüften CDKA;1 Varianten zeigte nur CDKA;1 (D146N) eine Interaktion mit WEE1. Dass keine Interaktion mit CDKA;1 (Pstd.) nachgewiesen werden kann, kann zwei Gründe haben. Es kann bedeuten, dass WEE1 den CDKA;1 Cyclin Komplex benötigt um CDKA;1 zu erkennen und zu phosphorylieren oder dass WEE1 doch ein Substrat von CDKA;1 ist. Für die anderen getesteten CDKs konnten Interaktionen mit CDKB1;2 und allen D-Typ CDKs nachgewiesen werden. Die Interaktion mit CDKB1;2 ist bisher unbekannt. Die Interaktion von WEE1 mit den D-Typ CDKs konnte schon einmal nachgewiesen werden (Shimotohno A 2006).

4.4 Zellzyklus Marker

Die für die Zellzyklus Marker durchgeführten Experimente zeigen, dass es voraussichtlich möglich ist, jede Phase des Zellzyklus mit einem anderen fluoreszierenden Protein zu markieren. Die Marker für die M-Phase sehen sehr gut aus, doch die für die S-Phase zeigen in fast allen Zellen ein Signal. Es ist aber unwahrscheinlich, dass all diese Zellen in der S-Phase sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Konstrukte zu stabil sind und nicht nach der S-Phase abgebaut werden. Um dies zu untersuchen, sollte der nächste Schritt sein eine Kombination von S- und M-Phase Markern zu testen. Mit dieser Kombination könnte ermittelt werden, ob die Zellen, die das Signal des M-Phase Markers zeigen auch positiv für den S-Phase Marker sind. Ist das der Fall, so sind die Konstrukte für die S-Phase Marker zu stabil.

4.5 Ausblick

4.5.1 Technische Möglichkeiten

Für die Interaktionen des CDKA;1-Cyclin Komplexes wäre es sehr interessant, die Interaktionen mit einem Interaktionssystem zu testen, in dem drei Interaktionspartner zusammen getestet werden können. Dieses System ist recht leicht zu erstellen, denn es bedarf nur der Kombination des BiFC Systems mit der FRET Technik. Man könnte damit die Interaktion von CDKA;1 mit einem Cyclin in BiFC System darstellen und durch Zugabe eines weiteren Interaktors in einem FRET Vektor mit CFP wäre das System dann komplett. Wenn alle drei Proteine miteinander interagieren, könnte man durch Anregung des CFP einen Energieübertragung auf das YFP des BiFC Systems erreichen und die Interaktion der drei Proteine nachweisen. Dies wäre eine Möglichkeit, die Substratspezifität, die durch die Cycline vermittelt wird, zu testen. Mit diesem System könnten Fragen geklärt werden wie: Mit welchem Cyclin können welche Substrate erkannt werden? Könnte ein typische M-Phase CDKA;1-CYCB1;2 Komplex Substrate aus der S-Phase phosphorylieren?

4.5.2 CDKA;1 Interaktionen

Für die abschließende Bestätigung der gefundenen neuen Substrate von CDKA;1 fehlt noch der biochemische Nachweis in Form eines Kinase Experiments. Es ist aber leider nicht gelungen, die neu entdeckten Substrate aufzureinigen, obwohl diverse Versuche in Bakterien, Hefe und Insektenzellen unternommen worden sind. Die mit dem BiFC System bestätigten Interaktionen von CDKA;1 sind aber sicherlich auch von Interesse. Ihr Zusammenhang mit dem Zellzyklus sollte näher untersucht werden. Von besonderem Interesse ist die Interaktion von CDKA;1 mit SDP1, da diese einen direkten Zusammenhang zwischen der Mobilisierung der Nährstoffe im Samen und dem Beginn der Zellteilungen für die Keimung, darstellt. Zur Aufklärung dieses Zusammenhangs

sind diverse Versuche geplant und auch schon in die Wege geleitet. Zudem besteht eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Eastmond, welcher SDP1 als Erster charakterisiert hat.

4.5.3 Zellzyklus Marker

Die hier vorgestellten Marker müssen noch ihre Spezifität für die entsprechende Zellzyklus-Phase unter Beweis stellen, doch sieht es so aus, als ob es möglich wäre, einen solchen Zellzyklus Marker zu erstellen. Wahrscheinlich sind für die Experimente mit den Zellzyklus-Inhibitoren, die bisher durchgeführt wurden, die ganze Pflanze bzw. die Wurzel nicht die besten Testobjekte um den Zellzyklus darzustellen. Es ist sinnvoller, die Experimente in Protoplasten durchzuführen, welche für die Zellzyklus-Inhibitoren genauso zugänglich sind wie die Wurzel. Mit ihnen wäre eine Synchronisation möglich (Menges M 2002), was es erleichtern würde, die Spezifität der Marker zu bestätigen und auch die G₁- und G₂-Phasen Marker zu testen. Denn für diese Zellzyklus Phasen existieren keine Inhibitoren. Das finale Ziel ist es, den Zellzyklus Marker zu komplettieren, sodass er alle Phasen des Zellzyklus in einer Zelle darstellen kann.

Literaturverzeichnis

- Boudolf V, I. D., De Veylder L (2006). "What if higher plants lack a CDC25 phosphatase?" TRENDS in Plant Science 11(10): 474-479.
- Bourne Y, W. M., Arvai AS, Bernstein SL, Reed SI, Tainer JA (2000). "Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions." Structure 8(8): 841-850.
- Bourne Y, W. M., Michael J. Hickey M, Holmes W, Rocque W, Reed SI (1996). "Crystal Structure and Mutational Analysis of the Human CDK2 Kinase Complex with Cell Cycle-Regulatory Protein CksHs1." Cell 84: 863-874.
- Bracha-Drori K, S. K., Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N (2004). "Detection of protein-protein interactions in plant using bimolecular fluorescence complementation." The Plant Journal 40: 419-427.
- Castellano M, d. P. J., Ramirez-Parra E, Brown S, Gutierrez C (2001). "Expression and Stability of Arabidopsis CDC6 Are Associated with Endoreplication." The Plant Cell 13: 2671-2686.
- Causier B, D. B. (2002). "Analysing protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system." Plant Molecular Biology 50: 855-870.
- Chabouté ME, C. N., Philipps G, Ehling M, Gigot C (1987). "Genomic organization and nucleotide sequence of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*." Plant Molecular Biology 8: 179-191.
- Chaubet N, F. M., Clement B, Brignon P, Gigot C (1996). "Identification of cis-elements regulating the expression of Arabidopsis histone H4 gene." The Plant Journal 10(3): 425-435.
- Clarke PR, Z. C. (2001). "Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eucaryotic cell division cycle?" TRENDS in Cell Biology 11(9): 366-371.
- Cobbett C, G. P. (2002). "PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis." Annu. Rev. Plant Biol. 53: 159-182.
- Colcombet J, H. H. (2008). "Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes." Biochem. J. 413: 217-226.
- Cole KC, M. H., Johnson DI (2007). "Use of bimolecular fluorescence complementation to study in vivo interactions between Cdc42p and Rdi1p of *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell 6(3): 378-387.

- De Veylder L, B. T., Beemster GTS, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van Der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D (2001). "Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis." The Plant Cell 13: 1653-1667.
- De Veylder L, S. G., Glabb N, Casteelsa P, Van Montagua M, Inze D (1997). "The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt." FEBS Letters 412: 446-452.
- del Pozo JC, B. M., Gutierrez C (2002). "Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SCFAtSKP2 Pathway in Response to Light" The Plant Cell 14: 3057-3071.
- Dissmeyer N, N. M., Pusch S, Stals H, Inze D, Grini PE, Schnittger A (2007). "T-Loop Phosphorylation of Arabidopsis CDKA;1 Is Required for Its Function and Can Be Partially Substituted by an Aspartate Residue." The Plant Cell 19: 972-985.
- Drakakaki G, Z. O., Delgado I, Robert S, Keegstra K, Raikhel N (2006). "Arabidopsis Reversibly Glycosylated Polypeptides 1 and 2 Are Essential for Pollen Development." Plant Physiology 142: 1480-1492.
- Eastmond, P. J. (2006). "SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating Arabidopsis Seeds." The Plant Cell 18: 665-675.
- Fields S, S. O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature 340(6230): 245-246.
- Fukamatsu Y, M. S., Yasuhara M, Tokioka Y, Ihara N, Fujita S, Kiyosue T (2005). "Identification of LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2)-interacting Factors That Can Recruit LKP2 to Nuclear Bodies." Plant Cell Physiol. 46(8): 1340-1349.
- Fülöp K, T. S., Kelemen Z, Horváth G, Kevei Z, Nikovics K, Bakó L, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi E (2005). "Arabidopsis Anaphase-Promoting Complexes Multiple Activators and Wide Range of Substrates Might Keep APC Perpetually Busy." Cell Cycle 4(8): 1084-1092.
- Garcia-Hernandez M, M. A., Taiz L (1998). "Metallothioneins 1 and 2 Have Distinct but Overlapping Expression Patterns in Arabidopsis." Plant Physiol. 118: 387-397.
- Görlich D, K. U. (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 607-660.
- Guo W-J, M. M., Goldsbrough PB (2008). "Examining the Specific Contributions of Individual Arabidopsis Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance." Plant Physiology 146: 1697-1706.
- Haizel T, M. T., Pay A, Fejes E, Nagy F (1997). "Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in Arabidopsis." The Plant Journal 11(1): 93-103.

- Healy JMS, M. M., Doonan JH, Murray JAH (2001). "The Arabidopsis D-type Cyclins CycD2 and CycD3 Both Interact in Vivo with the PSTAIRE Cyclin-dependent Kinase Cdc2a but Are Differentially Controlled." The Journal of Biological Chemistry 276(10): 7041-7047.
- Hemerlyl A, d. A. E. J., Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inze D, Ferreira P (1995). "Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development." EMBO Journal 14(16): 3925-3936.
- Hetzer M, G. O., Mattaj IW (2002). "The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly." Nature Cell Biology 4: 177-184.
- Hoegge C, P. B., Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." Nature 419: 135-141.
- Hu C-D, C. Y., Kerppola TK (2002). "Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation." Molecular Cell 9: 789-798.
- Iqbal A, Y. Y., Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2006). "Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana." FEBS Journal 273: 5589-5597.
- Jakoby MJ, W. C., Pusch S, Kuijt SJ, Merkle T, Dissmeyer N, Schnittger A (2006). "Analysis of the subcellular localization, function, and proteolytic control of the Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1." Plant Physiol. 141: 1293-1305.
- Johnsson N, V. A. (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 10340-10344.
- Kim DH, J. Y., Jung EA, Han MJ, Kobashi K (1995). "Purification and characterization of beta-glucuronidase from Escherichia coli HGU-3, a human intestinal bacterium." Biol Pharm Bull. 18(9): 1184-1188.
- Kwok SF, S. R., Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, Deng X-W (1998). "Arabidopsis Homologs of a c-Jun Coactivator Are Present Both in Monomeric Form and in the COP9 Complex, and Their Abundance Is Differentially Affected by the Pleiotropic cop/det/fus Mutations." The Plant Cell 10: 1779-1790.
- Landrieu I, d. C. M., De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszeski J-M, Faure J-D, Van Montagu M, Inze D, Lippens G (2004). "A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in Arabidopsis thaliana." PNAS 101(36): 13380-13385.

- Landrieu I, H. S., Sauty M, Dewitte F, Wieruszeski J-M, Inze D, De Veylder L, Lippens G (2004). "Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath;CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase." BBRC 322: 734-739.
- Leonhardt H, R. H., Weinzierl P, Sporbart A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC (2000). "Dynamics of DNA replication factories in living cells." The Journal of Cell Biology 149(2): 271-279.
- Marri L, S. F., Pupillo P, Trost P (2004). "Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in Arabidopsis thaliana." Journal of Experimental Botany 56(409): 73-80.
- Melan MA, D. X., Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK (1993). "An Arabidopsis thaliana Lipoxxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens, Abscisic Acid, and Methyl Jasmonate." Plant Physiol. 101: 441-450.
- Melan MA, E. A., Peterman TK (1994). "The Lox1 Gene of Arabidopsis 1s Temporally and Spatially Regulated in Germinating Seedlings." Plant Physiol. 105: 385-383.
- Menges M, d. J. S., Gruissem W, Murray JAH (2005). "Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis indentifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model of plant cell cycle control." The Plant Journal 41: 546-566.
- Menges M, H. L., Gruissem W, Murray JA (2002). "Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis." The Journal of Biological Chemistry 277(44): 41987-42002.
- Mishra NS, T. R., Tuteja N (2006). "Signaling through MAP kinase networks in plants." Archives of Biochemistry and Biophysics 452: 55-68.
- Morgan, D. O. (2007). The Cell Cycle, Principles of Control, New Science Press.
- Nowack MK, G. P., Jakoby MJ, Lafos M, Koncz C, Schnittger A (2006). "A positive signal from the fertilization of the egg cell sets of endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis." Nature Genetics 38(1): 63-67.
- Oakenfull AE, R.-K. C., Murray JAH (2002). "Plant D-type cyclins and the control of G1 progression." The Royal Society 357: 749-760.
- Planchais S, G. N., Inze D, Bergounioux C (2000). "Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies." FEBS Letters 476: 78-83.
- Ramachandran GN, P. S. (1965). "Anomalous Dispersion Method: Its Power for Protein Structure Analysis." Science 150(3693): 212-214.
- Ren H, S. A., del Pozo JC, Murray JAH, Estelle M (2008). "Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases." The Plant Journal 53: 705-716.

- Riddle SM, V. K., Hanson GT, Vogel KW (2006). "Time resolved fluorescence resonance energy transfer kinase assays using physiological protein substrates: Applications of terbium-fluorescein and terbium-green fluorescent protein fluorescence resonance energy transfer pairs." Analytical Biochemistry 356: 108-116.
- Rodriguez Milla MA, M. A., Rodriguez Huete A, Gustafson jP (2003). "Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways." The Plant Journal 36: 602-615.
- Rose A, M. I. (2001). "A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim." Plant Biology 98(26): 15377-15382.
- Rudner AD, M. A. (2000). "Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-dependent Activity of the Anaphase-promoting Complex." The Journal of Cell Biology 149(7): 1377-1390.
- Schultz TF, K. T., Yanovsky M, Wada M, Kay SA (2001). "A Role for LKP2 in the Circadian Clock of Arabidopsis." The Plant Cell 13: 2659-2670.
- Shimotohno A, O. R., Bisova K, Sakaguchi N, Huang J, Koncz C, Uchimiya H, Umeda M (2006). "Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis." The Plant Journal 47: 701-710.
- Shimotohno A, U.-H. C., Bisova K, Uchimiya H and Umeda M (2004). "The Plant-Specific Kinase CDKF;1 Is Involved in Activating Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinases in Arabidopsis." The Plant Cell 16: 2954-2966.
- Shyu YJ, H. S., Duren HM, Ellis RE, Kerppola TK, Hu CD. (2008). "Visualization of protein interactions in living *Caenorhabditis elegans* using bimolecular fluorescence complementation analysis." Nat Protoc. 3(4): 588-596.
- Sitry D, S. M., Ko TK, Ganoth D, Breward SE, Itzhaki LS, Pagano M, Hershko A (2002). "Three Different Binding Sites of Cks1 Are Required for p27-Ubiquitin Ligation." The Journal of Biological Chemistry 277(44): 42233-42240.
- Tomoda K, K. Y., Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato J-y (2002). "The Cytoplasmic Shuttling and Subsequent Degradation of p27Kip1 Mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 Signalosome Complex." The Journal of Biological Chemistry 277(3): 2302-2310.
- Tsvetkov LM, Y. K.-H., Lee S-J, Sun H, Zhang H (1999). "p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27." Current Biology 9: 661-664.
- Ubersax JA, W. E., Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO (2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1." Nature 425: 859-864.
- Vernoud V, H. A., Yang Z, Nielsen E (2003). "Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis." Plant Physiology 131: 1191-1208.

- Voinnety O, R. S., Mestre P, Baulcombe D (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." The Plant Journal 33: 949-956.
- Wagner U, E. R., Dixon DP, Mauch F (2002). "Probing the Diversity of the Arabidopsis glutathion S-Transferase Gene Family." Plant Molecular Biology 49: 515-532.
- Wang H, Q. Q., Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998). "ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid." The Plant Journal 15(4): 501-510.
- Wen R, N. L., Li G, Wang H, Xiao W (2006). "Arabidopsis thaliana UBC13: implication of error-free DNA damage tolerance and Lys63-linked polyubiquitylation in plants." Plant Molecular Biology 61: 241-253.
- Winter D, V. B., Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007). "An 'Electronic Fluorescent Pictograph' Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets." Plosone.
- Wittke S, L. N., Müller S, Johnsson N (1999). "Probing the Molecular Environment of Membrane Proteins In Vivo." Molecular Biology of the Cell 10: 2519-2530.
- Yang Y, K. H.-B., Peng H-P, Shih M-C (1993). "Stress Responses and Metabolic Regulation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes in Arabidopsis." Plant Physiol. 101: 209-216.
- Yano A, K. Y., Koike A, Shinya T, Kim HJ, Matsumoto M, Ogita S, Wada Y, Ohad N, Sano H (2006). "Interaction between methyl CpG-binding protein and ran GTPase during cell division in tobacco cultured cells." Ann Bot (London) 98(6): 1179-1187.
- Yasuhara M, M. S., Hirano H, Takanabe R, Tokioka Y, Ihara N, Komatsu A, Seki M, Shinozaki K, Kiyosue T (2004). "Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in Arabidopsis." Journal of Experimental Botany 55(405): 2015-2027.
- Yudushkin IA, S. A., Kinkhabwala A, Neel BG, Schultz C, Bastiaens PIH (2007). "Live-Cell Imaging of Enzyme-Substrate Interaction Reveals Spatial Regulation of PTP1B." Science 315: 115-119.
- Zhang C, C. P. (2000). "Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in Xenopus egg extracts." Science 288(5470): 1429-1432.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Arp Schnittger für die Betreuung und fachlichen Diskussionen während meiner Doktorarbeit bedanken.

Prof. Dr. Martin Hülskamp möchte ich dafür danken, dass er sich dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten meiner Arbeit zu verfassen und mich zu prüfen. Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass er den Vorsitz der Prüfungskommission übernommen hat. Und Dr. Martina Pesch danke ich dafür, dass sie sich als Beisitzerin angeboten hat.

Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Schnittger, Hülskamp und Höcker. Die Seminare, die von diesen Gruppen veranstaltet wurden, waren sehr informativ und eine große Hilfe für mich, die Darstellung und den Vortrag von wissenschaftlichen Ergebnisse zu lernen. Sie führten häufig auch zu neuen Ideen und Anregungen für die Verbesserung der vorgestellten Experimente.

Den Mitgliedern der AG Schnittger möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation innerhalb der Arbeitsgruppe danken.

Besonderer Dank gilt Nico Dissmeyer und Annika Weimer, mit denen die Zusammenarbeit besonders eng war und ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

Einen großen Dank möchte ich auch meiner Frau und meiner Familie für die Unterstützung in der ganzen, meist nicht so einfachen, Zeit zukommen lassen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner kleinen Tochter danken. Ihre Geburt im Mai hat zwar dafür gesorgt, dass das Zusammenschreiben der Arbeit etwas länger gedauert hat, aber sie hat auch dafür gesorgt, dass diese Zeit zu einem unvergesslichen Erlebnis wurde.

P129	AttB1_E2FC	35	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGCGACATCAA	50,8	
P130	E2FC_AttB2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTCAGCTGTTGAAGTTGCTCC	50,3	compl.
P131	E2FC_AttB2_S	37	CAAGAAAGCTGGGTTGCTGTTGAAGTTGCTCCATAAA	51,5	compl.
P132	TMKRPs	35	CCTTCCAGAACTAGATATGGTGAGAAAAATAGA	ca. 35	
P133	TMKRPsas	35	TCTATATTTTCTCACCATATCTAGTTTCTGGAAGG	ca. 35	compl.
P134	155KRPs	34	CGTCTATATCATGGCCATGGTGAGAAAAATAGA	ca. 35	
P135	155KRPsas	34	TCTATATTTTCTCACCATGGCCATGATATAGAGC	ca. 35	compl.
P136	TM109s	30	CCTTCCAGAACTAGATTTTGAATCGCGGG	ca. 35	
P137	TM109sas	30	CCGCCGATTCAAAATCTAGTTTCTGGAAGG	ca. 35	compl.
P138	84109s	33	CCTTCCAGAACTAGATGACAAGCAGAAGAAGC	ca. 35	
P139	84109sas	33	CGTTCTTCTGCTTTCATCTAGTTTCTGGAAGG	ca. 35	compl.
P140	AttB1_KRP2	34	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGCGGTTAGG	ca. 50	
P141	AttB2_KRP2	37	CAAGAAAGCTGGGTTTCATGGATTCATTTAACCCAC	ca. 50	compl.
P142	AttB2_KRP2_S	36	CAAGAAAGCTGGGTTTGGATTCAATTTAACCCACTC	ca. 50	compl.
P143	T109s	37	ACCGCTTCCAGAACTAGATGAAITTTGAATCGCGGG	ca. 50	
P144	T109sas	37	CCGCCGATTCAAAATCTAGTTTCTGGAAGGCGGT	ca. 50	compl.
P145	RAN1_B2	38	CAAGAAAGCTGGGTTTACTCAAGATATCATCATCGT	46	compl.
P146	RAN23_B1	38	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTTACCTAACCCAGC	46	
P147	RAN2_B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTTACTCAATGCGTCATCATC	48	compl.
P148	RAN2_S	34	CAAGAAAGCTGGGTTCTCAAATGCGTCATCATCA	47	compl.
P149	RAN3_B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTCTACTCGAAGGTGTCATCATC	46	compl.
P150	RAN3_S	34	CAAGAAAGCTGGGTTCTCGAAGGTGTCATCATCG	48	compl.
P151	Att1q51550_B1	33	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGCGGAATC	47	
P152	Att1q51550_S	31	CAAGAAAGCTGGGTTTCATGCTTTTCCGGGT	46	compl.
P153	Att5q42350_B1	41	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGATGATTCTGAGAAACCAT	47	
P154	Att5q42350_S	34	CAAGAAAGCTGGGTTGAGATGAAGCAATGCAATG	46	compl.
P155	Att5q67320_B1	40	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCTTCACTTACCTCCGTC	47	
P156	Att5q67320_S	35	CAAGAAAGCTGGGTTGATTCTGAAATCAAGAACCC	47	compl.
P157	pCDT1_upper	33	ATGGCGCGCCATTGTAAACACAGCAGCATTGG	51,6	
P158	pCDT1_lower	37	ATCTCGAGTTTATCAACAATGCTATAGAGTGTGAG	52	compl.
P159	pPCNA1_upper	36	ATGGCGCGCCATTCTCTTATCCTGATTGATTG	51	
P160	pPCNA1_lower	35	ATCTCGAGTTCTGCTGTTAGATATTATCAGAGTT	51,6	compl.
P161	Linker_PCNA1	69	GGACAAGGACAAGGACAAGGACCTGGAAGAGGATATGCT	48,3	
P162	AttB1_PCNA1	40	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTGGAGCTACGCTTGT	48,3	
P163	AttB2_PCNA1	40	CAAGAAAGCTGGGTTTAGGATTAGTGTCTTCTTCT	49,3	compl.
P164	AttB2_PCNA1_S	39	CAAGAAAGCTGGGTTGGGATTAGTGTCTTCTTCTTCTC	49,5	compl.
P165	Linker_CDT1	71	GGACAAGGACAAGGACAAGGACCTGGAAGAGGATATG	49,1	
P166	AttB1_CDT1	42	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGAGTACACCAGGCTCTCTAG	49,1	
P167	AttB2_CDT1	34	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAAAGCAGTGGAGCC	50,1	compl.
P168	AttB2_CDT1_S	35	CAAGAAAGCTGGGTTAGAAAGCAGTGGAGCCATCT	50,5	compl.
P169	AttB1_RCA1	36	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGAGGCGCTATATCG	40	
P170	AttB2_RCA1_S	30	CAAGAAAGCTGGGTTAAAGCAGAGCGGCTT	40	compl.
P171	RAF_L Clone_B1	50	AAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGCGGAATCGGAATCAACCAGAAACTC	40	
P172	SpCDT1_01	23	GGTAATCTAACATTTATTAGCTT	42,1	
P173	SpCDT1_02	24	AATATATCACATTAAGAAAAAAT	42	compl.
P174	SpDG_01	18	CGATCTCAAAATCCACG	48,3	
P175	SpDG_02	18	AAAACCTCGACGGCCTGTG	50,8	
P176	SpDG_03	18	CCTGGGTGGACGATATCA	48,2	
P177	Sp_l2	18	ACTCCAAGTGGGAGATTC	43	
P178	Sp_l3	18	CACGGGTATGATGTTTCT	42	
P179	Sp_l4	18	CTTGGAGATGCTGATAGG	42	
P180	B2_CDC6_MS	37	CAAGAAAGCTGGGTTTCATAGAAGACAGTTGGCGAAG	51	compl.
P181	B2_CDC6_OS	37	CAAGAAAGCTGGGTTTAGAAGACAGTTGGCGAAGAAAT	50	compl.
P182	AttB1_CDKA1	42	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGATCAGTACGAGAAAGTTGA	50	
P183	XhoI_CDKA1	32	GGCCTCGAGATGGATCAGTACGAGAAAGTTGA	50	
P184	NotI_CDKA1	31	CCTGCGCCGCTAAGGCATGCCTCCAAAGT	51	compl.
P195	AttB1_B12	37	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCAGCAGAGGAAAC	50,8	
P196	AttB2_B12_M	38	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAAAGCAGGCTCTTCTCC	50,6	compl.
P197	AttB2_B12_O	36	CAAGAAAGCTGGGTTAGAAAGAACAGGCTTCTTCCA	50,1	compl.
P198	B1_5q04040	45	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGATATAGTAAAGAGGCTAGTGT	49,3	
P199	B2M_5q04040	41	CAAGAAAGCTGGGTTTGAAGCATCTATAACACTACCAGACA	49,2	compl.
P200	B2O_5q04040	40	CAAGAAAGCTGGGTTAGCATCTATAACACTACCAGACACC	50,6	compl.
P201	B1_5q02500	39	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCGGGTAAGGAGAAGG	50	
P202	B2M_5q02500	37	CAAGAAAGCTGGGTTTATGTCAGACCTCTCGATCTTA	50,2	compl.
P203	B2O_5q02500	36	CAAGAAAGCTGGGTTGTCAGACCTCTCGATCTTAGG	52	compl.
P204	B1_4q30270	45	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCCTTTCAAAATATCTTCTT	50,7	
P205	B2M_4q30270	37	CAAGAAAGCTGGGTTTATGAGCTTGTGTGCTATCC	51,7	compl.
P206	B2O_4q30270	35	CAAGAAAGCTGGGTTGAGCTTGTGTGCTATCCCT	50,6	compl.
P207	B1_5q45510	41	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCGATCGTGAAGATGG	53	
P208	B2M_5q45510	35	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGCATTCATGTTGGGAGG	51,4	compl.
P209	B2O_5q45510	36	CAAGAAAGCTGGGTTGCATTCATGTTGGAGGATC	51,6	compl.
P210	B1_4q14320	40	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGTGAAGATTCGAAAACT	50,3	
P211	B2M_4q14320	39	CAAGAAAGCTGGGTTTAAAGAGAGATGTTCCCTTTCC	50,2	compl.
P212	B2O_4q14320	37	CAAGAAAGCTGGGTTAAAGAGAGATGTTCCCTTTCC	52,2	compl.
P213	B1_FB	50	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGCGGAATCAACCAGAACTCTTCTC	50,6	
P214	B1_CDKB11	43	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAGAGTACGAGAAGCTAGAG	50,3	
P215	B2M_CDKB11	38	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAACTGAGACTTGTCAAGGC	52,8	compl.
P216	B2O_CDKB11	37	CAAGAAAGCTGGGTTGAAGCTGAGACTTGTCAAGGCTG	50,8	compl.
P217	B1_CDKB12	41	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAGAAATACGAGAAGCTCG	52,2	
P218	B2M_CDKB12	38	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAACTGAGATTTGTCAAGGCTG	52,8	compl.
P219	B2O_CDKB12	37	CAAGAAAGCTGGGTTGAAGCTGAGATTTGTCAAGGCTG	50,8	compl.
P220	B1_CDKB21	40	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAGCAGGGAGTTATAGCA	50,6	
P221	B2M_CDKB21	38	CAAGAAAGCTGGGTTTGAAGAGAGGACTTTTCTGGCA	52	compl.
P222	B2O_CDKB21	36	CAAGAAAGCTGGGTTGAGAGAGGACTTTTCTGGCAG	49,9	compl.
P223	B1_CDKB22	42	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGACAACAATGGAGTTAAACC	51,6	
P224	B2M_CDKB22	37	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAGAGGACTTGTGAGGC	52,6	compl.
P225	B2O_CDKB21	36	CAAGAAAGCTGGGTTGAGAGAGGACTTGTGAGGCAA	50,9	compl.
P232	SP_L_01	18	TGAAGGCAACTGCTGGTG	49,9	
P233	SP_K_01	18	TGGTAGAACGCTTTGCT	48,1	
P234	SP_K_02	18	GGCAAGGACGTTCCAAGA	50,6	
P235	SP_N_01	18	TCATCTGAAAGAAAGCCG	45,7	
P236	SP_N_02	24	GCAAGTCTATAAGCTTAATAAGG	48,5	
P237	SP_N_03	18	TGCAAGCAAGAAAGGAG	46,1	
P238	SP_N_04	18	ATTCCAGGATCTGCGGT	49	
P239	B1_GLS10	43	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCGAGCTGAGTCACTTGG	56,4	
P240	B2O_GLS10	39	CAAGAAAGCTGGGTTAAGACCAGAATTTGGGATTTGCTCC	56,4	compl.
P241	GLS10_Nhe1_s	25	GTGATATCTCGCTAGCCTCATTTGCT	57,1	
P242	GLS10_Nhe1_as	25	AGCAATGAGGCTAGCGAGATATCAC	57,1	compl.
P243	YS_GLS10_B1	43	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCACATTCGGACCTTGAGC	54,1	
P244	RAN1_B2_MS	43	CAAGAAAGCTGGGTTTACTCAAGATATCATCATCGTCATCCG	56,8	compl.
P245	KPCR_1s	18	CTTACGCGCAGCAGTTTC	51,6	
P246	KPCR_1as	18	GCCAACCAAGCTCAAAGG	50,5	compl.
P247	KPCR_2s	18	CGCGGAAATGCTATCCAA	50,2	
P248	KPCR_2as	18	TGATGACCCGAGAGGCTT	52,5	compl.
P249	PCNA2_TDNA_s	27	AAATGAACCTGTTGTTTATTGTTGTTGA	59,3	

P250	PCNA2 TDNA as	27	ACACTTCTCGTCTTACTTCATTGTCT	60,2	compl.
P251	D31 B2 OS	34	CAAGAAAGCTGGGTTTTGGAGTGGCTACGATTGCC	53,3	compl.
P252	GSL10 Bcul s	21	GGAAATTTGACCGGGACCATGG	59,7	
P253	GSL10 Bcul as	21	CCATGGTCCCGGTCAAATTC	59,7	compl.
P254	G Pfl23II s	23	TTATTTGACGTACGGTCTCGCTG	56	
P255	G Pfl23II as	23	CAGCGAGACCGTACGTCAAATA	56	compl.
P256	SDP1 DRPK s	40	TTCTCGGGATCACCGTTTTGCGACCCAAGGAAGCATGAACC	53,3	
P257	SDP1 DRPK as	32	AGACACCGAGGAGGTTTCATGCTTCTTGGGTC	51,2	compl.
P258	SDP1 DP s	49	TCCTCGGTGCTTAACTATTTGACGGATCCTCATGTGGTTATATGGAGC	51,4	
P259	SDP1 DP as	30	ACTGCGCTCCATATAACCACATGAGGATCC	55,6	compl.
P268	DXR B1	48	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGATGACATTAACCTCACTATCTCCAGC	56,5	
P269	DXR M B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTCATGCATGAACCTGGCCTAG	51	compl.
P270	DXR O B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTGATGAACCTGGCCTAGCAG	53,6	compl.
P271	GAPC2 B1	43	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTGACAAAGAGATCAGAATC	53,3	
P272	GAPC2 M B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTTTAGGCCTTTGACATGTGAACG	54,3	compl.
P273	GAPC2 O B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTGCGCTTTGACATGTGAACGATA	54,1	compl.
P274	GPX2 B1	40	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCGGATGAATCTCCAAAG	55,4	
P275	GPX2 M B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTTAAGAAGAGGCCTGCCCA	51,4	compl.
P276	GPX2 O B2	34	CAAGAAAGCTGGGTTAGAAGAGGCCTGCCCAAC	50,4	compl.
P277	GSTF2 B1	41	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCAGGTATCAAAGTTTTCG	52,8	
P278	GSTF2 M B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTGAACCTTCTCGGAAGC	53,5	compl.
P279	GSTF2 O B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTCTGAACCTTCTCGGAAGCTG	51,6	compl.
P280	GSTF9 B1	41	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGTGTAAAGGTGTAACGGAC	52,5	
P281	GSTF9 M B2	38	CAAGAAAGCTGGGTTTTAAGCTGGGAATGAATACTTGG	52,2	compl.
P282	GSTF9 O B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTAGCTGGGAATGAATACTTGG	52,6	compl.
P283	LOX1 B1	41	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTCCGAGAAGCTTAGGGATC	50,8	
P284	LOX1 M B2	41	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTAGAGACGCTATTGGAAATTC	54,4	compl.
P285	LOX1 O B2	39	CAAGAAAGCTGGGTTGATAGAGACGCTATTGGAAATTC	52,2	compl.
P286	LOX1 SP1	21	GCTTAAAGGATGGGACAGAGT	49,4	
P287	LOX1 SP2	23	GTGAATCATACGGTAACCCAGAAC	49,8	
P288	LTPa B1	39	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTTCTAAGGCTCTTGC	50,6	
P289	LTPa M B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTTTCAAGAACATTGGAACCCATG	50	compl.
P290	LTPa O B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTAGAACATTGGAACCCATGAGG	50,6	compl.
P291	LTPb B1	42	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAAACCCATGTTTTATCTCG	53,9	
P292	LTPb M B2	38	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGGCAGAGTATAAGCTCCAC	52,3	compl.
P293	LTPb O B2	40	CAAGAAAGCTGGGTTAGGCAGAGTATAAGCTCCACATTTG	55	compl.
P294	MOK4 B1	40	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTTTGGCGGAGATAAAC	50,3	
P295	MOK4 M B2	40	CAAGAAAGCTGGGTTTTCAAGCGTAGAATTAACAGAATTC	53,4	compl.
P296	MOK4 O B2	38	CAAGAAAGCTGGGTTAGCGCTAGAATTAACAGAATTC	51,1	compl.
P297	MT2A B1	40	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTCTGCTGTGGAGAAAC	50,7	
P298	MT2A M B2	33	CAAGAAAGCTGGGTTCACTTGCAGGTGCAAGG	49,9	compl.
P299	MT2A O B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTCTTGCAGGTGCAAGGATCAC	53	compl.
P300	MXI10 B1	40	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTTCTCTATGCTCTCC	51,8	
P301	MXI10 M B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTTAAGCTTCCGGTGAAGCTTG	50,2	compl.
P302	MXI10 O B2	33	CAAGAAAGCTGGGTTAGCTTCCGGTGAAGCTTGG	50,2	compl.
P303	WEE1 B1	42	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTCCGAGAAGAACCGAAGAAC	53,4	
P304	WEE1 M B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTTCAACCTCGAATCCTATCAAAAC	50,3	compl.
P305	WEE1 O B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTACCTCGAATCCTATCAAAACATG	50,1	compl.
P306	AJH1 B1	39	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAAAGTTCTCTCGTCAGC	53,1	
P307	AJH1 M B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTGAATCCTTCAAGGACCC	52,3	compl.
P308	AJH1 O B2	36	CAAGAAAGCTGGGTTGATGTAATCATGGGCTCTGG	54,4	compl.
P309	CDK1 B1	41	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAAACCGAAGAAAGTTG	54,9	
P310	CDK1 M B2	41	CAAGAAAGCTGGGTTCTATAGGAACCTCGAGTCAAGTTTCC	53,2	compl.
P311	CDK1 O B2	40	CAAGAAAGCTGGGTTTAGGAACCTCGAGTCAAGTTTCTCC	54,2	compl.
P312	CDK2 B1	41	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCGAAATCCGGCCGATAATC	53,8	
P313	CDK2 M B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTGAATCCTTCAAGGACCC	54,5	compl.
P314	CDK2 O B2	37	CAAGAAAGCTGGGTTAGTGAATCCTTCAAGGACCCATC	53,5	compl.
P315	CDK3 B1	37	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGCGGAGCAGCCAAAG	56	
P316	CDK3 M B2	40	CAAGAAAGCTGGGTTTTACTGGAACCTCAAGTCCAGTTTC	52,9	compl.
P317	CDK3 O B2	38	CAAGAAAGCTGGGTTCTGGAACCTCAAGTCCAGTTTCC	53,7	compl.
P318	CDKF1 B1	39	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGATAAACACCCGGCGAC	53,9	
P319	CDKF1 M B2	39	CAAGAAAGCTGGGTTTTCAAGGGAATCTATTGTAATTC	52,5	compl.
P320	CDKF1 O B2	41	CAAGAAAGCTGGGTTGGGGAATCTATTGTAATCCACTAC	52,9	compl.
P321	CDKF1 SP1	21	GCGAACCCACGAAGTTATTC	50,7	
P324	SDP1 APRK s	40	TTCTCGGGATCACCGTTTTGGGCCCAAGGAAGCATGAACC	ca. 50	
P325	SDP1 APRK as	32	AGACACCGAGGAGGTTTCATGCTTCTTGGGGC	ca. 50	compl.
P326	SDP1 AP s	49	TCCTCGGTGCTTAACTATTTGACGGCGCCTCATGTGGTTATATGGAGC	ca. 50	
P327	SDP1 AP as	30	ACTGCGCTCCATATAACCACATGAGGGCC	ca. 50	compl.
P328	J610	29	GGGGACAAGTTGTACAAAAGCAGGCT	ca. 50	
P329	J611	29	GGGGACCCTTTGTACAAAAGCAGGCT	ca. 50	compl.
P330	CYCH B1	42	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCGGATTTTCAGACATCAAC	56,8	
P331	CYCH M B2	35	CAAGAAAGCTGGGTTTCAACCTATGGGTGGCGGTG	57,8	compl.
P332	CYCH O B2	34	CAAGAAAGCTGGGTTACCTATGGGTGGCGGTGCC	59,1	compl.
P333	HIS11 B1	45	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCAGAGGTGGAATAGAGAAGCCG	58	
P334	HIS11 M B2	41	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTTCTTAAACCTAGAAGAAGCCC	56,8	compl.
P335	HIS11 O B2	44	CAAGAAAGCTGGGTTCTTCTTAAACCTAGAAGAAGCCCTTTG	59,7	compl.
P336	HIS12 B1	48	CAAAAAGCAGGCTCCACCATGCTATAGAGGAAGAAAACGTTCCAAC	57	
P337	HIS12 M B2	42	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTTCTTAGCCTTCTAGTCAAGG	58,9	compl.
P338	HIS12 O B2	43	CAAGAAAGCTGGGTTCTTCTTAGCCTTCTAGTCAAGGCTCTC	59	compl.
P339	CDKB12 M B2	42	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAACTGAGATTTGTCAAGGCTGTC	59	compl.
P340	CDKB12 O B2	43	CAAGAAAGCTGGGTTGAACTGAGATTTGTCAAGGCTGTCAAAG	59,7	compl.

Tabelle B: erstellten Konstrukte in *E. coli* und *A. tumefaciens*

Nr.	Konstrukt	Klonierung/Quelle/Spender	Res.	Empfänger	Risiko-Gruppe
ST3	pEXSG-YFP	erhalten von AG Romeis (Marcel Wiermer)	Amp	DH5a	1
ST5	pENSG-YFP	erhalten von AG Romeis (Marcel Wiermer)	Amp	DH5a	1
ST9	pEXSG-CFP	erhalten von AG Romeis (Marcel Wiermer)	Amp	DH5a	1
ST11	pENSG-CFP	erhalten von AG Romeis (Marcel Wiermer)	Amp	DH5a	1
ST30	CDKA;1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit ST24	Amp	DH5a	1
ST31	KRP1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit ST25	Amp	DH5a	1
ST32	KRP1/109 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt	Amp	DH5a	1
ST33	KRP1/152 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt	Amp	DH5a	1
ST34	CKS1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit ST26	Amp	DH5a	1
ST39	CDKA;1 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. mit ST30 und pMet (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST40	CDKA;1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. mit ST30 und Nul (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST41	KRP1 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. mit ST31 und pMet (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST42	KRP1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. mit ST31 und Nul (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST43	KRP1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST31 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST44	KRP1/109 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. mit ST32 und pMet (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST45	KRP1/109 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. mit ST32 und Nul (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST46	KRP1/109 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST32 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST47	KRP1/152 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. mit ST33 und Nul (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST48	KRP1/152 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. mit ST33 und pMet (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST49	KRP1/152 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST33 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST51	CKS1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. mit ST34 und Nul (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST52	CKS1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST34 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST64	CDKA;1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST30 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST70	CYCB1;2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. Mit MJ705; erhalten von Marc Jakoboy (CYCB1;2 mit C-term. Strep-Tag)	Amp	DH5a	1
ST71	CYCB1;2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. Mit MJ705; erhalten von Marc Jakoboy (CYCB1;2 mit C-term. Strep-Tag)	Amp	DH5a	1
ST72	CKZ-A	Durch Ligation von CKZ-A aus ST62 mit CKZ (Laurent Deslandes) erstellt	Ch/Amp	DB31	1
ST73	NuA	Durch Ligation von NuA aus ST61 mit CKZ (Laurent Deslandes) erstellt	Ch/Amp	DB31	1
ST75	CYC3,1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt (Ursprung Oliver Hofmann)	Kana	DH5a	1
ST76	pSPYNE-35	erhalten von Prof. Klaus Harter	Kana	DH5a	1
ST77	CYC3,1 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. mit ST75 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST78	CYC3,1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. mit ST75 und CKZ (Laurent Deslandes)	Amp	DH5a	1
ST79	CYCB1;2 in pEXSG-CFP	erstellt durch LR-Rkt. mit ST9 und CYCB1;2-STREP in pDONR201 (Marc Jakoboy)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST81	pSPYCE-35	erhalten von Prof. Klaus Harter	Kana	DH5a	1
ST89	SV40-YFP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt	Kana	DH5a	1
ST90	CDKA;1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST3 mit CDKA;1 in pDONR210 (Marc Jakoboy)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST91	CDKA;1 in pEXSG-CFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST9 mit CDKA;1 in pDONR210 (Marc Jakoboy)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST92	CKS1 in pEXSG-CFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST9 mit CKS1 in pDONR210 (Arp Schnittger)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST93	CKS1 in pENSG-CFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST11 mit CKS1 in pDONR201 (Arp Schnittger)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST94	CKS1 in pENSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST4 mit CKS1 in pDONR201 (Arp Schnittger)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST95	SPYCE in PUC19	erhalten von Dierk Wanke (AG Harter)	Amp	DH5a	1
ST96	SPYNE in PUC19	erhalten von Dierk Wanke (AG Harter)	Amp	DH5a	1
ST100	pSYC	erstellt durch Ligation von Schnittstück(Sdal/Avall) aus ST95	Ch/Amp	DB31	1
ST101	pSYN	erstellt durch Ligation von Schnittstück(Sapl/Sacl) aus ST96	Ch/Amp	DB31	1
ST116	pGII(A+)-BAR-UBQ10	Vector von Susanne Kujit erhalten	Amp	DH5a	1
ST118	pTMM in pLeela	Vector von Christina Weini erhalten	Amp	DH5a	1
ST121	ECFP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201	Kana	DH5a	1
ST122	pH4 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt in pGEM-T	Amp	DH5a	1
ST123	CDKA;1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST124	KRP1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST127	pH4 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von AscI / XhoI Schnittstück aus ST122 in pAM-PAT	Ch/Amp	DB31	1
ST128	KRP1_109 mit Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201	Kana	DH5a	1
ST129	CKS1 ohne Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201	Kana	DH5a	1
ST130	CKS2 ohne Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201 (Mutation!!!)	Kana	DH5a	1
ST132	KRP1 mit Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201	Kana	DH5a	1
ST133	CKS2 ohne Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. Mit PCR-Produkt und pDONR201	Kana	DH5a	1
ST134	pGJ2628	erhalten von Guido Jach; GFP "Emerald"	Amp	DH5a	1
ST135	DB-YFP in pDONR201	erhalten von Nico Dissmeier	Kana	DH5a	1
ST136	CDKA;1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST137	KRP1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST138	109 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST139	CKS1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST129 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST140	109 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST141	GUS-STOP in pDONR201	erhalten von Klaus Richter	Kana	DH5a	1
ST142	GUS-STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. mit ST141 und ST100	Amp	DH5a	1
ST143	DB-GUS:RFP in pDONR201	erhalten von Nico Dissmeier	Kana	DH5a	1
ST144	pDONR201	erhalten von Christina Weini	Kana	DB31	1
ST146	DB-YFP:GR in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a	1
ST149	pH4::DB-GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST127 mit ST143	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST151	GFP (UV ind.) in pLeela	erstellt durch LR-Rkt. von ST145 mit pLeela	Amp	DH5a	1
ST153	PCNA2 cDNA in pZL1	erhalten von ABRC Clone 9313	Amp	DB10b	1
ST154	CDC6:GFP(Emerald) in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt erhalten von Christina Weini; Helferstamm für Split-YFP; Ursprung: Voignet, Rivas et al. 2003	Kana	DH5a	1
ST157	19K		Rif/Kan	Agros	1
ST158	pCYCB1;2::CYCB1;2:RFP in pAM-PAT	erhalten von Farshad Rootbakelari	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST159	pCYCB1;2 in pAM-PAT	erhalten von Farshad Rootbakelari	Ch/Amp	DB31	1
ST160	pCYCB1;2::DB-GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST143 mit ST159	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST161	CKS1 ohne Stop in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST129 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK
ST162	GUS ohne Stop in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST141 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK

ST163	GFP:Linker:PCNA2 -Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST165	TM:YFP:109 in pGL2 pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von TM:YFP:109 in pDONR201 (Sebastian) mit pGL2 pAM-PAT	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST166	TM:YFP:109 in pTMM pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von TM:YFP:109 in pDONR201 (Sebastian) mit pTMM pAM-PAT	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST169	TM:YFP:KRP in pDONR201	erhalten von Sebastian Marquardt	Kana	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST170	Skp2.1 in pDONR201	erhalten von Sebastian Marquardt	Kana	DH5a		1
ST171	Skp2.2 in pDONR207	erhalten von Sebastian Marquardt	Genta	DH5a		1
ST172	GFP:Linker:PCNA2 +Stop in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST173	CYCB1:2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST101 mit CK352 (Christina Weinel)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST175	pGL2:TM:YFP:KRP1 in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von pGLABRA mit ST169	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST176	truncated CYCB1:2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST101 mit CK352 (Christina Weinel)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST177	pPCNA2 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt in pGEM-T	Amp	DH5a		1
ST178	Skp2.1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST179	Skp2.2 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST180	Skp2.2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST181	pCYCB1:3:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST164 mit ST146	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST182	pUBQ10 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt in pGEM-T	Amp	DH5a		1
ST183	CYCB1:2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von CK351 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST185	truncated CYCB1:2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von CK352 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST186	truncated CYCB1:2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von CK352 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST187	CYCB1:2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von CK351 mit CKZ	Amp	DH5a		1
ST188	CYCB1:2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von CK351 mit Nul	Amp	DH5a		1
ST189	KRP1_152 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST33 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST190	KRP1_152 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST33 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST192	truncated CYCB1:2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von CK352 mit CKZ	Amp	DH5a		1
ST193	CYCB1:2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von CK351 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST194	Skp2:2-STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST195	Skp2:2-STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST196	Skp2:2-STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST197	pUBQ10 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von AscI / XhoI Schnittstück aus ST182 in pAM-PAT	Ch/Amp	DB31		1
ST198	pPCNA2 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von AscI / XhoI Schnittstück aus ST177 in pAM-PAT	Ch/Amp	DB31		1
ST199	Skp2.1-STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST200	PCNA2-STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST201	E2Fc in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST202	E2Fc-STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST203	Skp2.1-STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST199 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST204	Skp2.1-STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST199 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST205	PCNA2-STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST206	PCNA2-STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST207	pPCNA2:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST143 mit ST198	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST208	pUBQ10:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST143 mit ST197	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST210	DB-Mutant CYCB1:2 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST212	E2Fc-STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST202 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST213	E2Fc-STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST202 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST214	E2Fc-STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST202 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST215	E2Fc-STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST202 mit Nul	Amp	DH5a		1
ST216	PCNA2-STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST217	PCNA2-STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit Nul	Amp	DH5a		1
ST218	Skp2.2-STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit Nul	Amp	DH5a		1
ST219	DB-Mutant CYCB1:2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST220	DB-Mutant CYCB1:2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST221	DB-Mutant CYCB1:2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST222	DB-Mutant CYCB1:2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit Nul	Amp	DH5a		1
ST223	DB-Mutant CYCB1:2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit CKZ	Amp	DH5a		1
ST224	Skp2.1-STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST199 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST225	Skp2.2-STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit CKZ	Amp	DH5a		1
ST228	pUBQ10:ECFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST121 mit ST197	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST229	pPCNA2:GFP:Linker:PCNA2 in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST172 mit ST198	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST230	pPCNA2:DB:YFP:GR in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST146 mit ST198	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST231	pH4:DB:YFP:GR in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST146 mit ST127	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST235	pCDC6 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt in pGEM-T	Amp	DH5a		1
ST240	pCDC6 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von AscI/SalI Schnittstück aus ST235 in AscI/XhoI verdauten pAM-PAT	Amp	DH5a		1
ST241	CKS2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST242	CKS2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST243	pCDC6:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST143 mit ST240	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST245	CKS1-STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST129 mit pMet	Amp	DH5a		1
ST246	pMet	erhalten von Laurent Deslandes	Ch/Amp	DB31		1
ST247	Nul	erhalten von Laurent Deslandes	Ch/Amp	DB31		1
ST248	CKZ	erhalten von Laurent Deslandes	Ch/Amp	DB31		1
ST249	108 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST250	108 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST251	108 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST252	108 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST253	RAN1 (WT) in pB42AD	erhalten von Thomas Merkle	Amp	DH5a		1
ST254	RAN1 (GDP) in pB42AD	erhalten von Thomas Merkle	Amp	DH5a		1

ST255	RAN1 (GTP) in pB42AD	erhalten von Thomas Merkle	Amp	DH5a		1
ST256	RAN2 in pB42AD	erhalten von Thomas Merkle	Amp	DH5a		1
ST257	RAN3 in pB42AD	erhalten von Thomas Merkle	Amp	DH5a		1
ST258	pE-SYCE	erhalten von Klaus Harter	Ch/Amp	DB31		1
ST259	pE-SYNE	erhalten von Klaus Harter	Ch/Amp	DB31		1
ST260	108 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST261	Skp2.2 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST262	109 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST32 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST263	109 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST32 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST264	108 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST265	CYCB1;2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von CK351 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST266	152 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST33 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST267	N1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST268	N1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST269	N1 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST270	108 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von CK382 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST271	N2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST272	N2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST273	N2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST274	N2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST275	N2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST276	Skp2.2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST277	TM:YFP:109 in pDONR201	erhalten von Sebastian Marquardt	Kana	DH5a		1
ST278	N1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST279	N1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST280	N1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST281	N1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von N1 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST282	152 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST33 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST283	truncated CYCB1;2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von CK352 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST284	Skp2.2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST285	CKS1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST129 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST286	CKS1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST129 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST287	CKS1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST129 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST288	CKS1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST129 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST289	truncated CYCB1;2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von CK352 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST290	Skp2.2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST291	PCNA2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST292	PCNA2 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST293	E2FC in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST201 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST294	E2FC in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST201 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST295	DB-Mutant CYCB1;2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST210 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST296	N2 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST297	CKS2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST298	CKS2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST299	CKS2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST300	CKS2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST301	CKS2 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST133 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST302	N2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von N2 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST303	Skp2.2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST304	Skp2.2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST305	Skp2.2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST180 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST306	CDKA;1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST30 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST307	KRP1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST31 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST308	KRP1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST31 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST309	E2Fc in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST201 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST310	KRP2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST311	KRP2 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST312	ECFP+STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt mit PCR-Produkt	Kana	DH5a		1
ST313	KRP2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST314	KRP2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST315	KRP2 in pMet	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST316	KRP2 in Nul	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST317	KRP2 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST318	KRP2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST319	pTMM:TM:YFP:KRP1 in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST169 mit pTMM in pAM-PAT	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST320	Skp2.1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST199 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST321	PCNA2 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST200 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST322	KRP2 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt von ST310 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST323	Skp2.1+STOP in pENSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt von ST178 mit ST5	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST324	Skp2.2+STOP in pENSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt von ST179 mit ST5	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST326	CDKA;1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt von ST30 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST327	Skp2.1-STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt von ST199 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST328	pUBQ10:ECFP+STOP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt von ST312 mit ST197	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST329	TM:YFP in pDONR201	erhalten von Sebastian Marquardt (K8.1)	Kana	DH5a		1
ST330	Skp2.2-STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt von ST180 und ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST331	TM:YFP84:109 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P138; P139)	Kana	DH5a		1
ST332	KRP1 (NLS-Mut.) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (SP20; KRP1+STOP+AttB1(Christina))	Kana	DH5a		1
ST333	KRP1 (NLS-Mut.) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (SP20; SP21)	Kana	DH5a		1
ST339	KRP1 (NLS-Mut.) in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST340	KRP1 (NLS-Mut.) in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST341	KRP1 (NLS-Mut.) in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST342	KRP1 (NLS-Mut.) in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST343	KRP1 (NLS-Mut.) in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST344	KRP1 (NLS-Mut.) in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST345	KRP1 (NLS-Mut.) in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST350	TM:YFP:KRP in pDONR201	erstellt durch Klonierung eines EcoO109I/BshNI Schnittstückes aus ST329 in ST169	Kana	DH5a		1
ST351	Skp2.1-STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST199 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST352	Skp2.1-STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST199 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST353	Skp2.1-STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST199 mit ST73	Amp	DH5a		1

ST354	TM:YFP:KRP in pLeela	erstellt durch LR-Rkt. von ST350 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST355	TM:YFP:KRP in pGL2	erstellt durch LR-Rkt. von ST350 mit ST21	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST356	TM:YFP:KRP in pTMM	erstellt durch LR-Rkt. von ST350 mit ST118	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST357	YFP:DB in pLeela	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST358	RFP:DB in pLeela	erstellt durch LR-Rkt. von ST365 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST359	CFP:DB in pLeela	erstellt durch LR-Rkt. von ST366 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST360	pCYCB1;2:YFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST159	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST361	pCDKA;1:RFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST365 mit MN27 (Moritz)	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST362	pCDC6:CDC6:GFP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST154 mit ST240	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST363	pCDKA;1 in pAM-PAT	erhalten von Moritz Nowak (MN27)	Ch/Amp	DB31		1
ST364	YFP:DB in pDONR201	erhalten von Nico Dissmeier	Kana	DH5a		1
ST365	RFP:DB in pDONR201	erhalten von Nico Dissmeier	Kana	DH5a		1
ST366	CFP:DB in pDONR201	erhalten von Nico Dissmeier	Kana	DH5a		1
ST372	pH4:YFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST127	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST373	pUBQ10:YFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST197	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST374	pCDC6:YFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST240	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST375	pPCNA2:YFP:DB in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST198	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST376	Skp2.1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST199 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST377	CYCD3;1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST378	CYCD3;1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST379	CYCD3;1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST380	CYCD3;1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST381	CYCD3;1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST382	pCYCB1;1:YFP:DB in pAM-PAT	erhalten von Nico Dissmeier	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST383	RAN1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P112; P122) von ST253	Kana	DH5a		1
ST384	RAN1 (GDP) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P112; P122) von ST254	Kana	DH5a		1
ST385	RAN1 (GTP) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P112; P122) von ST255	Kana	DH5a		1
ST386	RAN2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P146; P147) von ST256	Kana	DH5a		1
ST387	RAN2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P146; P148) von ST256	Kana	DH5a		1
ST388	RAN3 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P146; P149) von ST257	Kana	DH5a		1
ST389	RAN3 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P146; P149) von ST257	Kana	DH5a		1
ST390	RAN1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST391	RAN1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST392	RAN1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST393	RAN1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST394	RAN1 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST395	RAN1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST396	RAN1 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST397	RAN1 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST383 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST398	RAN2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST399	RAN2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST400	RAN2 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST401	RAN2 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST402	RAN2 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST403	RAN2 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST404	RAN2 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST405	RAN3 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST406	RAN3 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST407	RAN3 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST408	RAN3 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST409	RAN3 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST410	RAN2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST387 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST411	RAN3 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST412	RAN3 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST413	p35S:GFP:CDC6	erstellt durch LR-Rkt. von ST154 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST414	pCDKA;1:GFP:Linker:PCNA2	erstellt durch LR-Rkt. von ST163 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST415	TM:YFP:152 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (J610/J693) von ST254	Kana	DH5a		1
ST416	pPCNA1 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt (P159/P160) in pGEM-T	Amp	DH5a		1
ST417	At1g25275 (A) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P109/P119) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST418	At5g02380 (B) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P111/P121) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST419	At1g10590 (D) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P114/P124) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST420	At1g78870 (E) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P115/P125) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST421	At4g21980 (F) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P116/P126) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST422	At1g62040 (G) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P117/P127) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST423	At4g33666 (H) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P118/P128) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST424	At2g30860 (I) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P110/P120) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST425	35S:TM:YFP:KRP1_1-152	erstellt durch LR-Rkt. von ST415 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST426	pCDKA;1:TM:YFP:KRP1_1-152	erstellt durch LR-Rkt. von ST415 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST427	At2g37200 (C) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P113/P123) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST429	CKS1 E61Q +STOP in	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P25/P26) von MJ769 (Marc Jakoby)	Kana	DH5a		1

	pDONR201					
ST430	CKS1 E61Q -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P25/P84) von MJ769 (Marc Jakoby)	Kana	DH5a		1
ST431	PCNA1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P162/P163) von cDNA	Kana	DH10b		1
ST432	GFP:Linker:PCNA1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit Fusionskonstrukt aus PCR-Produkt (P161/P163) mit GFP:Linker	Kana	DH10b		1
ST433	CDT1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P166/P168) von cDNA	Kana	DH10b		1
ST434	CDT1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P166/P167) von cDNA	Kana	DH5a		1
ST435	pPCNA1 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von Ascl / XhoI Schnittstück aus ST416 in pAM-PAT	Ch/Amp	DB31		1
ST436	pCDT1 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt (P157/P158) in pGEM-T	Amp	DH10b		1
ST437	A in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST438	B in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST439	D in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST440	E in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST441	F in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST442	G in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST443	H in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST444	A in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST445	B in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST446	C in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST447	D in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST448	E in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST449	F in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST450	G in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST451	A in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST452	B in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST453	C in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST454	D in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST455	E in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST456	F in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST457	G in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST458	H in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST459	A in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST460	B in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST461	C in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST462	D in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST463	E in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST464	F in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST465	G in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST466	H in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST467	pPCNA1:GFP:Linker:PCNA1	erstellt durch LR-Rkt. von ST432 mit ST435	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST468	pPCNA1:YFP:DB	erstellt durch LR-Rkt. von ST364 mit ST435	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST469	35S:GFP:Linker:PCNA1	erstellt durch LR-Rkt. von ST432 mit pLeela	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST470	C in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST471	H in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST472	pCDT1 in pAM-PAT	erstellt durch Ligation von Ascl / XhoI Schnittstück aus ST436 in pAM-PAT	Ch/Amp	DB31		1
ST473	A in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST474	B in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST475	C in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST476	D in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST477	E in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST478	F in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST479	G in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST480	H in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST481	CKS1 E61Q in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST482	CKS1 E61Q in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST483	CKS1 E61Q in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST484	CKS1 E61Q in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST489	RAN1 (GDP) in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST490	RAN1 (GDP) in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST491	RAN1 (GDP) in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST492	RAN1 (GDP) in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST493	RAN1 (GTP) in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST494	RAN1 (GTP) in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST495	RAN1 (GTP) in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST496	RAN1 (GTP) in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST497	PCNA1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P162/P164) von ST431	Kana	DH5a		1
ST498	A in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST499	B in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST500	C in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST501	D in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST502	E in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST503	F in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST504	G in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST505	H in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST246	Amp	DH5a		1

ST506	A in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST507	B in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST508	C in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST509	D in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST510	E in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST511	G in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST73	Amp	DH10b		1
ST512	H in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST73	Amp	DH10b		1
ST513	F in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST514	RAN1 (GDP) in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST515	RAN1 (GDP) in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST516	RAN1 (GDP) in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST517	RAN1 (GDP) in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST384 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST518	RAN1 (GTP) in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST519	RAN1 (GTP) in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST520	RAN1 (GTP) in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST521	RAN1 (GTP) in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST385 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST522	CKS1 E61Q in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST523	CKS1 E61Q in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST524	CKS1 E61Q in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST525	CKS1 E61Q in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST430 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST530	CDKA;1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST30 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST531	At1g51550 (III)	erhalten von RIKEN: pda13797, RAFL21-85-M15	Amp	DH5a		1
ST532	At5g42350 (III)	erhalten von RIKEN: pda05645, RAFL09-22-J19	Amp	DH5a		1
ST533	At5g67320 (IV)	erhalten von RIKEN: pda06454, RAFL09-50-H11	Amp	DH5a		1
ST534	A in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST417 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST535	B in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST418 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST536	C in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST427 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST537	D in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST419 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST538	F in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST421 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST539	G in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST422 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST540	I in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST424 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST541	I in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST424 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST542	I in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST424 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST543	I in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST424 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST544	I in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST424 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST545	I in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST242 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST546	I in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST242 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST547	I in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST242 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST548	E in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST420 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST549	H in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST423 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST550	CDKA;1 (T161V) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (ND10/SP22) von 66 (Nico Dissmeyer)	Kana	DH5a		1
ST551	CDKA;1 (DE) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (ND10/SP22) von 65 (Nico Dissmeyer)	Kana	DH5a		1
ST552	CDKA;1 (T161V) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST100	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST553	CDKA;1 (T161V) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST101	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST554	CDKA;1 (T161V) -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST246	Amp	DH10b		1
ST555	CDKA;1 (T161V) -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST247	Amp	DH10b		1
ST556	CDKA;1 (T161V) -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST248	Amp	DH10b		1
ST557	CDKA;1 (T161V) -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST73	Amp	DH10b		1
ST558	CDKA;1 (T161V) -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST72	Amp	DH10b		1
ST559	CDKA;1 (T161V) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST550 mit ST3	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST560	CDKA;1 (DE) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST100	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST561	CDKA;1 (DE) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST101	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST562	CDKA;1 (DE) -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST246	Amp	DH10b		1
ST563	CDKA;1 (DE) -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST247	Amp	DH10b		1
ST564	CDKA;1 (DE) -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST248	Amp	DH10b		1
ST565	CDKA;1 (DE) -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST73	Amp	DH10b		1
ST566	CDKA;1 (DE) -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST72	Amp	DH10b		1
ST567	CDKA;1 (DE) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST551 mit ST3	Amp	DH10b	GV3101 pMP90RK	1
ST568	III in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P153/P154) von ST532	Kana	DH5a		1
ST569	IV in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P155/P156) von ST533	Kana	DH5a		1
ST570	CDT1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST571	CDT1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST572	CDT1 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST573	CDT1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST574	CDT1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST575	CDT1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST576	CDT1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST577	CDT1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST433 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST578	CDKA;1 (T161D) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P182/SP22) von 64 (Nico Dissmeyer)	Kana	DH5a		1
ST579	CDKA;1 (T161V) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P182/SP22) von 66 (Nico Dissmeyer)	Kana	DH5a		1
ST580	CDKA;1 (DE) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P182/SP22) von 65 (Nico Dissmeyer)	Kana	DH5a		1
ST581	CDG6 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P63/P180) von ST154	Kana	DH5a		1
ST582	CDG6 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit PCR-Produkt (P63/P181) von ST154	Kana	DH5a		1
ST583	CDKA;1 (T161D) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST584	CDKA;1 (T161D) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST585	CDKA;1 (T161D) -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST586	CDKA;1 (T161D) -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST587	CDKA;1 (T161D) -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST248	Amp	DH5a		1

ST588	CDKA;1 (T161D) -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST589	CDKA;1 (T161D) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST578 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST590	CDC6 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST591	CDC6 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST592	CDC6 in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST593	CDC6 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST594	CDC6 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST595	CDC6 in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST596	CDC6 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST597	CDC6 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST582 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST601	III in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST602	III in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST603	III in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST604	III in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST605	III in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST606	III in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST607	IV in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST608	IV in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST614	CDKA;1 (VF) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P182/SP22) von N76(Nico Dissmeyer) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST615	CCSB -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (F173/F174) von MJ732 (Marc Jakoby) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST620	CDKA;1 (VF) in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST621	CDKA;1 (VF) in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST622	CDKA;1 (VF) in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST623	CDKA;1 (VF) in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST624	CDKA;1 (VF) in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST625	CDKA;1 (VF) in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST626	CDKA;1 (VF) in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST627	CDKA;1 (VF) in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST614 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST628	III in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST629	III in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST568 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST630	IV in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST631	IV in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST632	IV in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST633	IV in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST634	IV in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST569 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST635	PCNA1 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST636	PCNA1 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST637	PCNA1 in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST638	PCNA1 in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST639	PCNA1 in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST640	PCNA1 in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST641	PCNA1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST642	CCSB in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST643	CCSB in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST644	CCSB in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST645	CCSB in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST646	CCSB in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST647	CCSB in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST648	CCSB in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST649	CCSB in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST656	K (At5g04040)	erhalten von RIKEN: pda09937; RAFL09-82-D01	Amp	DH5a		1
ST657	L (At5g02500)	erhalten von RIKEN: pda05826; RAFL09-31-B01	Amp	DH5a		1
ST658	M (At4g30270)	erhalten von RIKEN: pda00542; RAFL04-09-O24	Amp	DH5a		1
ST659	N (At5g45510)	erhalten von RIKEN: pda05449; RAFL09-14-G24	Amp	DH5a		1
ST660	O (At4g14320)	erhalten von RIKEN: pda02989; RAFL06-10-J18	Amp	DH5a		1
ST661	P (At2g37560)	erhalten von RIKEN: pda12367; RAFL09-74-N08	Amp	DH5a		1
ST669	II -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P213/P152) von ST531 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST670	CDKB1;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P214/P215) von BH01 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST671	CDKB1;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P214/P216) von BH01 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST672	CDKB1;2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P217/P218) von BH02 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST673	CDKB1;2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P217/P219) von BH02 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST674	CDKB2;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P220/P221) von BH03 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST675	CDKB2;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P220/P222) von BH03 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST676	CDKB2;2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P223/P224) von BH04 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST677	CDKB2;2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P223/P225) von BH04 (Björn Heidt) in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST678	M +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P204/P205) von ST658 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST679	P +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P185/P187) von ST661 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST680	P -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P185/P186) von ST661 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST681	T1B9	Bac erhalten von ABRC; GSL10, At3g07160, T1B9_18	Chloramph.	DH10b		1
ST683	U19065	pJUN151 mit cDNA erhalten von ABRC; CCSA2, At4g11920	Kana	PIR1		1
ST684	U24687	pJUN151 mit cDNA erhalten von ABRC; CCSA1, At4g22910	Kana	PIR1		1
ST685	CDKB2;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST686	CDKB2;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST687	CDKB2;1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST688	CDKB2;1 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST689	CDKB2;1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST690	CDKB2;1 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST691	CDKB2;1 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST72	Amp	DH5a		1

ST692	CDKB2;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST675 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST693	P -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST694	P -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST695	P -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST696	P -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST697	P -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST698	P -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST699	P -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST700	P -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST680 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST701	II in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST702	II in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST703	II in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST704	II in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST705	II in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST706	II in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST707	CDKB1;2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST708	CDKB1;2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST709	CDKB2;2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST710	CDKB2;2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST711	M -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P204/P206) von ST658 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST712	O +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P210/P211) von ST660 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST713	O -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P210/P212) von ST660 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST714	O -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST715	O -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST716	O -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST717	O -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST718	O -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST719	O -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST720	O -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST721	O -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST713 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST722	L +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P201/P202) von ST657 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST723	L -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P201/P203) von ST657 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST724	N +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P207/P208) von ST659 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST725	N -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P207/P209) von ST659 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST726	CDKB1;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST727	CDKB1;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST728	CDKB1;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST729	CDKB1;2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST730	CDKB2;2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST731	II in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST732	II in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST669 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST733	PCNA1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST497 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST734	L -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST735	L -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST736	L -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST737	L -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST738	L -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST739	L -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST740	L -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST741	L -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST723 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST742	K -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P200) von ST656 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST743	CCSA2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (F169/F170) von ST683 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST744	M -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST745	M -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST746	M -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST747	M -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST748	M -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST749	M -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST750	M -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST751	M -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST711 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST752	K +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P199) von ST656 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST753	CCSA1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (F171/F172) von ST684 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST754	K -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST755	K -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST756	K -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST757	K -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST758	K -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST759	K -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST760	K -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST761	K -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST742 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST762	CCSA2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST763	CCSA2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST764	CCSA2 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST765	CCSA2 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST766	CCSA2 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST767	CCSA2 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST768	CCSA2 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST769	CCSA2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101	1

	YFP				pMP90RK
ST770	N -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST100	Amp	DH5a	1
ST771	N -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST772	N -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST773	N -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST774	N -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST101	Amp	DH5a	1
ST775	N -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST776	GSL10 (YS) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P243/P240) von ST681 in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST777	CCSA1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST778	CCSA1 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST779	CCSA1 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST72	Amp	DH5a	1
ST780	CDKB1;1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST781	CDKB1;2 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST72	Amp	DH5a	1
ST782	CDKB2;2 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST783	CDKB2;2 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST784	CDKB2;2 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST785	CDKB2;2 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST72	Amp	DH5a	1
ST786	CCSA1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST100	Amp	DH5a	1
ST787	CCSA1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST101	Amp	DH5a	1
ST788	CCSA1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST789	CDKB1;1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST790	CDKB1;1 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST791	CDKB1;1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST792	CDKB1;1 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST671 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST793	CDKB1;2 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST794	CDKB1;2 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST795	CDKB1;2 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST796	CDKB2;2 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST677 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST797	N -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST798	CCSA1 -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST799	GSL10 (YS) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST776 mit ST100	Amp	DH5a	1
ST800	GSL10 (YS) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST776 mit ST101	Amp	DH5a	1
ST801	GSL10 (YS) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST776 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST802	PCNA2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST200 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST803	CDKB1;2 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST673 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST804	N -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST725 mit ST72	Amp	DH5a	1
ST805	CCSA1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST806	RAN1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P122/P244) von ST391 in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST807	RAN1 (GDP) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P122/P244) von ST489 in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST808	RAN1 (GTP) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P122/P244) von ST493 in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST809	KRP1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST31 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST810	108 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CK382 (Christina Weini) mit ST3	Kana	DH5a	1
ST811	109 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST32 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST812	152 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST33 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST813	CKS1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST129 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST814	CKS2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST133 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST815	CYCD3;1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST75 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST816	CYCB1;2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CK351 (Christina Weini) mit ST3	Kana	DH5a	1
ST817	truncated CYCB1;2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CK352 (Christina Weini) mit ST3	Kana	DH5a	1
ST818	N1 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von N1 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST819	N2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von N2 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST820	E2Fc in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST202 mit ST3	Kana	DH5a	1
ST821	CYCB1;2 (I60R) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P195/P196) von Template ? (Farshad) in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST822	CYCB1;2 (I60R) -STOP in pDONR201	erstellt durch Ligation von PfoI / XhoI Schnittstück aus Template ? (Farshad) in CK351 (Weini)	Kana	DH5a	1
ST827	KRP2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST310 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST828	DB-Mut. -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST210 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST829	KRP1 (NLS-Mut.) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST333 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST830	CCSA1 -STOP in pEXSG-CFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST9	Amp	DH5a	1
ST831	RAN3 -STOP in pENSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST389 mit ST5	Amp	DH5a	1
ST832	CYCB1;2 (I60R) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST100	Amp	DH5a	1
ST833	CYCB1;2 (I60R) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST101	Amp	DH5a	1
ST834	CYCB1;2 (I60R) -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST246	Amp	DH5a	1
ST835	CYCB1;2 (I60R) -STOP in Nul	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST247	Amp	DH5a	1
ST836	CYCB1;2 (I60R) -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST248	Amp	DH5a	1
ST837	CYCB1;2 (I60R) -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST72	Amp	DH5a	1
ST838	CYCB1;2 (I60R) -STOP in pEXSG YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST3	Amp	DH5a	1
ST839	CYCB1;2 (I60R) -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST822 mit ST73	Amp	DH5a	1
ST840	CYCD3;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (SP27/P251) von Template ST815 in pDONR201	Kana	DH5a	1
ST841	GFP/Linker in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt (P97/P93) in pGEM-T	Amp	DH5a	1

ST842	CYCD3;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST843	CYCD3;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST844	CYCD3;1 -STOP in pMet	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST246	Amp	DH5a		1
ST845	CYCD3;1 -STOP in NuI	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST247	Amp	DH5a		1
ST846	CYCD3;1 -STOP in CKZ	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST248	Amp	DH5a		1
ST847	CYCD3;1 -STOP in NuA	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST73	Amp	DH5a		1
ST848	CYCD3;1 -STOP in CKZ-A	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST72	Amp	DH5a		1
ST849	CYCD3;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST840 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST850	SDP1 (DP) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P259/P258) von Template ST656 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST851	CYCB1;2 (DB/160R/O67T) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P195/P196) von Template Farshad in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST852	CYCB1;2 (DB/160R/O67T) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P195/P197) von Template Farshad in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST853	CYCB1;2 (DB/160R/O67T) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST852 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST854	CYCB1;2 (DB/160R/O67T) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST852 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST855	CYCB1;2 (DB/160R/O67T) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST852 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST856	Linker:CDT1 in pGEM-T	erstellt durch Ligation von PCR-Produkt (P165/P167) in pGEM-T	Amp	DH5a		1
ST857	pCDKA;1 : SDP1 (DP) +STOP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST850 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST858	SDP1 (2D) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P256/P257) von Template ST850 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST859	SDP1 (DP) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P259/P258) von Template ST656 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST860	pCDKA;1 : SDP1 (2D) +STOP in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST858 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST861	CYCB1;2 (160R/O67T) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P195/P196) von Template Farshad in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST862	CYCB1;2 (160R/O67T) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P195/P197) von Template Farshad in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST863	pBatTL-B-mRFP	erhalten von Bastian (AG Hülkamp)	Spec	DB31		1
ST864	CCSA1 in pBatTL-B-mRFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST753 mit ST863	Spec	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST865	CCSA2 in pBatTL-B-mRFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST743 mit ST863	Spec	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST866	CCSB in pBatTL-B-mRFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST615 mit ST863	Spec	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST867	CDKA;1 in pBatTL-B-mRFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST30 mit ST863	Spec	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST868	SDP1 (DP) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST869	SDP1 (DP) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST870	SDP1 (DP) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST871	CYCB1;2 (160R/O67T) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST872	CYCB1;2 (160R/O67T) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST873	CYCB1;2 (160R/O67T) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST859 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST874	DXR in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U11011	Kana	DH5a		1
ST875	GAPC-2 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U13226	Kana	DH5a		1
ST876	GPX2 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U14040	Kana	DH5a		1
ST877	GSTF2 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U09076	Kana	DH5a		1
ST878	GSTF9 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U12400	Kana	DH5a		1
ST879	LOX1 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U17760	Kana	DH5a		1
ST880	LTPa in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U83415	Kana	DH5a		1
ST881	LTPb in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U82063	Kana	DH5a		1
ST882	MQK4.26 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U10383	Kana	DH5a		1
ST883	MT2A in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U12739	Kana	DH5a		1
ST884	MXI10.13 in pUNI52	erhalten von ABRC Clone U09101	Kana	DH5a		1
ST885	GFP-Linker:CDT1 in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. mit Ligation von PCR-Fragmenten (J610/P93;ST841) und (P165/J611;ST856)	Kana	DH5a		1
ST886	DXR +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P268/P269) von Template ST874 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST887	DXR -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P268/P270) von Template ST874 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST888	GAPC-2 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P271/P272) von Template ST875 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST889	GAPC-2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P271/P273) von Template ST875 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST890	GPX2 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P274/P275) von Template ST876 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST891	GPX2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P274/P276) von Template ST876 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST892	GSTF2 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P277/P278) von Template ST877 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST893	GSTF2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P277/P279) von Template ST877 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST894	GSTF9 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P280/P281) von Template ST878 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST895	GSTF9 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P280/P282) von Template ST878 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST896	LTPb +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P291/P292) von Template ST881 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST897	LTPb -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P291/P293) von Template ST881 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST898	MQK4.26 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P294/P295) von Template ST882 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST899	MQK4.26 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P294/P296) von Template ST882 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST900	MT2A +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P297/P298) von Template ST883 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST901	MT2A -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P297/P298) von Template ST883 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST902	pCDKA;1:SDP1 in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST752 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST903	p35S:GFP-Linker:CDT1	erstellt durch LR-Rkt. von ST885 mit pLEELA	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST904	pCDT1:GFP-Linker:CDT1 in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST885 mit ST436	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST905	MXI10.13 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P300/P302) von Template ST884 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST906	DXR in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST887 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101	1

ST907	DXR in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST887 mit ST101	Amp	DH5a	pMP90RK GV3101 pMP90RK	1
ST908	DXR in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST887 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST909	GAPC-2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST889 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST910	GAPC-2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST889 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST911	GAPC-2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST889 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST912	GPX2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST891 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST913	GPX2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST891 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST914	GPX2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST891 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST915	GSTF2 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST893 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST916	GSTF2 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST893 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST917	GSTF2 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST893 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST918	GSTF9 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST895 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST919	GSTF9 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST895 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST920	GSTF9 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST895 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST921	WEE1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P303/P304) von Template CK113 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST922	LTPb in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST897 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST923	LTPb in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST897 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST924	LTPb in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST897 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST925	MQK4.26 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST899 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST926	MQK4.26 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST899 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST927	MQK4.26 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST899 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST928	MT2A in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST901 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST929	MT2A in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST901 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST930	MT2A in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST901 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST931	MXI10.13 in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST905 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST932	MXI10.13 in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST905 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST933	MXI10.13 in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST905 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST934	WEE1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P303/P305) von Template CK113 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST935	WEE1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST934 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST936	WEE1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST934 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST937	WEE1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST934 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST938	LOX1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P283/P285) von Template ST879 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST939	MXI10.13 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P300/P303) von Template ST884 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST940	LOX1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P283/P284) von Template ST879 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST941	LOX1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST938 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST942	LOX1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST938 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST943	LOX1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST938 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST944	LTPa -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P288/P290) von cDNA (Root) von Jakoby in pDONR201	Amp	DH5a		1
ST945	LTPa -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST944 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST946	LTPa -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST944 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST947	LTPa -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST944 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST948	LTPa +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P288/P289) von cDNA (Root) von Jakoby in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST949	AJH1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von CS2 (Cathrine Schalck) mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST950	AJH1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von CS2 (Cathrine Schalck) mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST953	CDKD;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von CS4 (Cathrine Schalck) mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST954	CDKD;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von CS4 (Cathrine Schalck) mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST957	CDKD;2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von CS6 (Cathrine Schalck) mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST958	CDKD;2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von CS6 (Cathrine Schalck) mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST961	CDKD;3 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von CS8 (Cathrine Schalck) mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST962	CDKD;3 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von CS8 (Cathrine Schalck) mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST973	AJH1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CS2 (Cathrine Schalck) mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST974	CDKD;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CS4 (Cathrine Schalck) mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST975	CDKD;2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CS6 (Cathrine Schalck) mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST976	CDKD;3 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von CS8 (Cathrine Schalck) mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST977	SDP1 (DPRK) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P257 und P256/P200) von ST656 in pDONR201	Kana	DH5a		1

ST978	SDP1 (DPRK) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST977 mit ST100	Amp	DH5a		1
ST979	SDP1 (DPRK) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST977 mit ST101	Amp	DH5a		1
ST980	SDP1 (DPRK) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST977 mit ST3	Amp	DH5a		1
ST981	SDP1 (2D) -STOP in pDONR201	erstellt durch Ligation von Schnittstück (NdeI/PstI) aus ST859 in ST858	Kana	DH5a		1
ST982	SDP1 (2D) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST981 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST983	SDP1 (2D) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST981 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST984	SDP1 (2D) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST981 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST985	SDP1 (APRK) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P325 und P324/P200) von ST742 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST986	SDP1 (AP) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P327 und P326/P199) von ST752 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST987	CDKF;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P318/P319) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST988	CDKF;1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P318/P320) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST989	Histone H1.1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P333/P335) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST990	Histone H1.2 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P336/P338) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST993	CDKA;1 (D146N) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P182/SP22) von Klon Nico in pDONR203	Kana	DH5a		1
ST998	CDKA;1 (Pstd) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P182/SP22) von Klon Nico in pDONR208	Kana	DH5a		1
ST1000	CDKF;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST987 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1001	CDKF;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST987 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1002	CDKF;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST987 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1003	SDP1 (APRK) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P325 und P324/P199) von ST742 in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1004	Histone H1.1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST989 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1005	Histone H1.1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST989 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1006	Histone H1.2 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST990 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1007	Histone H1.2 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST990 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1008	Histone H1.2 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST990 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1009	CDKA;1 (Pstd) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST998 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1010	CDKA;1 (Pstd) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST998 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1011	CDKA;1 (D146N) -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST993 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1012	CDKA;1 (D146N) -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST993 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1013	Histone H1.1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P333/P334) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1014	Histone H1.2 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P336/P337) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1015	CYCH;1 -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P330/P332) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1016	Histone H1.1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST989 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1017	CDKA;1 (Pstd) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST998 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1018	CDKA;1 (D146N) -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST993 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1019	CYCH;1 +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P330/P331) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1020	CYCH;1 -STOP in pSYC	erstellt durch LR-Rkt. von ST1015 mit ST100	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1021	CYCH;1 -STOP in pSYN	erstellt durch LR-Rkt. von ST1015 mit ST101	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1022	CYCH;1 -STOP in pEXSG-YFP	erstellt durch LR-Rkt. von ST1015 mit ST3	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1023	CDKB1;2 +STOP (Nico) in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P217/P339) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1024	CDKB1;2 -STOP (Nico) in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P217/P340) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1025	CDKB2;1 +STOP (Nico) in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P220/P221) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1026	pCDKA;1:SDP1 (AP) in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST986 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1027	pCDKA;1:SDP1 (APRK) in pAM-PAT	erstellt durch LR-Rkt. von ST1003 mit ST363	Amp	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1028	CDKB2;1 (Nico) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P220/P222) von cDNA in pDONR201	Kana	DH5a		1
ST1029	SDP1 (DPRK) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P257 und P256/P199) von ST977 in pDONR201	Kana	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1030	SDP1 (AP) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P327 und P326/P200) von ST656 in pDONR201	Kana	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1031	SDP1 (2AP) +STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P327 und P326/P199) von ST1003 in pDONR201	Kana	DH5a	GV3101 pMP90RK	1
ST1032	SDP1 (2AP) -STOP in pDONR201	erstellt durch BP-Rkt. von PCR-Produkt (P198/P325 und P324/P200) von ST986 in pDONR201	Kana	DH5a	GV3101 pMP90RK	1

Tabelle C: Pflanzenlinien

Nr.	Konstrukt	Linie / Okotyp	Generation
ST149	pH4:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T2
ST156	pCYCB1;4:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T3
ST160	pCYCB1;2:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T2
ST165	TM:YFP:109 in pGL2 pAM-PAT	col-0	T2
ST166	TM:YFP:109 in pTMM pAM-PAT	col-0	T2
ST175	TM:YFP:KRP1 in pGL2 pAM-PAT	col-0	T2
ST207	pPCNA2:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T2
ST208	pUBQ10:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T2
ST229	pPCNA2:GFP:Linker:PCNA2 in pAM-PAT	col-0	T3
ST243	pCDC6:DB:GUS:RFP in pAM-PAT	col-0	T2
ST319	pTMM:TM:YFP:KRP1 in pAM-PAT	col-0	T2
ST328	pUBQ10:ECFP+STOP in pAM-PAT	col-0	T3
ST355	TM:YFP:KRP in pGL2	col-0	T2
ST356	TM:YFP:KRP in pTMM	col-0	T2
ST361	pCDKA;1:RFP:DB in pAM-PAT	col-0	T3
ST362	pCDC6:CDC6:GFP in pAM-PAT	col-0	T3
ST372	pH4:YFP:DB in pAM-PAT	col-0	T2
ST373	pUBQ10:YFP:DB in pAM-PAT	col-0	T2
ST374	pCDC6:YFP:DB in pAM-PAT	col-0	T2
ST375	pPCNA2:YFP:DB in pAM-PAT	col-0	T2
ST414	pCDKA;1:GFP:Linker:PCNA2	col-0	T3
ST426	pCDKA;1:TM:YFP:KRP1 1-152	col-0	T3
ST467	pPCNA1:GFP:Linker:PCNA1	col-0	T3
ST468	pPCNA1:YFP:DB	col-0	T3
ST857	pCDKA;1 :SDP1 (DP) +STOP in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST860	pCDKA;1 :SDP1 (2D) +STOP in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST902	pCDKA;1:SDP1 in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST904	pCDT1:GFP:Linker:CDT1 in pAM-PAT	col-0	T2
ST1026	pCDKA;1:SDP1 (AP) in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST1027	pCDKA;1:SDP1 (APRK) in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST1033	pCDKA;1:SDP1 (DPRK) in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2
ST1034	pCDKA;1:SDP1 (2AP) in pAM-PAT	sdp1 / col-0	T2

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 Priv.-Doz. Dr. Arp Schnittger betreut worden.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert als:

Dissmeyer N, Nowack MK, Pusch S, Stals H, Inzé D, Grini PE, Schnittger A.

T-loop phosphorylation of Arabidopsis CDKA;1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue.

Plant Cell. 2007 Mar;19(3):972-85. Epub 2007 Mar 16.

Jakoby MJ, Weinl C, Pusch S, Kuijt SJ, Merkle T, Dissmeyer N, Schnittger A.

Analysis of the subcellular localization, function, and proteolytic control of the Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1.

Plant Physiol. 2006 Aug;141(4):1293-305. Epub 2006 Jun 9.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan René Pusch
geboren am: 12.05.1979 in Karlsruhe
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

Ausbildung

- Ab 01.03.05 Promotionsarbeit bei Priv.-Doz. Dr. A. Schnittger, Köln
- Thema der Doktorarbeit: Interaktionsanalyse von CDKA;1 und anderer Zellzyklusregulatoren aus *Arabidopsis thaliana*
- Tag der mündlichen Prüfung 17.11.08
- 12.10.2004 Diplom in Biologie, Köln
- Thema der Diplomarbeit: Identifikation von Interaktoren von CDKA;1 und KRP1 aus *Arabidopsis thaliana*
- 15.10.99-12.10.04 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
- Studienziel: Diplom Biologie
 - Studienschwerpunkte: Botanik, Biochemie und organische Chemie
- 01.07.98-31.07.99 Zivildienst Behinderten Werkstätte Bürrig, Leverkusen
- Bereich Garten- und Landschaftsbau
- 1989 - 1998 Werner-Heisenberg-Schule, Leverkusen
- Abschluss mit Abitur
- 1985-1989 Städtische Gemeinschaftsgrundschule, Leverkusen

Ergänzende freiwillige Praktika

- 20.01.-14.02.03 Praktikum in der Arbeitsgruppe Marner
Institut für Biochemie der Universität zu Köln
- Metaboliten Analyse von *Corynebacterium glutamicum*
- 16.09.-11.10.02 Praktikum in der Arbeitsgruppe Bothe
Lehrstuhl für Botanik II der Universität zu Köln
- Genotypisierung von Mykorrhizasporen in unterschiedlichen Bodenproben
 - Stoffwechsel Analyse von Cyanobakterien
 - Expressionsanalyse des Nitratreduktasegens von *Glomus intraradices* mittels quantitativer RT-PCR

Weitere Fähigkeiten

Fremdsprachen: Sehr gute Englisch-Kenntnisse (in Wort und Schrift)
Schul-Französisch

PC/Software: Geübt im Umgang mit
diversen Standard-Anwendungen (z.B. Microsoft Word, Excel, Powerpoint; Adobe Photoshop, etc.)
Betriebssystemen (Microsoft Windows 2000, XP und Vista)
Biologisch relevante Anwendungen (z.B. Vektor-NTI, EndNote, Leica Confocal Software)
Internetrecherche (Genvestigator, eFP-Browser, BLAST, u.a.)
sowie gute Hardware-Kenntnisse.

Lehrgänge: Ersthelfer (zuletzt 08/2007)
Evakuierungshelfer (zuletzt 05/2008)

Personalverantwortliche Tätigkeiten

Diplomanden: 2 Diplomarbeiten (03/2006-03/2007 und 05/2007-05/2008)

Praktikanten: 2 Berufspraktika (01-02/2006 und 2007) von BTA-Schülern
der Rheinischen Akademie Köln gGmbH
6 studentische Praktika (2003-2008) je 4 Wochen

Lehrveranstaltungen: 3 Kurse in Pflanzen-Systematik und -Anatomie
2 Kurse in Pflanzen-Physiologie
1 Kurs Zellzyklus

Nebentätigkeiten

01.11.-30.11.01 Werksstudent SCHWARZ PHARMA Deutschland
GmbH, Abteilung Customer Care

22.10.-31.10.01 Werkstudent Hoyer-Madaus GmbH & Co. KG,
Projekt „Produkteinführung“

14.08.-06.10.00 Werksstudent Bayer AG, Bereich Informatik

14.02.-24.03.00 Werksstudent Bayer AG, Bereich Informatik

01.08.-30.09.99 Werksstudent Bayer AG, Bereich Informatik

Freizeit

Kochen, Tanzen (Standard und Latein), Volleyball