

Untersuchung der TALE-Homöodomänen-Proteine in
Arabidopsis thaliana:

Identifizierung und Charakterisierung von
Komponenten des TALE-Interaktions-Netzwerkes

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jana Hackbusch
aus Westerstede

Bonn 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Schreier

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juli 2004

„Die unerhörte Kompliziertheit der Wirklichkeit anzuerkennen,
ist für mich eine Sache des Respekts vor der Wirklichkeit,
eines Respekts, der sich zum Staunen steigert.“

Karel Capek

1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen von Entwicklungs-Prozessen	1
1.2. Die TALE-Superfamilie der Homöobox-Gene	3
1.3. Funktion der TALE-Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.4. Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Material	9
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	9
2.1.2. Organismen	9
2.1.2.1. Bakterien	9
2.1.2.2. Hefen	9
2.1.2.3. Pflanzen	10
2.1.3. Vektoren und cDNA-Banken	10
2.1.3.1. <i>E. coli</i> -Vektoren	10
2.1.3.2. Hefe-Vektoren	10
2.1.3.3. Pflanzen-Vektoren	11
2.1.3.4. cDNA-Bibliotheken für das Hefe-zwei-Hybrid-System	11
2.1.4. Klonierung der Vektoren	11
2.1.4.1. Vektoren zur Verwendung im Hefe-zwei-Hybrid-System	11
2.1.4.2. Vektoren für die Herstellung von Überexpressions-Pflanzen	12
2.1.4.3. Vektoren für die transiente Expression von GFP- und RFP- Fusionsproteinen	13
2.1.5. Lösungen und Nährmedien	13
2.1.5.1. Hefemedien	13
2.1.5.2. Pflanzenmedien	13
2.1.6. Oligonukleotide	14
2.1.7. Mikroskope	14
2.1.8. Software und Datenbanken	14
2.2. Methoden	15
2.2.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren	15
2.2.1.1. Präparation von Nukleinsäuren	15
2.2.1.2. Rekombinante DNA-Techniken	15
2.2.1.3. Amplifikation mit der Polymerase-Ketten-Reaktion	16
2.2.1.4. RT-PCR-Analyse	16
2.2.1.5. Analyse der DNA der Pflanzen-Mutanten	16
2.2.1.6. DNA-Sequenzierungen	17
2.2.2. Arbeiten mit Agrobakterien	17
2.2.2.1. Herstellung und Transformation elektrokompetenter Agrobakterien ..	17
2.2.2.2. Anzucht von Agrobakterien in Flüssigmedium	17
2.2.3. Arbeiten mit Hefen	18
2.2.3.1. Das Hefe-zwei-Hybrid-System	18
2.2.3.2. Kultivierung von Hefen	19

2.2.3.3. Transformation von Hefen.....	19
2.2.3.4. Screenen von cDNA-Bibliotheken im großen Maßstab	19
2.2.3.5. PCR auf Hefen	20
2.2.3.6. Beta-Galaktosidase-Filtertest	20
2.2.3.7. <i>In vivo</i> -Rekombination in Hefen	20
2.2.4. Arbeiten mit Tabak	21
2.2.4.1. Sterilkultur von Tabak	21
2.2.4.2. Transformation von Tabak.....	21
2.2.4.3. Transiente Expression von Proteinen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
2.2.5. Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.2.5.1. Oberflächen-Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen	22
2.2.5.2. Anzucht und Selektion von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	22
2.2.5.3. Transformation von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	22
2.2.5.4. Besprühen von Pflanzen mit Gibberellinsäure.....	22
2.2.6. Analyse des Hefe-Protein-Protein-Interaktions-Netzwerkes	22
2.3. Abkürzungsverzeichnis.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Die TALE-Superfamilie in <i>A. thaliana</i>	25
3.2. Analyse von Mutanten der BEL-Gene	28
3.2.1. Analyse von Mangelmutanten der BEL-Gene.....	28
3.2.1.1. Untersuchung von Insertionslinien.....	29
3.2.1.2. Herstellung und Untersuchung von Mangelmutanten mittels interferierender RNA	31
3.2.2. Analyse der Überexpression der BEL-Gene	33
3.3. Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen der TALE-Proteine mittels des Hefe-zwei-Hybrid-Systems	36
3.3.1. Klonierung der TALE-Konstrukte und Test auf deren Verwendbarkeit im Hefe-zwei-Hybrid-System.....	37
3.3.2. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der TALE-Superfamilie	38
3.3.3. Kartierung der Interaktions-Domänen	40
3.3.3.1. Konstruktion von Hefe-zwei-Hybrid-Vektoren für die unidirektionale Deletion von beliebigen Genen.....	40
3.3.3.2. Kartierung der für die BEL-BEL-Interaktion verantwortlichen Domäne	42
3.3.4. Hefe-zwei-Hybrid-Screens zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der TALE-Proteine.....	42
3.4. Sequenzanalyse von At5g01840 – Die AtOFP-Familie	46
3.5. Kartierung der Interaktions-Domänen von AtOFP1 und den TALE-Proteinen ..	47
3.6. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Mitgliedern der TALE-Superfamilie und Mitgliedern der AtOFP-Familie	49
3.7. Analyse des erhaltenen Interaktions-Netzwerkes	51

3.8. Untersuchung des Expressionsmusters der TALE-Gene.....	55
3.9. Untersuchung des Expressionsmusters der AtOFP-Gene	56
3.10. Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der TALE-Proteine und AtOFPs ..	57
3.11. Charakterisierung von <i>AtOFPI</i> -Mutanten.....	62
3.12. Heterologe Überexpression von <i>AtOFPI</i> in <i>Nicotiana tabacum</i>	66
3.13. Einfluss der <i>AtOFPI</i> -Überexpression auf die Expression von <i>AtGA20ox1</i>	68
4. Diskussion	70
4.1. Redundanz und Spezifität	70
4.2. Das TALE-Interaktions-Netzwerk	74
4.3. AtOFPs regulieren die intrazelluläre Lokalisation der TALE-Proteine	80
Zusammenfassung	84
Abstract	85
Literaturverzeichnis	86
Anhang	96
A1. Unbestätigte Interaktions-Kandidaten aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screens	96
A2. Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	96
Danksagung.....	100

1. Einleitung

1.1. Grundlagen von Entwicklungs-Prozessen

Der Vielfalt der Erscheinungsformen mehrzelliger Organismen, die sich im Laufe der Evolutionsgeschichte entwickelt hat, liegen einige wenige Kontroll-Mechanismen zugrunde, die wiederholt in verschiedenen Kombinationen eingesetzt werden. Sowohl in der frühen Embryonalentwicklung als auch bei der erst später einsetzenden Differenzierung von Organen wird das Prinzip der sequentiellen Induktion angewandt. Hierbei löst ein durch differentielle Genexpression ausgebildetes Muster in dem sich entwickelnden Gebilde eine Reihe von lokal unterschiedlichen Expressions-Programmen aus, die wiederum für die Verfeinerung des Gesamtmusters sorgen. Die am Ende erscheinende Struktur differenzierter Zellen ist also das Ergebnis eines hierarchischen Zellspezialisierungs-Programms, das von den sich ändernden Mustern der Expression genregulierender Proteine, die in einer Kaskade agieren, ausgeführt wurde.

Während in der tierischen Entwicklung der gesamte Grundbauplan des späteren Organismus bereits im Embryo angelegt wird, zeichnet sich die Entwicklung der Pflanzen durch eine größere Flexibilität aus. Im Pflanzenembryo wird lediglich die Polarität durch die Ausbildung eines Spross- und eines Wurzelapikalmeristems bestimmt, und die Entstehung von Organen findet postembryonal durch die Aktivität dieser Meristeme statt. Dies gewährleistet eine Anpassungsfähigkeit an die jeweiligen Umweltbedingungen des Standortes der Pflanze. Auch der Pflanzenkörper ist jedoch aus sich wiederholenden Modulen aufgebaut, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an verschiedenen Positionen erzeugt werden können. Solche, auch als Phytomere bezeichneten Abschnitte, bestehen für den oberirdischen Teil der Pflanze aus einem Internodium, einem damit verbundenen Blatt und dessen achselständiger Knospe, die zu einem Seitenspross auswachsen kann. Die innere Organisation eines solchen Moduls wird mit den gleichen Mechanismen der hierarchischen Expressionsregulierung erzeugt, wie es bei tierischen Entwicklungsvorgängen der Fall ist.

Die an diesen Prozessen beteiligten Transkriptions-Faktoren gehören einigen wenigen Protein-Gruppen an, die in allen mehrzelligen Lebewesen konserviert sind. Eine der Gruppen, die bei den Musterbildungs-Prozessen eine hierarchisch hohe Stelle in der Kaskade einnimmt, wird durch die Gruppe der Homöobox-Gene kodiert.

Erste Mitglieder dieser Multi-Genfamilie wurden im Zusammenhang mit homöotischen Mutationen, bei denen es zu einer Ausprägung einer Körperstruktur an einer nicht dafür vorgesehenen Position kommt, in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (McGinnis *et al.*, 1984). Später wurden Homöobox-Gene auch in allen weiteren daraufhin untersuchten Eukaryonten gefunden. Die Mitglieder dieser Multi-Genfamilie sind durch

die 180 Basenpaare lange Homöobox charakterisiert, welche die DNA-bindende Homöodomäne kodiert.

Diese verfügt nur über eine sehr geringe DNA-Bindungs-Spezifität (Kalionis & O'Farrell, 1993; Shang *et al.*, 1994). Die spezifischen Funktionen, die die Homöodomänen-Proteine in Entwicklungs-Prozessen ausüben, werden durch die Einbindung dieser Proteine in die Interaktions-Netzwerke der Zelle erzielt.

Dies umfasst zum einen die zeitlich und räumlich kontrollierte Expression durch andere Transkriptionsfaktoren (höher gestellt in einer Signal-Kaskade) sowie den regulatorischen Einfluss auf Zielgene (weiter abwärts in der Kaskade). Zum anderen ist die Lokalisation aller Proteine in der Zelle im zeitlichen Verlauf kontrolliert. Für beide Aspekte spielen Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle. Bindungspartner sind in ihrer Verfügbarkeit durch genetische Regulations-Mechanismen kontrolliert und können als Teil eines Proteinkomplexes die Spezifität in Hinblick auf die Zielgene verändern. Außerdem können Protein-Interaktionen die Position der Proteine in der kompartimentierten Zelle oder auch im ganzen Zellverband beeinflussen.

Die Daten aus genomweiten Expressions-Studien, Metabolom-Analyse und Protein-Interaktions-Studien können mit den Methoden der Netzwerk-Theorie vereinheitlichend betrachtet werden. Hier werden die einzelnen Komponenten (Gene, Proteine, Metaboliten) als Punkte dargestellt. Eine Verbindung zwischen zwei Punkten symbolisiert den biologischen Zusammenhang (Gen-Aktivierung oder -Repression, Interaktion, Überführung in einer Reaktion) der entsprechenden Komponenten. Der aus einer solchen Darstellung resultierende Netzwerk-Graph kann mit mathematischen Methoden untersucht werden.

Alle bislang analysierten biologischen Netzwerke weisen ähnliche Charakteristika auf (Barabasi & Oltvai, 2004; Rives & Galitski, 2003; Hartwell *et al.*, 1999; Wagner, 2002). Es gibt jeweils eine große Anzahl von Punkten mit nur sehr wenigen Verbindungen, die von einer kleinen Anzahl Punkten mit sehr vielen Verbindungen, den sogenannten Zentralpunkten („Hubs“), zusammengehalten werden. Dies bewirkt eine geringe Störanfälligkeit gegen zufällige Ausfälle, da verschiedene Pfade zwischen den einzelnen Komponenten des Netzwerkes vorhanden sind. Ein Ausfall einer der Zentralpunkte führt hingegen meist zu einer Funktionsstörung, die nicht von anderen Komponenten aufgefangen werden kann.

Auch der modulare Aufbau der biologischen Organisation (Hartwell *et al.*, 1999) wird in den biologischen Netzwerken widergespiegelt. Solche Module bestehen aus verschiedenen Arten von Molekülen, die durch Interaktionen diskrete Funktionen ausführen. So stellt beispielsweise ein Ribosom ein Modul dar, das die Funktion hat, ein Polypeptid

herzustellen. Auch eine Signal-Transduktionskette kann als Modul betrachtet werden, das von einem Reiz ausgehend zu einer Reaktion führt.

Die Analyse der Netzwerke von Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans* führte zu der Entdeckung, dass Teile solcher Module in topologischen Strukturen zu finden sind, die untereinander stark verknüpft sind und nur wenige Verbindungen mit dem restlichen Netzwerk aufweisen (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Giot *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004).

Aufgrund von Sequenz-Homologien der aus drei α -Helices bestehenden Homöodomäne und dem Vorhandensein weiterer konservierter Domänen werden die Homöodomänen-Proteine in verschiedene Familien eingeteilt. Die am besten untersuchte Gruppe stellen die sogenannten HOX-Proteine dar. Sie sind Teil des regulatorischen Systems, das während der Embryonal-Entwicklung in Tieren die antero-posteriore Körperachse festlegt (Übersichtsartikel: McGinnis & Krumlauf, 1992). Zahlreiche Mutationen in Hox-Genen führen zur Ausbildung homöotischer Veränderungen. Die Hox-Gene sind in Clustern auf den Chromosomen organisiert, deren serielle Anordnung weitgehend mit der Reihenfolge der Expressions-Aktivierung entlang der Körperachse übereinstimmt (Übersichtsartikel: Duboule, 1998). Die HOX-Proteine stehen an der Spitze von Expressionskaskaden und geben den verschiedenen Zellbereichen der Körperachse eine Positionsinformation, die im weiteren Verlauf der Entwicklung beibehalten wird. Hierfür sind die Gruppen der Polycomb- und Trithorax-Transkriptionsregulatoren verantwortlich, die die Expression der aktivierten Hox-Gene aufrechterhalten bzw. die nicht-exprimierten Hox-Gene durch Chromatin-Modifikation dauerhaft reprimieren (Übersichtsartikel: Orlando, 2003).

Pflanzen besitzen keine mit den Hox-Genen vergleichbaren Cluster. Die pflanzlichen Homöobox-Proteine werden von sechs Genfamilien kodiert, den KNOX-, BEL-, PALE-, HD-ZIP-, HD-GL2- und PHD-Finger-Genen. Die KNOX- und BEL-Gene gehören der Superfamilie der TALE-Gene (Three amino acid loop extension) an. Die einzige homöotische Mutante in Pflanzen, die auf Veränderungen in einem Homöobox-Gen zurückzuführen ist, ist die sogenannte „Kapuzengerste“ (Hooded), bei der es zur Bildung einer Extrablüte auf den Grannen kommt. Diese Mutation ist auf eine Duplikation im vierten Intron des *BKn3*-Gens zurückzuführen, die eine ektopische Expression dieses KNOX-Gens auslöst (Müller *et al.*, 1995).

1.2. Die TALE-Superfamilie der Homöobox-Gene

Die Superfamilie der TALE-Proteine zeichnet sich durch das Vorhandensein von drei zusätzlichen Aminosäuren zwischen der Helix I und II der Homöodomäne aus und umfasst die Familien der PBC-, Meis-, TGIF- und IRO-Proteine in Tieren, der M-ATYP- und

CUP-Proteine in Pilzen sowie der BEL- und KNOX-Proteine in pflanzlichen Organismen (Bürglin, 1997) (Abb. 1.1).

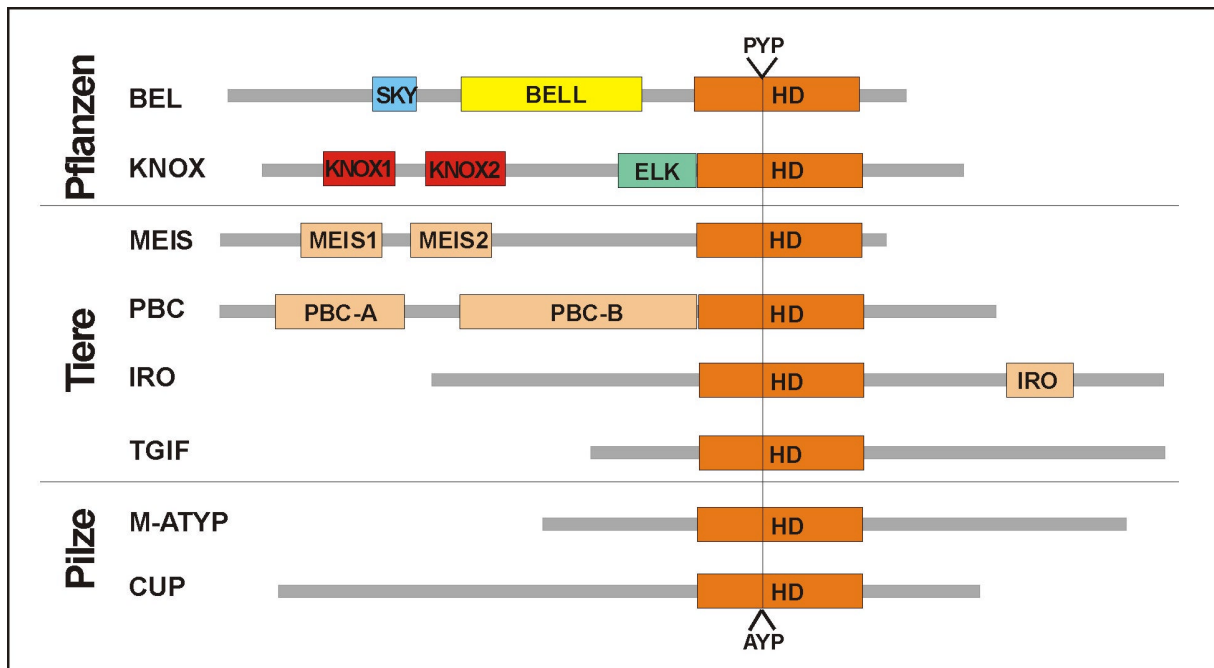


Abb. 1.1: Übersicht über die TALE-Superfamilie. Die innerhalb der Familien konservierten Domänen sind als Rechtecke dargestellt. SKY: SKY-Box; BELL: BELL-Domäne; HD: Homöodomäne; KNOX1 und 2: zweiteilige KNOX-Domäne; ELK: ELK-Domäne; MEIS1 und 2: zweiteilige MEIS-Domäne; PBC-A und PBC-B: zweiteilige PBC-Domäne; IRO: IRO-Box. Die für die TALE-Superfamilie charakteristischen Einschübe von drei Aminosäuren (PYP bei Pflanzen und Tieren, AYP bei Pilzen) sind über der Homöodomäne angedeutet.

Die KNOX-Proteine (**K**notted-like Homeobox) erhielten ihren Namen nach dem *Knotted1*-Gen (*Kn1*) in Mais, dem ersten Homöobox-Gen, das in Pflanzen entdeckt wurde (Vollbrecht *et al.*, 1991). Neben den Homologien in der Homöodomäne besitzen die Mitglieder der KNOX-Familie weitere konservierte Sequenzmotive. Unmittelbar vor der Homöodomäne liegt die kurze ELK-Domäne, die sich durch basische Aminosäuren auszeichnet. Weiter N-terminal befindet sich die zweiteilige KNOX-Domäne, welche sich vermutlich aus einer mit den tierischen Meis-Proteinen gemeinsamen Vorgänger-Domäne, der „MEINOX“-Domäne, entwickelt hat (Bürglin, 1998). Ausgehend von Sequenzhomologien dieser KNOX- und der Homöodomäne lassen sich die KNOX-Proteine in zwei Klassen einteilen (Bürglin, 1997). Die Mitglieder der Klasse 1 weisen neben diesen zwei Domänen häufig noch eine sechs Aminosäuren umfassende GSE-Box auf, die vor der ELK-Domäne lokalisiert ist. Auch hinsichtlich des Expressionsmusters unterscheiden sich die Klasse 1 von den Klasse 2 KNOX-Genen. Während die Klasse 1 Gene vornehmlich in distinkten Bereichen der meristematischen Gewebe exprimiert werden, scheinen die Gene der Klasse 2 ubiquitär exprimiert zu sein.

Die Proteine der BEL-Familie haben neben der konservierten Homöodomäne noch eine weiter N-terminal gelegene Domäne gemeinsam. Dieser auch als BELL-Domäne (Bellaoui *et al.*, 2001) bezeichnete Abschnitt bildet eine amphipathische α -Helix und ist in allen BEL-Proteinen, die bisher in *Arabidopsis*, Kartoffel (Chen *et al.*, 2003), Gerste (Müller *et al.*, 2001), Apfel (Dong, Y.H. *et al.*, 2000), Mais (Smith *et al.*, 2002) und dem Gymnospermen *Gnetum gnemon* (Becker *et al.*, 2002) gefunden wurden, stark konserviert. Darüber hinaus ist ein kurzer Bereich, der wegen seiner ersten, nahezu invariablen Aminosäuren auch als SKY-Box bezeichnet wird, in vielen BEL-Proteinen zu finden. Auch dieser Bereich könnte eine amphipathische Helix bilden und damit als Protein-Interaktions-Domäne fungieren.

Die Funktion der TALE-Proteine in Pflanzen ist bislang größtenteils anhand von Mangel- und Fehlexpressions-Mutanten untersucht worden. Dominante *Kn1*-Mutanten in Mais weisen unter anderem charakteristische Blattphänotypen auf, bei denen es durch meristematische Wucherungen zur Bildung knotenartiger Verdickungen entlang der lateralen Venen der Blattspreite kommt (Vollbrecht *et al.*, 1991). Das Hervorbringen von meristematischer Aktivität an gewöhnlicherweise ausdifferenzierten Stellen des Pflanzenkörpers ist später bei der Überexpression verschiedener KNOX-Proteine beobachtet worden (Lincoln *et al.*; 1994; Chuck *et al.*, 1996; Ori *et al.*, 2000).

Die Funktion der TALE-Proteine auf der molekularen Ebene ist in tierischen Organismen wesentlich besser untersucht als in Pflanzen. Mitglieder der Meis- und PBC-Familie stellen wichtige Interaktions-Partner von Proteinen der HOX-Gruppe während der Embryogenese von *Drosophila* aber auch Wirbeltieren dar (Ryoo *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1997). Ebenfalls aus tierischen Organismen ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von TALE-Proteinen auf der intrazellulären Ebene von interagierenden Proteinen entscheidend beeinflusst wird. Beispielsweise ist das PBC-Protein Extradenticle in der *Drosophila*-Zelle nur in Anwesenheit von Homothorax, einem weiteren Homöodomänen-Protein, im Kern lokalisiert (Rieckhof *et al.*, 1997; Jaw *et al.*, 2000; Abu-Shaar *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren haben sich die Anzeichen dafür verdichtet, dass in der Pflanze analog zu den tierischen Meis/PBX/HOX-Komplexen BEL- und KNOX-Proteine zusammen eine funktionelle Einheit bilden. So wurden Interaktionen zwischen Proteinen dieser beiden Familien mittlerweile in *Arabidopsis* (Bellaoui *et al.*, 2001), Gerste (Müller *et al.*, 2001), Mais (Smith *et al.*, 2002) und Kartoffel (Chen *et al.*, 2003) nachgewiesen. Die Interaktion zwischen KN1 und dem BEL-Protein KIP (**K**notted **I**nteracting **P**rotein) erhöht die Bindungsaffinität zu einer ermittelten DNA-Zielsequenz der beiden Proteine stark (Smith *et al.*, 2002). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass das Gen *ga20ox* in Kartoffel von einem Komplex aus einem BEL- einem KNOX-Protein reprimiert wird (Chen *et al.*, 2004).

Eine pflanzliche Besonderheit der TALE-Proteine scheint ihre Fähigkeit zum Zell-Zell-Transport durch Plasmodesmata zu sein. So wurde schon früh beobachtet, dass das

dominante *Kn1*-Allel während der Blattentwicklung in Mais nicht zell-autonom wirkt (Hake & Freeling, 1986). Lucas *et al.* (1995) zeigten dann in Mikroinjektions-Versuchen, dass sowohl das KN1-Protein als auch seine mRNA in benachbarte Zellen transportiert wird. Neuere Untersuchungen haben außerdem ergeben, dass auch die *Arabidopsis*-KNOX-Proteine KNAT1 und STM im Meristem transportiert werden können und nach dem Transport funktional sind (Kim *et al.*, 2003).

1.3. Funktion der TALE-Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich zwei Mutanten in *A. thaliana* bekannt, die durch das Fehlen von TALE-Proteinen hervorgerufen werden. Mutationen im *BEL1*-Gen, nach dem die BEL-Familie benannt wurde, betreffen in erster Linie die Morphogenese und Identität der Ovulen-Integumente (Reiser *et al.*, 1995). Anstelle des inneren Integumentes bildet sich in *bell*-Ovulen eine veränderte integument-artige Struktur an der Position des äußeren Integumentes, die der Ovule ein glockenförmiges Aussehen gibt. Die Entwicklung des weiblichen Gametophyten kommt zum Stillstand, so dass *bell* Mutanten weiblich steril sind. Diese Transformation wird zumindestens teilweise durch die fehlerhafte Expression des Homöobox-Gens *AGAMOUS* (*AG*) in den mutanten Ovulen hervorgerufen (Ray *et al.*, 1994; Western & Haughn, 1999).

Rezessive Mangelmutanten des KNOX-Gens *STM* bilden kein Sprossapikalmeristem (SAM) aus. Während sich in Wildtyp-Embryonen im sog. Torpedo-Stadium Zellen des Apex in charakteristischer Weise teilen und so die Tunica- und Corpus-Schichten ausbilden, verbleiben die Vorgänger-Zellen der *stm1*-Mutanten in diesem Stadium und teilen sich nicht weiter (Long *et al.*, 1996).

Inzwischen sind weitere TALE-Mutanten identifiziert worden. In der rezessiven Mangelmutante *blr* (BELLRINGER) oder auch *Pennywise* (*pnw*), die eine Insertion im BEL-Gen *BLH9* besitzt, ist die Phyllotaxis, das heißt, das Muster, in dem sich laterale Organe vom Meristem aus bilden, gestört. Hier kommt es zu einer im Vergleich zum Wildtyp vermehrten Bildung von Lateralorganen (Byrne *et al.*, 2003; Smith & Hake, 2003). Roeder *et al.* (2003) beschrieben außerdem kürzlich die Replumless Mutante, bei der die Zellen des Replum, dem Rahmen der samentragenden Fruchtblattränder, der nach dem Aufspringen der Schote stehen bleibt, unterentwickelt ist. Diese Mutante geht ebenfalls auf eine Insertion im *BLH9*-Gen zurück.

Eine Deletion des KNOX-Gens *KNAT1* ist als Ursache für den *brevipedicellus*-Phänotyp identifiziert worden (Venglat *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002). In diesen Mutanten sind die Pedicels und Internodien verkürzt, und die Pedicels weisen aufgrund asymmetrischer Zellteilungen nach unten.

Die Überexpression sowohl von *KNAT1* als auch von *KNAT2* führt zu einer Vielzahl von Veränderungen, wie der Ausbildung von gelappten Blättern, der ektopischen Bildung von Stipulae und Meristemen in der Sinus-Region der Blätter (Lincoln *et al.*; 1994; Chuck *et al.*, 1996; Ori *et al.*, 2000).

Die KNOX-Proteine von *A. thaliana* spielen also eine zentrale Rolle bei den Differenzierungsvorgängen von meristematischen Zellen zu Zellen der Blatt-Primordien sowie bei der Aufrechterhaltung der meristematischen Identität des Sprossapikalmeristems. Die Klasse 1 KNOX-Gene werden in unterschiedlichen Bereichen des SAM exprimiert und zum Zeitpunkt der Blattinitiation in den Primordienzellen herunterreguliert (Jackson *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1992; Lincoln *et al.*, 1994). An diesem Vorgang sind unter anderem die Proteine AS1 und AS2 (Asymmetric leaves1 und 2) beteiligt. Sie werden in den Blattprimordien produziert und sorgen für die Repression der Klasse 1 KNOX-Gene *KNAT1*, 2 und 6 (Ori *et al.*, 2000; Byrne *et al.*, 2000, Semiarti *et al.*, 2001). In den Zellen des SAM wirkt das KNOX-Protein STM reprimierend auf die Expression der Gene *AS1* und *AS2* (Byrne *et al.*, 2000, 2002).

Die Morphogenese des Blattes wird von den daran beteiligten Transkriptionsfaktoren vermutlich über die Wachstumsregulatoren Auxin und Gibberellinsäure (GA) gesteuert. Ein reduzierter Gehalt an GA ist zumindestens teilweise für die phänotypischen Veränderungen der Blätter bei der ektopischen Expression von KNOX-Genen verantwortlich (Kusaba *et al.*, 1998). Sowohl in *Arabidopsis* als auch in Kartoffel, Tabak und Tomate konnte gezeigt werden, dass diese Änderung im GA-Gehalt auf eine Repression eines GA20-Oxidase-Gens zurückzuführen ist (Hay *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Auch das KNOX-Gen *STM*, dessen Expression im SAM notwendig ist, um dessen meristematische Identität aufrechtzuerhalten, ist vermutlich ein Repressor von *AtGA20ox1* (Hay *et al.*, 2002).

Ein niedriger Gehalt an GA sorgt im SAM für die meristematische Identität der Zellen, während in den sich entwickelnden Blättern, wo durch AS1 und AS2 die KNOX-Gene der Klasse 1 herunterreguliert sind, ein hoher GA-Gehalt entsteht, der die Differenzierung der Zellen fördert.

1.4. Zielsetzung

Homöobox-Gene spielen eine entscheidende Rolle in den Entwicklungsprozessen aller mehrzelligen Organismen. Diese Transkriptions-Faktoren sind in ihrer Funktion in den Kontext der zellulären Netzwerke eingebunden. Über ihre genaue Funktion in der pflanzlichen Entwicklung ist bisher wenig bekannt, was nicht zuletzt auf eine Redundanz in dieser Superfamilie zurückzuführen sein könnte.

Anhand des Modellorganismus *A. thaliana* sollte die TALE-Superfamilie als Ganzes untersucht werden, um Regulations-Mechanismen zu finden, die für alle Mitglieder gemeinsam gelten. Für diese Analysen sollten genetische, molekularbiologische und zellbiologischen Methoden miteinander verknüpft werden.

Durch die Erzeugung von Pflanzen mit veränderter Genexpression der BEL-Gene sollte eine Betrachtung der Funktion auf der pflanzlichen Ebene durchgeführt werden. Parallel dazu sollte eine Erforschung der TALE-Proteine im Hinblick auf deren Einbindung in die Interaktions-Netzwerke der Zelle stattfinden. Hierfür sollten interagierende Proteine identifiziert werden, die anschließend wiederum mit genetischen und zellbiologischen Methoden auf ihre Funktion in der Pflanze untersucht werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Phytohormone wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), BioRad (München), Difco Laboratories (Detroit), Duchefa (Haarlem), Fluka (Neu-Ulm), GIBCO BRL (Gaithersburg), MERCK (Darmstadt), Roth (Heidelberg), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) erworben.

Enzyme stammten von Invitrogen (Carlsbad), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Quiagen (Hilden) und Roche Biochemicals (Mannheim). Filter und Membranen wurden von Schleicher & Schuell (Dassel), Whatman (Maidstone) und Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont) erworben.

Für die Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* wurden QIAprep Spin Columns und Quiagen Tips 2500 der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Der Aufreinigung von DNA in PCR-Ansätzen und nach Restriktionen diente das High Pure PCR Purification Kit von Roche (Mannheim).

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Carlsbad) sowie Metabion (Martinsried) bezogen.

2.1.2. Organismen

2.1.2.1. Bakterien

Von *Escherichia coli* wurden folgende Stämme verwendet:

- DH5 α *F*, *f80dlacZ* **DM15**, **D**(*lacZYA-argF*), *U169*, *end1*, *recA1*, *hsdR17*, (*r_K⁻* - *m_K⁺*), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, **I**, *gyrA96*, *relA1* (Hanahan, 1983)
- DB3.1 *E. coli* RR1 *gyrA462 endA* (*recA*-), von Invitrogen

Von *Agrobacterium tumefaciens* wurden folgende Stämme verwendet:

- LBA4404 nicht onkogener Stamm ohne eigenes Ti-Plasmid, basierend auf dem WT-Stamm Ach5 (Hoekema *et al.*, 1983)
- GV3103::pMP90RK (Koncz und Schell, 1986)

2.1.2.2. Hefen

Von *Saccharomyces cerevisiae* wurden folgende Stämme verwendet:

- PJ69-4a *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4D*, *gal80D*, *LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ* (James *et al.*, 1996)

AH109	<i>MATa</i> , <i>trp-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4D</i> , <i>gal80D</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> , <i>MEL1</i> (Clontech)
Y187	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4D</i> , <i>met</i> , <i>gal80D</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i> (Harper <i>et al.</i> , 1993)

2.1.2.3. Pflanzen

Für *Arabidopsis*-Transformationen wurde *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia), für die stabile Tabak-Transformation *Nicotiana tabacum* Petit Havanna, Linie SR1 verwendet. Die transiente Expression von Proteinen wurde in *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Transgene Samen der T-DNA-Insertionslinien kamen aus der GABI-KAT-Kollektion (Rosso *et al.*, 2003) und der Kollektion des SALK-Instituts (Alonso *et al.*, 2003).

2.1.3. Vektoren und cDNA-Banken

2.1.3.1. *E. coli*-Vektoren

pDONR201	Klonierungsvektor für das Invitrogen Gateway-System
pENTR4	Klonierungsvektor für das Invitrogen-Gateway-System
TOPO-BH1 bis 12	pCR-TOPO-Vektoren (Invitrogen), die die cDNA-Sequenzen der <i>Arabidopsis</i> BEL-Gene enthalten (Judith Müller, MPIZ Köln)
TOPO-KNAT1 bis 8	pCR-TOPO-Vektoren (Invitrogen), die die cDNA-Sequenzen der <i>Arabidopsis</i> KNOX-Gene enthalten (Judith Müller, MPIZ Köln)

2.1.3.2. Hefe-Vektoren

pACT2-attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Gateway-Klonierung von N-terminalen GAL4 Aktivatorodomänen-Fusionen (abgewandelt von Clontech)
pAS2-attR	Zwei-Hybrid-Vektor zur Gateway-Klonierung von N-terminalen GAL4 DNA-Bindungsdomänen-Fusionen (abgewandelt von Clontech)
pAD-SNF4	Derivat des pACT-Vektors, enthält als BamHI-Fragment das Hefe SNF4-Gen (Celenza <i>et al.</i> , 1989) fusioniert an die GAL4-Aktivatorodomäne (Fields & Song, 1989)
pBD-SNF1	Derivat des pAS1-Vektors, enthält als BamHI-Fragment das Hefe SNF1-Gen (Celenza & Carlson, 1986) fusioniert an die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Fields & Song, 1989)
pAD-BKn1	AD-Vektor, der den Genbereich von <i>BKn1</i> , der für die Aminosäuren 77 bis 349 kodiert, enthält (Müller <i>et al.</i> , 2001).
pAD-BKn3	AD-Vektor, der den Genbereich von <i>BKn3</i> , der für die Aminosäuren 111 bis 364 kodiert, enthält (Müller <i>et al.</i> , 2001).

pAD-BKn7 AD-Vektor, der die vollständige kodierende Sequenz von *BKn7* enthält (Müller *et al.*, 2001).

2.1.3.3. Pflanzen-Vektoren

pLX-Gateway pLX222-Derivat zur Gateway-Klonierung von Genen unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors (Hackbusch, 2001)

pLEELA Gateway-Vektor zur Klonierung von Genen unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors (Marc Jacoby, MPIZ Köln)

pJawohl8-RNAi Vektor zur Gateway-Klonierung von DNA-Fragmenten für RNAi (Bekir Uelker, MPIZ Köln)

pGJ2033 binärer Pflanzenvektor, der RFP unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors enthält (Guido Jach, MPIZ Köln)

pGJ2099 binärer Pflanzenvektor, der GFP unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors enthält (Guido Jach, MPIZ Köln)

pBatTL-K-RFP Derivat des pGJ2033 zur Gateway-Klonierung von C-terminalen RFP-Fusionen (Klaus Richter, MPIZ Köln)

pBatTL-K-GFP Derivat des pGJ2099 zur Gateway-Klonierung von C-terminalen GFP-Fusionen (Klaus Richter, MPIZ Köln)

pAM-ILWEQ-GFP binärer Pflanzenvektor, der ein Protein mit ILWEQ-Domäne als C-terminale Fusion an GFP unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors exprimiert (Volker Lipka, MPIZ Köln)

pAM-MAP3-GFP binärer Pflanzenvektor, der MAP3 als C-terminale GFP-Fusion unter Kontrolle des CaMV35S-Vektors exprimiert (Volker Lipka, MPIZ Köln).

2.1.3.4. cDNA-Bibliotheken für das Hefe-zwei-Hybrid-System

Ara 446: aus *A.thaliana* Suspensionskultur (ohne Licht), DNA erhalten von K.Salchert, AG C. Koncz, MPIZ Köln

Ara-1101: Clontech Matchmaker cDNA Library; grünes Blattmaterial von *A.thaliana*; 3 Wochen altes vegetatives Gewebe, Ökotyp Columbia; aus polyT- und randomisierter cDNA (Clontech)

HS-Ara1: normalisierte polyT-cDNA aus allen Organen von *A.thaliana* Ökotyp Columbia, erhalten von Hans Sommer, MPIZ Köln

2.1.4. Klonierung der Vektoren

2.1.4.1. Vektoren zur Verwendung im Hefe-zwei-Hybrid-System

- Die Sequenzen der TALE-Gene wurden ausgehend von den TOPO-Vektoren, die von Judith Müller kloniert wurden, mit den Oligonukleotiden [BLH1: JH004, JH018], [BLH2: JH005, JH014], [BLH3: JH008, JH016], [BLH4: JH006, JH015], [BLH5: JH001, JH018], [BLH6: JH002, JH019], [BLH7: JH007, JH018], [BLH8: JH003, JH013], [BLH9: JH009, JH018], [BLH10: JH010, JH017], [BEL1: JH012,

JH018], [ATH1: JH011, JH018], [KNAT1: JH023, JH030], [KNAT2: JH024, JH030], [KNAT3: JH025, JH030], [KNAT4: JH026, JH030], [KNAT5: JH027, JH030], [KNAT6: JH029, JH030], [KNAT7: JH028, JH030] und [STM: JH031, JH030] amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in die Vektoren pAS2-attR und pACT-attR (siehe 2.2.1.2).

- Die für die Homöodomänen kodierenden Sequenzen der Gene BLH1 und KNAT1 wurden mit durch eine PCR auf den Entry-Klonen mit den Oligonukleotiden [JH147, JH148] und [JH128, JH129] amplifiziert und in die Vektor pACT-attR und pAS-attR rekombiniert.
- Die Sequenzen der AtOFP-Gene wurden auf genomischen *A. thaliana* Col0-Präparaten mit den Oligonukleotiden [AtOFP1: JH052, JH053], [AtOFP2: JH072, JH073], [AtOFP5: JH078, JH079], [AtOFP6: JH084, JH085], [AtOFP7: JH080, JH081], [AtOFP10: JH086, JH087], [AtOFP13: JH090, JH091], [AtOFP14: JH092, JH093], [AtOFP15: JH094, JH095] und [AtOFP16: JH096, JH097] amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in pAS2-attR.
- Die OVATE-Domänen der AtOFP-Gene wurden auf den Entry-Klonen der Vollängen-Versionen bzw. auf genomischer DNA mit den Oligonukleotiden [AtOFP1: JH130, JH053], [AtOFP2: JH131, JH073], [AtOFP3: JH123, JH077], [AtOFP4: JH133, JH075] [AtOFP5: JH134, JH079], [AtOFP6: JH135, JH085], [AtOFP7: JH136, JH081], [AtOFP10: JH139, JH087], [AtOFP12: JH141, JH089], [AtOFP13: JH142, JH091], [AtOFP14: JH143, JH093], [AtOFP15: JH144, JH095] und [AtOFP145: JH096, JH097] in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in pAS2-attR.
- Die Umklonierung der in den Hefe-Screens erhaltenen Gene *At2g40000*, *At1g26260*, *At1g11910*, *At5g04830* und *At1g30590*, vom pACT-Vektor in den pAS-Vektor wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden AD_BD_recom_GAD10 (für Vektoren aus der Clontech-Bibliothek) bzw. AD_BD_recom_ACT (für Vektoren aus den anderen Bibliotheken) und AD3 und anschließender homologer Rekombination mit einem linearisierten pAS2-Vektor in Hefen durchgeführt.

2.1.4.2. Vektoren für die Herstellung von Überexpressions-Pflanzen

Für die Überexpression von BEL-Genen wurden die Entry-Klone (siehe 2.1.4.1.) in den pLEELA-Vektor rekombiniert.

Das Gen *AtOFP1* wurde für die Transformation von *A. thaliana* mit den Oligonukleotiden JH052 und JH053 auf genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pDONR201 rekombiniert. Es folgte die Rekombination in den pLEELA-Vektor.

Für die Transformation von *N. tabacum* wurde das Gen ausgehend vom Entry-Klon in den Vektor pLX-Gateway rekombiniert.

2.1.4.3. Vektoren für die transiente Expression von GFP- und RFP-Fusionsproteinen

Zur Beseitigung des STOP-Codons der Gene wurden die Sequenzen von *BLH1*, *BLH7*, *KNAT1* und *AtOFPP5* in einer PCR mit den Oligonukleotiden [JH004, JH054], [JH007, JH058], [JH023, JH062] und [JH078, JH153] amplifiziert. Es folgte die Rekombination in die pBatTL-K-GFP- bzw. pBatTL-K-RFP-Vektoren. Zur Entfernung des STOP-Codons des *AtOFPP1*-Gens wurde aus dem Entry-Vektor (siehe 2.1.4.1.) mit *XmnI* und *PvuI* ein 654 bp langes Stück entfernt und durch das entsprechende Stück eines mit *EcoRV* und *PvuI* geschnittenen pENTR4-Vektors ersetzt.

2.1.5. Lösungen und Nährmedien

Die verwendeten Standardlösungen und -medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1993) mit MilliQ-Wasser (Millipore) hergestellt und wenn zulässig für 20 min bei 125°C autoklaviert. Thermoinstabile Lösungen wurden mit einer Millipore Steritop™ (0,22 µm)-Filtereinheit steril filtriert.

2.1.5.1. Hefemedien

YPAD	Difco-Pepton	20 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	Adenin Hemisulfat	100 mg/l
	(Bacto-Agar	18 g/l)
	pH mit NaOH auf 5,8	
SD	Difco“Nitrogen base w/o amino acids“	6,7 g/l
	Drop out supplement	
	ohne Leucin, Tryptophan und Histidine	0,62 g/l
	Adenin-Hemisulfat	100 mg/l
	L-Leucin	100 mg/l
	L-Tryptophan	50 mg/l
L-Histidin	20 mg/l	
	pH auf 5,8 mit NaOH	
	Die zur Selektion verwendeten Aminosäuren wurden weggelassen	

2.1.5.2. Pflanzenmedien

MS (<i>A. thaliana</i>)	MS-Nährsalze (Duchefa)	4,3 g/l
	Saccharose	30 g/l
	<i>myo</i> -Inositol	0,1 g/l
	MES	0,5 g/l
	(Bacto-Agar	9 g/l)

pH auf 5,8 mit KOH

nach dem Autoklavieren Zugabe von je 1 ml folgender Vitaminlösungen:

	1 mg/ml	Biotin	
	1 mg/ml	Nicotinsäure	
	1 mg/ml	Pyridoxin	
	20 mg/ml	Thiamin	
MS (<i>N. tabacum</i>)	MS-Medium (Sigma)		4,3 g/l
	Saccharose		30 g/l
	(Bacto-Agar		8 g/l)
pH auf 5,8 mit KOH			
nach dem Autoklavieren Zugabe folgender Zusätze:			
C15-Medium:	Claforan		250,0 mg/l
	Kanamycin		100,0 mg/l
C16-Medium:	Claforan		500,0 mg/l
	Kanamycin		100,0 mg/l
	Benzylaminopurin		0,5 mg/l
	Nicotinsäure:		0,1 mg/l

2.1.6. Oligonukleotide

Eine vollständige Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

2.1.7. Mikroskope

Für die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde ein Digital Scanning Microscope DSM940 von Zeiss, für die Bildverarbeitung der Zeiss LSM5 ImageBrowser verwendet. Die Trichom-Aufnahmen mit Digitaler Scanning-Mikroskopie wurden von der Service-Einheit CEMIC am MPIZ Köln durchgeführt.

2.1.8. Software und Datenbanken

Sequenz-Alignments wurden mit ClustalW nach der BLOSUM62-Matrix von Henikoff und Henikoff (1992) berechnet und mit dem BioEdit-Programm Version 5.0.9 graphisch dargestellt.

Phylogenetische Bäume wurden mit dem TreeView-Programm (Page, 1996) Version 1.6.1 hergestellt.

Für den BLAST (Altschul *et al.*, 1994, 1997) von Protein- und Gensequenzen wurden folgende Online-Datenbanken verwendet:

<http://www.ch.embnet.org/software/aBLAST.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://tigrblast.tigr.org/er-blast/>

Für die Analyse von Protein- oder Gensequenzen nach konservierten Domänen wurde PredictNLS (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>) sowie Expasy-PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>) verwendet.

Der Erstellung und Bearbeitung von Bildern dienten die Programme CorelDRAW 8.0 und Adobe Photoshop 6.0.

Für die graphische Darstellung der Netzwerke, sowie die Erzeugung zufälliger Netzwerke wurde das Programm Pajek verwendet (<http://vlado.fmf.uni-lj.si/pub/networks/pajek/default.htm>).

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1. Präparation von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde mit QIAprep Spin Columns oder in größerem Maßstab mit Qiagen Tip 500 Säulen (QIAGEN) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Isolierung von Plasmiden aus Hefe wurde eine 5 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert und in Sorbitol aufgenommen, mit einer Spatelspitze Yeast Lytic Enzyme versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die so vorbehandelten Zellen wurden dann mit Hilfe des QIAprep Spin Kits weiterverarbeitet, wobei die Menge der verwendeten P1-, P2- und N3-Puffer verdoppelt wurde und die Lyse der Zellen im P2-Puffer fünf Minuten bei 37°C durchgeführt wurde.

Die Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte nach der CTAB-Methode von Doyle und Doyle (1990).

Gesamt-RNA von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mit dem Biorad-Total RNA Reagenz isoliert und nach einem DNaseI-Verdau über QIAGEN RNeasy™ Plant Mini Säulchen aufgereinigt.

2.2.1.2. Rekombinante DNA-Techniken

Nicht näher beschriebene molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktionen, Ligationen, Dephosphorylierungen, Agarose-Gelelektrophoresen sowie Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden nach Angaben von Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1993) oder den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die meisten Klonierungen wurden mit Hilfe des Invitrogen Gateway-Systems durchgeführt, das eine sequenzspezifische Rekombination von DNA-Sequenzen basierend auf den Mechanismen der Rekombination des Bakteriophagen Lambda erlaubt. Es findet zunächst eine Rekombination eines linearen DNA-Abschnittes in einen Donor-Vektor statt (hier: pDONR201), wodurch ein sogenannter Entry-Klon entsteht. Von diesem ausgehend können Rekombinationen in beliebige Destinations-Vektoren durchgeführt werden. Für Details sei hier auf die Produkt-Informationen des Hersteller verwiesen. Die Rekombinationen wurden nach Hersteller-Angaben in einem auf 2,5 µl reduzierten Maßstab durchgeführt.

2.2.1.3. Amplifikation mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

PCR-Amplifikationen für die Klonierung von DNA-Sequenzen wurden mit *Pwo* (Roche) oder *Pfx* DNA-Polymerase (Invitrogen) durchgeführt. Kleine Ansätze erfolgten mit einem „thermo-DUX Techne“-Gerät von Progene. Reaktionen im Mikrotiterplatten-Format wurden in einem Biozym „Multicycler PTC-225“ durchgeführt. Die Reaktionen wurden standardmäßig mit 1-50 ng DNA-Template, 10-40 pmol Oligonukleotiden, 200 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer (mit 1,5 mM MgSO₄) und 1 Unit DNA-Polymerase durchgeführt. Die Anzahl der Amplifikations-Schritte, die Höhe der Annealing-Temperatur und die Dauer der einzelnen Schritte wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und den Sequenzen der Oligonukleotide bestimmt.

2.2.1.4. RT-PCR-Analyse

Für den Nachweis der mRNA der verschiedenen TALE-Gene in unterschiedlichen *A. thaliana*-Organen, sowie der mRNA in den Mangel- und Überexpressionsmutanten, wurde die Gesamt-RNA aus den Organen präpariert (siehe 2.2.1.1.), mit einem Poly-dT-Oligonukleotid durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in einer PCR mit folgenden Oligonukleotiden auf die spezifische cDNA hin untersucht: [BLH1: BELhom4-1, BELhom4-2], [BLH2: BELhom5-3, BELhom5-4], [BLH3: BELhom8-1, BELhom8-4], [BLH4: JH006, JH015], [BLH5: BELhom1-1, BELhom1-4], [BLH6: BELhom2-1, BELhom2-2], [BLH7: BELhom7-1, BELhom7-2], [BLH8: BELhom3-1, BELhom3-4], [BLH9: BELhom9-1, BELhom9-2], [BLH10: BELhom10-1, BELhom10-2], [BEL1: BEL-3, JH060], [ATH1: ATH-1, ATH-4], [KNAT1: KNAT1-5, KNAT1-3], [KNAT2: KNAT2-5, JH063], [KNAT3: KNAT3-5, JH064], [KNAT4: KNAT4-5, KNAT4-3], [KNAT5: JH027, JH066], [KNAT6: KNAT7-5, KNAT7-3], [KNAT7: KNAT6-5, KNAT6-3] und [STM: STM-5, STM-3].

Der Nachweis der cDNA von *AtGA20ox-1* erfolgte durch eine PCR in 30 Zyklen bei 56°C Annealing Temperatur mit den Oligonukleotiden JH116 und JH117.

Die zur Kontrolle amplifizierte cDNA des Gens *RAN3* wurde mit den Oligonukleotiden RAN3_for und RAN3_rev amplifiziert.

2.2.1.5. Analyse der DNA der Pflanzen-Mutanten

Zum Nachweis der Insertionen in Pflanzen aus Insertionslinien und der Transformationskontrolle der RNAi-Pflanzen wurde die genomische DNA isoliert (2.2.1.1.) und eine PCR mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt: [Linie 053G03: PH76, RB1-GABI], [Linie 285G08: JH115, LB1-GABI; JH070, RB1-GABI], [Linie 111492 und 127550: JH052, RB-SALK; JH053, JH048], [Linie 484D08 und 114D09: JH108,], [Linie 385A11: LB1-GABI, BELhom5-10; RB1, BELhom5-7], [Linie 432F02 und 373G12: BELhom2-3, LB1-GABI], [Linie 145B10: BELhom 6-5, RB1-GABI; LB1-GABI, BELhom6-6], [BLH1-RNAi: JH004, WRKY], [BLH2-RNAi: JH005, WRKY], [BLH3-RNAi: JH008, WRKY], [BLH4-RNAi: JH036, WRKY], [BLH5-RNAi: JH001, WRKY], [BLH6-RNAi: JH002, WRKY], [BLH7-RNAi: JH007, WRKY], [BLH8-RNAi:

JH003, WRKY], [BLH9-RNAi: JH009, WRKY], [BLH1-RNAi: JH010, WRKY], [BEL1-RNAi: JH012, WRKY], [ATH1-RNAi: JH011, WRKY].

Um zu überprüfen, ob die Pflanzen der Insertionslinien heterozygot oder homozygot für die Insertion waren, wurde auf den genomischen DNA-Präparaten eine PCR mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt: [Linien 484D08 und 114D09: JH108, BELhom4-2], [Linie 049H07: BELhom5-3, JH166], [Linie 385A11: BELhom5-7, BELhom5-10], [Linie 145B10: BELhom6-5, BELhom6-6], [Linie 219F01: BELhom1-3, BELhom1-4], [Linien 432F02 und 373G12: BELhom2-3, BELhom2-4], [Linie 285G08: JH070, JH115], [Linie 053G03: JH070, PH76], [Linien 111492 und 127550: JH052, JH053].

2.2.1.6. DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von der ADIS-Service-Einheit am MPIZ Köln auf einem PE/Applied Biosystems 377 und 3700 Sequencer durchgeführt.

2.2.2. Arbeiten mit Agrobakterien

2.2.2.1. Herstellung und Transformation elektrokompenter Agrobakterien

Für die Herstellung elektrokompenter Agrobakterien wurde eine 400 ml-Kultur des Agrobakterien-Stammes in YEB-Medium bei 28°C und 220 rpm angezogen bis eine Zelldichte von $OD_{600} = 0,5-0,8$ erreicht war. Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und dann bei 4°C 20 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit jeweils 200 und 100 ml eiskaltem, sterilem ddH₂O und 10 ml eiskaltem, sterilen 10%igen Glycerin gewaschen. Die so behandelten Zellen wurden in 800 µl kaltes, steriles 10 %iges Glycerin aufgenommen und in 20 µl-Aliquots in flüssigen N₂ eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Für die Transformation der elektrokompenten Agrobakterien wurde ein Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Vektor-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Der Strompuls erfolgte in einem BioRad Gene Pulser™ bei 1,6 V, 200 Ω und 25 µFD. Die Zellen wurden dann in 200 µl kaltes YEB-Medium mit 100 mg/l Rifampicin aufgenommen, für 1 h bei 28°C geschüttelt und anschließend auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.2.2. Anzucht von Agrobakterien in Flüssigmedium

Für die Anzucht von Agrobakterien in Flüssigmedium wurden die Bakterien von einer maximal zwei Wochen alten Platte, die bei 4°C aufbewahrt wurde, in 5 ml Selektionsmedium angeimpft und für einen (LBA4404-Stamm) oder zwei Tage (GV3101::pMP90RK) bei 28°C schüttelnd angezogen. Die Erhöhung des Volumens erfolgte dann schrittweise, wobei eine zu große Verdünnung der Kulturen vermieden wurde.

2.2.3. Arbeiten mit Hefen

2.2.3.1. Das Hefe-zwei-Hybrid-System

Fields und Song etablierten 1989 das Hefe-zwei-Hybrid-System, mit dem die Interaktion zweier Proteine nachgewiesen werden kann. Dieses System basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne, die mit den allgemeinen Transkriptions-Komponenten in Kontakt tritt, aufgebaut sind. Die minimale GAL4-DNA-Bindungsdomäne kann mit der verkürzten GAL4-Aktivierungsdomäne nicht mehr alleine zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor zusammentreten. Sind an die zwei Domänen jedoch jeweils Proteine fusioniert, die aneinander binden können, so kommt es zu einer Zusammenführung der GAL4-DNA-Bindungs- und der Aktivierungsdomäne zu einem funktionellen Hybridtranskriptionsfaktor, der in der Lage ist, Reportergene, die unter der Kontrolle des GAL1-Promotors stehen, zu aktivieren (Abb. 2.1).

Nicht geeignet für diese Methode sind Proteine, die nicht in den Kern transportiert werden können, Proteine, die nicht in der Hefe hergestellt werden bzw. sich toxisch auswirken, und solche die in der Lage sind, selbst die Reportergene zu aktivieren. Diese sogenannte unspezifische Aktivierung kann dadurch getestet werden, dass man die Fusionsproteine zusammen mit einem Zwei-Hybrid-Vektor transformiert, der für ein Protein kodiert, das in keinem Zusammenhang mit den zu testenden Proteinen steht (in dieser Arbeit: SNF1 bzw. SNF4), und auf Aktivierung des Reportergens testet.

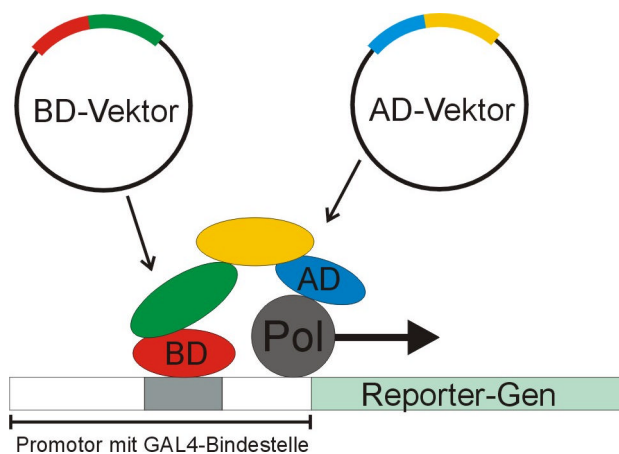


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Systems. Vom BD-Vektor aus wird eine Fusion des Proteins X (grün) mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (rot, BD) exprimiert. Vom AD-Vektor wird eine Fusion des Proteins Y (gelb) mit der GAL4-Aktivierungs-Domäne (blau, AD) exprimiert. Interagieren die Proteine X und Y, kann der Hybrid-Transkriptionsfaktor über Aktivierung des allgemeinen Transkriptionsapparates (grau, Pol) das Reporter-Gen ablesen.

In dieser Arbeit wurden die Stämme Y187 mat α und PJ694A mat a bzw. AH109 mat a verwendet, die alle für normales Wachstum die Zugabe von Leucin, Tryptophan und Histidin benötigen. Durch Transformation mit dem Vektor pACT2 erhalten sie die Fähigkeit, auf Medium ohne Leucin zu wachsen, die Transformation mit dem Vektor pAS2 verleiht ihnen Tryptophan-Prototrophie. Als Reporter-Gene stehen *HIS3* und *LacZ* unter Kontrolle GAL4-abhängiger Promotoren zur Verfügung, so dass eine Selektion auf Histidin-Prototrophie und ein Test auf Blaufärbung für die Erkennung von Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt werden kann.

Abhängig von den verwendeten Hefestämmen und Vektoren kann es durch eine geringe Basalexpression des *HIS3*-Reporter-Gens zu einem Wachstum auf Minimalmedium auch in Abwesenheit einer echten Reporter-gen-Aktivierung kommen. Durch Zugabe geringer Mengen von 3-Aminotriazol (3AT), einem kompetitiven Inhibitor der Histidinbiosynthese, kann man dieses Wachstum unterdrücken.

2.2.3.2. Kultivierung von Hefen

Die Hefestämme wurden auf YPAD-Platten bei 30°C für zwei bis drei Tage herangezogen und dann für bis zu vier Wochen bei 4°C aufbewahrt, ehe sie erneut auf frische Platten überstrichen wurden.

2.2.3.3. Transformation von Hefen

Die Transformation der Hefen wurde nach der LiAc-Methode von Gietz & Schiestl (1995) durchgeführt, wobei zwischen 200 und 750 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Für Transformationen im Mikrotiter-Platten (MTP)-Format wurde diese Methode folgendermaßen abgeändert: pro MTP wurden 150 ml Hefekultur im Vollmedium oder im entsprechenden SD-Medium für 3,5 h bei 30°C und 220 rpm angezogen. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen der Hefen wurden folgende Mengen der Lösungen auf die Hefen pipettiert:

7200 µl	50% PEG (MW3350)
1440 µl	1 M LiAc pH 7,5
750 µl	ssDNA (2 mg/ml)
1350 µl	steriles ddH ₂ O

Die Hefen wurden dann unter Vermischen der Lösungen darin resuspendiert. In der MTP wurde die DNA in die einzelnen Vertiefungen vorgelegt und jeweils 100 µl der Hefe-Suspension dazupipettiert. Die MTP wurde 30 min bei 30°C und anschließend 25 min bei 42°C inkubiert, um dann entweder sofort oder nach einem Tag Inkubation bei 30°C auf eine Platte mit Selektionsmedium ausgestempelt zu werden oder in einer neuen MTP 1:100 in Selektionsmedium verdünnt und in Flüssigkultur selektiert zu werden.

2.2.3.4. Screenen von cDNA-Bibliotheken im großen Maßstab

Für das parallele Screenen von vielen Köderproteinen gegen mehrere Bibliotheken wurde die Methode von Söllick & Uhrig (2001) eingesetzt. Die nach bis zu sieben Tagen nach dem Ausplattieren auf dem Selektionsmedium erhaltenen Kolonien wurden in LWH3-Medium in Mikrotiter-Platten gepickt, auf eine frische LWH3-Platte gestempelt und nochmals angezogen. Für die Verifizierung der Interaktions-Kandidaten wurde auf den Kolonien in einer PCR mit Oligonukleotiden, die auf der GAL4-Aktivierungs-Domäne und auf dem Terminator gelegen sind [AD3 und AD5], die enthaltene cDNA vervielfältigt. Durch *TaqI*-Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung der geschnittenen PCR-Produkte in einem 2 %igen Agarose-Gel konnten mehrfach erhaltene gleiche cDNA-Plasmide erkannt und aussortiert werden. Alle ausgewählten PCR-Produkte wurden

anschließend durch homologe Rekombination in Hefen in den leeren pACT-Vektor wieder eingebracht und der erhaltene Vektor auf Selbstaktivierung getestet. Bei negativem Ergebnis wurde die Plasmid-DNA aus der Hefe isoliert (siehe 2.2.1.1.) und das Kandidaten-Plasmid erneut mit seinem ursprünglichen Köder zusammen in Hefe transformiert. Bei Kandidaten, die auch dann noch ein Wachstum auf LWH3-Medium zeigten, wurde das PCR-Produkt sequenziert.

2.2.3.5. PCR auf Hefen

Zur Durchführung einer PCR auf Hefen wurden diese auf Selektionsmedium frisch angezogen und eine kleine Menge in jeweils 25 µl 20 mM NaOH-Lösung aufgenommen und darin lysiert. 2 µl der Lysate wurden dann in eine 50 µl-PCR-Reaktion mit *Taq*-Polymerase eingesetzt. Die Lysate konnten bei -20°C bis zu zwei Jahren aufbewahrt werden. Die Insertionen der aus den Screens erhaltenen Klone wurden mit den Oligonukleotiden AD5 und AD3 amplifiziert.

2.2.3.6. Beta-Galaktosidase-Filtertest

Auf die Selektions-Platten mit Hefekolonien wurde ein passend zugeschnittene Filter (HybondTM-N⁺ von Amersham) gelegt, der danach mit den anhaftenden Hefezellen für ca. 20 sec in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Nach kurzem Auftauen bei RT wurde der Filter dann auf ein mit LacZ-Nachweislösung getränktes 3MM-Papier (GB002 von Schleicher & Schuell) in einer Petrischale platziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen auf der Oberseite befanden und der Filter blasenfrei aufgelegt wurde. Die Petrischale wurde zugedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend wurde der Filter im Abzug getrocknet.

LacZ-Nachweislösung (frisch anzusetzen): pro kleiner Petrischale:

2 ml Z-Puffer, 7 µl β-Mercaptoethanol und 100 µl X-Gal (2% in DMF)

Z-Puffer: 10,7 g/l Na₂HPO₄; 5,5 g/l NaH₂PO₄; 0,75 g/l KCl; 0,24 g/l MgCl₂ pH: 7.0.

2.2.3.7. *In vivo*-Rekombination in Hefen

PCR-Produkte können über homologe Rekombination in Hefe in linearisierte Plasmide integriert werden (Oldenburg *et al.*, 1997). Das zu integrierende PCR-Produkt hatte an seinen Enden einen Bereich von ca. 100 Nukleotiden, der mit denen des rekombinationsortes übereinstimmte. Das pACT2-Plasmid wurde mit den Enzymen *Nco*I, *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und mit SAP (Shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Der pAS2-Vektor wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Pst*I verdaut und die entstehenden Enden mit SAP dephosphoryliert. Zur homologen Rekombination wurden Hefen mit dem linearisierten Vektor (ca. 5 ng), in den das Insert integriert werden soll, und dem PCR-Produkt (5 µl) kotransformiert und auf Selektionsmedium ausgestrichen.

2.2.4. Arbeiten mit Tabak

2.2.4.1. Sterilkultur von Tabak

Nicotiana tabacum-Pflanzen der Linie SR1 wurden in Weckgläsern auf MS-Medium unter Langtagbedingungen in der Klimakammer (25°C, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) kultiviert. Zur Vermehrung wurden Internodien von älteren Pflanzen abgetrennt und in frisches Medium gesteckt, um sich zu bewurzeln und neue Pflanzen zu regenerieren.

2.2.4.2. Transformation von Tabak

Die Transformation des Tabaks der Linie SR1 erfolgte nach dem Prinzip der Methode von Horsch *et al.* (1985). Transformierte *Agrobakterien*-Kulturen wurden in 20 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 28°C schüttelnd angezogen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in 15 ml MS-Medium aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Von den Tabakpflanzen wurden Blätter abgetrennt, von der Mittelrippe befreit und in einer Petrischale in ca. 1x1cm große Stücke zerteilt, die dann mit der Rasierklinge leicht verletzt wurden. Die so behandelten Stücke wurden für ca. 5 min in der *Agrobakterien*-Lösung inkubiert und dann auf 3xMS-Platten ausgelegt. Diese wurden für zwei Tage in eine Klimakammer (25°C, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit) gestellt. Anschließend wurden die Blattstücke auf Platten mit C16-Medium weiträumig verteilt und in der Klimakammer inkubiert. Alle 14 Tage wurden die Stücke auf frische Platten umgesetzt, bis sich Sprosse hinreichender Länge ausgebildet hatten, die dann in C15-Medium eingesteckt wurden. Nach der Bewurzelung der Sprosse, wurden diese in Erde umgesetzt und im Gewächshaus weiter kultiviert.

2.2.4.3. Transiente Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana*

Für die transiente Expression von Proteinen zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurden *Agrobakterien* nach der Methode von Kapila *et al.* (1997) in Tabakblätter infiltriert. Um eine schnelle Herunterregulierung der eingebrachten Gene durch den Silencing-Mechanismen der Pflanze zu unterdrücken, wurde neben den Plasmiden, die die GFP- und RFP-fusionierten Gene von Interesse enthielten, ein Plasmid mit eingebracht, das den Silencing Suppressor des Tomato Bushy Stunt Virus unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors enthielt (Voinnet *et al.*, 2003). Für die Infiltration wurden *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen verwendet, die nach dem Pikieren für vier bis fünf Wochen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen wurden. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen für weitere drei bis acht Tage im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert, bevor die Expression der Proteine mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert wurde.

2.2.5. Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

2.2.5.1. Oberflächen-Sterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Bis zu 2500 *Arabidopsis*-Samen wurden für 7 min in 1 ml Sterilisationslösung (32 % DanKlorix (Colgate-Palmolive GmbH), 0,8 % N-lauryl-sarcosine) inkubiert und dabei gelegentlich geschüttelt. Die Samen wurden anschließend abzentrifugiert und mindestens sechs Mal mit 1 ml sterilem ddH₂O gewaschen.

2.2.5.2. Anzucht und Selektion von *Arabidopsis*-Pflanzen

Samen von *A. thaliana* wurden entweder sterilisiert (2.2.5.1.) und auf MS-Medium oder direkt auf Erde unsteril ausgesät. Um eine verbesserte und gleichmäßige Keimung der Samen zu erreichen, wurden die Platten oder Schalen zunächst fünf Tage bei 4°C inkubiert, bevor sie in die Klimakammer oder das Gewächshaus gestellt wurden. Für die Charakterisierung aller SALK- und GABI-KAT-Linien wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit). Die Selektion Kanamycin- oder Sulfadiazin-resistenter Linien erfolgte in Sterilkultur auf MS-Medium unter Zugabe von 50 mg/l Kanamycin bzw. 11,25 mg/l Sulfadiazin. Für die BASTA-Selektion wurden Samen direkt auf Erde ausgelegt und nach der Keimung im Abstand von vier Tagen zweimal mit einer 0,25 %igen BASTA-Lösung besprüht.

2.2.5.3. Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen

Zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *A. thaliana* wurde das Verfahren des Eintunkens von Blüten (Clough & Bent, 1998) mit den folgenden Abänderungen benutzt. Das Detergenz Silwet L-77 wurde durch Tween 20 ersetzt. Die über Nacht angezogene Agrobakterien-Kultur wurde nicht abzentrifugiert, sondern direkt mit der Infiltrationslösung (0,1 % Tween-20, 5 % Saccharose) versetzt.

2.2.5.4. Besprühen von Pflanzen mit Gibberellinsäure

Die Pflanzen wurden auf Erde im Gewächshaus angezogen und, sobald sie ihre zweiten Blätter entwickelt hatten, alle zwei bis drei Tage mittels eines Vaporisators mit einer GA₃-Lösung (0,2 % Silwet L-77, 100 µM GA₃) besprüht.

2.2.6. Analyse des Hefe-Protein-Protein-Interaktions-Netzwerkes

Für die Identifizierung des 8-Cores aus dem TALE-Netzwerk wurden zunächst alle Knoten mit nur einer Verbindung entfernt. Das Rest-Netzwerk stellte dann einen 2-Core dar. Nun wurden alle Knotenpunkte entfernt, die weniger als drei Verbindungen besaßen und das verbleibende Netzwerk daraufhin überprüft, ob alle Knoten auch nach diesem Schritt noch mindestens drei Verbindungen aufweisen. Waren Knoten entstanden, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden sie wiederum entfernt und das Netzwerk erneut geprüft.

Für die Analyse des Protein-Protein-Netzwerk aus Hefe wurde auf die Protein-Protein-Interaktions-Daten der Datenbank „The Grid“ (Breitkreutz *et al.*, 2003) zugegriffen. Die Extraktion der 8-Cores aus diesem Netzwerk wurde mit Hilfe eines PERL-Scripts durchgeführt, das Klaus Richter (MPIZ Köln) verfasst hat.

2.3. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AD	GAL4 Aktivator-Domäne
3AT	3-Aminotriazol
BD	GAL4 DNA-Bindungs-Domäne
bp	Basenpaar(e)
CaMV	Cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	N-Hexadecyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotide
dsRNA	doppelsträngige RNA
GA	Gibberellinsäure
GFP	Green fluorescence protein
LiAc	Liciumacetat
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
mRNA	Boten-RNA
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
RFP	Red fluorescence protein
RNAi	interferierende RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SAM	Sprossapikalmeristem
ssDNA	Herings-Sperma-DNA
T-DNA	Transfer-DNA
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

3. Ergebnisse

Homöodomänen-Proteine nehmen in den Entwicklungs-Prozessen von mehrzelligen Organismen eine wichtige Rolle ein. Die Homöodomäne an sich besitzt nur eine sehr geringe DNA-Bindungs-Spezifität, so dass diese Proteine durch weitere Faktoren reguliert werden müssen, um ihre spezifischen Funktionen wahrnehmen zu können. Für diese Transkriptionsfaktoren ist somit eine Einbindung in die genetischen und die Protein-Interaktions-Netzwerke der Zelle von entscheidender Bedeutung. Die Analyse von biologischen Netzwerken hat gezeigt, dass eines ihrer charakteristischen Merkmale die geringe Anfälligkeit gegen Störungen ist. Das heißt, dass viele Elemente ohne Störung der Gesamtfunktion entfernt werden können, da es aufgrund der starken Vernetzung Nebenpfade gibt. Dies spiegelt die Redundanz von Proteinen in Bezug auf bestimmte Funktionen wider.

Die TALE (Three amino acid loop extension)-Superfamilie stellt eine Untergruppe der Homöodomänen-Proteine dar, über deren molekulare Funktion in Pflanzen bisher wenig bekannt ist.

In *A. thaliana* besteht aufgrund des sequenzierten Genoms die Möglichkeit, die TALE-Superfamilie als Ganzes zu betrachten und mögliche gemeinsame Regulationsmechanismen zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Ansätze gewählt und miteinander verknüpft. Um die Funktion der TALE-Proteine auf der pflanzlichen Ebene zu untersuchen, sollten Mangel- und Überexpressions-Mutanten hergestellt und charakterisiert werden. Um Einblicke in die Funktion auf der molekularen Ebene zu bekommen, wurde die Einbindung der TALE-Proteine in die Interaktions-Netzwerke der Zelle analysiert. Hierfür wurde mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems systematisch nach Interaktionen gesucht. Die identifizierten Proteine sollten wiederum mit genetischen und zellbiologischen Methoden auf ihre Rolle in den Regulations-Prozessen der TALE-Proteine auf der pflanzlichen Ebene untersucht werden.

3.1. Die TALE-Superfamilie in *A. thaliana*

Basierend auf den Homologien der Proteinsequenzen können der Superfamilie der TALE-Proteine in *A. thaliana* zwanzig Mitglieder zugeordnet werden. Neben der für die Superfamilie charakteristischen Homöodomäne mit drei zusätzlichen Aminosäuren (Prolin-Tyrosin-Prolin) zwischen den ersten beiden der drei Helices besitzen die Proteine zusätzliche Domänen, die eine Einteilung in die BEL- und KNOX-Familien erlauben.

Der Familie der BEL-Proteine von *A. thaliana* gehören neben dem namensgebenden BEL1 (Reiser *et al.*, 1995) die Proteine ATH1 (*A. thaliana* homeobox1) (Quaedvlieg *et al.*, 1995)

und BLH1 bis 3 (BEL1 homologous) sowie sieben weitere Proteine an, die mit BLH4 bis 10 bezeichnet wurden (vgl. Abb. 3.1).

Die KNOX-Familie wird aufgrund von Sequenzmerkmalen der Homöodomäne in die Klassen 1 und 2 eingeteilt (Kerstetter *et al.*, 1994). In *A. thaliana* gibt es acht KNOX-Proteine, die mit KNAT1 bis 7 (**K**notted like *A. thaliana*) (Lincoln *et al.*, 1994; Serikawa *et al.*, 1996) sowie STM (Shootmeristemless) (Long *et al.*, 1996) bezeichnet werden. Der KNOX-Klasse 1 gehören die Proteine KNAT1, 2, 6 und STM an, der Klasse 2 die Proteine KNAT3, 4, 5 und 7.

Die BEL-Gene von *A. thaliana* haben eine stark konservierte Exon-Intron-Struktur. In der zwischen 1290 und 2040 bp langen kodierenden Region befinden sich jeweils drei Introns. Eines liegt in der Mitte der BELL-Domäne, die anderen beiden befinden sich in der Homöobox, Intron II zwischen den Sequenzen, die für die erste und zweite α -Helix kodieren, Intron III innerhalb der für die Helix 3 kodierenden Sequenz.

Die KNOX-Gene kodieren für 290 bis 420 Aminosäuren und sind in ihrer Exon-Intron-Struktur in den beiden Klassen unterschiedlich aufgebaut. Allen Genen bis auf *STM* gemeinsam sind die Introns an konservierten Positionen in der KNOX 2-Domäne (fehlt bei *STM*) und in der Homöobox, zu Beginn der Sequenz, die für die zweite Helix kodiert. Neben diesen beiden Introns besitzen die Klasse 1-Gene außerdem noch ein Intron in der KNOX 1-Domäne sowie hinter der KNOX 2-Domäne. Die Gene der KNOX-Klasse 2 verfügen mit Ausnahme von *KNAT7* über drei weitere Introns, von denen eines am Ende der KNOX2-Domäne, eines in der ELK-Domäne und eines hinter der Homöobox positioniert ist. *KNAT7* fehlt das Intron hinter der Homöobox.

Ein Vergleich der Sequenzen der TALE-Proteine von *A. thaliana* zeigt eine starke Konservierung der für die Super-Familie charakteristischen Homöodomäne sowie der für die BEL- und KNOX-Familie charakteristischen Domänen (Abb. 3.1). Die BEL-Proteine haben die BELL-Domäne und die sogenannte SKY-Box gemeinsam. Bei den KNOX-Proteinen lässt sich ein Unterschied zwischen den Proteinen der Klasse 1 und der Klasse 2 in Bezug auf die Homöodomäne und die unmittelbar N-terminal gelegene ELK-Domäne erkennen. Die in anderen Pflanzenarten in der Klasse 1 vorkommende GSE-Box zwischen der KNOX- und der ELK-Domäne lässt sich in den *Arabidopsis*-Proteinen nicht ausmachen.

Ein auf der Basis der Homologien aller *Arabidopsis*-TALE-Proteine erstellter Verwandtschaftsbaum zeigt zum einen die Einteilung in die zwei Familien und zum anderen die Aufteilung der KNOX-Proteine in ihre zwei Klassen (Abb. 3.2). Innerhalb der BEL-Familie lässt sich keine starke Gruppierung der verschiedenen Proteine erkennen.

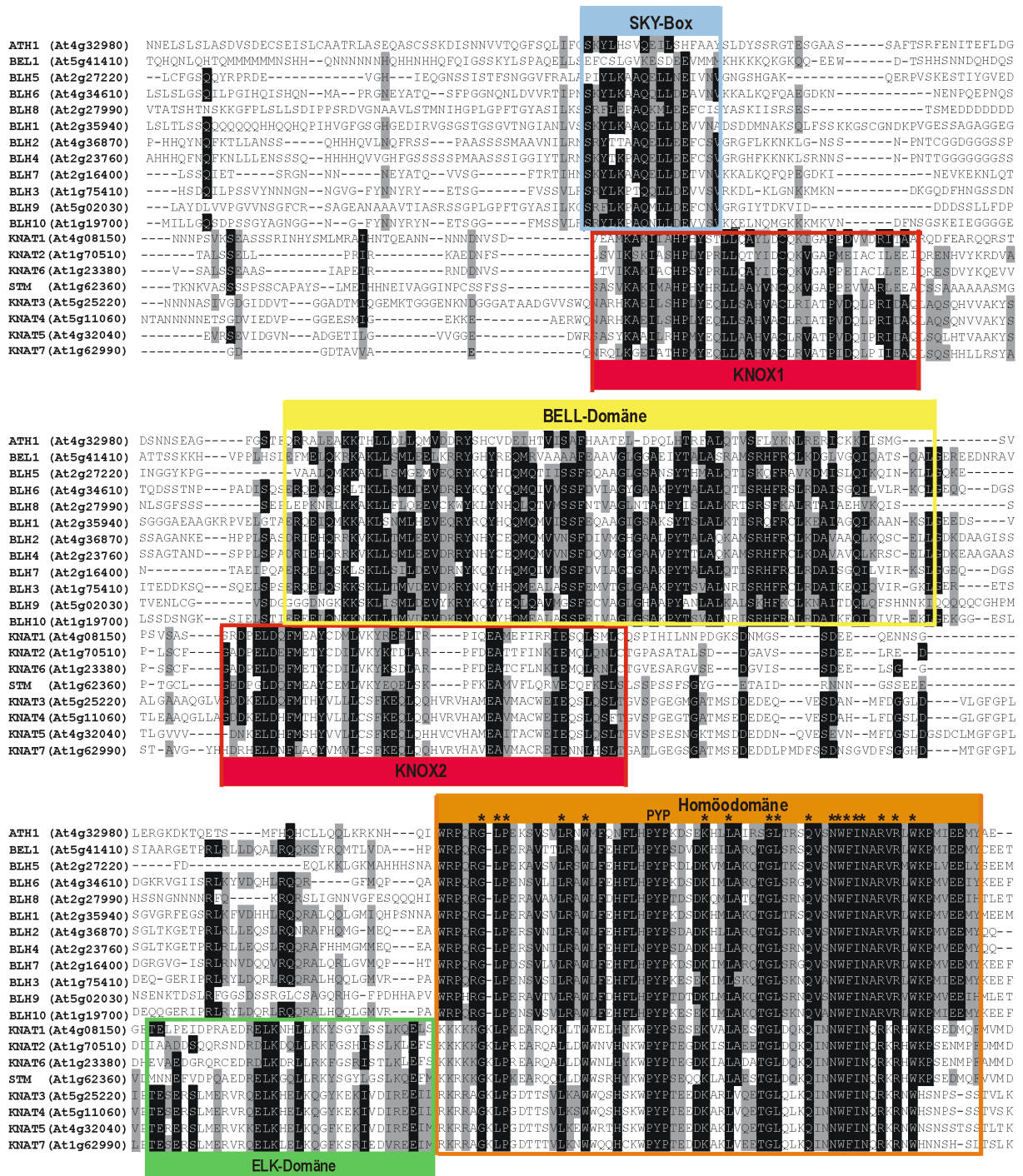


Abb. 3.1: Multipler Sequenzvergleich der TALE-Proteine von *A. thaliana*. Die konservierten Positionen sind grau (Ähnlichkeit $\geq 60\%$ in den Familien) bzw. schwarz (Identität $\geq 60\%$ in den Familien) hinterlegt. Aminosäuren, die in allen Sequenzen identisch sind, sind durch einen Stern über der Sequenz gekennzeichnet; der für die TALE-Superfamilie kennzeichnende Einschub von drei Aminosäuren ist durch „PYP“ über den Sequenzen markiert. Die für die Familien charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken hervorgehoben. Lücken, die für optimale Sequenzhomologie eingefügt wurden, sind durch Bindestriche gekennzeichnet.

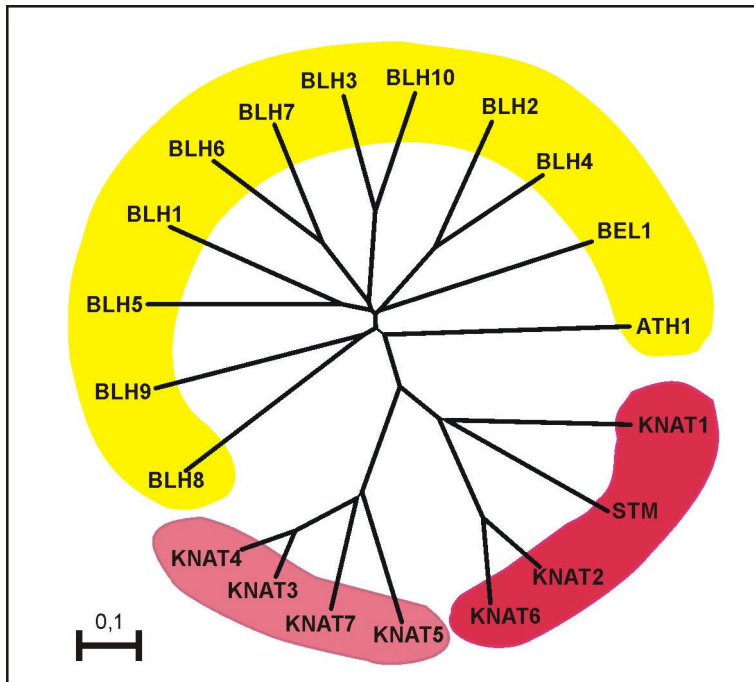


Abb. 3.2: Verwandtschaftsbaum der TALE-Proteine in *A. thaliana*, basierend auf den Sequenzhomologien. Gelb hinterlegt: BEL-Proteine, rötlich hinterlegt: KNOX-Proteine der Klasse 1 und 2. Der Eichstrich beschreibt die Strecke im Diagramm, die für 0,1 Aminosäure-Austausch pro Position steht.

3.2. Analyse von Mutanten der BEL-Gene

Die Veränderung der Expression von Genen kann Anhaltspunkte über deren Funktion im Organismus liefern. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich zwei Mutanten bekannt, die auf einen Verlust der Funktion von TALE-Genen zurückzuführen sind, und von zwei KNOX-Genen war ein Effekt der Überexpression beschrieben. Die Familie der KNOX-Proteine ist seit 13 Jahren Gegenstand der Forschung, während BEL-Proteine erst in den letzten Jahren in verschiedenen Pflanzenarten entdeckt wurden. Da in dieser Arbeit die Funktion der TALE-Proteine sowohl mit einer genetischen als auch mit einer molekularen Herangehensweise untersucht werden sollten, wurde die zeitaufwändige Analyse von Mutanten auf die BEL-Familie beschränkt. Weiterhin wurden die Untersuchungen des mRNA-Gehaltes nur in phänotypisch auffälligen Linien durchgeführt.

3.2.1. Analyse von Mangelmutanten der BEL-Gene

Eine Störung der Expression funktionaler Proteine kann experimentell auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Zum einen existieren für *A. thaliana* Sammlungen von Insertionslinien. Die Insertion von DNA in regulatorische oder kodierende Bereiche von Genen kann hier zu einem Funktionsverlust führen.

Ein anderer Weg der Unterbrechung der Genexpression ist die Methode der interferierenden RNA (RNAi). Hierbei löst die Ausbildung doppelsträngiger RNA-Moleküle den sequenz-spezifischen Effekt der posttranskriptionalen Genunterdrückung (PTGS) aus.

3.2.1.1. Untersuchung von Insertionslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben verschiedene Linien der GABI-KAT-Kollektion mit Insertionen in vier unterschiedlichen BEL-Genen unter Langtagbedingungen aufgezogen und untersucht. Die Lage der Insertionen ist in Abb. 3.3 schematisch dargestellt. Bei der *BLH1*-Insertionslinie 484D08 befindet sich die T-DNA 108 bp vor dem Start-Codon und somit im putativen Promotor-Bereich des Gens. In der zweiten Insertionslinie 114D09 befindet sich die T-DNA unmittelbar am Anfang der kodierenden Sequenz, was dazu führen sollte, dass kein BLH1-Protein gebildet wird.

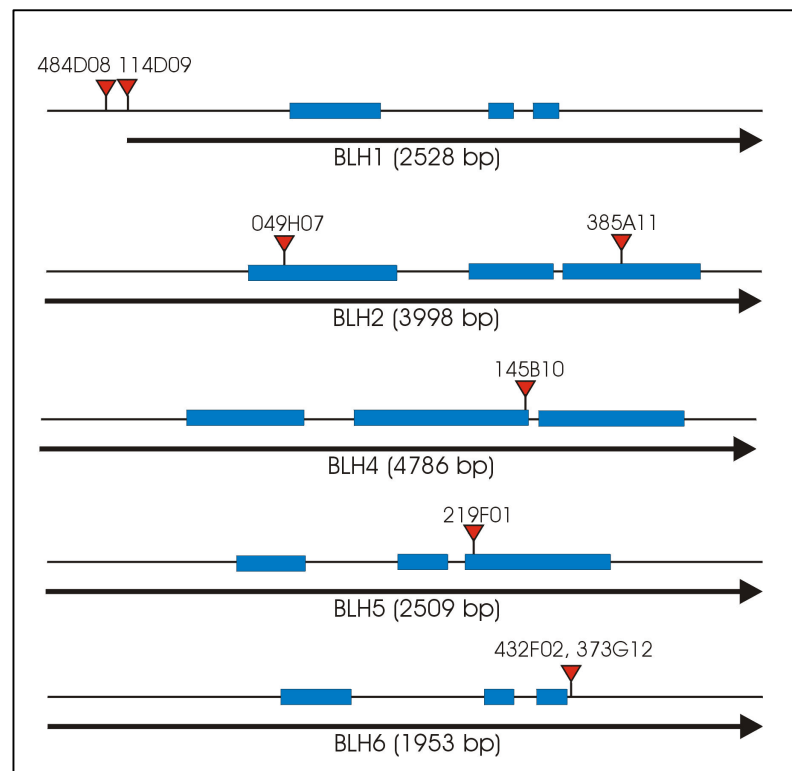


Abb. 3.3: Lage der Insertionen in den einzelnen GABI-KAT-Linien. Die Pfeile geben das Gen beginnend mit dem Startcodon wieder. Die Intron-Bereiche sind durch blaue Rechtecke gekennzeichnet, während die Insertion durch ein rotes Dreieck dargestellt ist.

Bei den *BLH2*-, *BLH4*- und *BLH5*-Insertionslinien befinden sich die Insertionen jeweils in den Introns. Die Insertionen in den *BLH6*-Linien liegen im Bereich, der für die Homöodomäne kodiert und sollten zur Expression deletierter Proteine führen.

Jeweils 50 Samen der aufspaltenden T2-Generation wurden auf Selektionsmedium ausgelegt und die resistenten Pflanzen dann weiter unter Langtagbedingungen im Gewächshaus aufgezogen. In allen untersuchten Linien konnten keine auffälligen, vom Wildtyp abweichenden Phänotypen festgestellt werden. Die Anwesenheit der Insertionen in den Sulfadiazin-resistenten Pflanzen wurde mittels PCR auf genomischen DNA-Präparaten verifiziert. Mit Oligonukleotiden, die auf die Sequenz vor und hinter der

Insertion im Gen passen, wurde untersucht, ob die Pflanzen homozygot oder heterozygot für die Insertion waren. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Charakterisierung der Insertionslinien. Jeweils 50 Samen der aufspaltenden T2-Generation wurden auf MS-Platten mit Sulfadiazin ausgelegt. Die resistenten Keimlinge wurden anschließend im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen. Keine der Pflanzen zeigte einen vom WT abweichenden Phänotyp. Das Vorhandensein der Insertion und der Anteil der homozygoten Pflanzen wurde durch PCR auf der genomischen DNA ermittelt. Die GABI-KAT-Nummer, das betroffene Gen und die Lage der Insertion im Gen sind angegeben.

GABI-KAT-Linie	betroffenes Gen	Lage der Insertion im Gen	Anzahl gekeimter Samen	Anzahl resistenter Samen	Verhältnis Anzahl resistente zu gekeimten Samen (%)	Anteil der für die Insertion homozygoten Pflanzen (%)
484D08	BLH1	5'-UTR	35	32	91,4	33,3
114D09		1. Exon	49	34	69,3	35,0
049H07	BLH2	1. Intron	34	26	76,4	5,2
385A11		3. Intron	50	38	76,0	18,7
219F01	BLH5	3. Intron	42	30	71,4	38,1
432F02	BLH6	4. Exon	48	24	50,0	30,0
373G12		4. Exon	50	37	74,0	36,8

Das Verhältnis der resistenten zu den gekeimten Samen gibt einen Anhaltspunkt dafür, ob in der Linie nur eine oder aber mehrere T-DNA-Insertionen vorliegen. Handelt es sich um eine einzelne Insertion, sollten in der aufspaltenden Generation ungefähr 75% der Pflanzen die Insertion in mindestens einem Chromosom besitzen und somit resistent sein. Beim Vorhandensein von zwei ungekoppelten Insertionen hingegen würde nur 1/16 der Pflanzen weder die eine noch die andere Insertion besitzen und alle restlichen Pflanzen (93,75%) wären resistent.

Bei der *BLH1*-Linie 484D08 spricht die hohe Anzahl der resistenten Keimlinge dafür, dass hier mehr als eine Insertion vorliegt. Alle anderen Linien haben ein Verhältnis von resistenten zu gekeimten Samen, das auf das Vorhandensein nur einer Insertion oder aber mehrerer gekoppelter Insertionen hindeutet.

Nach der Mendelschen Verteilung sollten von den resistenten Pflanzen mit nur einer Insertion 2/3 heterozygot und 1/3 homozygot für die Insertion sein. Bei Linien mit zwei ungekoppelten Insertionen sind hingegen 4/16 aller Pflanzen, also 4/15 (26,6%) der resistenten Pflanzen homozygot für die gesuchte Insertion.

Die Linien von *BLH5*, *BLH6* und die *BLH1*-Linie 114D09 entsprechen diesen statistischen Erwartungen. Bei den *BLH2*-Linien war der Anteil der Pflanzen, die für die Insertion homozygot waren, deutlich geringer als erwartet.

Die *BLH1*-Linie 484D08 zeigte einen Anteil homozygoter Pflanzen, der der Annahme, dass mehrere Insertionen vorliegen, widerspricht.

3.2.1.2. Herstellung und Untersuchung von Mangelmutanten mittels interferierender RNA

Bei der Unterdrückung der Genexpression durch RNAi wird in den Organismus ein DNA-Stück eingeführt, das einen Abschnitt des zu unterdrückenden Gens in normaler und in reverser Orientierung enthält. Der durch die entstehenden doppelsträngigen RNA-Moleküle ausgelöste Effekt der PTGS ist sequenz-spezifisch.

Um zu gewährleisten, dass nur das jeweilige Zielgen und nicht die homologen Gene vom PTGS betroffen ist, wurden für alle BEL-Gene kurze DNA-Sequenzen ausgewählt, die bei einer BLAST-Analyse gegen das *Arabidopsis*-Genom keine Abschnitte aufwiesen, die eine vollständige Homologie von mehr als 18 Basen zu anderen Genen hatten (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Übersicht über die für die RNAi-Experimente verwendeten Genfragmente. Angegeben sind die Basenpositionen in den cDNA-Sequenzen, wobei das Adenin des Startcodons als Base 1 gezählt wird. Bei den Genen *BLH5* und *BEL1* ist die Position der Deletion angegeben.

Gen	RNAi-Abschnitt	Klonierungsstrategie
<i>BLH1</i>	1-400	PCR mit Oligonukleotidpaar JH004, JH037
<i>BLH2</i>	1-350	PCR mit Oligonukleotidpaar JH005, JH038
<i>BLH3</i>	1-384	PCR mit Oligonukleotidpaar JH008, JH044
<i>BLH4</i>	1616-1884	PCR mit Oligonukleotidpaar JH036, JH015
<i>BLH5</i>	Δ 161-844	Deletion durch <i>XhoI</i> -Verdau des <i>BLH5</i> -Entry-Klons
<i>BLH6</i>	1-380	PCR mit Oligonukleotidpaar JH002, JH041
<i>BLH7</i>	1-322	PCR mit Oligonukleotidpaar JH007, JH039
<i>BLH8</i>	1-350	PCR mit Oligonukleotidpaar JH003, JH043
<i>BLH9</i>	1-467	PCR mit Oligonukleotidpaar JH009, JH045
<i>BLH10</i>	1-282	PCR mit Oligonukleotidpaar JH010, JH042
<i>BEL1</i>	Δ 250-1767	Deletion durch <i>BclI</i> -Verdau des <i>BEL1</i> -Entry-Klons
<i>ATH1</i>	1-262	PCR mit Oligonukleotidpaar JH011, JH040

Diese DNA-Sequenzen wurden durch Rekombination in den pJawohl8-RNAi-Vektor kloniert und über *A. tumefaciens* in *A. thaliana* Col0-Pflanzen eingebracht. Die transformierten Samen wurden durch BASTA-Behandlung selektiert.

10 von 15 der *BEL1*-RNAi-Pflanzen zeigten denselben, aberranten Phänotyp (Abb. 3.4). Alle Schoten waren verglichen mit WT-Schoten stark verkürzt (Abb. 3.4b). Die Samenanlagen (Ovulen) in den Schoten waren verkümmert und hatten teilweise eine glockenförmige Struktur (Abb. 3.4c). Diese Beobachtungen stimmen mit dem schon früher beschriebenen Phänotyp rezessiver *bell*-Mutanten überein.

Bei den *BLH9*-RNAi-Pflanzen kam es in 10 von 25 Fällen zu einer Änderung des phyllotaktischen Musters. Die Anlage von aufeinanderfolgenden Lateralorganen an den Flanken des Sprossapikalmeristems führt zu einem für jede Pflanzenart vorbestimmten Muster, das die charakteristische Phyllotaxis (griech. Blattanordnung) hervorbringt.

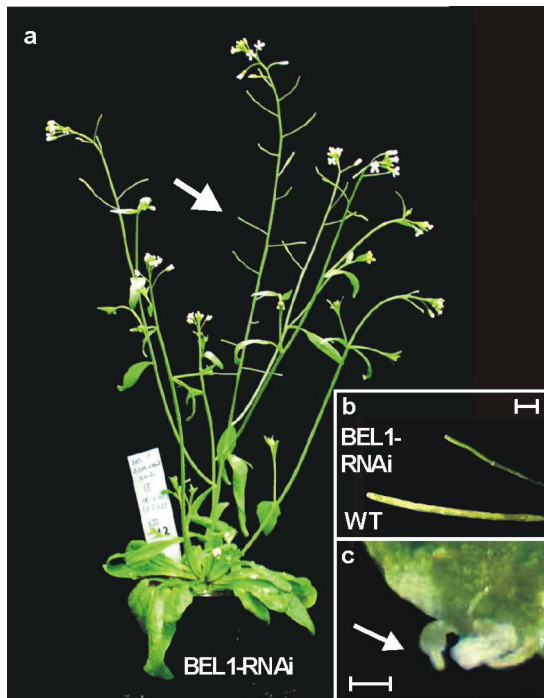


Abb. 3.4: Phänotyp der *BEL1*-RNAi-Pflanzen. **a**, Gesamthabitus. Alle Schoten sind deutlich verkürzt (Pfeil). **b**, Vergleich der Schoten der RNAi-Pflanze mit dem WT. Eichstrich: 2 mm. **c**, Präparation einer glockenförmigen Samenanlage aus einer Schote der RNAi-Pflanze (Pfeil). Eichstrich: 0,1 mm.

Bei *A. thaliana* kommt es zu einer spiralförmigen Phyllotaxis, die durch die regelmäßige Anlage der aufeinanderfolgenden Primordien der Lateralorgane in einem Winkel von $137,5^\circ$ zueinander entsteht. Die sich später am Spross entwickelnden Blätter und Nebensprosse stehen somit normalerweise in einem regelmäßigen Abstand zueinander. Bei den zehn *BLH9*-RNAi-Pflanzen initiierten hingegen jeweils drei oder vier Blätter mit Nebensprossen an demselben Knoten des Hauptsprosses (Abb. 3.5).

Gesamtzahl der untersuchten Pflanzen	25
Anzahl der Pflanzen mit Dreier-Verzweigungen	7
Anzahl der Pflanzen mit Vierer-Verzweigungen	3

Abb. 3.5: Phänotyp einer *BLH9*-RNAi-Pflanze, bei der das phyllotaktische Muster verändert ist. Die Anzahl der Pflanzen, bei denen phyllotaktische Veränderungen auftraten, ist angegeben.



Die RNAi-Linien aller anderen *BEL*-Gene zeigten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen.

Die RNA von Rosettenblättern der phänotypisch auffälligen Pflanzen wurde isoliert, mit Hilfe eines poly-dT-Oligonukleotids in cDNA umgeschrieben und durch PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden auf den ursprünglichen Gehalt an *BEL1*- bzw. *BLH9*-mRNA analysiert. In den Blättern der RNAi-Pflanzen ist nur noch sehr wenig *BEL1*- bzw.

keine *BLH9*-mRNA mehr nachweisbar (Abb. 3.6). Die phänotypischen Veränderungen sind also höchstwahrscheinlich auf die Suppression der entsprechenden BEL-Gene zurückzuführen.

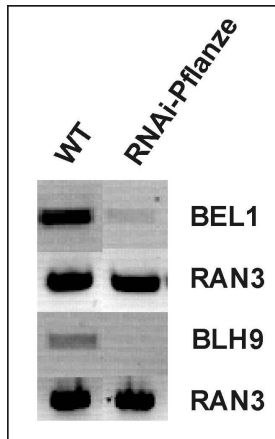


Abb. 3.6: RT-PCR auf RNAi-Pflanzen im Vergleich zum WT. Auf RNA-Präparaten aus Blättern wurde in einer RT-PCR das Vorhandensein der *BEL1*- bzw. *BLH9*-mRNA überprüft. Die Menge der *BEL1*-mRNA ist in der RNAi-Pflanze im Vergleich zum WT stark reduziert, die *BLH9*-mRNA im *BLH9*-RNAi-Präparat ist nicht mehr nachweisbar. Als Kontrolle diente jeweils die Amplifikation von *RAN3*-mRNA.

3.2.2. Analyse der Überexpression der BEL-Gene

Die ektopische Expression von Homöobox-Genen hat häufig schwerwiegende phänotypische Veränderungen zur Folge. An Stellen, an denen ihre Genfunktion in Wildtyppflanzen unterdrückt ist, können sie in Überexpressions-Mutanten Entwicklungsprogramme anschalten und dadurch für die Ausprägung von Merkmalen an nicht dafür vorgesehenen Stellen sorgen. Aus der Art dieser Veränderungen lassen sich oftmals Schlüsse auf die Funktion der betroffenen Gene ziehen.

Um die Auswirkungen einer Überexpression der BEL-Proteine zu untersuchen, wurden die cDNA-Sequenzen aller BEL-Gene in den pLEELA-Vektor kloniert, der einen doppelten CaMV35S-Promotor besitzt. Über Agrobakterien wurden diese DNA-Abschnitte in *Arabidopsis*-Pflanzen eingebracht. Jeweils 24 der BASTA-resistenten Pflanzen wurden pikiert (Ausnahme: BLH5, dort nur 11 Pflanzen resistent) und weiter unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen. Das Ergebnis der phänotypischen Charakterisierung ist in Tab. 3.3 dargestellt. Die nicht erwähnten Linien zeigten keine Auffälligkeiten.

Tab. 3.3: Übersicht über die phänotypische Charakterisierung der BEL-Überexpressionslinien. Es wurden jeweils 24 Pflanzen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen.

Überexpressions-Linie	Anzahl der veränderten Pflanzen	Art der Veränderung
BEL1	20	stark verkürzte Schoten
ATH1	4	kein Streckungswachstum
BLH4	4	verkümmerte Blüten, keine Samenbildung

Zwanzig der *BEL1*-Überexpressions-Pflanzen hatten nach der Blüte stark verkürzte Schoten, wie es auch bei den *BEL1*-RNAi-Pflanzen der Fall gewesen ist (Abb. 3.7).



Abb. 3.7: Vergleich einer der auffälligen 35S::*BEL1*-Pflanzen mit einer WT-Pflanze. Die Überexpressions-Pflanze bildet durchgehend verkürzte Schoten (roter Pfeil) im Vergleich zum WT (weißer Pfeil).

Bei vier der *ATH1*-Überexpressions-Pflanzen (35S::*ATH1*) blieb das normalerweise mit Beginn der reproduktiven Phase einsetzende Streckungswachstum des Stängels aus (Abb. 3.8). Die Infloreszenzen und die Stängelblätter befanden sich daher direkt auf der Rosette. Sowohl die Blüten als auch die sich aus ihnen entwickelnden Schoten waren sehr instabil und fielen häufig vorzeitig von der Pflanze ab.



Abb. 3.8: Blütenstand einer 35S::*ATH1*-Pflanze. Ein Streckungswachstum ist gänzlich ausgeblieben, so dass sich die Hochblätter und die Blüten unmittelbar auf der Rosette ausbilden.

Die vier auffälligen *BLH4*-Pflanzen bildeten wenige Seitensprosse und sterile Blüten, die nur verkümmerte Schoten hervorbrachten, in denen sich keine vollständigen Samenanlagen entwickelten. Eine Rückkreuzung der Pollen dieser Pflanzen auf Stempel von WT-Pflanzen ergab nur sehr wenige Samen, die alle zu WT-Pflanzen auswuchsen.

Die Überexpression der *BEL*-Gene in den auffälligen Pflanzen wurde mittels RT-PCR überprüft. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Stängelblättern (in den *ATH1*-Pflanzen aus Rosettenblättern) isoliert und durch reverse Transkription mit einem poly-dT-

Oligonukleotid in cDNA umgeschrieben. Durch eine PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden auf der erhaltenen cDNA und einer entsprechenden WT-Probe konnte eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes in den Blättern der *ATH1* und *BLH4*-Mutanten verglichen mit dem WT nachgewiesen werden. Die phänotypisch auffälligen *BEL1*-Pflanzen wiesen weder einen erhöhten noch einen reduzierten Gehalt an *BEL1*-mRNA auf (Abb. 3.9). Der beobachtete Phänotyp ist somit nicht auf eine Überexpression des Genes zurückzuführen.



Abb. 3.9: RT-PCR-Analyse der 35S::BEL-Pflanzen. Es wurde RNA aus den Stängelblättern (bei 35S::ATH1 aus den Rosettenblättern) der phänotypisch auffälligen Pflanzen und aus WT-Pflanzen isoliert. In einer RT-PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden auf diesen Präparaten wurde der Gehalt der entsprechenden mRNAs im Vergleich zu dem der WT-Pflanzen getestet. Als Kontrolle diente jeweils eine PCR mit RAN3-spezifischen Oligonukleotiden. Linke Spalte: PCR-Produkte der 35S-Pflanzen, rechte Spalte: PCR-Produkte der WT-Pflanze. Rechts angegeben sind die Gene, auf deren mRNA-Gehalt getestet wurde.

Zusammenfassung

Die Analyse von sieben Insertionslinien, die putative Mangelmutanten von vier verschiedenen BEL-Proteinen darstellen könnten, ergab keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Untersuchung der Keimungsraten und des Anteils der homozygoten Pflanzen deutet darauf hin, dass wenigstens sechs der Linien nur eine Insertion in ihrem Genom besitzen und die Verteilung der homozygoten Pflanzen in etwa den statistischen Erwartungen nach den Mendelschen Gesetzen entspricht. Für alle BEL-Gene wurden Mangelmutanten mittels der RNAi-Technik hergestellt. Die *BEL1*-RNAi-Linie ergab Pflanzen, die einen Defekt in der Ovulen-Entwicklung aufwiesen, der dem in der Literatur beschriebenen Phänotyp von rezessiven *bell*-Mutanten entsprach. Die Analyse von BEL-Überexpressions-Pflanzen, ergab einen aberranten Phänotyp für die Gene *ATH1*, *BEL1* und *BLH4*. Bei den 35S::*ATH1*-Pflanzen blieb das Streckungswachstum des Stängels vollständig aus. Die 35S::*BEL1*-Pflanzen entsprachen in ihrer Erscheinung den *BEL1*-RNAi-Pflanzen und die 35S::*BLH4*-Pflanzen bildeten sterile Blüten. Durch RT-PCR-Untersuchung konnte für die *ATH1*- und *BEL1*-Pflanzen eine Überexpression der jeweiligen Gene nachgewiesen werden.

3.3. Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen der TALE-Proteine mittels des Hefe-zwei-Hybrid-Systems

Mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems (siehe 2.2.3.1.) wurden alle TALE-Proteine auf die Interaktions-Fähigkeit miteinander untersucht, um einen vollständigen Überblick über die möglichen TALE-Dimere in *A. thaliana* zu erhalten. Ferner sollten durch das Verfahren des Screenens von cDNA-Bibliotheken im großen Maßstab interagierende Proteine außerhalb der TALE-Superfamilie gesucht werden, die putative neue Faktoren in der Regulation der TALE-Proteine darstellen. Die Abb. 3.10 zeigt eine schematische Übersicht der zu diesem Zweck verwendeten Strategie.

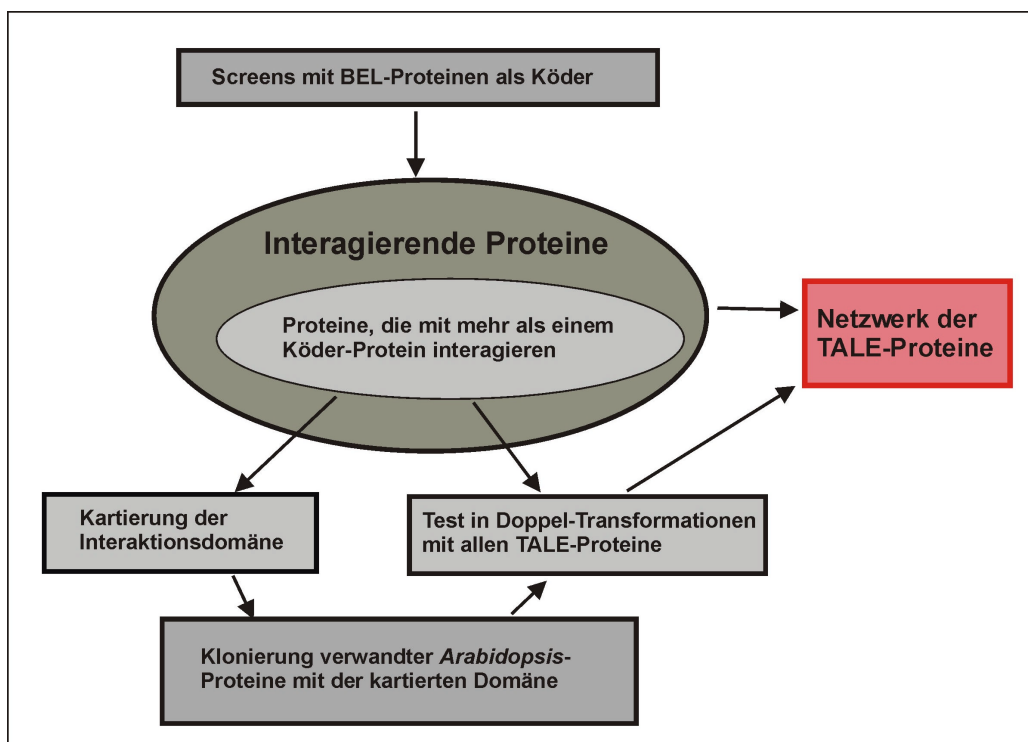


Abb. 3.10: Strategie für die Suche nach allgemeinen regulatorischen Interaktionspartnern der TALE-Proteine.

Zunächst wurden alle BEL-Proteine als Köder in Screens gegen mehrere verschiedene *A. thaliana*-cDNA-Bibliotheken eingesetzt. Aus der Gruppe der interagierenden Proteine wurden diejenigen ausgewählt, die mit mehreren der BEL-Proteine erhalten wurden. Diese wurden durch kombinatorische Doppeltransformationen auf ihre Wechselwirkungen mit allen TALE-Proteinen getestet. Durch eine Deletionsanalyse wurden im Hefe-zwei-Hybrid-Verfahren die für die Interaktionen verantwortlichen Domänen kartiert und im *Arabidopsis*-Genom nach weiteren Proteinen mit diesen Domänen gesucht. Solche Gene wurden kloniert und die kodierte Proteine wiederum auf ihre Interaktionsfähigkeit mit den TALE-Proteinen getestet. Die erhaltenen Daten ergeben ein Interaktionsnetzwerk der

TALE-Proteine, das mit Methoden der Netzwerk-Analytik auf seine Relevanz untersucht werden kann.

3.3.1. Klonierung der TALE-Konstrukte und Test auf deren Verwendbarkeit im Hefe-zwei-Hybrid-System

Alle TALE-Gene lagen zu Beginn der Arbeit als cDNA-Sequenzen in TOPO-Vektoren kloniert vor. Mit Hilfe des Invitrogen Gateway-Systems wurden sie jeweils in den pACT2-attR und pAS2-attR-Vektor umklontiert.

Die GAL4-DNA-Bindungsdomänen und Aktivierungsdomänen-Fusionen der Vollängen-Gene wurden auf ihre Eignung im Hefe-zwei-Hybrid-System getestet. Hierfür wurden sie zusammen mit dem pACT-SNF4- bzw. dem pAS-SNF1-Vektor in Hefen transformiert und auf ihr Wachstum auf Selektions-Medium, dem die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin fehlten und das verschiedene Konzentrationen an 3AT enthielt (LWH“x“-Medium, x gibt den 3AT-Gehalt in mM an), getestet. Das Ergebnis ist in Tab. 3.4 zusammengestellt.

Tab. 3.4: Ergebnis des Tests auf unspezifische Reporter-gen-Aktivierung der TALE-Fusionsproteine. Die angegebenen Vektoren wurden jeweils zusammen mit pAS-SNF1- (bei pACT-Konstrukten) oder pACT-SNF4-Vektor (bei pAS-Konstrukten) in den Hefestamm PJ69-4a transformiert und auf Histidin-Prototrophie bei Anwesenheit der angegebenen Menge 3AT getestet. Ein „+“ gibt Wachstum auf dem Mangelmedium an, während ein „-“ die Nichtaktivierung des Reporter-gens darstellt.

Gen	LWH3-Medium	
	pACT2-Konstrukt	pAS2-Konstrukt
<i>BLH1</i>	-	-
<i>BLH2</i>	-	-
<i>BLH3</i>	-	-
<i>BLH4</i>	-	-
<i>BLH5</i>	-	-
<i>BLH6</i>	-	-
<i>BLH7</i>	-	-
<i>BLH8</i>	-	-
<i>BLH9</i>	-	-
<i>BLH10</i>	-	-
<i>BEL1</i>	-	-
<i>ATH1</i>	-	-

Gen	LWH3-Medium		LWH20-Medium
	pACT2-Konstrukt	pAS2-Konstrukt	
<i>KNAT1</i>	-	+	-
<i>KNAT2</i>	-	+	+
<i>KNAT3</i>	-	+	+
<i>KNAT4</i>	-	-	-
<i>KNAT5</i>	-	-	-
<i>KNAT6</i>	-	+	+
<i>KNAT7</i>	-	+	-
<i>STM</i>	-	+	-

Die Untersuchungen ergaben, dass alle Proteine als Aktivierungs-Domänen-Fusionen für den Einsatz im Hefe-zwei-Hybrid-System geeignet sind. Als GAL4-DNA-Bindedomänen-Fusionen erwiesen sich alle BEL-Proteine, sowie KNAT4 und 5 unter den Standardbedingungen als geeignet. Die KNOX-Proteine KNAT1, 7 und STM wiesen bei Zugabe von 20 mM 3AT zu Selektionsmedium ebenfalls keine Selbstaktivierung auf.

3.3.2. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der TALE-Superfamilie

Um einen vollständigen Überblick über alle möglichen Interaktionen der Proteine innerhalb der TALE-Superfamilie zu bekommen, wurden in einem Ansatz kombinatorischer Doppeltransformationen Hefen mit den TALE-Konstrukten transformiert und auf die Aktivierung der Reporter-Gene getestet.

Für eine Prüfung der BEL/KNAT-Interaktionen wurde der Stamm AH109 im Mikrotiter-Platten (MTP)-Format jeweils mit den BEL-Genen im pAS-Vektor und den KNAT-Genen im pACT-Vektor transformiert. Die mit beiden Vektoren transformierten Kolonien wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Nach drei Tagen Wachstum wurden die Hefen in einer MTP in Wasser resuspendiert und auf Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin überstempelt, das verschiedene Konzentrationen an 3AT enthält. Mittels eines β -Galaktosidase-Tests wurde die Aktivierung des zweiten Reporter-Gens *LacZ* überprüft. Das Ergebnis dieser Interaktions-Matrix ist in Abb. 3.11 dargestellt.

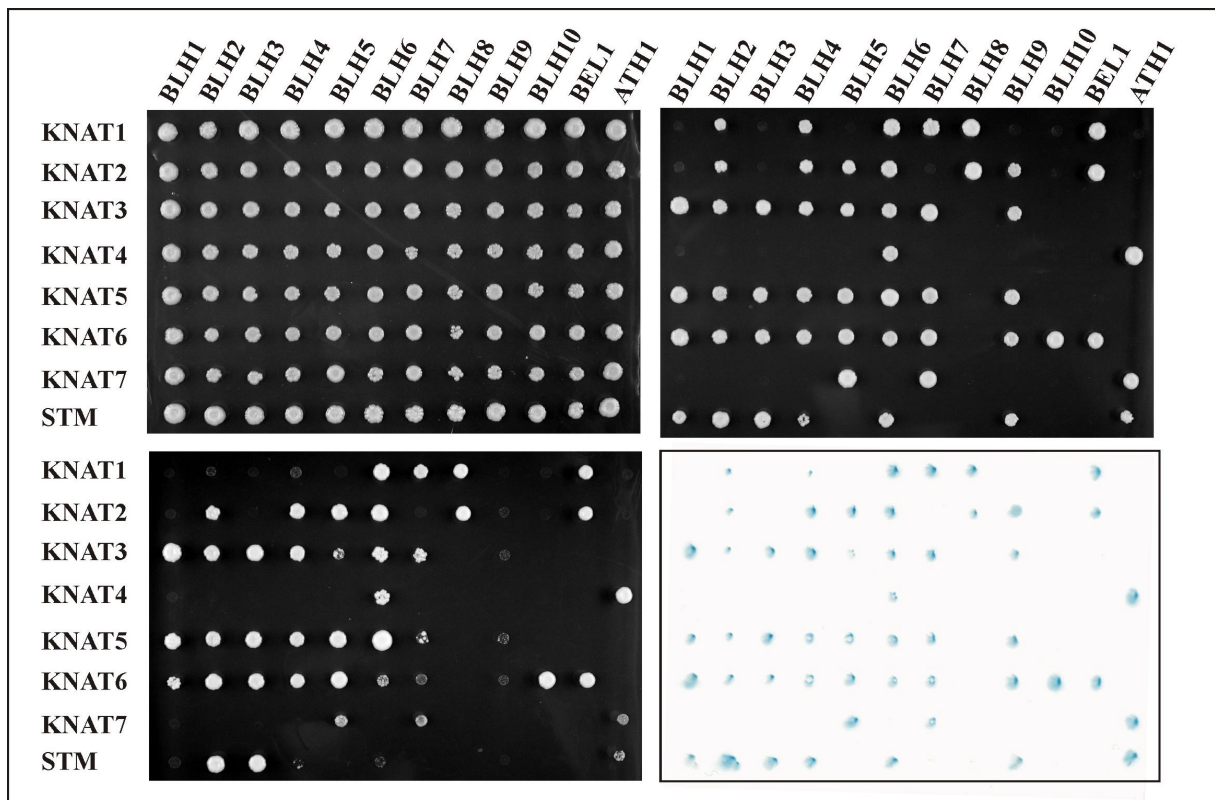


Abb. 3.11: Interaktionen innerhalb der *Arabidopsis*-TALE-Superfamilie im Hefe-zwei-Hybrid-System. Links oben: Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin; Rechts oben: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 3 mM 3AT; Links unten: Selektionsmedium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin mit 10 mM 3AT; Rechts unten: β -Galaktosidase-Test. Die entsprechenden pAS-BEL- und pACT-KNAT-Vektoren wurden durch Doppeltransformation in die Hefen eingebracht und diese auf Selektionsmedium überstempelt. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.

Um mögliche Interaktionen zwischen den Proteinen der BEL-Familie zu untersuchen, wurden Hefen mit allen Kombinationen der pACT-BEL- und pAS-BEL-Vektoren transformiert und wie schon für die BEL/KNAT-Untersuchungen beschrieben selektiert. Mit demselben Verfahren wurden Interaktionen innerhalb der KNOX-Familie untersucht, wobei einige Kombinationen aufgrund der Selbstaktivierung der Proteine KNAT2, 3 und 6 als Bindedomänen-Fusionen nicht ausgewertet werden konnten. Das Ergebnis aller Tests ist in Tab. 3.5 schematisch dargestellt.

Tab. 3.5: Interaktionen der TALE-Proteine im Hefe-zwei-Hybrid-System. Die pACT- und pAS-Vektoren wurden durch Doppeltransformation in den Stamm AH109 oder PJ69-4a eingebracht und die Hefen auf Aktivierung des *HIS3*-Reportergens durch Wachstum auf LWH3-Medium getestet (im Fall der KNOX/KNOX-Kombinationen wurde LWH20-Medium verwendet). Ein grün hinterlegtes „+“ gibt Wachstum auf dem Mangelmedium an. Ein rot hinterlegtes „-“ signalisiert das Ausbleiben des Wachstums. Weiße Felder geben an, dass die Kombination aufgrund der Selbstaktivierung der beiden Partner nicht getestet werden konnte.

	KNOX Klasse II				KNOX Klasse I				BEL											
	KNAT7	KNAT5	KNAT4	KNAT3	STM	KNAT6	KNAT2	KNAT1	ATH1	BEL1	BLH10	BLH9	BLH8	BLH7	BLH6	BLH5	BLH4	BLH3	BLH2	BLH1
BLH1	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
BLH2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH3	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
BLH4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BLH5	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH7	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH8	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH9	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BLH10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BEL1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATH1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT1	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNAT7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es wurden insgesamt 51 Kombinationen von BEL- und KNAT-Proteinen gefunden, die im Hefe-zwei-Hybrid-System miteinander interagieren können. Bis auf das BLH10-Protein haben alle TALE-Proteine mehr als einen Bindungspartner in der jeweils anderen Familie.

Von den 144 möglichen Kombinationen der BEL-Proteine fand in 19 Fällen eine Interaktion statt. Dabei handelte es sich in drei Fällen um Homodimerisierungen. Die Proteine BLH8 und BLH5 haben innerhalb der BEL-Familie keine Interaktionspartner.

Innerhalb der KNOX-Proteine wurden elf Paare gefunden; auch hier konnten in drei Fällen Homodimerisierungen nachgewiesen werden. Das Protein STM zeigt keine Interaktionen mit Mitgliedern der KNOX-Familie und auch für KNAT2 wurden in den untersuchten Kombinationen keine Wechselwirkungen festgestellt.

Die Dimerisierung von BEL- und KNOX-Proteinen wurde schon in verschiedenen Pflanzenarten beobachtet, und auch die Wechselwirkung von Proteinen innerhalb der KNOX-Familie ist beschrieben (Müller *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der Hefe-zwei-Hybrid-Untersuchungen aller TALE-Kombinationen zeigen, dass es auch zur Bildung von Komplexen der BEL-Proteine kommen kann.

3.3.3. Kartierung der Interaktionsdomänen

Die im Hefe-zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen geben Auskunft über die Fähigkeit der eingesetzten Proteine zu dimerisieren. Da in den oben angeführten Experimenten jeweils mehrere interagierende Partner mit einem getesteten Protein gefunden wurden, kann es *in vivo* auch zu einer Bildung von trimeren oder höher molekularen Komplexen kommen. Um erste Hinweise auf die Möglichkeit einer solchen Komplexbildung zu bekommen, ist die Betrachtung der Interaktions-Domänen wichtig. Hier wurden die Interaktions-Domänen der neu entdeckten BEL-BEL-Komplexe kartiert. Schon bekannt sind die Domänen, die für die Interaktion von BEL- und KNAT-Proteinen verantwortlich sind (Bellaoui *et al.* 2001; Müller *et al.*, 2001).

Für die Ermittlung der Interaktionsdomänen wurde in dieser Arbeit ebenfalls das Hefe-zwei-Hybrid-System eingesetzt. Deletionsbibliotheken wurden mit Hilfe eines ExonucleaseIII-Verdau hergestellt und in Screens mit den entsprechenden interagierenden Partnern durchmustert.

3.3.3.1. Konstruktion von Hefe-zwei-Hybrid-Vektoren für die unidirektionale Deletion von beliebigen Genen

Um die Herstellung von Deletionsbibliotheken einfach und unabhängig von der jeweiligen Gen-Sequenz durchführen zu können, wurden zwei neue Gateway-Vektor konstruiert.

Hierfür wurden in den pACT2-attR und den pAS2-attR mittels einer PCR jenseits der Rekombinationsstellen attR1 und attR2 jeweils zwei Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt. Diese besitzen eine acht Nukleotide lange Zielsequenz und sollten somit in den meisten Genen keine weiteren Schnittstellen haben.

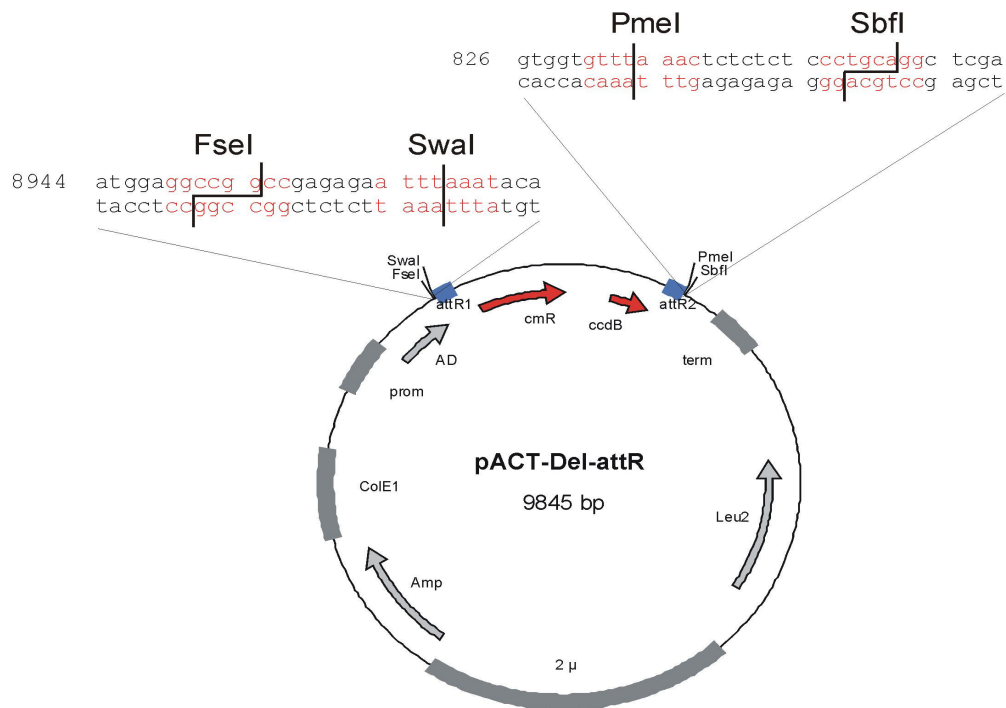


Abb. 3.11: Der Vektor pACT-Del-attR für die Herstellung unilateraler Deletionen durch Exonuclease III-Verdau. Hervorgehoben sind die in den pACT-attR-Vektor eingeführten Schnittstellen. Mit roten Pfeilen gekennzeichnet sind die Gene der Gateway-Kassette. Die blauen Rechtecke kennzeichnen die Sequenzen der beiden Rekombinations-Stellen. cmR: Chloramphenicol-Resistenz-Gen; ccdB: ccdB-Gen; term: ADH1 Terminator; Leu2: Leu2 kodierende Sequenz; 2µ: 2 µ Origin; Amp: Beta-Lactamase-Gen mit Promotor; ColE1: pBR322 Plasmid Replikations-Origin (*E. coli*); prom: ADH1 Promotor; AD: GAL4 AD Polypeptid (Codons 768-881) + HA-Epitop + SV40 T-Antigen NLS.

Die außen gelegenen Schnittstellen für *FseI* und *SbfI* weisen nach der Restriktion einen 3'-Überhang von vier Basen auf, der die DNA vor einem Angriff durch Exonuclease III schützt. Die auf der zum Gen hingewandten Seite liegenden Schnittstellen für *SwaI* und *PmeI* hingegen haben nach der Restriktion stumpfe Enden und können so von der Exonuclease III angegriffen werden (Abb. 3.11).

In die so klonierten Vektoren pACT-attR-del und pAS-attR-del können beliebige Gene mittels einer Gateway-LR-Reaktion rekombiniert werden. Nach Restriktionsverdau der entstehenden Vektoren mit den entsprechenden Enzymen können die Gene dann N- oder C-terminal deletiert werden. Die überstehenden Enden der erhaltenen Deletionen werden abgedaut und ligiert. Nach einer Vermehrung in *E. coli* kann die Bibliothek direkt in die Hefe transformiert werden.

Die mit den Köderproteinen in einem Screen erhaltenen kleinsten Interaktions-Partner können nach Restriktion mit den entsprechenden Enzymen von der anderen Seite ebenfalls mit Exonuclease III deletiert werden, um eine genaue Kartierung der Domänen zu erlangen. Die neuen Vektoren stellen eine Möglichkeit dar, im Hefe-zwei-Hybrid-System gefundene interagierende Proteine auch in größerem Maßstab auf ihre Interaktionsdomänen zu untersuchen, da sie die in herkömmlichen Verfahren benötigten zahlreichen Subklonierungen umgehen.

3.3.3.2. Kartierung der für die BEL-BEL-Interaktion verantwortlichen Domäne

Mittels des pACT-attR-del-Vektors wurde eine C-terminale Deletionsbibliothek von *BLH1* hergestellt, die mit dem BLH1-GAL4-DNA-Bindedomänen-Protein durchmustert wurde. Es wurden 96 Kandidaten in eine MTP gepickt und lysiert. Auf diesen Lysaten wurde in einer PCR der Bereich zwischen der Aktivierungsdomäne und dem Terminator amplifiziert. Die PCR, die das kleinste Produkt ergab, wurde sequenziert. Dabei handelte es sich um einen Klon, der die ersten 258 Aminosäuren des BLH1-Proteins kodiert und somit kurz vor der BELL-Domäne abbricht.

Mit Hilfe einer unmittelbar vor der SKY-Domäne im richtigen Leseraster liegenden *EcoRV*-Schnittstelle wurde der Klon auch N-terminal deletiert und auf seine Interaktionsfähigkeit mit einem Volllängen-BLH1-Konstrukt getestet. Die Ergebnisse der Interaktions-Tests sind in der Abb. 3.12 dargestellt.

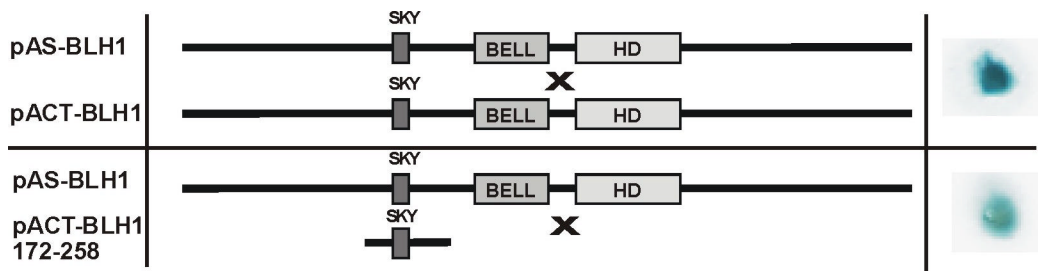


Abb. 3.12: Kartierung der BEL/BEL-Interaktionsdomäne. In der linken Spalte angegeben sind die Hefe-zwei-Hybrid-Konstrukte, die Zahlen geben die kodierten AS an. Die mittlere Spalte zeigt schematisch die Domänenstruktur. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse der β -Galactosidase-Tests dargestellt. Das Volllängen-BLH1-Protein homodimerisiert im Hefe-zwei-Hybrid-System. Ein deletierter Klon, der nur noch für die SKY-Domäne und den unmittelbar benachbarten Bereich kodiert, ist ausreichend für die Interaktion mit dem Volllängen-Protein.

Die SKY-Domäne alleine ist ausreichend, um eine Interaktion mit dem Volllängen-BLH1-Protein zu vermitteln.

3.3.4. Hefe-zwei-Hybrid-Screens zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der TALE-Proteine

Für die Identifizierung neuer Interaktionspartner der TALE-Proteine mittels Hefe-zwei-Hybrid-Screens standen drei verschiedene *Arabidopsis*-cDNA-Bibliotheken zur Verfügung, die aus Suspensionskultur-Zellen, grünem Pflanzenmaterial und ganzen Pflanzen gewonnen wurden. Um einen vollständigen Überblick über die Interaktionspartner der BEL-Proteine zu bekommen, wurden alle drei Bibliotheken mit jeweils allen zwölf BEL-Proteinen durchmustert. Dafür wurde ein verbessertes Verfahren durch Massen-Konjugation zweier Hefestämme unterschiedlichen Kreuzungstyps, das für große Durchsätze optimiert wurde, verwendet. Als Köderproteine wurden die Volllängen-Versionen der zwölf BEL-Proteine fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne eingesetzt.

Die nach Konjugation mit den Bibliotheken auf LWH3-Medium wachsenden Hefen wurden auf neue SD-LWH3-Platten übertragen und erneut angezogen. Auf diesen Interaktionskandidaten wurde eine Kolonie-PCR mit Oligonukleotiden, die auf die GAL4-Aktivierungsdomäne und den Terminator passen, gemacht, um die cDNA-Insertion zu amplifizieren. Mit Hilfe eines *TaqI*-Verdau der PCR-Produkte und anschließender Auftrennung in einem Agarose-Gel konnten gleiche Klone, die mehrmals erhalten wurden, anhand des spezifischen Bandenmusters erkannt und aussortiert werden. Die restlichen PCR-Produkte wurden unter Ausnutzung des Mechanismus der homologen Rekombination der Hefe in den leeren pACT-Vektor rekombiniert. Dieser Vektor wurde dann nach Konjugation mit dem ursprünglichen Köderstamm erneut auf Histidin-Prototrophie getestet. Von den so bestätigten Interaktionskandidaten wurde das PCR-Produkt sequenziert und in einer BLAST-Analyse gegen das *Arabidopsis*-Genom analysiert.

Die Tab. 3.6 gibt einen Überblick über die Beschaffenheit der Bibliotheken und die Screens.

Tab. 3.6: Übersicht über die Bibliotheken und Screens. Die Anzahl der vorhandenen Primärtransformanden in den einzelnen Bibliotheken ist angegeben. Der Durchschnitt der durchmusterter Zygoten bezieht sich auf das mittlere Ergebnis aus den jeweils mit allen zwölf BEL-Proteinen durchgeführten Screens. Die Zahl der analysierten Kandidaten stellt die Summe aus allen zwölf Screens dar.

	cDNA Bibliothek		
	Suspensions-Kultur	grünes Gewebe	ganze Pflanzen
Anzahl der Primärtransformanden	1×10^7	3×10^6	unbekannt
\emptyset durchmusterter Zygoten	$6,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
analysierte Kandidaten	173	81	92

Die Tabelle 3.7 gibt einen Überblick über die bestätigten interagierenden Proteine, wobei die ribosomalen Proteine weggelassen wurden, da sie im Hefe-zwei-Hybrid-System als bekannte Falsch-Positive gelten. Eine Liste der bisher noch nicht bestätigten Kandidaten befindet sich im Anhang.

Einige der Kandidaten wurden mit mehreren verschiedenen Köderproteinen der BEL-Familie erhalten. Bei ihnen könnte es sich um Proteine handeln, die eine konservierte Funktion in einem möglichen Netzwerk der BEL-Proteine besitzen. Da das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund der nicht immer ausreichend hohen Zahl von Zygoten nicht alle vorhandenen Interaktionen aufdeckt, wurden diese Proteine in kombinatorischen Doppeltransformationen nochmals auf die Interaktion mit allen BEL-Proteinen untersucht. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tab. 3.8 schematisch dargestellt. Alle sechs Proteine interagieren mit mindestens vier der BEL-Proteine.

Tab. 3.7: Bestätigte Kandidaten aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screens mit allen BEL-Proteinen.

AGI-Nr.	mögliche Funktion nach BLAST-Analyse	Name der Köder	wurde x mal erhalten
At1g01050	Pyrophosphatase	BLH1	1
At3g11130	mögliches Clathrin (schwere Kette)	BLH1	1
At4g38800	mögliche Phosphorylase	BLH1	1
At1g73480	Lysophospholipase-Homolog	BLH1	1
At3g27400	mögliche Pectat-Lyase	BLH1	1
At3g55850	Amidohydrolase	BLH1	1
At1g14740	unbekanntes Protein	BLH1	1
At5g14250	COP9 Komplex, Untereinheit 3	BLH1	1
At3g62530	unbekanntes Protein	BLH1	1
At3g59450	unbekanntes Protein mit Calmodulin-Motiv	BEL1	1
At3g52890	mögliche Proteinkinase	BEL1	1
At5g18400	unbekanntes Protein	BEL1	1
At3g49240	unbekanntes Protein	BLH10	1
At5g48130	unbekanntes Protein, Ähnlichkeit zu bZIP-Faktor	BLH10	1
At1g08650	mögliche Proteinkinase	BLH4	1
At2g40000	homolog zum putativen Nematoden-Resistenz-Protein Hsl-Pro 1 aus <i>Beta procumbens</i>	BLH1, BLH3, BLH4, BLH10	26
At1g26260	bHLH76	BLH1, BLH4	15
At1g11910	mögliche Proteinase	BLH3, BLH4	6
At5g04830	unbekanntes Protein	BLH1, BEL1	5
At5g01840	unbekanntes Protein	BLH1, BEL1	41
At1g30590	unbekanntes Protein	BLH1, BLH4	7
At5g25220	KNAT3	BLH1, BLH4	32
At4g08150	KNAT1	BLH4, BLH6	4

Tab. 3.8: Interaktionsmatrix der aus den Screens erhaltenen interagierenden Proteine mit allen BEL-Proteinen. Getestet wurde die Histidin-Prototrophie der Hefen nach Doppeltransformation mit den Vollängen-BEL-Proteinen als GAL4-Bindedomänen-Fusion und der interagierenden Klone als Aktivierungsdomänen-Fusion. Wachstum auf dem Selektionsmedium ist durch ein grün hinterlegtes „+“, Nicht-Wachstum durch ein rot hinterlegtes „-“ gekennzeichnet.

	BLH1	BLH2	BLH3	BLH4	BLH5	BLH6	BLH7	BLH8	BLH9	BLH10	BEL1	ATH1
At2g40000	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
At1g26260	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
At1g11910	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
At5g04830	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
At5g01840	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
At1g30590	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-

BEL- und KNOX-Proteine nehmen ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren vermutlich als Komplexe miteinander wahr. Es ist daher möglich, daß es Proteine gibt, die Interaktionen sowohl mit den BEL- als auch mit den KNOX-Proteinen eingehen können.

Die ermittelten interagierenden Proteine, die mehrere Bindungspartner unter den BEL-Proteinen haben, wurden daher ebenfalls auf ihre Interaktionsfähigkeit mit den KNOX-Proteinen getestet. Dazu wurden die Sequenzen in einer PCR mit einem Oligonukleotid, das komplementär zum hinteren Abschnitt der Aktivierungsdomäne ist und dem Produkt den letzten Abschnitt der DNA-Bindungsdomäne anfügt, amplifiziert. Durch eine anschließende homologe Rekombination in Hefe konnten diese Produkte dann in den pAS2-Vektor umklontiert werden. Alle entstandenen pAS-Vektoren zeigten keine Selbstaktivierung, wenn sie zusammen mit dem pACT-SNF4-Vektor in Hefe transformiert wurden.

In einer Doppeltransformation wurden die Vektoren zusammen mit den pACT-KNAT-Vektoren in Hefen gebracht und diese anschließend auf Histidin-Prototrophie getestet. Das Ergebnis ist in Tab. 3.9 schematisch dargestellt.

Tab. 3.9: Interaktionsmatrix der aus den Screens erhaltenen interagierenden Proteine mit allen KNOX-Proteinen. Getestet wurde die Histidin-Prototrophie der Hefen nach Doppeltransformation mit den Vollängen-KNOX-Proteinen als GAL4-Aktivierungsdomänen-Fusion und der interagierenden Proteine als GAL4-DNA-Bindungsdomänen-Fusion. Wachstum auf dem Selektionsmedium ist durch ein grün hinterlegtes „+“, Nicht-Wachstum durch ein rot hinterlegtes „-“ gekennzeichnet.

	KNAT1	KNAT2	KNAT6	STM	KNAT3	KNAT4	KNAT5	KNAT7
At2g40000	-	-	-	-	-	-	-	-
At1g26260	+	-	+	-	+	+	+	+
At1g11910	-	-	+	-	+	-	+	-
At5g04830	-	-	-	-	-	-	-	-
At5g01840	+	-	-	-	+	+	+	+
At1g30590	-	-	-	-	-	-	-	-

Drei der Proteine zeigten Interaktionen mit mehreren BEL- und KNOX-Proteinen. Hierbei handelt es sich um die Proteine At1g26260, At1g11910 und At5g01840.

Das Gen *At1g26260* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Familie der bHLH (**b**asic **H**elix-**L**oop-**H**elix)-Faktoren. In *Arabidopsis* wurden bislang 162 Gene mit einem bHLH-Motiv identifiziert, die aufgrund des Vorhandenseins weiterer konservierter Motive in insgesamt zwölf Klassen eingeteilt werden (Bailey *et al.*, 2003). Das Protein At1g26260 fällt in die Klasse 12 (Heim *et al.*, 2003), der unter anderem die Proteine BEE1, 2 und 3 (**B**R **e**nhanced **e**xpression) angehören. Diese stehen in Verbindung mit verschiedenen wachstums- und entwicklungs-regulatorischen Vorgängen (Friedrichsen *et al.*, 2002).

Das Protein At1g11910 besitzt ein Sequenz-Motiv, das in vielen Aspartyl-Proteinasen zu finden ist. Von Vertretern dieser Enzym-Klasse wurde gezeigt, dass sie in Pflanzen eine Rolle in der Prozessierung von Proteinen (D'Hondt *et al.*, 1993), dem Abbau von Speicherproteinen in Samen (Hiraiwa *et al.*, 1997, Gruis *et al.*, 2002) sowie in der

Pathogen-Abwehr (Schaller & Ryan, 1996) spielen. Das *Arabidopsis*-Genom kodiert für mindestens 67 Aspartyl-Proteinasen.

Das Gen *At5g01840* kodiert für ein unbekanntes Protein, das im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

Zusammenfassung

In Untersuchungen mit dem Hefe-zwei-Hybrid-System wurde ein vollständiger Überblick über alle möglichen Kombinationen von TALE-Interaktionen gewonnen. Es wurde außerdem gezeigt, dass es neben den schon in anderen Pflanzenarten gefundenen Wechselwirkungen zwischen BEL- und KNOX-Proteinen, sowie zwischen KNOX- und KNOX-Proteinen, auch Interaktionen zwischen Proteinen innerhalb der BEL-Familie gibt. Mit Hilfe eines Screen-Verfahrens im großen Maßstab und anschließenden kombinatorischen Doppeltransformationen wurden sechs Proteine identifiziert, die mit jeweils mindestens vier verschiedenen BEL-Proteinen interagieren. Drei dieser Proteine (bHLH76, eine putative Proteinase sowie ein Protein unbekannter Funktion) können außerdem mit mehreren Mitgliedern der KNOX-Familie interagieren.

3.4. Sequenzanalyse von *At5g01840* - Die AtOFP-Familie

Das Gen *At5g01840* ist 813 bp lang, hat keine Introns und verfügt über eine C-terminale Domäne, die in verschiedenen Proteinen von Reis, Tomate und *Arabidopsis* konserviert ist. Die Abb. 3.13 zeigt einen Vergleich der Proteinsequenzen dieser Domänen. Das einzige bislang charakterisierte Mitglied dieser Gruppe ist das Ovate-Protein aus *Lycopersicon esculentum*. Der sogenannte Ovate-Phänotyp in Tomate, der sich durch die Ausbildung flaschenförmiger Früchte auszeichnet, wurde auf einen Verlust der *ovate*-Gen-Funktion zurückgeführt (Liu *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* existieren 18 Gensequenzen, die diese konservierte Domäne, im folgenden als OVATE-Domäne bezeichnet, besitzen. Sie wurden AtOFP1 bis 18 (*A. thaliana* **Ovate family protein**) benannt (Tab. 3.10).

Bis auf den Bereich der OVATE-Domäne sind die Mitglieder dieser neuen Proteinfamilie sehr variabel und besitzen keine weiteren Abschnitte, die innerhalb der Familie konserviert sind oder Homologien zu bereits bekannten Domänen anderer Proteine aufweisen. Sieben der Mitglieder dieser neuen Protein-Familie, auch AtOFP1, verfügen allerdings über potentielle Kernlokalisierungs-Signale. Augenfällig ist außerdem die Tatsache, dass 16 der 18 *AtOFP*-Gene keine Introns haben.

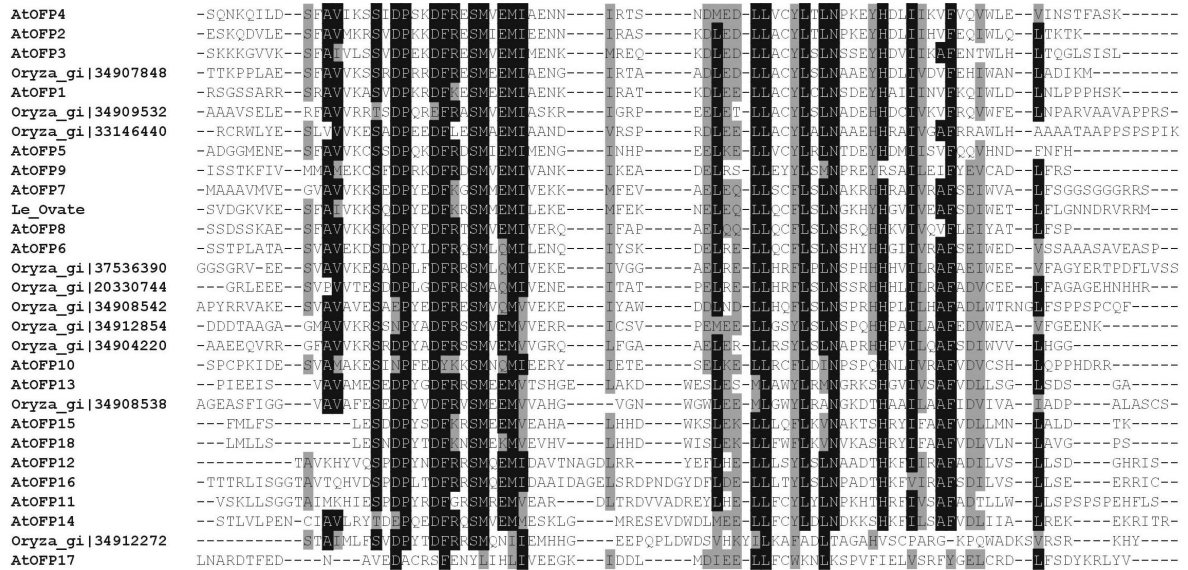


Abb. 3.13: Multipler Sequenzvergleich der C-terminalen OVATE-Domäne von Proteinen aus Tomate, Reis und *Arabidopsis*. Die konservierten Positionen sind grau (Ähnlichkeit $\geq 60\%$) bzw. schwarz (Identität $\geq 60\%$) hinterlegt. Die *Arabidopsis*-Proteine sind als AtOFP1 bis 18 bezeichnet (vergleiche Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Übersicht über die Mitglieder der Ovate-Familie in *A. thaliana* (AtOFPs). Angegeben sind jeweils die Längen der Proteine nach Vorhersage der kodierenden Region gemäß der TIGR-Datenbank.

Name	AGI-Nr.	Länge des putativen Proteins (aa)	Name	AGI-Nr.	Länge des putativen Proteins (aa)
AtOFP 1	At5g01840	270	AtOFP 10	At5g22240	196
AtOFP 2	At2g30400	320	AtOFP 11	At4g14860	182
AtOFP 3	At5g58360	296	AtOFP 12	At1g05420	226
AtOFP 4	At1g06920	315	AtOFP 13	At5g04820	260
AtOFP 5	At4g18830	349	AtOFP 14	At1g79960	294
AtOFP 6	At3g52525	159	AtOFP 15	At2g36050	261
AtOFP 7	At2g18500	315	AtOFP 16	At2g32100	244
AtOFP 8	At5g19650	221	AtOFP 17	At2g30395	223
AtOFP 9	At4g04030	411	AtOFP 18	At3g52540	282

3.5. Kartierung der Interaktionsdomänen von AtOFP1 und den TALE-Proteinen

Für die Kartierung der Domänen von AtOFP1, die für die Interaktion mit den TALE-Proteinen verantwortlich sind, wurde mit Hilfe eines ExonucleaseIII-Verdau eine N- und eine C-terminale Deletionsbibliothek hergestellt.

Screens der C-terminalen Bibliothek mit den KNAT4- und BLH1-GAL4-DNA-Bindedomänen-Proteinen ergaben nur das Vollängen-Protein als Interaktionspartner. Ein Screen der N-terminal deletierten Bibliothek von AtOFP1 mit BLH1 als Köder lieferte als kürzesten Klon ein Plasmid, das für die letzten 126 Aminosäuren kodiert. Der kürzeste Klon, der mit dem KNAT4-Protein als Köder erhalten wurde, enthielt die DNA, die für die letzten 69 Aminosäuren von AtOFP1 kodiert. Wie die Abb. 3.14 zeigt, ist dieser kurze

Abschnitt ausreichend, um sowohl die Interaktion mit KNAT4 als auch mit BLH1 zu vermitteln, es handelt sich dabei um die konservierte OVATE-Domäne.

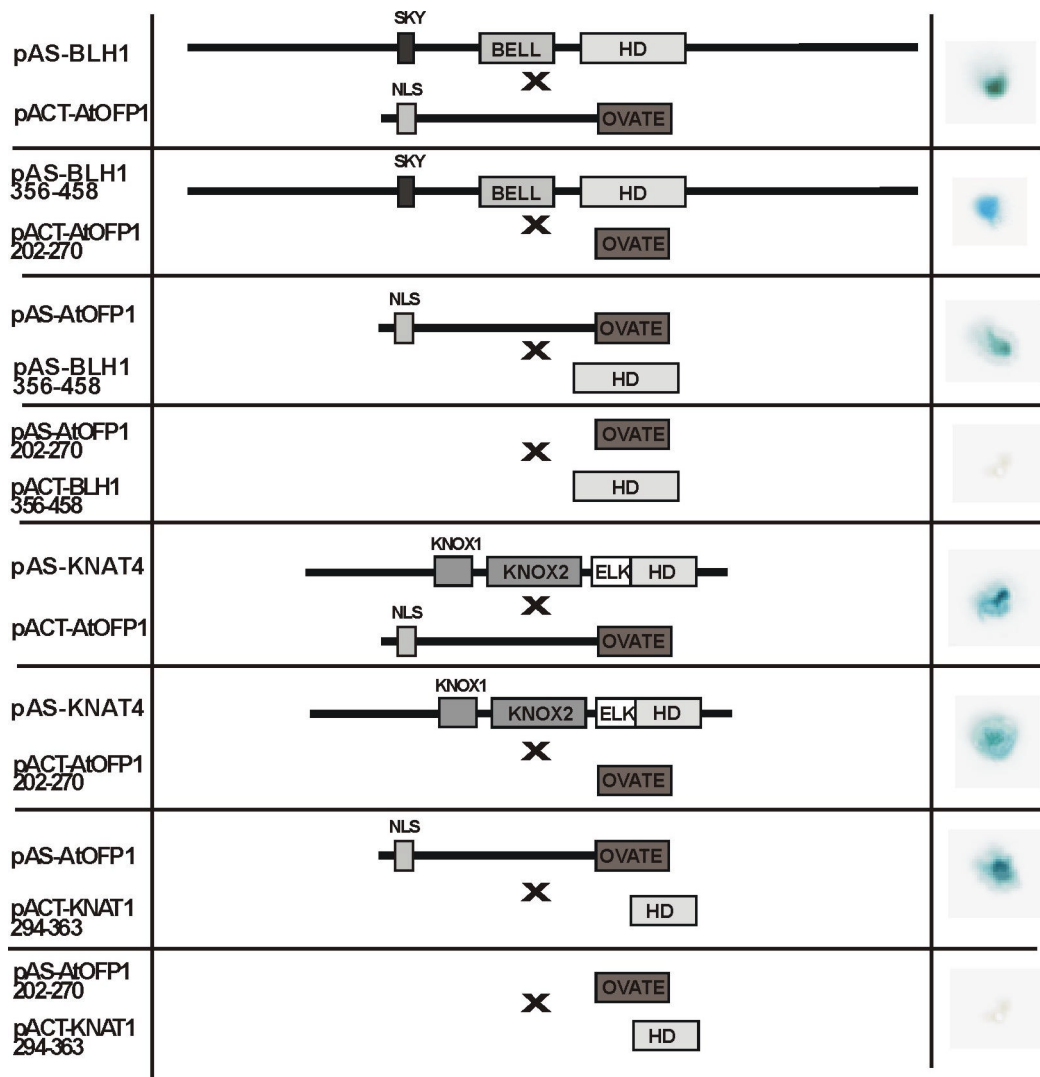


Abb. 3.14: Kartierung der für die Interaktion von AtOFP1 und den TALE-Proteinen verantwortlichen Domänen. In der linken Spalte angegeben sind die Hefe-zwei-Hybrid-Konstrukte, die Zahlen geben die kodierten Aminosäuren an. Die mittlere Spalte zeigt schematisch die Domänenstruktur. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse der β -Galactosidase-Tests dargestellt.

Wie in einem Test gegen die Vollängen-Versionen aller TALE-Proteine gezeigt werden konnte, ist die OVATE-Domäne auch weiterhin spezifisch in ihrer Bindung mit den TALE-Proteinen. Es interagieren dieselben TALE-Proteine mit der OVATE-Domäne, die auch schon mit dem Vollängen-AtOFP1 Wechselwirkungen gezeigt haben (Tab. 3.12 im nächsten Kapitel).

Um den auf Seiten der TALE-Proteine für die Interaktion mit AtOFP1 verantwortlichen Sequenzbereich zu kartieren, wurden C-terminale Deletionsbibliotheken von *KNAT1* und *BLH1* mit dem Vollängen-AtOFP1-Protein als Köder durchmustert. In beiden Fällen ergab die Sequenzierung der kürzesten erhaltenen Klone, dass die DNA-Sequenz bis kurz hinter die Homöodomäne reichte. Mit Oligonukleotiden, die unmittelbar vor und hinter der

Homöodomäne binden, wurde diese sowohl von *BLH1* als auch von *KNAT1* amplifiziert und mit dem Gateway-System in den pAS2- und pACT2-attR-Vektor kloniert. Die entstandenen Vektoren wiesen keine Selbst-Aktivierung im Hefe-zwei-Hybrid-System auf. Anschließende Doppeltransformationen mit dem AtOFP1-Protein als GAL4-DNA-Bindeprotein-Fusion in Hefe ergaben, dass die Homöodomäne für die Interaktion mit dem AtOFP1-Volllängen-Protein im Hefe-zwei-Hybrid-System ausreichend ist. Keine Interaktion konnte jedoch zwischen den Homöodomänen und der OVATE-Domäne festgestellt werden (Abb. 3.14).

Es ist somit anzunehmen, dass es noch weitere Bereiche in den TALE-Proteinen gibt, die für die Interaktion mit AtOFP1 wichtig sind.

3.6. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Mitgliedern der TALE-Superfamilie und Mitgliedern der AtOFP-Familie

Zehn der achtzehn AtOFP-Gene wurden mit Hilfe des Gateway-Systems als Volllängen-Versionen durch PCR auf genomischer DNA von *A. thaliana* und anschließender BP- und LR-Reaktion in den pAS-attR-Vektor kloniert. Die Doppeltransformation von Hefen zusammen mit dem leeren pACT-Vektor und anschließendem Test auf Histidin-Prototrophie ergab, dass alle Proteine nicht selbstaktivierend und somit geeignet für weitere Untersuchungen im Hefe-zwei-Hybrid-System waren.

In einem Ansatz kombinatorischer Doppeltransformationen wurden sie zusammen mit den pACT-BEL- und pACT-KNAT-Vektoren in Hefe transformiert. Um zu testen, ob die Interaktion mit den AtOFP-Proteinen über Artgrenzen hinweg konserviert ist, wurden auch die Gersten-KNOX-Proteine BKn1, BKn3 und BKn7, die bereits als GAL4-Aktivierungsdomänenfusionen vorlagen, in die Untersuchungen mit einbezogen. Das Wachstum der transformierten Kolonien auf LWH3-Medium nach fünf Tagen wurde ausgewertet. Das Ergebnis dieser Interaktionstests ist in Tab. 3.11 schematisch dargestellt.

In einem weiteren Ansatz wurden die konservierten Ovate-Domänen von 13 der AtOFPs in den pAS-attR-Vektor kloniert und auf ihre Fähigkeiten getestet, mit den TALE-Proteinen zu interagieren. Für diese Untersuchungen erwiesen sich die Konstrukte AtOFP15 und AtOFP16 als ungeeignet, da sie selbstaktivierend waren. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 3.12 schematisch dargestellt.

Von dem Protein AtOFP5 abgesehen zeigen die OVATE-Domänen aller Proteine dasselbe Spezifitäts-Muster wie die Volllängen-Proteine.

Insgesamt konnte von neun der 18 AtOFPs gezeigt werden, daß sie mit Mitgliedern der TALE-Superfamilie interagieren.

Tab. 3.11: Interaktionsmatrix der AtOFP-Vollängen-Konstrukte mit den *Arabidopsis*-TALE- und drei Gersten-KNOX-Proteinen. Getestet wurde die Histidin-Prototrophie der Hefen nach Doppeltransformation mit den Vollängen-AtOFPs als GAL4-DNA-Bindedomänen-Fusion und der TALE-Proteine als GAL4-Aktivierungs-Domänen-Fusion. Wachstum auf dem Selektionsmedium ist durch ein grün hinterlegtes „+“, Nicht-Wachstum durch ein rot hinterlegtes „-“ gekennzeichnet.

	<i>Arabidopsis</i>																				Gerste		
	KNAT								BEL												KNOX		
	KNAT1	KNAT2	KNAT6	STM	KNAT3	KNAT4	KNAT5	KNAT7	BLH1	BLH2	BLH3	BLH4	BLH5	BLH6	BLH7	BLH8	BLH9	BLH10	BEL1	ATH1	BKn1	BKn3	BKn7
AtOFP1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
AtOFP2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
AtOFP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AtOFP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP14	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AtOFP15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 3.12: Interaktionsmatrix der OVATE-Domänen der AtOFPs mit den *Arabidopsis*-TALE-Proteinen. Getestet wurde die Histidin-Prototrophie der Hefen nach Doppeltransformation mit den Vollängen-AtOFPs als GAL4-DNA-Bindedomänen-Fusion und der TALE-Proteine als GAL4-Aktivierungs-Domänen-Fusion. Wachstum auf dem Selektionsmedium ist durch ein grün hinterlegtes „+“, Nicht-Wachstum durch ein rot hinterlegtes „-“ gekennzeichnet.

	KNAT								BEL											
	KNAT1	KNAT2	KNAT6	STM	KNAT3	KNAT4	KNAT5	KNAT7	BLH1	BLH2	BLH3	BLH4	BLH5	BLH6	BLH7	BLH8	BLH9	BLH10	BEL1	ATH1
AtOFP1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
AtOFP2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
AtOFP3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP4	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
AtOFP5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
AtOFP6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP12	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AtOFP14	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zusammenfassung

Das Protein At5g01840, das im Hefe-zwei-Hybrid-System mit dreizehn der zwanzig *A. thaliana*-TALE-Proteine interagiert, verfügt über einen C-terminalen Bereich von 60

Aminosäuren, der in verschiedenen Proteinen aus *Arabidopsis*, Reis und Tomate konserviert ist. Nach dem Ovate-Protein aus Tomate wurde die Domäne als OVATE-Domäne bezeichnet und die *Arabidopsis*-Proteine als AtOFP1 bis 18 (*A. thaliana* Ovate-family proteins). Eine Kartierung der Interaktionsdomänen im Hefe-zwei-Hybrid-System ergab, dass die OVATE-Domäne für die Interaktion mit den TALE-Proteinen ausreichend ist sowie dass die Homöodomäne der TALE-Proteine für eine Wechselwirkung mit den AtOFPs genügt. Insgesamt wurde für neun der 18 AtOFPs nachgewiesen, dass sie die Fähigkeit haben, mit Proteinen der TALE-Familie aus *A. thaliana*, aber auch aus Gerste zu interagieren.

3.7. Analyse des erhaltenen Interaktions-Netzwerkes

Die im Hefe-zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen können in einem Netzwerk-Diagramm graphisch dargestellt werden (Abb. 3.15). Hier geben die Punkte, auch Knoten genannt, die einzelnen Proteine wieder und ein Verbindungsstrich steht für eine Interaktion zwischen zwei Proteinen und macht diese zu „Nachbarn“. Das so erhaltene Netzwerk gibt einen Überblick über die potentiellen Verbindungen in einer Zelle.

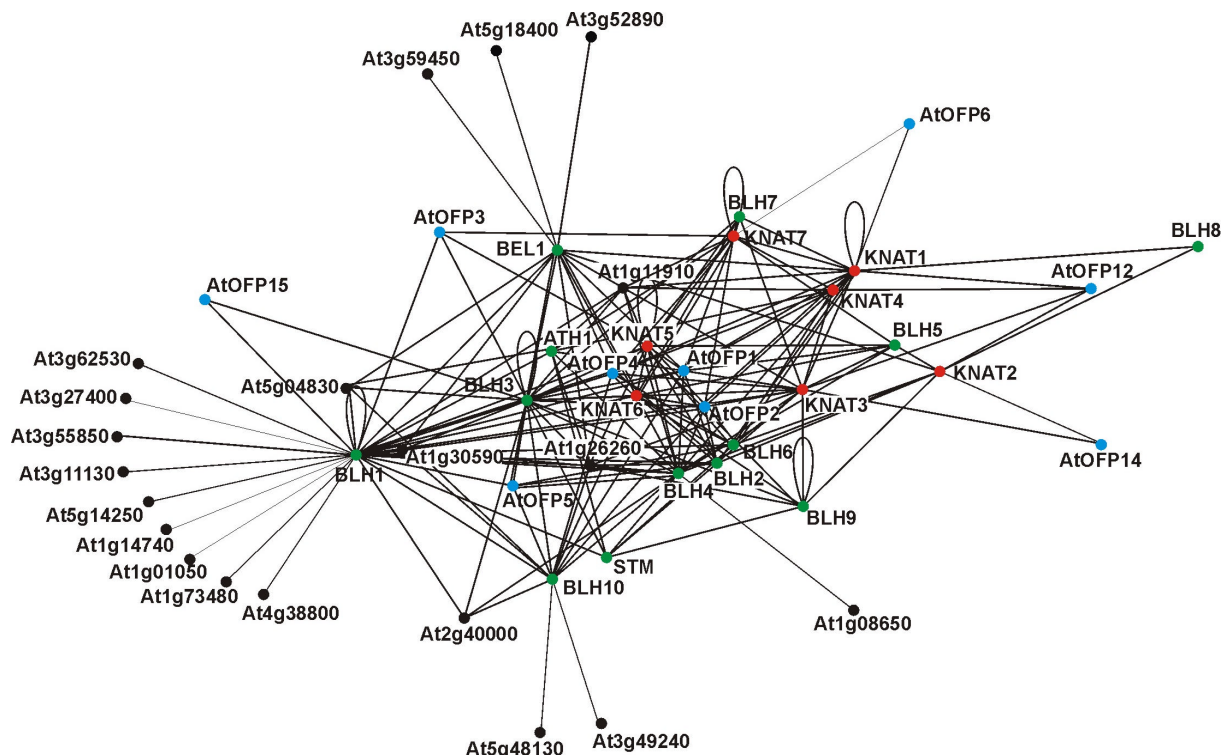


Abb. 3.15: Das TALE-Interaktions-Netzwerk abgeleitet aus den Analysen mit dem Hefe-zwei-Hybrid-System. Die Darstellung wurde mit dem Programm Pajek nach einem modifizierten Fruchterman-Reingold Algorithmus erstellt. Grün: BEL-Proteine, rot: KNAT-Proteine, blau: AtOFPs, schwarz: sonstige Proteine.

Die Betrachtung des Netzwerkes mit Methoden der Netzwerk-Analytik erlaubt eine Einordnung der Relevanz der gefundenen Interaktionen. Analysen biologischer Netzwerke deuten darauf hin, dass Protein-Gruppen mit einer hohen Verbindungs-Dichte häufig funktionale Gemeinsamkeiten aufweisen (Spirin & Mirny, 2003; Rives & Galitsky, 2003).

Der sogenannte Clustering-Koeffizient C_1 ist ein Maß für die Verbindungsdichte im direkten Umfeld eines Knotens I . Definiert nach Watts & Strogatz (1998), errechnet er sich, indem die tatsächliche Anzahl der Verbindungen zwischen den Nachbarn eines Knotens I dividiert wird durch die Gesamtzahl der überhaupt möglichen Verbindungen zwischen den Nachbarn. Ein niedriger Clustering-Koeffizient steht für eine geringe Vernetzung des unmittelbaren Umfelds, während ein Wert von 1 angibt, dass die Umgebung lokal vollständig miteinander vernetzt ist.

Die Clustering-Koeffizienten für die Proteine des TALE-Interaktions-Netzwerkes wurden berechnet und sind in der Tab. 3.13 aufgeführt.

Tab. 3.13: Clustering-Koeffizienten der Proteine aus dem TALE-Netzwerk. Die Proteine sind nach der Höhe ihrer Clustering-Koeffizienten sortiert. Alle nicht aufgelisteten Proteine aus dem Netzwerk haben einen Clustering Koeffizienten von 0.

Protein	Clustering-Koeffizient	Protein	Clustering-Koeffizient
BLH3	0,225	BLH2	0,140
BLH4	0,224	BLH8	0,135
KNAT5	0,215	BEL1	0,133
AtOFP2	0,211	At2g40000	0,129
KNAT6	0,203	ATH1	0,120
AtOFP4	0,193	BLH7	0,118
AtOFP1	0,193	AtOFP5	0,118
KNAT3	0,185	BLH9	0,103
BLH1	0,180	At5g04830	0,097
At1g11910	0,172	BLH10	0,086
At1g26260	0,165	STM	0,086
KNAT4	0,165	AtOFP3	0,086
KNAT1	0,161	AtOFP12	0,064
BLH10	0,149	AtOFP6	0,064
At1g30590	0,145	AtOFP15	0,064
KNAT7	0,145	KNAT2	0,016

Das aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screens erhaltene Netzwerk der TALE-Proteine wurde nun mit zehn zufälligen Netzwerken derselben Anzahl von Knoten und Verbindungen verglichen, die mit dem Programm-Paket Pajek erstellt wurden (Abb. 3.16). Hierbei ist festzustellen, dass bei den zufälligen Netzwerken die Knoten wesentlich geringere Clustering-Koeffizienten aufweisen, als dies bei dem TALE-Netzwerk der Fall ist. Der durchschnittliche Clustering-Koeffizient der Zufalls-Netzwerke betrug 0,054, während der des TALE-Netzwerkes 0,091 beträgt. In keinem der generierten Zufalls-Netzwerke gab es Knoten, die einen Clustering-Koeffizienten größer als 0,181 besaßen.

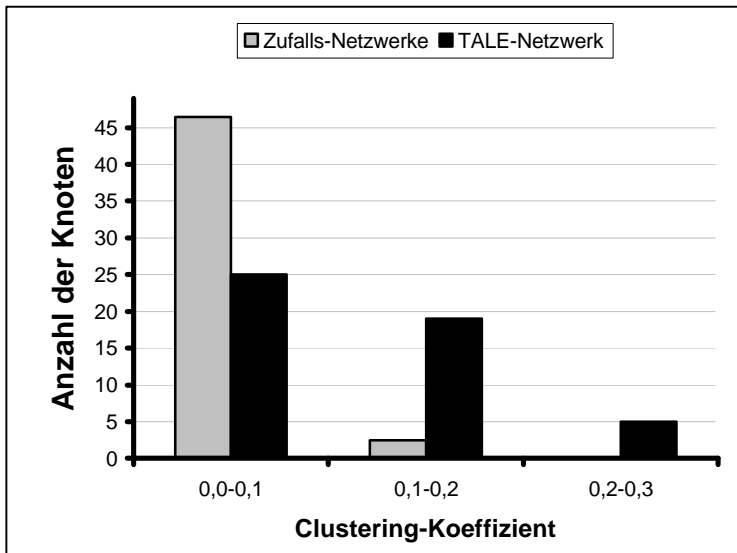


Abb. 3.16: Verteilung der Clustering-Koeffizienten des TALE-Netzwerkes verglichen mit zufälligen Netzwerken des gleichen Ausmaßes. Zehn zufällige Netzwerke mit jeweils 49 Knotenpunkten und 189 Verbindungslinien wurden mit Hilfe des Programms Pajek erstellt und deren Clustering-Koeffizienten berechnet. Die grauen Balken geben die durchschnittliche Anzahl der Knotenpunkte mit den entsprechenden Clustering-Koeffizienten an.

Die Proteine des TALE-Interaktions-Netzwerkes besitzen also sehr viele Interaktionspartner, die auch untereinander Wechselwirkungen zeigen. In Zufalls-Netzwerken ist eine solche Verteilung der Verbindungen nicht zu finden.

Um eine Aussage über die Relevanz des ermittelten Netzwerkes in Bezug auf biologische Netzwerke machen zu können, sollten ähnliche Strukturen aus dem genomweiten Hefe-Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk ermittelt werden.

Um einen Vergleich des TALE- und des Hefe-Netzwerkes zu ermöglichen, wurden beide in Untereinheiten fragmentiert, die sogenannte k-Cores darstellten. Ein k-Core enthält eine Anzahl von Knoten, die alle innerhalb des Cores mindestens k Verbindungen besitzen. Das TALE-Netzwerk enthält einen 8-Core, der aus 18 Proteinen besteht (Abb. 3.17), die untereinander 99 Verbindungen besitzen.

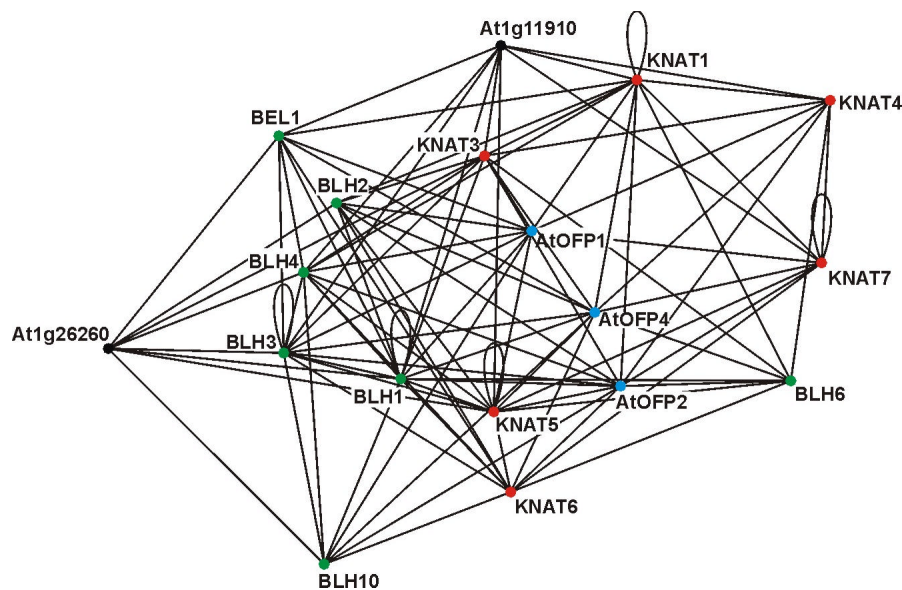


Abb. 3.17: Im TALE-Netzwerk enthaltener 8-Core. Alle Proteine dieses Netzwerk-Motivs haben mindestens acht Verbindungen innerhalb des Cores. Grün: BEL-Proteine, rot: KNAT-Proteine, blau: AtOFFs, schwarz: sonstige Proteine.

Ein Maß für die Verbindungs-Dichte innerhalb einer Gruppe von Knoten ist der Parameter Q , der sich nach der Formel $Q = 2m / (n(n-1))$ errechnet, wobei m die Anzahl der Verbindungen im Netzwerk und n die Anzahl der Knoten angibt (Spirin & Mirny, 2003). In einem vollständig vernetzten Graphen, bei dem jeder Knoten zu jedem anderen eine Verbindung besitzt, beträgt $Q = 1$, während in einem unvernetzten Graphen $Q = 0$ ist. Für den 8-Core des TALE-Netzwerkes beträgt $Q = 0,32$.

Um zu ermitteln, mit welcher Häufigkeit eine solche hoch-vernetzte Struktur in den Netzwerken aus genomweiten Analysen auftritt und ob die in ihnen vertretenen Proteine funktional zusammenhängen, wurden aus dem Hefe Protein-Protein-Interaktions Netzwerk mit einem Algorithmus, der die Proteine mit wenigen Verbindungen sukzessive entfernt, 8-Cores isoliert und deren Mitglieder auf ihre annotierte Funktion hin überprüft. Es ergaben sich sechs Cluster mit Q -Werten zwischen 0,28 und 1. Die Proteine, die in diesen Clustern zusammengefasst waren, waren entweder Bestandteile eines Multiprotein-Komplexes, wie z.B. die Komponenten des TRAPP-Komplexes, oder hatten jeweils zusammengehörige Funktionen, wie die Proteine des mRNA-Splicings und -Katabolismus (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Übersicht über die 8-Cores, die aus dem Hefe-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk isoliert wurden. Angegeben ist die Größe und der Q -Wert der einzelnen Cores sowie die Funktion der Protein-Komponenten aufgrund ihrer Annotation in der GRID-Datenbank.

Anzahl der Proteine im Core	Q -Wert	vornehmliche Funktion der Proteine
10	1	TRAPP-Komplex
11	1	Anaphase Promoting Complex
14	0,89	mRNA-Polyadenylierung
21	0,64	Ubiquitin-abhängiger Protein-Katabolismus, Proteasom-Bestandteile
31	0,36	mRNA-Splicing und mRNA-Katabolismus
50	0,28	rRNA Prozessierung

Alle diese Betrachtungen lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem aus den Hefe-zwei-Hybrid-Daten erhaltenen Interaktions-Netzwerk nicht um zufällig miteinander interagierende Proteine sondern um ein Modul handelt, dessen Komponenten in einem funktionalen Zusammenhang stehen. Mindestens drei der AtOFP-Proteine (AtOFP1, 2 und 4) nehmen in diesem Modul eine zentrale Position ein, da sie eine große Konnektivität, sowie sehr hohe Clustering-Koeffizienten besitzen.

Zusammenfassung

Die in den Hefe-zwei-Hybrid-Analysen gewonnenen Daten können in einem Netzwerk-Graphen dargestellt werden. Betrachtungen mit Methoden der Netzwerk-Analytik zeigen, dass das erhaltene TALE-Netzwerk eine sehr hohe Verbindungs-Dichte aufweist. Vergleiche mit Zufalls-Netzwerken und Substrukturen, die aus dem Hefe Protein-Protein

Interaktions-Netzwerk isoliert wurden, ergeben, dass das TALE-Netzwerk alle Charakteristika eines funktionalen Moduls aufweist.

3.8. Untersuchung des Expressionsmusters der TALE-Gene

Die umfassende Analyse der Interaktionen der TALE-Proteine im Hefe-zwei-Hybrid-System ergab, dass alle TALE-Proteine eine Vielzahl von Interaktionspartnern besitzen.

Die Verfügbarkeit der jeweiligen Bindungspartner in den unterschiedlichen Geweben zu einem festgelegten Zeitpunkt der Entwicklung könnte einer der Faktoren sein, der die Spezifität der KNOX/BEL-Komplexe reguliert.

Um das Expressionsmuster der für die TALE-Proteine kodierenden Gene zu untersuchen, wurde RNA aus verschiedenen Pflanzenteilen von adulten *A. thaliana*-Pflanzen isoliert, die unter Langtagbedingungen im Gewächshaus gezogen wurden. Mittels einer RT-PCR wurden die Präparate auf das Vorhandensein der verschiedenen TALE-mRNAs untersucht.

Bei *BLH2* und 5 ergab die PCR auf der cDNA keiner der Organe eine Bande. Das Ergebnis der übrigen PCRs ist in Abb. 3.18 gezeigt.

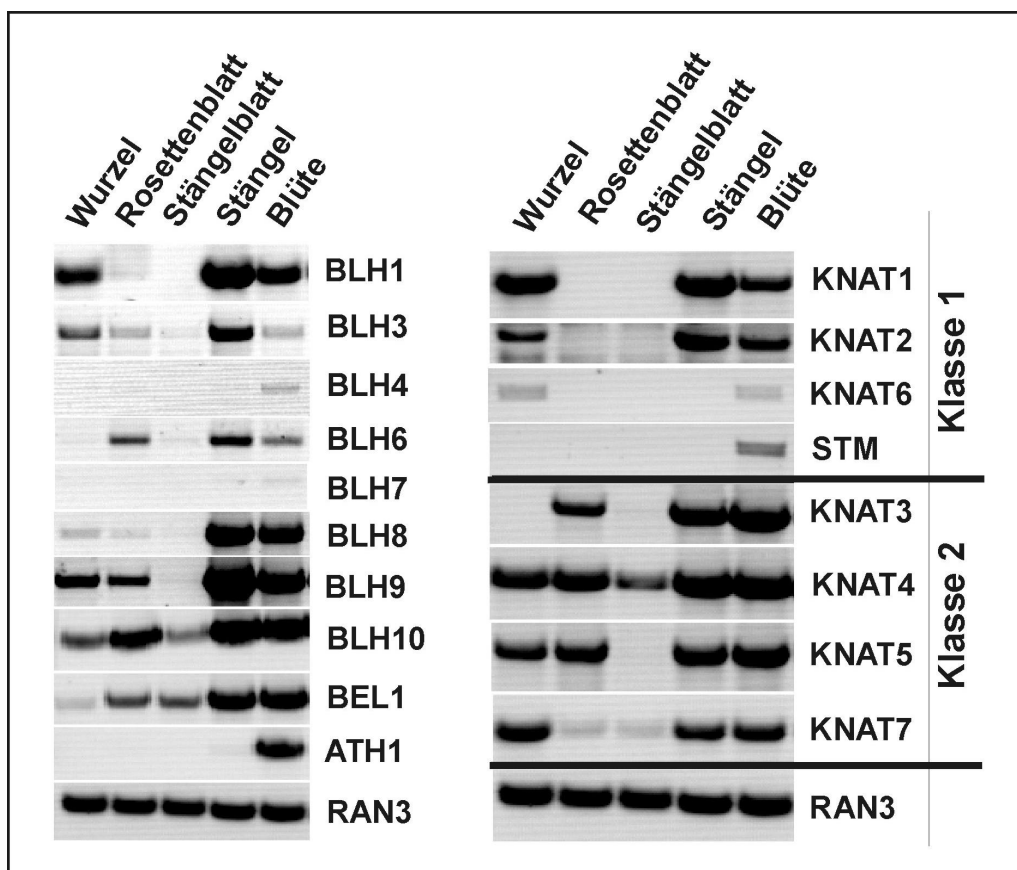


Abb. 3.18: Expressionsmuster der *TALE*-Gene, das durch RT-PCR auf RNA-Präparationen verschiedener *Arabidopsis*-Organe ermittelt wurde. Als Kontrolle diente das *RAN3*-Gen, das in allen Organen gleichmäßig exprimiert ist.

Alle BEL-Gene sind in der Blüte exprimiert und mit Ausnahme von *ATH1* und *BLH7* auch im Stängel. *BLH10*- und *BEL1*-mRNAs sind in allen untersuchten Geweben in unterschiedlichen Ausmaßen zu finden.

Die KNOX-Gene der Klasse 2 sind in fast allen Organen exprimiert, während die Expression der Gene der Klasse 1 stärker kontrolliert ist. Keine dieser mRNAs ist in Rosetten- und Stängelblättern nachzuweisen, während in den Blüten alle KNOX-Gene exprimiert werden.

3.9. Untersuchung des Expressionsmusters der AtOFP-Gene

Um festzustellen, ob und in welchen Geweben der Pflanze die TALE-Proteine die Möglichkeit haben, mit AtOFP-Proteinen in Kontakt zu treten, wurde das Expressionsmuster dieser Gene durch PCR auf der cDNA verschiedener Organe von adulten *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht. Die mRNAs von *AtOFP2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8* sowie *11* konnten in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis der RT-PCRs der restlichen AtOFPs ist in der Abb. 3.19 gezeigt. Die AtOFPs sind in unterschiedlichem Ausmaß in verschiedenen Geweben zu finden. Alle in der Abb. 3.19 dargestellten AtOFPs sind in den Blüten exprimiert. Für jedes der Proteine gibt es außerdem mindestens ein weiteres Gewebe, in dem das Gen abgelesen wird. In jedem der untersuchten Organe ist die mRNA von mindestens einem der AtOFP-Gene zu finden.

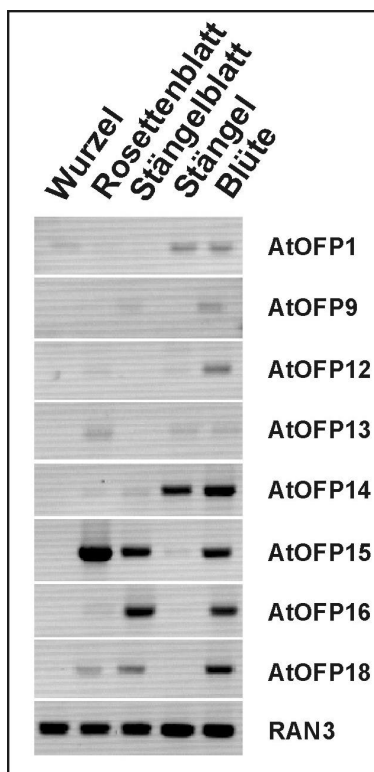


Abb. 3.19: Expressionsmuster der AtOFP-Gene, das durch PCR auf cDNA verschiedener *Arabidopsis*-Organe ermittelt wurde. Als Kontrolle diente das *RAN3*-Gen, das in allen Organen gleichmäßig exprimiert ist.

3.10. Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der TALE-Proteine und AtOFPs

Um eine Wechselwirkung der TALE-Proteine mit den AtOFPs *in vivo* zu analysieren, wurde die intrazelluläre Lokalisation dieser Proteine mittels transienter Expression von C-terminalen GFP- bzw. RFP-Fusionsproteinen in Tabakblättern untersucht.

Hierfür wurden die Vollängen-Konstrukte von BLH1, BLH7, KNAT1 sowie AtOFP1 und AtOFP5 mittels einer Gateway-Rekombination in die binären Vektoren pBatTL-K-GFP und pBatTL-K-RFP transformiert, die die Gene als C-terminale Fusionen an GFP oder RFP unter Kontrolle des CaMV35S-Vektors exprimieren. Mit diesen Vektoren wurden Agrobakterien transformiert, die dann in Blätter von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen infiltriert werden konnten. Zusätzlich wurde ein Vektor für die Expression eines Silencing-Suppressors eingeführt, der eine schnelle Abschaltung der Proteinproduktion durch die Pflanze verhindern sollte. Drei bis sieben Tage nach der Infiltration wurden die Epidermiszellen der Blätter unter einem Konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet.

Die untersuchten TALE-Proteine BLH1, BLH7 sind als GFP-Fusionen ausschließlich im Kern lokalisiert. KNAT1-GFP befindet sich ebenfalls zum größten Teil im Kern, kleinere Mengen waren auch im Cytoplasma zu finden (Abb. 3.20).

Die Proteine AtOFP1 sowie AtOFP5 sind als GFP-Fusionen im Nukleolus des Zellkerns zu finden, sowie am Cytoskelett assoziiert (Abb. 3.21a, b). Ein Vergleich des Lokalisationsmusters mit dem von MAP3-GFP (**m**icrotubuli **a**ssociated **p**rotein **3**) und einem Protein mit einer Actin-bindenden ILWEQ-Domäne (Abb. 3.21c), legt nahe, dass die AtOFPs an den Mikrotubuli der Zelle assoziiert ist. Diese Vermutung wird ferner dadurch unterstützt, dass eine Zugabe des Alkaloids Cytochalasin D, das die Polymerisation von Actinfilamenten blockiert, zu den Epidermiszellen keinen Effekt auf die Anordnung der AtOFP-Proteine hat (Abb. 3.21d).

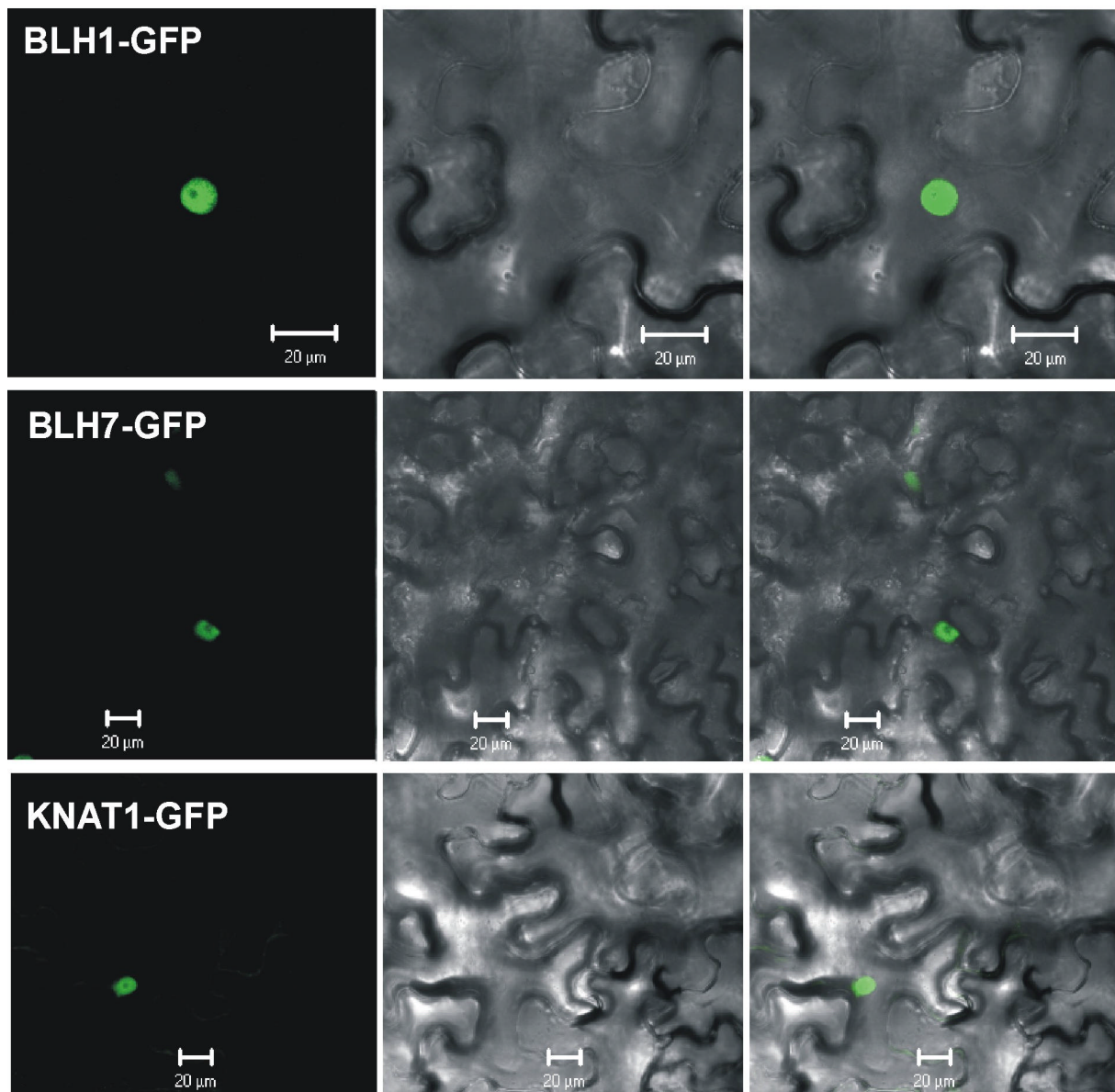


Abb. 3.20: Intrazelluläre Lokalisation von BLH1, BLH7 und KNAT1. C-terminale GFP-Fusionen der TALE-Proteine wurden transient in Tabakblättern exprimiert und die Epidermiszellen nach 3-7 Tagen unter einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop betrachtet. Alle Fusionsproteine befinden sich im Nukleus, nicht aber im Nukleolus.

Linke Spalte: GFP-Kanal, mittlere Spalte: Durchlichtbild, rechte Spalte: Überlagerung des GFP-Kanals mit dem Durchlichtbild.

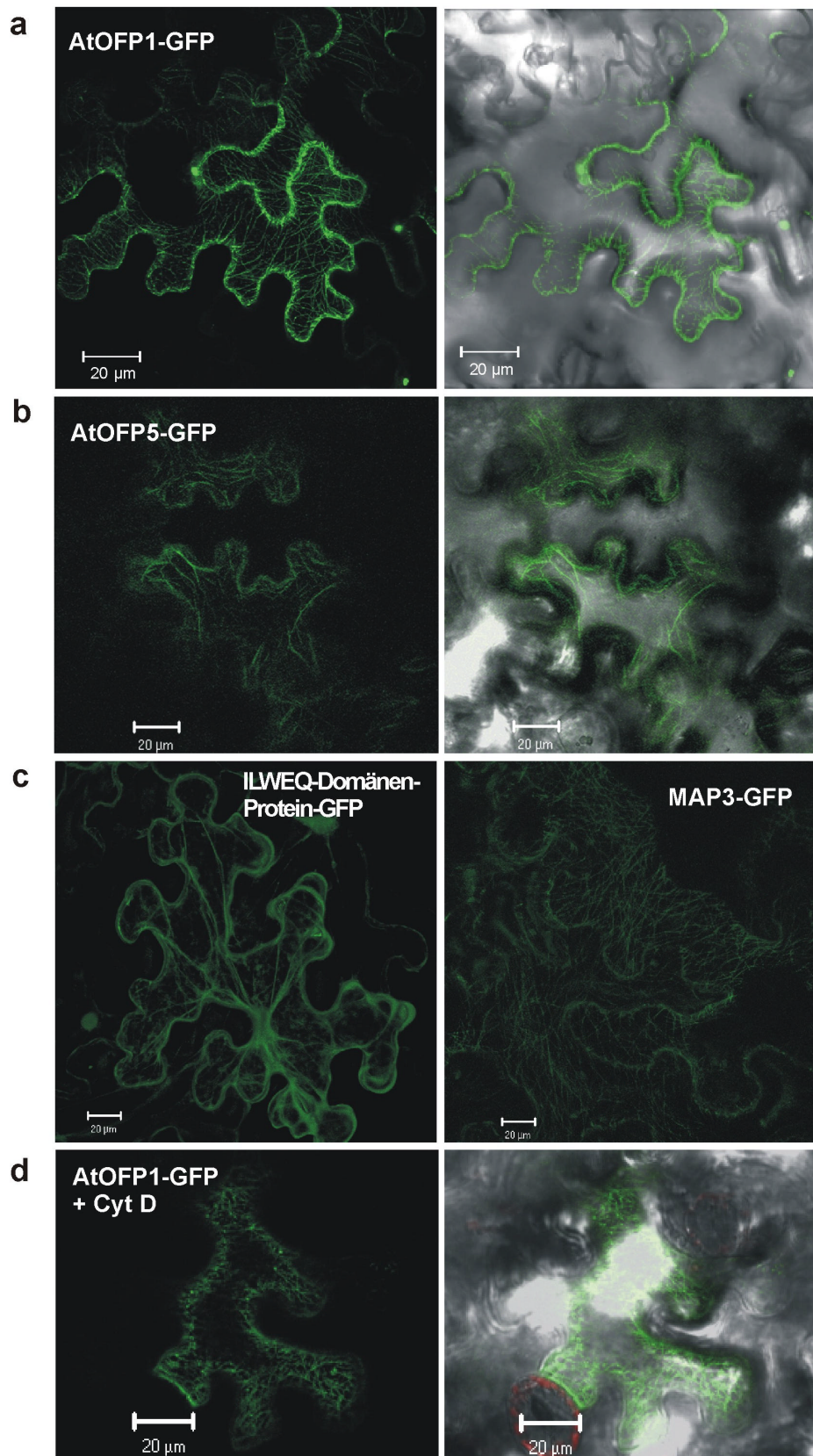


Abb. 3.21: Intrazelluläre Lokalisation von AtOFP1 und AtOFP5. C-terminale GFP-Fusions-Proteine wurden transient in Tabakblättern exprimiert und die Epidermiszellen nach 3-7 Tagen unter einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop betrachtet. **a+b**, AtOFP1 und AtOFP5 befinden sich im Nukleolus und sind mit dem Cytoskelett assoziiert. **c**, Die Actinfilamente der Epidermiszellen wurden mit einem GFP-fusionierten Protein, das eine Actin-bindende ILWEQ-Domäne enthält (links), die Mikrotubuli mit dem Protein MAP3 als GFP-Fusion markiert (rechts). Ein Vergleich dieser Bilder mit der Lokalisation der AtOFPs legt nahe, dass sich letztere an den Mikrotubuli befinden. **d**, Eine 20-minütiger Behandlung der Epidermiszellen mit 10 µM Cytochalasin D hat keinen Einfluss auf das Muster der AtOFP1-GFP-Fluoreszenz. **a, b, d**: Linke Spalte: GFP-Kanal, rechte Spalte: Überlagerung des GFP-Kanals mit dem Durchlichtbild.

Die Lokalisation der TALE- und AtOFPs in den Einzelinfiltrations-Versuchen gibt keine Hinweise darauf, ob und wo die Proteine in der Zelle interagieren könnten.

Durch Koexpression von RFP- und GFP-Fusionsproteinen wurde die intrazelluläre Lokalisation der Proteine bei Vorhandensein des jeweiligen Interaktionspartners untersucht.

Zunächst wurde sichergestellt, dass die Koexpression von GFP und BLH1-RFP keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung von BLH1 hat (Abb. 3.22a).

In allen Zellen, in denen sowohl AtOFP1- bzw. AtOFP5-GFP als auch BLH1-RFP exprimiert wurden, kam es zu einer Umlokalisierung des BLH1-Proteins aus dem Kern in das periphere Cytoplasma, wo es zusammen mit dem AtOFP in punktförmigen Strukturen zu finden war (Abb. 3.22b, c, d). Hierbei wiesen verschiedene Zellen ein unterschiedliches Muster auf, das auf ein dynamisches Verhalten der Proteine schließen lässt. In einigen Zellen war das AtOFP1-GFP weiterhin am Cytoskelett zu finden (Abb. 3.22b), in anderen Zellen löste sich das AtOFP1 vollständig vom Cytoskelett und lag nur noch in den punktförmigen Strukturen zusammen mit BLH1-RFP vor (Abb. 3.22c). Die durchgehende Anfärbung der Randbereiche der Zelle in den Abb. 3.22b und d ist auf die Aufsicht des hier vorhandenen Cytoplasmas zurückzuführen. In einer Projektion der gescannten Bilder der Zelle in drei Dimensionen ist ersichtlich, dass es sich überall um punktförmige Strukturen handelt.

Der Einfluss von AtOFP1 auf die Lokalisation von BLH1 spiegelt eine interaktionsspezifische Eigenschaft wider, wie die Untersuchung von Blättern zeigte, in denen AtOFP1-RFP und BLH7-GFP koexprimiert wurde. Dieses BEL-Protein interagiert im Hefe-zwei-Hybrid-System nicht mit AtOFP1. Wie in Abb. 3.22e zu erkennen ist, hat die Koexpression von AtOFP1 keinen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von BLH7. Ebenso wenig veränderte die Koexpression von GFP die BLH7-Lokalisation.

Alle Ergebnisse wurden in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt, in denen jeweils mehr als 200 koexprimierende Zellen betrachtet wurden. Eine Relokalisierung von BLH1 bei Koexpression mit AtOFP1 oder AtOFP5 trat in 100% der Fälle auf.

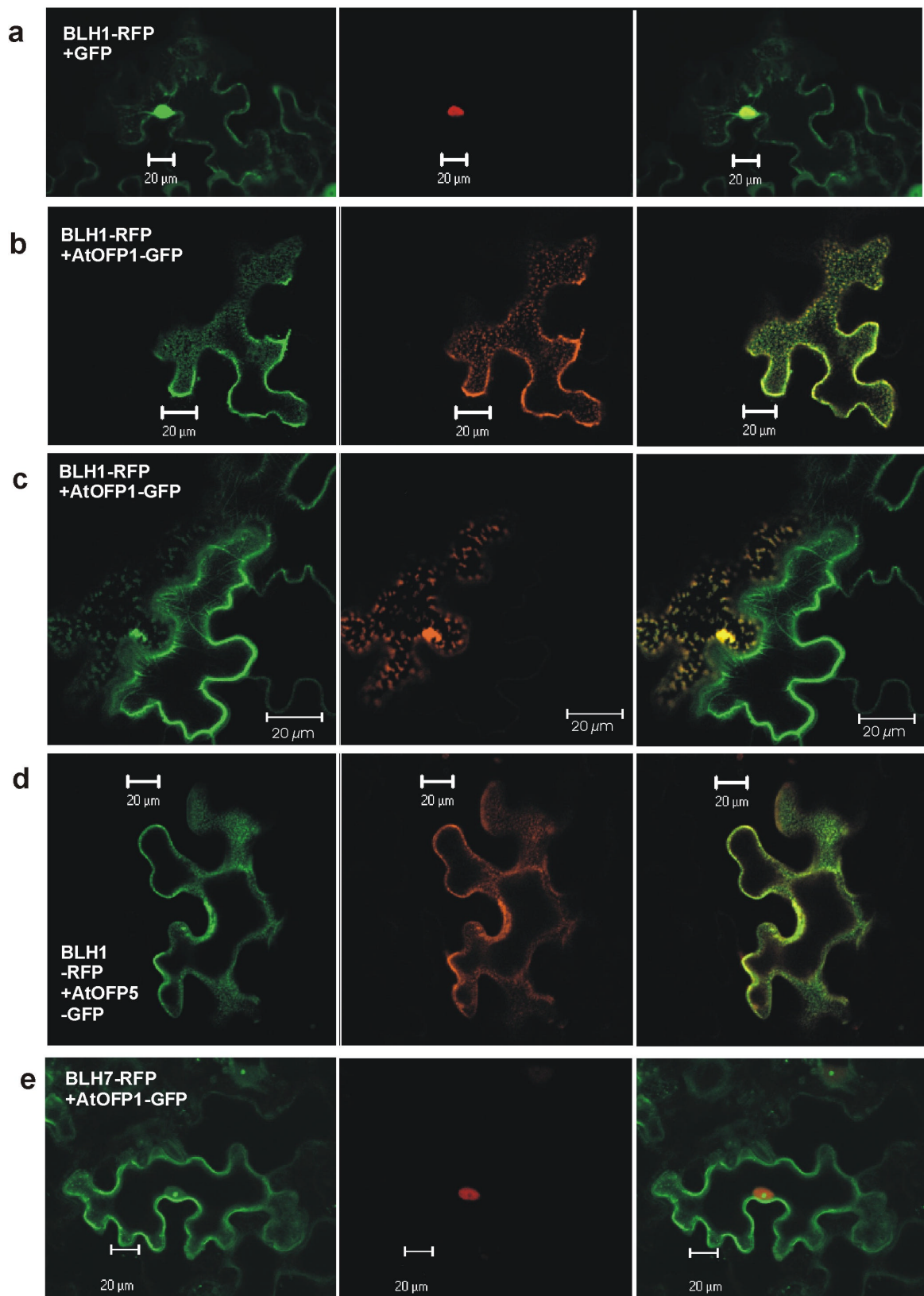


Abb. 3.22: AtOFP1 und AtOFP5 führen zu einer Relokalisierung des BLH1-Proteins aus dem Kern ins Cytoplasma. **a**, Die Koexpression von GFP hat keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung von BLH1. **b+c**, Bei einer Koexpression von BLH1-RFP und AtOFP1-GFP kommt es zu einer Relokalisierung von BLH1 ins Cytoplasma. Beide Proteine sammeln sich in punktförmigen Strukturen, wobei AtOFP1 teilweise noch ans Cytoskelett gebunden ist (**b**), oder aber sich von diesem vollständig löst (**c**). **d**, Eine Koexpression von AtOFP5 und BLH1 führt ebenfalls zu einer cytoplasmatischen Lokalisierung von BLH1. **e**, Das im Hefezwei-Hybrid-System nicht mit AtOFP1 interagierende Protein BLH7 bleibt bei einer Koexpression mit AtOFP1-GFP im Kern. Linke Spalte: GFP-Kanal, mittlere Spalte: RFP-Kanal, rechte Spalte: Überlagerung der GFP- und RFP-Bilder. Positionen, an denen sowohl die GFP- als auch die RFP-Emissions-Wellenlänge detektiert wird, erscheinen gelb.

Zusammenfassung

Durch transiente Expression von GFP- und RFP-Fusionen der TALE- und AtOFPs in Tabak-Blättern wurde deren intrazelluläre Lokalisierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass BLH1, BLH7 und KNAT1 eine Kern-Lokalisierung aufweisen, während AtOFP1 und AtOFP5 am Cytoskelett assoziiert und außerdem im Nukleolus zu finden sind. Sowohl AtOFP1 als auch AtOFP5 verändern bei einer Koexpression mit BLH1 dessen Lokalisierung. Das Protein, mit dem sie im Hefe-zwei-Hybrid-System interagieren, wird aus dem Kern in das Cytoplasma umlokalisiert, wo es zusammen mit den AtOFPs in punktförmigen Strukturen an der Peripherie der Zelle auftritt. Keinen Effekt hat das AtOFP1-Protein auf die Kern-Lokalisation von BLH7, mit dem es im Hefe-zwei-Hybrid-System nicht interagiert.

3.11. Charakterisierung von *AtOFP1*-Mutanten

Wie die Netzwerkanalyse der Interaktionen zeigt, stellt AtOFP1 möglicherweise einen zentralen Faktor in einem TALE-Funktions-Modul dar. Eine Veränderung der Expression dieses Gens könnte Konsequenzen auf die von den TALE-Proteinen gesteuerten Entwicklungsprozesse haben.

Aus den GABI-KAT und SALK-Kollektionen wurden vier Linien mit T-DNA-Insertionen im *AtOFP1*-Gen untersucht. Die Lage der Insertionen ist in Abb. 3.23 schematisch dargestellt. Zwei der Linien haben Insertionen im putativen Promotor-Bereich. Bei der Linie 053G03 befindet sich die T-DNA-Insertion, die einen CaMV35S-Promotor beinhaltet, in der korrekten Orientierung zum Gen. Dies sorgt für eine Überexpression des *AtOFP1*-Gens („activation tagging“). Zwei weitere Linien besitzen Insertionen am Anfang der kodierenden Sequenz.

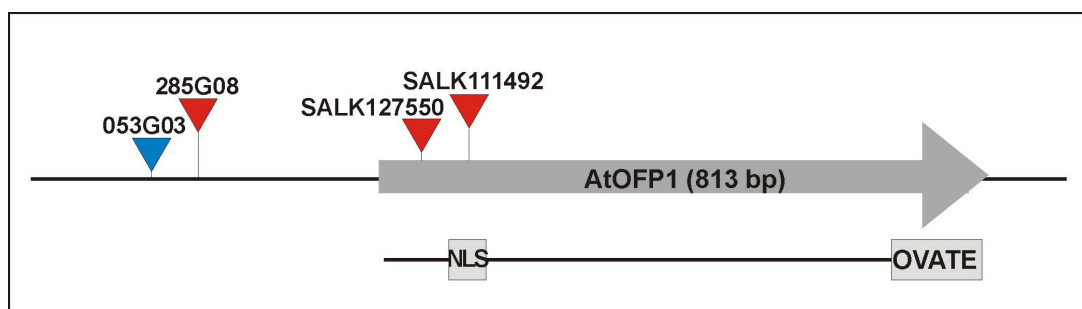


Abb. 3.23: Lage der Insertionen in den untersuchten GABI-KAT- und SALK-Linien. Der graue Pfeil gibt den kodierenden Bereich des *AtOFP1*-Gens auf der DNA wieder. Die T-DNA-Insertionen sind durch Dreiecke dargestellt. Das blaue Dreieck gibt eine Insertion des 35S-Promotors in korrekter Orientierung zum Gen an. NLS: Kernlokalisierungssignal, OVATE: OVATE-Domäne

Die Samen der aufspaltenden T2-Generation wurden auf Erde ausgelegt und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen. Das Vorhandensein der Insertionen

wurde mittels PCR auf der genomischen DNA nachgewiesen. Durch eine PCR mit Oligonukleotiden, die auf beiden Seiten der jeweiligen Insertion gelegen sind, wurden die Pflanzen auf das Vorhandensein eines Wildtyp-Allels getestet.

Die Tab. 3.15 gibt einen Überblick über die Keimungsraten und den Anteil der Pflanzen mit Insertionen.

Tab. 3.15: Übersicht über die Keimungsverhältnisse und die für die Insertionen heterozygoten Pflanzen der AtOFP1-Insertionslinien. Die Samen der aufspaltenden T2-Generation wurden direkt in Erde ausgesät und unter Langtagbedingungen kultiviert. Das Vorhandensein der Insertion sowie der Test auf die Anwesenheit eines WT-AtOFP1-Allels wurde mit einer PCR auf genomischer DNA durchgeführt. AT: Activation Tag.

Linie	Anzahl der ausgelegten Samen	Anzahl der gekeimten Samen	Keimungsrate	Pflanzen mit Insertion	Anteil der Pflanzen mit Insertion an der Gesamtzahl der gekeimten Samen	Anzahl der für die Insertion homozygoten Pflanzen
053G03 (AT)	92	70	76%	45	64%	0
285G08	75	57	76%	43	75%	0
SALK111492	24	22	92%	10	45%	0
SALK127550	24	24	100%	13	54%	0

Von keiner der Linien konnten Pflanzen erhalten werden, die für die Insertion homozygot waren. Dies traf auch für die F3-Generation zu, die aus den geselbsteten Heterozygoten gewonnen wurde. Alle Pflanzen der Linien 285G08, SALK111492 sowie SALK127550 waren phänotypisch unauffällig. Die Schoten der für die Insertion heterozygoten Pflanzen der SALK-Linien zeigten durchgehend gut entwickelte Samenanlagen, während die Schoten der heterozygoten 285G08-Pflanzen viele verkümmerte Samenanlagen aufwiesen. Pollenkörner der 285G08-Pflanzen, die die Insertion tragen, sind fertil, wie durch eine Rückkreuzung auf WT-Stempel nachgewiesen werden konnte. In der resultierenden Nachkommenschaft konnte die Insertion detektiert werden.

Die heterozygoten Pflanzen der Linie 053G03 zeigten alle einen aberranten Phänotyp, der auf die konstitutive Aktivierung des *AtOFP1*-Gens unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors zurückzuführen ist, wie durch RT-PCR-Analyse auf Blattmaterial gezeigt werden konnte (Abb. 3.24).

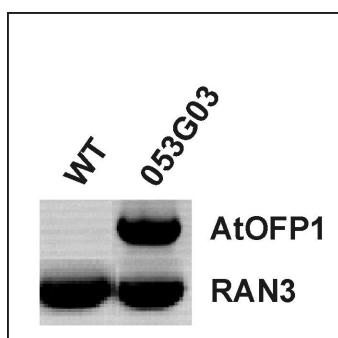


Abb. 3.24: Nachweis der *AtOFP1*-Überexpression in der Linie 053G03. Auf RNA-Präparationen von Rosettenblättern wurde mittels RT-PCR das Vorhandensein von *AtOFP1*-mRNA überprüft.

Die Pflanzen dieser Linie bildeten Blätter mit Auswölbungen an der Blattbasis. Der Stängel der Pflanzen war im Vergleich zum Wildtyp verdickt. Außerdem zeigte die Mutante ein verlangsamtes Wachstum mit einer geringeren Endgröße (Abb. 3.25).

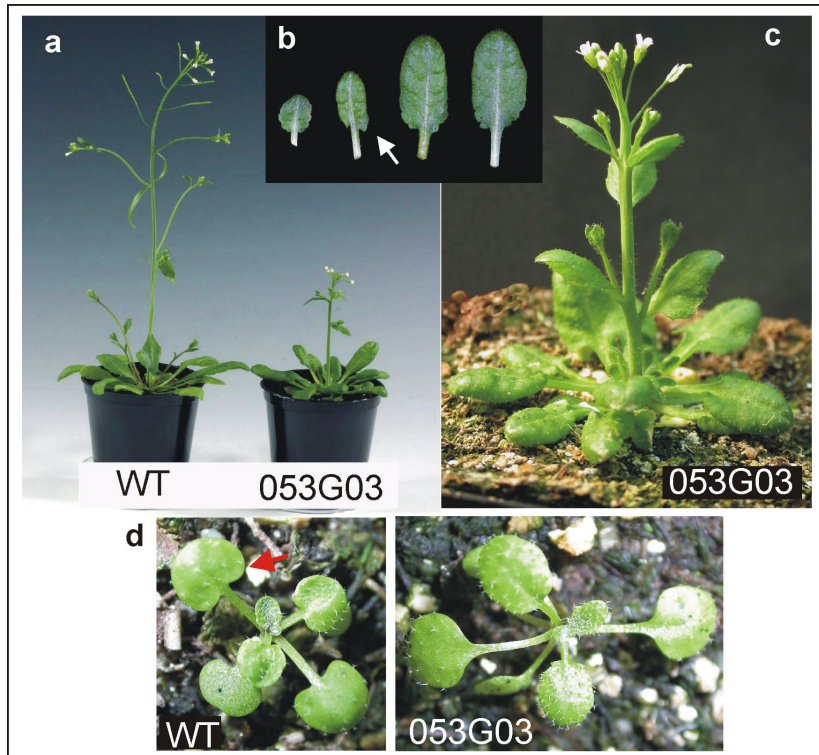


Abb. 3.25: Phänotyp der Linie 053G03. Die Insertionslinie 053G03 enthält die T-DNA mit einem CaMV35S-Promotor 282 bp vor dem Start-Codon des *AtOFPI*-Gens, was für eine ubiquitäre Expression sorgt. **a**, Die 053G03-Pflanzen zeigen ein verringertes Wachstum.

b + d, Die Blätter bilden Auswölbungen zur Blattspitze hin (Pfeil). **c**, Gesamthabitus einer 053G03-Pflanze. Die Stängel sind verdickt und die Blätter gewölbt.

Es wurden zusätzlich *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem *AtOFPI*-Gen im pLEELA-Vektor unter Kontrolle des doppelten CaMV35S-Promotors transformiert. Die Pflanzen der T1-Generation zeigten ein breites Ausprägungs-Spektrum der schon in der GABI-KAT-Linie 053G03 beobachteten Merkmale. Die am stärksten betroffenen Pflanzen zeigten außer den Veränderungen im Blatt- und Stängelbereich auch Abweichungen in den Blüten und Schoten. Sie wurden lediglich bis zu 10 cm hoch (Abb. 3.26).

Die Kelch- und Kronblätter der Überexpressionspflanzen hatten eine ovale Form, die Filamente der Staubblätter waren erheblich verkürzt und die Antheren verbreitert. Die sich aus den Blüten entwickelnden Schoten erreichten nur ein Fünftel der Länge von WT-Schoten und bildeten nur wenige reife Samenanlagen aus.

Während die Anzahl der einzelnen Blütenorgane unverändert war, zeigten alle Organe der Mutanten verglichen mit den WT-Organen eine starke Verkürzung und erhöhtes Breitenwachstum. Eine solche Proportionsverschiebung wird auch als Allometrie bezeichnet und kommt durch veränderte Wachstumsgeschwindigkeiten in der Entwicklung von Organen zustande.

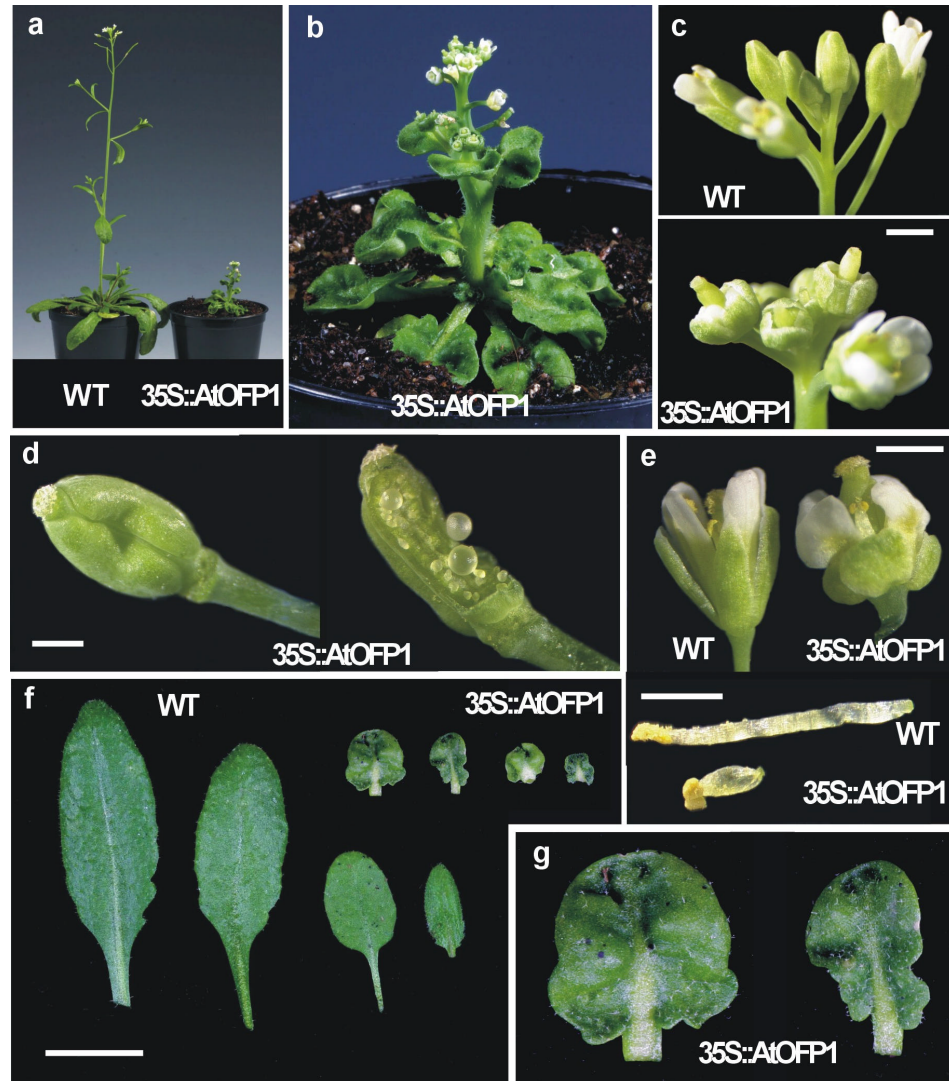


Abb. 3.26: Phänotypische Charakterisierung der *AtOFP1*-Überexpression in *A. thaliana*. Das Volllängen-Gen wurde unter Kontrolle des doppelten CaMV35S-Promotors exprimiert. **a**, Die 35S::*AtOFP1*-Pflanzen sind wesentlich kleiner als der WT. **b**, Nahaufnahme einer 35S::*AtOFP1*-Pflanze, der Spross ist stark verdickt und leicht gekrümmt. **c**, Blütenstand einer 35S::*AtOFP1*-Pflanze im Vergleich zum WT: die Stempel der jungen Blüten ragen weit über die Kelchblätter hinaus. **d**, Die Schoten der Überexpressionspflanzen sind stark verkürzt und unregelmäßig geformt; es bilden sich nur wenige fertile Samen. **e**, Nahaufnahme einer einzelnen 35S::*AtOFP1*-Blüte im Vergleich zum WT: die Sepalen und Tepalen haben eine ovale Form, die Filamente der Stamina sind verkürzt und die Antheren verbreitert (unten). **f**, Gegenüberstellung von WT-Blättern und Blättern einer 35S::*AtOFP1*-Pflanze: die Blätter der Überexpressionspflanze sind stark gewellt mit unregelmäßigen Umrissen und haben eine besonders an der Basis verbreiterte Mittelrippe. **g**, Vergrößerung von zwei Blättern einer 35S::*AtOFP1*-Pflanze. Eichstriche: c-e: 1mm, f: 20 mm.

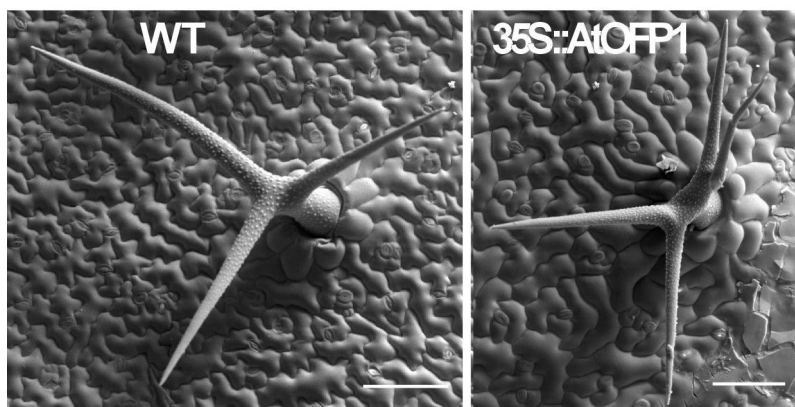


Abb. 3.27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Trichomen. Links: Typisches WT-Trichom mit drei Verzweigungen. Rechts: Trichom einer 35S::*AtOFP1*-Pflanze mit vier Spitzen. Eichstriche: 10 μm .

Die Trichome der frühen Blätter der Überexpressions-Pflanzen wiesen einen höheren Verzweigungsgrad auf als WT-Trichome. Die Abb. 3.27 zeigt ein Trichom mit vier Spitzen im Vergleich mit einem typischen drei-spitzigen WT-Trichom. Die Tab. 3.16 gibt einen statistischen Überblick über die gefundenen Trichomtypen auf Blättern von Überexpressions- und WT-Pflanzen. Bei den 35S::AtOFP1-Pflanzen hatten 43 % der untersuchten Trichome vier Spitzen, während bei den WT-Kontrollpflanzen nur 12 % der Trichome dieses Merkmal zeigten.

Tab. 3.16: Verteilung der unterschiedlichen Trichomtypen auf WT- und 35S::AtOFP1-Blättern. Ausgewertet wurden jeweils die Trichome der ersten beiden Blätter.

Pflanze	Anzahl der Trichomspitzen			Summe der analysierten Trichome
	2	3	4	
35S::AtOFP1	7	204	161	372
WT Col0	7	359	50	416

3.12. Heterologe Überexpression von *AtOFP1* in *Nicotiana tabacum*

Die Hefe-zwei-Hybrid-Untersuchungen haben gezeigt, dass viele AtOFPs mit KNOX-Proteinen aus Gerste interagieren können. Die Funktion dieser Proteine ist also vermutlich über Artgrenzen hinweg konserviert.

Für die heterologe Überexpression von *AtOFP1* wurde das *AtOFP1*-Volllängen-Gen in den pLX-Gateway-Vektor kloniert. Dieser wurde mittels *Agrobakterien*-vermittelter Blattscheibentransformation in Tabak-Gewebe eingebracht. Die sich bildenden Kalli wurden auf die Kanamycin-Resistenz des Plasmids selektiert und aus ihnen schließlich ganze Pflanzen regeneriert. Nach Bewurzelung wurden diese aus der Sterilkultur für weiteres Wachstum ins Gewächshaus überführt.

Die erhaltenen 18 Pflanzen zeigten in fast allen Organen mehr oder weniger starke Veränderungen (Abb. 3.28). Die Pflanzen mit den stärksten Phänotypen erreichten eine wesentlich geringere Wachstumshöhe als die Wildtyp-Kontrollpflanzen.

Wie auch bei der AtOFP1-Überexpression in *Arabidopsis* waren die Blätter im frühen Entwicklungs-Stadium stark gewellt, zeigten zum Teil Asymmetrien in ihrem Aufbau und hatten eine stark verbreiterte Mittelrippe. Ferner war der Winkel, in dem die Nebennerven von der Mittelrippe abzweigten erhöht und betrug teilweise über 90°. Die Überexpressions-Pflanzen hatten außerdem verdickte Stängel, die vertikale Einwölbungen aufwiesen, wie sie bei der Verwachsung von Organen auftreten. Die Nebensprosse trennten sich vom Hauptspross nicht direkt in den Blattachsen, sondern waren ein Stück mit dem Hauptspross verwachsen. Die Blüten wiesen verkürzte Kronblätter und verlängerte Stempel sowie eine stärkere Verwachsung der Kelchblätter im oberen Bereich auf. Die

sich aus den Blüten entwickelnden Schoten waren im Vergleich zu WT-Schoten verkürzt und verbreitert.

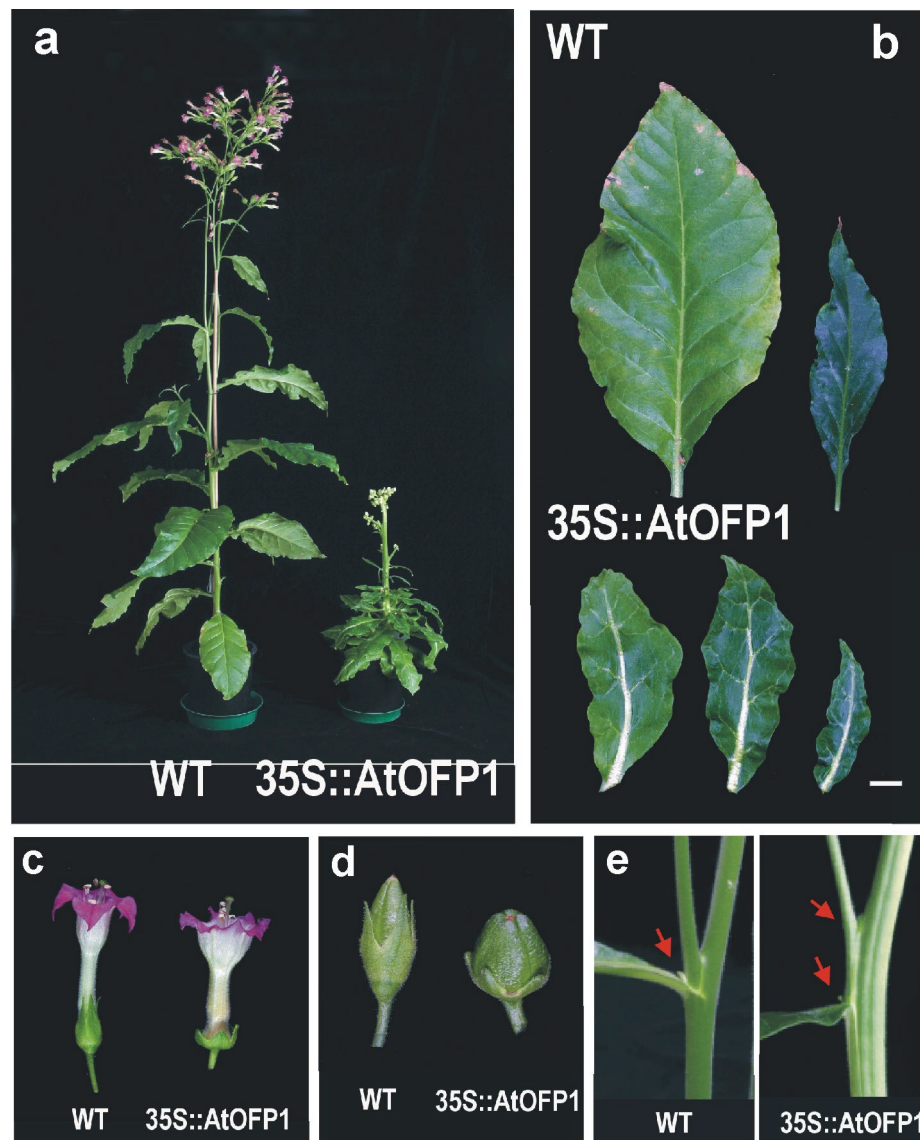


Abb. 3.28: Die heterologe Expression von *AtOFP1* unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors in *Nicotiana tabacum* erzeugt pleiotrope Veränderungen. **a**, Die 35S::AtOFP1-Pflanzen sind kleinwüchsig. **b**, Ihre Blätter weisen Asymmetrien auf und haben verbreiterte Hauptnerven. Eichstrich: 40 mm. **c**, Die Blüten haben kürzere Sepalen und stark aus der Blüte herausragende Stempel. **d**, Die Schoten sind kürzer und zur Basis hin verdickt. **e**, Die Stängel der 35S::AtOFP1-Pflanzen sind dicker und weisen vertikale Einkerbungen auf; die Nebensprosse sind mit dem Hauptspross verwachsen.

Zusammenfassung

Die Analyse von *AtOFP1*-Insertions-Pflanzen mit Insertionen im Promotor-Bereich oder in der kodierenden Region zeigte, dass für keine der Linien homozygote Pflanzen erhalten werden konnten. Ein Mangel an *AtOFP1* kann somit als letal betrachtet werden. Die Überexpression von *AtOFP1* unter dem CaMV35S-Promotor führt zu einem pleiotropen Phänotyp. Die Pflanzen blieben insgesamt sehr klein und alle oberirdischen Organe wiesen

ein verstärktes Breitenwachstum verglichen mit den WT-Organen auf. Die Blätter waren gewellt und hatten sehr breite Mittelrippen. Von den sich auf ihnen entwickelnden Trichomen hatte ein erhöhter Anteil vier statt der normalerweise üblichen drei Spitzen. Der Stängel der Überexpressions-Pflanzen besaß verglichen mit WT-Pflanzen einen größeren Durchmesser.

Die heterologe Überexpression von *AtOFP1* in *N. tabacum*-Pflanzen ergab einen Phänotyp, der mit dem der *A. thaliana*-35S::*AtOFP1*-Pflanzen vergleichbar war. Auch hier wiesen die Blätter vor allem im frühen Stadium eine starke Wellung auf. Die Blüten und die sich aus ihnen entwickelnden Schoten waren kürzer als beim WT und die Stängel der Pflanzen stark verbreitert.

3.13. Einfluss der *AtOFP1*-Überexpression auf die Expression von *AtGA20ox1*

Die Zielgene der TALE-Proteine in *A. thaliana* sind weitgehend unbekannt. Hay *et al.* (2002) zeigten, dass sowohl in *KNAT1*- als auch in *KN1*- Überexpressionspflanzen der Gehalt der *AtGA20ox1*-mRNA gegenüber dem Wildtyp stark verringert ist. *AtGA20ox1* kodiert für eine GA20-Oxidase (Xu *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1995), die an den letzten Schritten in der Gibberillinsäure-Synthese der Pflanze beteiligt ist.

Da die Überexpressions-Pflanzen von *TALE*-Genen häufig Veränderungen in den Blättern aufweisen (Müller *et al.*, 2001; Übersichtsartikel Reiser *et al.*, 2000) und ein starkes Merkmal der *AtOFP1*-Überexpressions-Pflanzen ebenfalls die veränderte Blattform ist, wurde der *AtGA20ox*-mRNA-Gehalt der Blätter von *AtOFP1*-Überexpressions-Pflanzen mit dem von Wildtyp-Pflanzen verglichen.

Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Blättern von 35S::*AtOFP1*- und WT-Pflanzen isoliert, die unter gleichen Bedingungen steril auf Nährmedium angezogen wurden. Durch eine RT-PCR mit 30 Zyklen wurde der Gehalt der *AtGA20ox1*-mRNA untersucht. Die PCRs wurden auf drei unabhängigen Präparationen mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Wie in Abb. 3.29 zu erkennen ist, ist der mRNA-Gehalt in den Blättern der 35S::*AtOFP1*-Pflanzen um ca. ein Fünftel verringert.

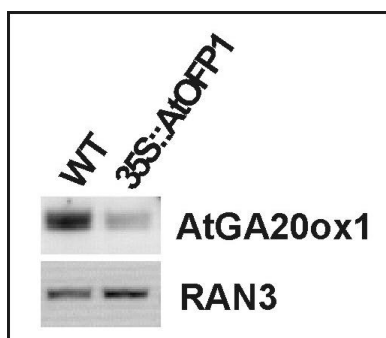


Abb. 3.29: Untersuchungen des *AtGA20ox1*-mRNA-Gehaltes. In Blättern von *AtOFP1*-Überexpressions-Pflanzen ist der Gehalt an *AtOFP1*-mRNA um ca. 80% geringer als in WT-Blättern. Als Kontrolle diente das Produkt des *RAN3*-Gens.

Um zu testen, ob die phänotypischen Veränderungen in der Überexpressions-Mutante durch den wahrscheinlich verringerten Gehalt an Gibberellinsäure hervorgerufen werden, wurden 35S::AtOFP1-Pflanzen über vier Wochen hinweg alle zwei bis drei Tage mit GA₃ besprüht. Die Pflanzen zeigten keine Veränderungen gegenüber den 35S::AtOFP1-Pflanzen, die unter denselben Bedingungen ohne GA₃-Zusatz angezogen wurden.

4. Diskussion

Die Entwicklungsvorgänge aller mehrzelligen Organismen beruhen auf dem hierarchischen Abrufen von Expressionsmustern genregulierender Proteine. Die hierfür entscheidenden Transkriptionsfaktoren werden von einigen wenigen Multi-Genfamilien kodiert. Eine dieser Gruppen, die eine hierarchisch hochgestellte Position in den Entwicklungsprozessen einnimmt, stellen die Homöobox-Gene dar.

Die Superfamilie der TALE-Gene spielt in tierischen Organismen eine zentrale Bedeutung bei der embryonalen Musterbildung. Viele Mitglieder dieser Gruppe wurden als Interaktionspartner der Hox-Gene identifiziert und verleihen diesen die notwendige DNA-Bindungs-Spezifität oder regulieren ihre intrazelluläre Lokalisation (Ryoo *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1995; Shan *et al.*, 1997). Über die Funktion der TALE-Proteine in Pflanzen ist bisher hingegen wenig bekannt.

Um die Funktion eines Proteins zu verstehen, darf man es nicht als Einzelmolekül betrachten. Alle Proteine wirken im Kontext ihrer Interaktionen in der Zelle und im Organismus. Dies umfasst die sowohl zeitlich als auch räumlich koordinierte Expression, die genetischen Interaktionen mit den Zielgenen von Transkriptionsfaktoren und die Kontrolle der Lokalisation von Proteinen in der Zelle und im Zellverband. Auf allen diesen Ebenen existieren Beispiele auch für die Regulation der TALE-Proteine.

In *A. thaliana* sollte die TALE-Superfamilie als Ganzes betrachtet werden, um einen Überblick über die konservierten Eigenschaften dieser Proteine in Bezug auf die sie beeinflussenden Regulationsmechanismen zu erhalten.

4.1. Redundanz und Spezifität

Redundanz ist eine generelle Eigenschaft der Genome von höheren Organismen. Alle Lebewesen unterliegen einer fortwährenden Selektion durch die sie umgebenden Umweltbedingungen. Um in der Evolution bestehen zu können, müssen Populationen in der Lage sein, auf Umweltveränderungen zu reagieren. Der hierfür zugrundeliegende Mechanismus ist die Einführung von Mutationen im Genom der verschiedenen Individuen, die zu einer Variation in der Population führt. Da die Mehrzahl der Mutationen in Genen eine Störung der bestehenden Funktion des kodierten Proteins zur Folge hat, wäre die Flexibilität des Genoms gering, wenn der Funktions-Ausfall jedes Gens negative Auswirkungen auf den Organismus hätte. Die Entstehung von Duplikationen ganzer Gene sorgen jedoch für einen Mechanismus, der zur Absicherung der Genfunktion führt. Das neu entstandene Duplikat kann nun gefahrlos Mutationen ansammeln, die häufig zur Bildung sog. Pseudogene, inaktiven Kopien anderer Gene, führen. Es kann jedoch auch

vorkommen, daß beide Kopien funktionell bleiben, während sie in ihrer Sequenz und ihrem Expressionsmuster divergieren und unterschiedliche Funktionen annehmen. Dadurch entstehen Genfamilien, deren Mitglieder teilweise überlappende Funktionen besitzen. Die entstehende Redundanz sorgt für eine Absicherung gegen Störungen und Ausfälle und macht den Organismus auf der zellulären Ebene stabiler.

Wie die systematischen Untersuchungen der Interaktionen innerhalb der *Arabidopsis* TALE-Superfamilie gezeigt haben, existieren für alle KNOX- und BEL-Proteine mehrere Interaktionspartner. Eine Spezifität in Hinblick auf eine Dimerisierung besteht daher nur in einem begrenzten Ausmaß. Diese könnte dadurch erreicht werden, dass die Verfügbarkeit der Interaktionspartner durch zeitlich und räumlich eingegrenzte Expressionsdomänen kontrolliert wird. Die Mehrzahl der TALE-Gene wird in mehreren Organen der Pflanze exprimiert, und die KNOX-Proteine der Klasse 2 scheinen sogar ubiquitär zu sein.

Es ist daher möglich, daß die TALE-Proteine teilweise redundante Funktionen besitzen. Diese Vermutung wird durch die in dieser Arbeit systematisch durchgeführten Analysen von Mangelmutanten der BEL-Gene bestärkt. Bei nur zwei der zwölf Gene führte ein Ausschalten der Expression zu einer offensichtlichen Veränderung des Phänotyps.

Die charakterisierten Insertionslinien zeigten allesamt keine auffälligen, phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp, unabhängig davon, ob sich die Insertion im Promotor-Bereich, in der kodierenden Region oder in einem Intron befand. Durch das Prinzip des RNAi wurde der schon von Reiser *et al.* (1995) beschriebene *bell*-Phänotyp kopiert. 66 % der transformierten Pflanzen wiesen die charakteristisch verkürzten Schoten auf und bildeten glockenförmige Samenanlagen. Das *BEL1*-Gen wird nicht nur in den Ovulen exprimiert, sondern auch in allen anderen Organen der Pflanze. Die Tatsache, dass ein Fehlen des BEL1-Proteins einen sehr spezifischen Effekt auf die Entwicklung der Samenanlagen hat, aber keine Konsequenzen auf die Ausbildung und Gestalt aller weiteren Organe, zeigt, dass hier eine redundante Funktion des Proteins vorliegt, was in den Ovulen nicht der Fall ist.

Bei den mit dem *BLH9*-RNAi-Konstrukt transformierten Pflanzen wiesen 40 % eine Veränderung im phyllotaktischen Muster auf. Verglichen mit dem Wildtyp, bei dem an einem Knoten jeweils nur ein Blatt und in dessen Achsel ein Nebenspross inseriert, kam es bei den *BLH9*-RNAi-Pflanzen zu einer häufigeren Ausbildung von Blättern und Seitensprossen. An einem Knoten inserierten bis zu drei Lateralorgane. Dieser Phänotyp wurde kürzlich auch von zwei anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Sie konnten die Mutation auf eine Insertion im *BLH9*-Gen zurückführen (Byrne *et al.*, 2003; Smith & Hake, 2003). Als Erklärung für die veränderte Phyllotaxis wird von Byrne *et al.* (2003) eine Unterbrechung des Auxin-Signalwegs vorgeschlagen. Ferner zeigten sie anhand von Dreifach-Mutanten, daß *BLH9* in einem *as1 stm*-Hintergrund notwendig ist, um das SAM aufrechtzuerhalten. Roeder *et al.* (2003) beschrieben außerdem kürzlich die Replumless

Mutante, bei der die Zellen des Replum, dem Rahmen der samentragenden Fruchtblattränder, der nach dem Aufspringen der Schote stehen bleibt, unterentwickelt ist. Diese Mutante geht ebenfalls auf eine Insertion im *BLH9*-Gen zurück.

Die Veränderungen aller dieser Mutanten betreffen das SAM und die sich entwickelnden Samenanlagen. *BLH9* wird jedoch auch in den Rosettenblättern und der Wurzel exprimiert, wo es in der RNAi-Mutante zu keinen Veränderungen kam. In diesem Kontext scheinen wiederum andere Proteine die BLH9-Funktion übernehmen zu können.

Die RNAi-Linien aller weiteren BEL-Gene hatten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen zur Folge. Aufgrund des breit gewählten Ansatzes in dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob der Gehalt der entsprechenden mRNA in diesen Pflanzen reduziert war. Weiterhin konnte nicht getestet werden, ob die Ausschaltung der Gene unter bestimmten Stressbedingungen einen Effekt zeigt.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Genfunktionen der BEL-Familie teilweise redundant sind. Auch von den KNOX-Genen in *A. thaliana* sind nur zwei rezessive Mutanten bekannt. Hierbei handelt es sich um die *stm*-Mutante (Long *et al.*, 1996) und den *brevipedicellus*-Phänotyp, der auf einen Mangel an KNAT1 zurückzuführen ist (Venglat *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002).

Viele homöotische Mutationen beruhen auf der ektopischen Expression von Genen. An Stellen, an denen ihre Genfunktion in Wildtyp-Pflanzen unterdrückt ist, können sie in Überexpressions-Mutanten Entwicklungsprogramme anschalten und dadurch für die Ausprägung von Organen an nicht dafür vorgesehenen Stellen sorgen.

Proteine können bei einer Überexpression allerdings nur in solchen Geweben einen Effekt auslösen, in denen auch alle für die Ausübung ihrer Funktion essentiellen Komponenten vorliegen.

Die Untersuchung der Überexpression der BEL-Gene brachte in der 35S::*ATH1*-Linie einen neuen Phänotyp hervor. Normalerweise findet in *A. thaliana* bei Einsetzen der reproduktiven Phase ein starkes Streckungswachstum der Internodien der letzten zwei bis drei gebildeten Knoten statt. Die Stängel der *ATH1*-Überexpressions-Pflanzen vollzogen hingegen kein Streckungswachstum, so dass sich die Bildung der Infloreszenzen direkt auf der Rosette vollzog. Es ist bekannt, dass verschiedene Pflanzenhormone an der Kontrolle der Elongation des Stängels beteiligt sind (Howell *et al.*, 2003; Folta *et al.*, 2003). Pflanzen, die in ihrem Gibberellinsäure-Gehalt reduziert sind, zeigen Zwergwuchs, während Pflanzen, die eine erhöhte Gibberellinsäure-Produktion besitzen, ein erhöhtes Stängelwachstum aufweisen (Übersichtsartikel Richards *et al.*, 2001; Schomburg *et al.*, 2003). Es wurde kürzlich gezeigt, dass das TALE-Protein KNAT1 Einfluss auf die Gibberellinsäure-Produktion, durch Unterdrückung einer GA20-Oxidase nimmt (Hay *et al.*, 2002), dasselbe wurde für ein BEL-Protein in Kartoffel gezeigt (Chen *et al.*, 2003,

2004). Diese Oxidase ist in elongierenden Stängeln normalerweise stark exprimiert (Xu *et al.*, 1997). Es ist möglich, dass auch *ATH1* einen reprimierenden Einfluss auf die Synthese dieses Pflanzenhormons ausübt und die Überexpression von *ATH1* daher zu dem beobachteten Phänotyp führt.

Einige der *BLH4*-Überexpressions-Pflanzen bildeten nur verkümmerte Blüten aus, die nicht fertil waren. Die Rückkreuzung der erzeugten Pollen auf WT-Stempel weisen darauf hin, dass die Pollenkörner zum großen Teil steril sind. Wie in RT-PCR-Analysen gezeigt werden konnte, wird das *BLH4*-Gen hauptsächlich in den Blüten transkribiert. Die Tatsache, dass eine Überexpression gerade in den Blüten einen Effekt zeigt, ist daher zunächst überraschend. Eine genauere Analyse des Expressionsmusters durch *In-situ*-Hybridisierung könnte Aufschluss über die Blütenorgane geben, die *BLH4* exprimieren und damit helfen, den Effekt der Überexpression zu interpretieren.

Die Pflanzen aller anderen Überexpressions-Linien zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten. Dies deutet darauf hin, dass sie für die Ausübung ihrer Funktion auf das Vorhandensein weiterer Kofaktoren angewiesen sind, die in den Organen, in denen sie ektopisch sind, nicht vorlagen. Bei diesen Kofaktoren kann es sich unter anderem um die KNOX-Proteine handeln. So wurde von Chen *et al.* (2004) kürzlich gezeigt, dass für die Transkriptions-Repression des *ga20ox*-Gens in Kartoffel ein Komplex aus den TALE-Proteinen StBEL5 und POTH1 vorliegen muss.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Herangehensweise der reversen Genetik nur in begrenztem Maße Aufschluss über die Funktion der TALE-Superfamilie gibt. Um trotz der scheinbar vorhandenen Redundanz der TALE-Gene Aussagen über deren Funktion mit genetischen Methoden zu bekommen, müssten mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet oder überexprimiert werden.

Auch in einfacheren Organismen wie *S. cerevisiae* und *C. elegans* weisen genomweite Untersuchungen darauf hin, dass ein Großteil der Gene nicht-essentielle Funktionen hat. In *S. cerevisiae* sind 80 % der haploiden Gen-Deletions-Mutanten lebensfähig (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002). In *C. elegans* zeigen nur 10 % der RNAi-Mutanten einen phänotypischen Effekt (Kamath *et al.*, 2003). Im Falle der Hefe ist es bereits möglich, in einem systematischen Ansatz Doppel-Mutanten zu erzeugen und auf spezifische Phänotypen zu untersuchen (Tong *et al.*, 2004).

In *A. thaliana* stellt die Produktion von Mehrfach-Mutanten hingegen einen sehr zeit- und arbeitsintensiven Prozess dar. In Hinblick auf die Anzahl der möglichen Kombinationen von TALE-Proteinen, die miteinander interagieren, wäre eine systematische Analyse von Mehrfach-Mutanten kaum durchführbar.

Eine weitere Möglichkeit, mit genetischen Methoden die TALE-Funktion zu erforschen, wäre die Herstellung dominant negativer Mutanten. War hierfür bisher die Kenntnis der

molekularen Funktion eines Proteins notwendig, gibt es mit der kürzlich vorgestellten Methode der Fusion einer Repressor-Domäne an einen Transkriptionsfaktor (Markel *et al.*, 2002) einen einfacheren und allgemeineren Zugang.

4.2. Das TALE-Interaktions-Netzwerk

Hartwell *et al.* (1999) postulieren eine modulare Organisation von Organismen. Ein funktionales Modul ist eine diskrete Einheit, deren Funktion von denen anderer Module abtrennbar ist. Dieser Aufbau zeigt sich unter anderem darin, dass einzelne Komponenten isoliert werden können, ohne dass sie ihre Funktion verlieren. Zum Beispiel kann der Prozess der Protein-Synthese aus den Komponenten dieses Moduls *in vitro* nachgebildet werden. Andere Beispiele von Modulen findet man in dem Bereich der Signal-Kaskaden und der Transkriptionsregulation.

Ein modularer Aufbau des Organismus hat auch Vorteile in der Evolution. Zum einen beeinflusst die Veränderung eines Proteins, das nur innerhalb eines Moduls Auswirkungen hat, nicht die Gesamteigenschaften der Zelle. Zum anderen können neue Funktionen entstehen, indem die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Modulen verändert werden, wodurch ein Organismus auf Veränderungen in der Umwelt angepasst werden kann.

In der post-genomischen Ära liegen Daten aus Metabolom-, Micro-Array- und genomweiten Interaktions-Studien vor. Diese können vereinheitlicht in Form von Netzwerk-Graphen dargestellt werden. Hier stellen Knoten die jeweilige Komponente, also einen Metaboliten, ein Gen oder ein Protein dar, die dann miteinander verbunden werden, wenn sie in einem biologischen Zusammenhang stehen. Dieser kann in einer Genaktivierung oder -repression, der gemeinsamen Teilnahme an einer chemischen Reaktion oder aber einer Interaktion bestehen.

Die Analyse der verschiedenen biologischen Netzwerke hat gezeigt, dass sich in ihnen der modulare Aufbau von Organisation und Funktion widerspiegelt (Rives & Galitski, 2003; Tanay *et al.*, 2004; Ravasz *et al.*, 2002). In den Graphen gibt es Gruppen von Knoten, die zueinander sehr viele Verbindungen haben, während sie zum restlichen Netzwerk nur wenige Kontakte aufweisen. Die Komponenten solcher Strukturen sind häufig Bestandteile eines funktionalen Moduls.

Mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems wurde in kombinatorischen Doppeltransformationen und genomweiten Screens ein Interaktions-Netzwerk der TALE-Proteine identifiziert. Innerhalb der TALE-Superfamilie wurden 81 Kombinationen von Proteinen gefunden, die eine Interaktion zeigten. Diese umfassten auch fünf der schon in anderen Arbeiten beschriebenen Wechselwirkungen (Bellaoui *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2003). Weitere drei bekannte Interaktionen zwischen BEL- und KNOX-Proteinen wurden

in dieser Arbeit jedoch nicht entdeckt. Es ist bekannt, dass das Hefe-zwei-Hybrid-System eine gewisse Fehlerrate beinhaltet. Die topologischen Betrachtungen von Netzwerken erlauben eine Einordnung und Bewertung von Interaktionen in einem fehler-behafteten Hintergrund (Goldberg & Roth, 2003).

Das TALE-Netzwerk weist eine ungewöhnlich hohe Verbindungsdichte auf. Dies bedeutet, dass viele Interaktionspartner eines Proteins auch untereinander interagieren können. In zufällig erzeugten Netzwerken war eine solch hohe Verbindungs-Dichte nicht vorhanden.

Den Kern des Netzwerkes stellt eine Struktur (8-Core) dar, in der alle Knoten mindestens acht Verbindungen zu den anderen Knoten des Cores aufweisen.

Um eine Aussage über die biologische Relevanz einer solchen Struktur zu bekommen, wurde in dem Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk von Hefe (Ito *et al.*, 2001; Uetz *et al.*, 2000) nach ähnlichen Strukturen gesucht. Diese Analysen ergaben, daß nur wenige solcher 8-Cores in den vorhandenen Daten existieren. Die Identifizierung der in den Cores zusammengeschlossenen Proteine zeigte wiederum, dass diese jeweils in einem funktionalen Zusammenhang stehen und somit Teile von Modulen darstellen.

Die Proteine solcher Netzwerk-Strukturen können Komponenten eines Multiprotein-komplexes sein. Hier gibt das Auftreten einer großen Anzahl von Wechselwirkungen dem Komplex eine erhöhte Stabilität. Die Proteine können jedoch auch lediglich in einem funktionalen Zusammenhang stehen, ohne dass es zu irgendeinem Zeitpunkt zu einem Zusammentreffen aller Komponenten kommt. Dies ist z.B. bei einem in dem Hefe-Netzwerk gefundenen 8-Core der Fall, der Proteine des Splicing-Apparates sowie Proteine, die am mRNA-Abbau beteiligt sind, enthält.

In ähnlicher Weise wurde dies auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Spirin & Mirny, 2003; Pereira-Leal *et al.*, 2004). Spirin & Myrni (2003) ermittelten beispielsweise ein stark vernetztes Cluster von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und einem Kern-Import-Protein.

Anhand der Vergleiche der Charakteristika der im Hefe-Netzwerk gefundenen Strukturen und dem Zentrum des TALE-Netzwerkes kann man schließen, dass es sich bei dem TALE-Netzwerk höchstwahrscheinlich um ein funktionales Modul handelt.

Im Zentrum dieses Netzwerkes steht eine neue Familie von Pflanzenproteinen, die alle über eine konservierte Domäne, die sogenannte OVATE-Domäne, in ihrem C-terminalen Bereich verfügen. Aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten konnten dieser Familie der AtOFPs (**A. thaliana** **O**vate **f**amily **p**rotein) im *Arabidopsis*-Genom 18 Gene zugeordnet werden, über deren Funktion bislang noch nichts bekannt war. Homologe Proteine werden auch in Reis und Tomate gefunden, wo eine Störung der Expression des OVATE-Proteins als Ursache für die Bildung von flaschenförmigen Früchten identifiziert wurde (Liu *et al.*, 2002). Neun Mitglieder dieser Familie in *A. thaliana* können mit mehreren TALE-

Proteinen interagieren. Für diese Wechselwirkungen ist die OVATE-Domäne verantwortlich, die mit der Homöodomäne der TALE-Proteine in Kontakt tritt. Die Abb. 4.1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit ermittelten bzw. aus anderen Publikationen (Bellaoui *et al.* 2001; Müller *et al.*, 2001) bekannten Interaktionsdomänen der Proteine des TALE-Moduls.

Der Befund, dass die OVATE-Domäne sowohl für die Wechselwirkung mit den KNOX- als auch mit den BEL-Proteinen verantwortlich ist, weist darauf hin, dass die AtOFPs und TALE-Proteine nicht Teil eines Multiproteinkomplexes sind, sondern paarweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben der Pflanze miteinander interagieren.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die AtOFPs eine Familie von Proteinen darstellen, die für einen allgemeinen Regulations-Mechanismus der TALE-Protein-Funktion verantwortlich ist.

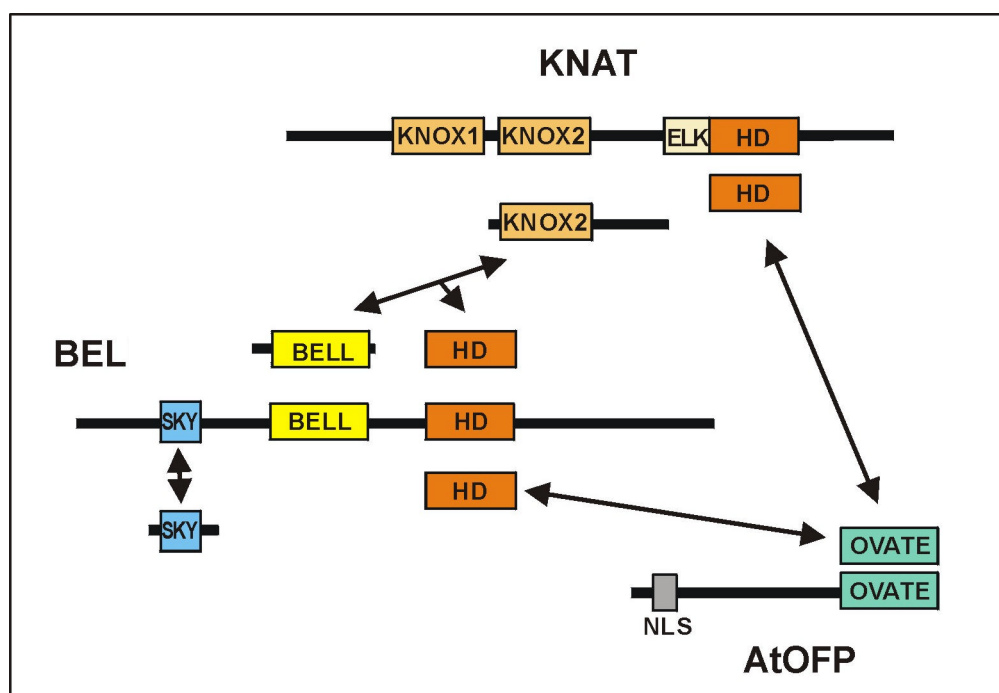


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der ermittelten Interaktions-Domänen der TALE-Proteine und AtOFPs. KNOX1 und 2: zweiteilige KNOX-Domäne, ELK: ELK-Domäne, HD: Homöodomäne, BELL: BELL-Domäne, SKY: SKY-Box, NLS: Kernlokalisierungssignal, OVATE: OVATE-Domäne.

Die beiden Familien der TALE-Proteine haben sich höchstwahrscheinlich schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Pflanzenevolution voneinander getrennt (Becker *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass mehrere Mitglieder der AtOFP-Familie sowohl mit BEL- als auch mit KNAT-Proteinen interagieren können, zeigt, dass diese Interaktionen über einen langen Zeitraum hinweg konserviert geblieben sind.

Auf den Bereichen von Genen, die für Interaktions-Domänen von Proteinen kodieren, liegt ein hoher Selektionsdruck, da die Interaktion auf einer molekularen Wechselwirkung von Aminosäuren beider Interaktionspartner beruht. Die Bereiche der Proteine, die miteinander in Kontakt treten, sind genau aufeinander abgestimmt, so daß eine einseitige Veränderung häufig zu einem Verlust der Interaktion führt.

Gen-Familien entstehen durch die Duplikation von DNA-Bereichen. Die kodierten Proteine der beiden Produkte der Duplikation haben zunächst noch dieselben Interaktions-Spezifitäten. Aufgrund eines fehlenden Selektionsdrucks auf eines der Gene kann es jedoch sehr bald zu einer Veränderung der Interaktions-Spezifitäten kommen. Wagner (2001) hat festgestellt, dass die Fluktuation der Protein-Interaktionen im Proteom nach Gen-Duplikationen sehr hoch ist. Die Interaktionen zwischen den Proteinen der TALE-Superfamilie und der AtOFP-Familie sind über einen langen Zeitraum hinweg konserviert geblieben. Dies deutet darauf hin, dass diese Wechselwirkungen einer positiven Selektion unterlagen, was auf eine wichtige Funktion in den zellulären Prozessen der Pflanze hinweist.

Diese Vermutung wird außerdem dadurch bestärkt, dass die AtOFPs auch mit KNOX-Proteinen aus Gerste interagieren können, die Wechselwirkung also über die Grenzen der Dikotyledonen hinweg konserviert ist.

Es ist anzunehmen, dass diese Proteine eine wichtige Funktion in den Entwicklungsprozessen von Pflanzen haben.

Die Untersuchung von vier unabhängigen Insertions-Linien von *AtOFP1* ergab, dass keine für die Insertion homozygoten Pflanzen erzeugt werden konnten.

Zwei der Linien enthielten eine Insertion unmittelbar am Anfang des kodierenden Bereichs. Alle Samenanlagen in den Schoten entwickeln sich normal und alle Samen der Folge-Generation keimen aus. Die Tatsache, dass keine für die Insertion homozygoten Pflanzen gebildet werden, lässt den Schluss zu, dass die Insertion einen letalen Effekt auf die Pollen hat.

Bei den anderen beiden Linien ist die T-DNA im putativen Promotor-Bereich inseriert. In der Linie 053G03 befindet sich die Insertion, die einen CaMV35S-Promotor enthält, in der korrekten Orientierung zum Gen hin, was eine Überexpression auslöst, wie anhand von RT-PCR-Analysen gezeigt werden konnte. Die beobachteten Keimungsraten und Segregationen deuten darauf hin, dass die homozygoten Samen nicht auskeimen. Diese Insertionen scheinen also keine letalen Effekte auf den Pollen zu haben, da sie vermutlich die Genexpression nicht vollständig unterdrücken. Sie scheinen jedoch in der weiteren Entwicklung der homozygoten Samen zu weitreichenden Störungen zu führen, so dass diese nicht auskeimen. Die Tatsache, dass die Linie 053G03 das AtOFP1-Gen unter der

Kontrolle des CaMV35S-Promotors exprimiert, spricht nicht gegen diese Vermutungen, da dieser Promotor in einigen Geweben der Pflanze, z.B. den Pollen, nicht aktiv ist.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass eine vollständige Unterbrechung der *AtOFPI*-Genfunktion letal ist.

Die Tatsache, dass es im TALE-Netzwerk mehrere AtOFPs mit ähnlichen Interaktionsmustern gibt, könnte zu der Vermutung Anlass geben, dass diese Proteine eine redundante Funktion erfüllen. Man muss jedoch beachten, dass das Netzwerk weder die zeitlichen noch die räumlichen Einschränkungen beinhaltet, die im pflanzlichen Organismus bestehen. Die Analysen der Expressionsmuster der AtOFPs mittels RT-PCR haben gezeigt, dass diese in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Es ist daher möglich, dass sie zwar eine ähnliche Funktion haben, diese jedoch in unterschiedlichen Pflanzenteilen oder zu verschiedenen Zeiten in der Entwicklung wahrnehmen.

Die Überexpression von *AtOFPI* unter dem doppelten ubiquitären CaMV35S-Promotor führt zu einem pleiotropen Phänotyp. Die Pflanzen zeigten ein eingeschränktes Wachstum, hatten stark verdickte Stängel und zeigten sowohl in den Blättern als auch allen Blütenorganen ein verstärktes Breitenwachstum, während das Längenwachstum verglichen mit dem WT geringer war. Die Umrisse der Blätter waren unregelmäßig und die Blätter hatten wie auch die Schoten außerdem eine wellenförmige Struktur. Die beobachtete Verschiebung der Proportionen, auch als Allometrie bezeichnet, kann durch eine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit während der Entwicklung der Organe zustande kommen. Dies deutet darauf hin, dass AtOFPI Einfluss auf die Zellteilungsaktivität oder aber die Ebene der Zellteilungen nimmt.

In den *AtOFPI*-Überexpressions-Mutanten wurde außerdem eine starke Erhöhung der Anzahl von Trichomen mit drei Verzweigungen (also vier Spitzen) beobachtet.

Die Trichome von *A. thaliana* sind einzelne sehr große Zellen, die in regelmäßigem Abstand auf den Blättern und Stängeln entstehen. Während ihrer Entwicklung durchlaufen sie mehrere Runden der Endoreplikation und bilden zwei Verzweigungen aus. Es sind mehrere Mutanten bekannt, die in der Anzahl der Trichom-Verzweigungen verändert sind. In vielen von ihnen korreliert die Erhöhung oder Erniedrigung der Verzweigungszahl mit dem DNA-Gehalt der Trichom-Zellen (Hülkamp *et al.*, 1994). Die beobachtete erhöhte Zahl der Trichome mit mehr als zwei Verzweigungen auf den Blättern der *AtOFPI*-Überexpressions-Pflanzen könnte also einen weiteren Hinweis auf die Deregulation der Zellzyklus-Kontrolle darstellen.

Es wurde weiterhin eine T-DNA-Insertions-Linie charakterisiert, bei der die Insertion eines CaMV35S-Promotors im putativen Promotor-Bereich des *AtOFPI*-Gens eine ubiquitäre Expression auslöste. Hier traten ähnliche phänotypische Veränderungen in den Blättern und Stängeln auf, wie es bei den 35S::*AtOFPI*-Pflanzen der Fall war. Die Blüten hingegen

waren keinen allometrischen Veränderungen unterworfen. Dies deutet darauf hin, dass für die Wirkung von AtOFP1 ein Konzentrationseffekt eine Rolle spielt. Wie die Analyse des Expressionsmusters in WT-Pflanzen zeigte, ist *AtOFP1* normalerweise nicht in den Blättern exprimiert. Hier könnte also jede Expression des Gens eine Veränderung der Gestalt nach sich ziehen. In den Blüten hingegen, wo das Gen auch normalerweise exprimiert wird, scheint eine stark erhöhte Expression aufgrund des doppelten CaMV35S-Promotors nötig zu sein, um eine Störung der Prozesse zu verursachen, an denen AtOFP1 beteiligt ist.

Die Tatsache, dass in den *AtOFP1*-Überexpressions-Pflanzen das *AtGA20ox1*-Gen herabreguliert ist, stimmt mit der Beobachtung überein, dass Pflanzen, die mit *AtGA20ox1*-Antisense-Konstrukten transformiert wurden, ebenfalls ein reduziertes Wachstum zeigen (Coles *et al.*, 1999). Dieser Effekt ist auf die Reduktion des Gibberellinsäure-Gehaltes zurückzuführen, da eine Behandlung der *AtGA20ox1*-Antisense-Pflanzen mit GA₃ aufgehoben werden konnte. In Kartoffel konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Komplex aus einem BEL- und einem KNOX-Protein an eine Sequenz im Promotor des *ga20ox1*-Gens bindet und dessen Expression reprimiert (Chen *et al.*, 2004). KNAT1 hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die *AtGA20ox1*-Expression (Hay *et al.*, 2002). Im Blatt scheint das GA20ox1-Protein und die mit der Oxidase verbundene Gibberellinsäure-Produktion einen entscheidenden Einfluss auf die Gestaltung der Form zu nehmen (Übersichtsartikel Tsiantis & Hay, 2003). Der Phänotyp der verzweigten Blätter in *KNAT1*-Überexpressionspflanzen kann durch die Zugabe von GA₃ abgemildert, aber nicht vollständig aufgehoben werden (Hay *et al.*, 2002). Die Behandlung der 35S::AtOFP1-Pflanzen mit GA₃ hat hingegen keinen Einfluss auf ihren Phänotyp. Der erniedrigte Gehalt an *AtGA20ox1*-mRNA ist also nicht alleine verantwortlich für die Veränderungen in den Überexpressions-Pflanzen. Vielmehr kann es sich hierbei um einen sekundären Effekt handeln, der durch eine post-translationale Fehl-Regulation der TALE-Proteine zustande kommt.

Die heterologe Überexpression von *AtOFP1* in *N. tabacum* brachte einen Phänotyp hervor, der dem der 35S::AtOFP1-Pflanzen von *A. thaliana* in weiten Teilen entsprach. Dies zeigt, dass die Funktion des AtOFP1 über Artgrenzen hinweg konserviert ist, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass das Protein im Hefe-zwei-Hybrid-System mit verschiedenen KNOX-Proteinen aus Gerste interagiert.

Die beobachteten Auswirkungen des Ausschaltens und der Überexpression von *AtOFP1* zeigen, dass dieses Gen ein wichtiger Regulator in den Entwicklungs-Prozessen der Pflanze ist.

Das Ovate-Gen in Tomate wurde im Zusammenhang mit einer rezessiven Mutante entdeckt, bei der eine Mutation zu einem vorzeitigen Abbruch des Leserasters führt (Liu *et al.*, 2002). Die mutanten Pflanzen bilden birnenförmige Früchte aus. Die Tatsache, dass die

Ausschaltung eines einzigen Gens zu einer erheblichen morphologischen Veränderung führt, brachte Liu *et al.* zu der Vermutung, dass es sich bei *Ovate* um ein Haupt-Regulations-Gen handelt. Tomaten-Pflanzen, die *Ovate* unter dem CaMV35S-Promotor überexprimieren, zeigen u.a. Blätter, die weniger gefiedert sind, als es bei WT-Pflanzen der Fall ist. KNOX-Proteine stehen über die Kontrolle der GA-Produktion im Zusammenhang mit der Blattgestaltung. Es ist daher anzunehmen, dass auch die bei Mangel- und Überexpression des OVATE-Proteins beobachteten Veränderungen über eine Fehlregulation der TALE-Protein-Funktion zustande kommen.

4.3. AtOFPs regulieren die intrazelluläre Lokalisation der TALE-Proteine

Ein Hinweis auf die Art, in der die AtOFPs die TALE-Funktion regulieren, wurde anhand von Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der Proteine gefunden.

Die Lokalisation von BLH1, BLH7 und KNAT1 sowie AtOFP1 und AtOFP5 wurde anhand der transienten Expression von RFP- und GFP-Fusionen analysiert. Alle untersuchten TALE-Proteine weisen eine Kernlokalisierung auf. Die AtOFPs hingegen zeigen eine Assoziation mit dem Cytoskelett und sind im Nukleolus zu finden. Aufgrund von Vergleichen mit der Lokalisation eines Actin- und eines Mikrotubuli-assoziierten GFP-Fusions-Proteins kann man schließen, dass sie an den Mikrotubuli der Zelle lokalisiert sind.

Bei einer Koexpression von AtOFP1 oder AtOFP5 und BLH1 kommt es zu einer Relokalisierung dieses TALE-Proteins. Das normalerweise kernlokalisierte Protein wird in das Cytoplasma gebracht oder dort festgehalten, wo es sich zusammen mit AtOFP1 bzw. AtOFP5 in punktförmigen Strukturen am Cytoskelett ansammelt. Dies stellt eine Verifikation der im Hefe-zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktion dar, da bei einer Koexpression des nicht-interagierenden BLH7-Proteins keine Veränderung von dessen Kern-Lokalisation auftritt.

Die Regulation der Funktion von TALE-Proteinen auf der post-translationalen Ebene ist anhand verschiedener Beispiele in tierischen und pflanzlichen Organismen gezeigt. So ist bekannt, dass das *Drosophila*-TALE-Protein Extradenticle (EXD) nur in Zellen, in denen auch ein zweites TALE-Protein, Homothorax (HTH) anwesend ist, in den Kern transportiert wird und funktional ist (Rieckhof *et al.*, 1997; Jaw *et al.*, 2000; Abu-Shaar, 1999). Dasselbe gilt für die orthologen Proteine PBX und Meis1 aus Säugetieren (Mercader *et al.*, 1999). Kürzlich wurde außerdem von Bhatt *et al.* (2004) gezeigt, dass cytoplasmatisches BLH9 in Anwesenheit von KNAT1 oder STM verstärkt in den Kern transportiert wird.

Eine negative Kontrolle von Transkriptionsfaktoren durch ein Zurückhalten am Cytoskelett im Cytoplasma ist von tierischen Proteinen, u. a. auch dem TALE-Protein PBX, bekannt (Huang *et al.*, 2003, Ziegelbauer *et al.*, 2001; Dong, C. *et al.*, 2000). Die post-transkriptionale Kontrolle der TALE-Proteine durch die Regulation ihrer intrazellulären Lokalisation scheint somit ein wichtiger Faktor zu sein, der ihre Funktion kontrolliert. Bei der beobachteten Umlokalisierung von BLH1 durch die AtOFPs könnte es sich also um einen Kontroll-Mechanismus handeln, der sich in ähnlicher Weise in Tieren und Pflanzen entwickelt hat.

AtOFP1 könnte die neu gebildeten TALE-Proteine, mit denen es interagiert, direkt im Cytoplasma binden und dabei das Kern-Lokalisierungs-Signal der TALE-Proteine maskieren. Das Kern-Lokalisierungs-Signal der KNOX-Proteine befindet sich in der Homöodomäne, also dem Bereich, der mit den AtOFPs interagiert.

Da AtOFP1 ebenfalls über ein Kern-Lokalisierungs-Signal verfügt und bei transienter Expression in Tabak-Epidermis-Zellen im Nukleolus gefunden wurde, besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass dieses Protein die interagierenden TALE-Proteine im Kern bindet und von dort exportiert.

Die interzelluläre Kommunikation ist für die Ausbildung unterschiedlicher Strukturen in vielzelligen Organismen essentiell. In der Pflanze sind benachbarte Zellen miteinander durch Plasmodesmata verbunden. Dadurch entsteht eine cytoplasmatische Kontinuität zwischen fast allen Zellen. Gerade in den letzten Jahren haben sich die Hinweise darauf vermehrt, dass viele Transkriptionsfaktoren, die in der Pflanzenentwicklung eine Rolle spielen, nicht-zell-autonome Effekte ausüben können, die durch Protein- und/oder mRNA-Transport zustande kommen (Übersichtsartikel: Haywood *et al.*, 2002). Insbesondere wurde gezeigt, dass das Mais-KNOX-Protein KN1 sowie KNAT1 und STM in benachbarte Zellen transportiert werden und dort ihre Funktionen ausüben (Lucas *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2003).

Es wird postuliert, dass es zwei verschiedene Mechanismen des Zell-Zell-Transportes von Proteinen durch die Plasmodesmata gibt (Crawford & Zambryski, 2000). Ein „ungerichteter“ Transport kann durch die Diffusion von Proteinen stattfinden und wird z.B. als Grundlage für die Zell-Zell-Bewegung des Transkriptions-Faktors LEAFY angenommen (Wu *et al.*, 2003). Ein zweiter, „gerichteter“ Mechanismus erfordert eine Wechselwirkung der zu transportierenden Makromoleküle mit Komponenten der Plasmodesmata, die zu einer spezifischen Öffnung dieser Strukturen führt. Am besten untersucht sind diese „gerichteten“ Transportvorgänge anhand von viralen Proteinen, den sogenannten Movement-Proteinen, bei der Ausbreitung von Pflanzenviren. Hier wurde an einigen Beispielen gezeigt, dass eine direkte oder durch weitere Proteine vermittelte Bindung an die Mikrotubuli stattfindet (Heinlein *et al.*, 1995; Boyko *et al.*, 2002;

Agranovsky *et al.*, 1998). Es ist anzunehmen, dass die Viren dabei einen Transportweg ausnutzen, der von der Pflanze ebenfalls verwendet wird.

Auch für KN1 wurde das Vorliegen eines „gerichteten“ Transportes postuliert (Kragler *et al.*, 2000). Die Assoziation von TALE-Proteinen an die Mikrotubuli könnte daher auch einen ersten Schritt bei der Aufklärung des Phänomens dieses interzellulären Transportes von TALE-Proteinen bedeuten. Die Bindung von TALE-Proteinen über AtOFP1 an die Mikrotubuli könnte diese zu den Plasmodesmata geleiten, wo sie über weitere Proteine in die benachbarte Zelle transportiert werden könnten.

Für die Funktion der TALE-Proteine scheint eine Kontrolle der intrazellulären Lokalisation auch durch die Wechselwirkungen von KNOX- und BEL-Proteinen zustande zu kommen. So zeigten Bhatt *et al.* (2004), dass BLH9 verstärkt im Kern lokalisiert ist, wenn STM oder KNAT1 ebenfalls exprimiert werden.

Die Tatsache, dass die Homöodomäne der BEL-Proteine sowohl für die Interaktion mit AtOFP1 als auch zumindestens teilweise für die Interaktion mit den KNAT-Proteinen verantwortlich ist, eröffnet die Möglichkeit, dass es in der Zelle zu einer Konkurrenz um diese Bindestelle kommt. Die Balance zwischen den Konzentrationen der verschiedenen TALE-Proteine und AtOFPs würde dann über die Assoziation mit dem Cytoskelett (und möglichen Transport) oder aber den Import in den Kern entscheiden.

Dies könnte eine Erklärung für die konzentrationsabhängige Ausprägung der Merkmale in den zwei verschiedenen AtOFP1-Überexpressions-Linien darstellen.

Sowohl AtOFP1 als auch AtOFP5 scheinen die TALE-Proteine über denselben Mechanismus zu kontrollieren. AtOFP5 interagiert im Hefe-zwei-Hybrid-System mit sieben verschiedenen BEL-Proteinen, nicht jedoch mit den KNOX-Proteinen. AtOFP1 hingegen interagiert sowohl mit BEL- als auch mit KNOX-Proteinen. Die Spezifität der TALE-Proteine könnte durch die differentielle Expression der AtOFP-Gene zustande kommen. Wie die RT-PCR-Analysen gezeigt haben, werden die AtOFP-Gene in verschiedenen Organen der Pflanze exprimiert. Kommt es in einer Zelle zur Expression mehrerer AtOFPs mit verschiedenen Bindungs-Spezifitäten, könnten die unterschiedlichen Konzentrations-Verhältnisse zwischen den AtOFPs und den TALE-Proteinen für eine Kontrolle des Kernimports verantwortlich sein.

Mit dem Netzwerk-Ansatz zur Analyse der TALE-Proteine konnte ein funktionales Modul ermittelt werden. Die darin enthaltenen Proteine einer neuen Pflanzen-Proteinfamilie stellen wichtige Regulatoren der Pflanzenentwicklung dar, wie exemplarisch anhand der Ausschaltung und Überexpression des *AtOFP1*-Gens gezeigt werden konnte. Der Mechanismus, mit dem die AtOFPs die TALE-Proteine regulieren, scheint eine post-translationale Kontrolle der intrazellulären Lokalisation zu sein. Die Entdeckung dieser

neuen Regulatoren wäre durch herkömmliche, genetische Ansätze nicht möglich gewesen. Die Kenntnis dieser Regulatoren erlaubt nun eine neue Herangehensweise an die Aufklärung der TALE-Protein-Funktion. Durch die Expression von AtOFP-Genen unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren kann eine Störung mehrerer TALE-Proteine gleichzeitig hervorgerufen werden. Dies würde es trotz der anscheinend vorhandenen Redundanz in der TALE-Superfamilie ermöglichen, die von diesen Proteinen gesteuerten Entwicklungs-Vorgänge zu untersuchen.

Zusammenfassung

Die Homöodomänen-Proteine stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die eine zentrale Rolle in den Entwicklungs-Prozessen aller mehrzelliger Organismen spielt. Die TALE-Superfamilie der Homöodomänen-Proteine wird in Pflanzen von den Familien der BEL- und der KNOX-Gene kodiert. Über die Funktion der pflanzlichen TALE-Proteine ist bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* die TALE-Superfamilie als Ganzes betrachtet und mittels genetischer, molekular- und zell-biologischer Ansätze ein gemeinsamer Regulationsmechanismus gefunden.

Es wurden Mangelmutanten aller BEL-Gene mit Hilfe der RNAi-Technik hergestellt sowie T-DNA-Insertionslinien einiger BEL-Gene charakterisiert. Ferner wurden die Auswirkungen einer Überexpression dieser Gene unter Kontrolle des ubiquitären CaMV35S-Promotors untersucht. Mittels der RNAi-Technik konnte der bereits früher veröffentlichte *bell*-Phänotyp erzeugt werden, der eine Missbildung der Ovulen verursacht. Eine Störung der *BLH9*-Expression durch RNAi führte in den Pflanzen zu einer veränderten Phyllotaxis. Die Überexpression des *ATH1*-Gens beeinflusste das Streckungswachstum des Stängels, während die Überexpression von *BLH4* zur Bildung steriler Blüten führte. Die BEL-Gene scheinen also Funktionen bei der Entwicklung unterschiedlicher Organe zu haben, die teilweise redundant sind, da die Unterdrückung der Expression von nur zwei der zwölf BEL-Gene einen offensichtlichen Effekt zeigte.

Die Funktion der TALE-Proteine im Hinblick auf ihre Einbindung in die zellulären Netzwerke wurde mit Hilfe des Hefe-zwei-Hybrid-Systems untersucht. Diese Untersuchungen ergaben ein Interaktions-Netzwerk der TALE-Proteine, das alle topologischen Charakteristika eines funktionalen Moduls aufweist. In diesem Netzwerk enthalten sind neun Mitglieder einer neuen pflanzlichen Proteinfamilie (AtOFPs), die durch das Vorhandensein einer konservierten C-terminalen Domäne von 60 Aminosäuren gekennzeichnet ist. Diese sogenannte OVATE-Domäne interagiert mit der Homöodomäne der TALE-Proteine.

Anhand von Analysen verschiedener *AtOFPI*-T-DNA-Linien konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Unterbrechung der Genexpression letal ist. Die Überexpression von *AtOFPI* führt sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tabak zu allometrischen Veränderungen, die vermutlich durch einen generellen Einfluss auf die Zellzyklus-Kontrolle hervorgerufen werden.

Für die Proteine AtOFP1 und 5 konnte gezeigt werden, dass sie am Cytoskelett assoziiert sind und bei einer Koexpression mit BLH1 dessen Relokalisation aus dem Zellkern ins Cytoplasma bewirken. Diese Eigenschaft der AtOFPs korreliert mit der Interaktions-Fähigkeit, da eine Koexpression mit einem im Hefe-zwei-Hybrid-System nicht interagierenden BEL-Protein keine Änderung der Kern-Lokalisation nach sich zieht. Ein allgemeiner Kontrollmechanismus, mit dem die AtOFPs die Präsenz der TALE-Proteine im Zellkern regulieren, wird postuliert. Weiterhin ist es möglich, dass die AtOFPs über die Assoziation von TALE-Proteinen an die Mikrotubuli einen ersten Schritt im Verständnis der Prozesse darstellen, die für den Zell-Zell-Transport der KNOX-Proteine verantwortlich sind.

Die Entdeckung der AtOFPs als Bestandteile des regulatorischen Netzwerkes der TALE-Proteine ermöglicht eine neue Herangehensweise an die Aufklärung der Funktion dieser Homöodomänen-Proteine.

Abstract

Homeodomain proteins play a central role in developmental processes of all multicellular organisms. Members of the TALE superfamily are encoded by BELL and KNOX genes in plants. Despite considerable progress in recent years, the molecular function of these proteins still remains obscure. Using genetic, molecular and cell-biological methods the TALE protein family in *Arabidopsis thaliana* was investigated to elucidate common regulatory principles.

Loss of function mutants of each single BEL gene were generated using RNAi technology. Plants reduced in *BEL1* expression phenocopy the formerly published *bell* mutant. Loss of *BLH9* expression has an influence on the phyllotactic pattern. By systematic overexpression studies two new phenotypes were obtained. Overexpression of *ATH1* interferes with elongation growth of the stem. Gain of function mutants of *BLH4* produce sterile flowers. These results indicate an influence of BEL proteins on developmental processes of different plant organs. Also function of TALE proteins seems to be partly redundant indicated by the fact that only two of the BEL gene knock outs have an obvious phenotypical effect.

A second approach covered the functional analysis of TALE proteins in respect of their involvement in molecular networks. Yeast two-hybrid studies revealed a densely connected TALE interaction network which has all characteristics of a functional module. Nine members of a novel plant specific protein family denominated AtOFP (*A. thaliana* Ovate Family Proteins) are interwoven in the network. The AtOFPs are characterized by a conserved C-terminal domain mediating the interaction with the homeodomain of TALE proteins. Knock out of AtOFP1 in *Arabidopsis* plants turned out to be lethal. Gain of function mutants of this gene showed pleiotropic effects with allometric changes in all organs. Tobacco plants heterologously expressing *AtOFP1* under control of the 35S promoter displayed similar phenotypical aberrations. The TALE-AtOFP1 interactions therefore seem to be central in cell cycle control mechanisms.

The subcellular localization of AtOFPs and TALE proteins, as well as their direct interactions *in vivo*, was analyzed. Both AtOFP1-GFP and AtOFP5-GFP accumulated in nucleoli and associated with cytoskeletal structures. Coexpression of BLH1 and AtOFP1 or 5, respectively, resulted in a marked relocalization of the TALE protein from the nucleus to the cytoplasmic space where it was found in punctate structures aligned with the cytoskeleton. This relocalization effect is dependent on the interaction of AtOFPs with specific BEL proteins, as AtOFP1-GFP had no effect on the localization of BLH7-RFP, a BEL protein unable to interact with AtOFP1.

A general regulatory mechanism of TALE protein localization by AtOFPs is postulated. The identification of AtOFPs linking TALE protein function and cytoskeleton association may also indicate a first step in the understanding of the molecular machinery underlying the frequently reported capacity of plant KNOX proteins to rapidly move from cell to cell.

Knowledge of AtOFPs as central regulators of TALE proteins enables new approaches to the function of these homeodomain proteins.

Literaturverzeichnis

- Abu-Shaar, M., Don Ryoo, H., Mann, R.S. (1999): Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* **13**, 935-945.
- Agranovsky, A.A. *et al.* (1998): Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potexvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus. *J. Gen. Virol.* **79**, 889-895.
- Alonso, J.M. *et al.* (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., Wootton, J.C. (1994): Issues in searching molecular sequence databases. *Nat. Genet.* **6**, 119-129.
- Altschul, S.F. *et al.* (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Ausubel, F.M. *et al.* (1993): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., N.Y., USA.
- Bailey, P.C. *et al.* (2003): Update on the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **15**, 2497-2502.
- Barabasi, A.L. & Oltvai, Z.N. (2004): Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 101-13.
- Becker, A., Bey, M., Bürglin, T.R., Saedler, H., Theissen, G. (2002): Ancestry and diversity of BEL1-like homeobox genes revealed by gymnosperm (*Gnetum gnemon*) homologs. *Dev. Genes Evol.* **212**, 452-457.
- Bellaoui, M. *et al.* (2001): The *Arabidopsis* BELL1 and KNOX TALE Homeodomain Proteins Interact through a Domain Conserved between Plants and Animals. *Plant Cell* **13**, 2455-2470.
- Bhatt, A.M., Etchells, J.P., Canales, C., Lagodienko, Dickinson, H. (2004): VAAMANA - a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 103-111.
- Boyko, V. *et al.* (2002): Intramolecular complementing mutations in tobacco mosaic virus movement protein confirm a role for microtubule association in viral RNA transport. *J. Virol.* **76**, 3974-3980.

- Breitkreutz, B.J., Stark, C., Tyers M. (2003): The GRID: the General Repository for Interaction Datasets. *Genome Biology* **4**(3): R23.
- Bürglin, T.R. (1997): Analysis of TALE superclass homeobox genes (Meis, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4173-4180.
- Bürglin, T.R. (1998): The PBC domain contains a MEINOX domain: Coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Dev. Genes Evol.* **208**, 113-116.
- Byrne, M.E. et al. (2000): Assymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-971.
- Byrne, M.E., Simorowski, J., Martienssen, R.A. (2002): *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in Arabidopsis. *Development* **129**, 1957-1965.
- Byrne, M.E., Groover, A.T., Fontana, J.R., Martienssen, R.A. (2003): Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the Arabidopsis homeobox gene *BELLRINGER*. *Development* **130**, 3941-3950.
- Celenza, J.L. & Carlson, M. (1986): A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* **233**, 1175-1180.
- Celenza, J.L., Eng, F.J., Carlson, M. (1989): Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5045-5054.
- Chang, C.P., Shen, W.F., Rozenfeld, S., Lawrence, H.J., Largman, C., Cleary, M.L. (1995): Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* **9**, 663-674.
- Chen, H., Rosin, F.M., Prat, S., Hannapel, D.J. (2003): Interacting Transcription Factors from the Three-Amino-Acid Loop Extension Superclass Regulate Tuber Formation. *Plant Physiol.* **132**, 1391-1404.
- Chen, H., Banerjee, A.K., Hannapel, D.J. (2004): The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1* *Plant J.* **38**, 276-284.
- Chuck, G., Lincoln, C., Hake, S. (1996): *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 1277-1289.
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.

- Coles, J.P. *et al.* (1999): Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J.* **17**, 547-556.
- Crawford, K.M. & Zambryski, P.C. (2000): Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr. Biol.* **10**, 1032–1040.
- D'Hondt, K. *et al.* (1993): An aspartic proteinase present in seeds cleaves Arabidopsis 2 S albumin in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**, 20884-20891.
- Dong, Y.H., Yao, J.L., Atkinson, R.G., Putterill, J.J., Morris, B.A., Gardner, R.C. (2000): *MDHI*: an apple homeobox gene belonging to the *BEL1* family. *Plant Mol. Biol.* **42**, 623-633.
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R. Jr., Feng, X. H., Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000): Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol. Cell* **5**, 27-34.
- Douglas, S.J., Chuck, G., Dengler, R.E., Pelecanda, L., Riggs, C.D. (2002): *KNAT1* and *ERECTA* Regulate Inflorescence Architecture in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 547-558.
- Doyle, J.L. & Doyle, J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Duboule, D. (1998): Vertebrate hox gene regulation: clustering and/or colinearity? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 514-518.
- Fields, S. & Song, O.-K. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Folta, K.M., Pontin, M.A., Karlin-Neumann, G., Bottini, R., Spalding, E.P. (2003): Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles of auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *Plant J.* **36**, 203-214.
- Friedrichsen, D.M.J. *et al.* (2002): Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bhlh transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**, 1445–1456.
- Giaever, G. *et al.* (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H. (1995): Transforming Yeast With DNA. *Meth. Mol. Cel. Biol.* **48**, 27-50.

- Giot, L. *et al* (2003): A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
- Goldberg, D.S., Roth, F.P. (2003): Assessing experimentally derived interactions in a small world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4372-4376.
- Gruis, D.F., Selinger, D.A., Curran, J.M., Jung, R. (2002): Redundant Proteolytic Mechanisms Process Seed Storage Proteins in the Absence of Seed-Type Members of the Vacuolar Processing Enzyme Family of Cysteine Proteases. *Plant Cell* **14**, 2863-2882.
- Hackbusch, J. (2001): Biochemische Charakterisierung des Nukleocapsid-Proteins von TSWV, Diplomarbeit, Köln.
- Hake, S. & Freeling, M. (1986): Analysis of genetic mosaics shows that the extraepidermal cell divisions in Knotted1 mutant maize plants are induced by adjacent mesophyll cells. *Nature* **320**, 621-623.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-560.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wie, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993): The p21 Cdk-Interacting Protein Cip1 is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., Murray, A.W (1999): From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**, C47-52.
- Hay, A. *et al.* (2002): The Gibberellin Pathway Mediates KNOTTED1-Type Homeobox Function in Plants with Different Body Plans. *Curr. Biol.* **12**, 1557-1565.
- Haywood, V., Kragler, F., Lucas, W.J. (2002): Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signalling. *Plant Cell* **14** (Suppl.): s303–s325.
- Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S., Beachy, R.N. (1995): Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983-1985.
- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. (1992): Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10915-10919.

- Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1997): An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur. J. Biochem.* **246**, 133-141.
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of *A.tumefaciens*. *Nature* **303**, 179-180.
- Horsch, R.B. *et al.* (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **277**, 1229-1231.
- Howell, S.H., Lall, S., Che, P. (2003): Cytokinins and Shoot Development. *Trends Plant Sci.* **8**, 453-459.
- Huang, H., Paliouras, M., Rambaldi, I., Lasko, P., Featherstone, M. (2003): Nonmuscle Myosin Promotes Localization of PBX. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3636-3645.
- Hülkamp, M., Misera, S., Jürgens, G. (1994): Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**, 555-566.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001): A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4569-4574.
- Jackson, D., Veit, B., Hake, S. (1994): Expression of maize KNOTTED1 related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.
- James, P., Halladay, J., Craig E.A. (1996): Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jaw, T.J. *et al.* (2000): Direct interaction of two homeoproteins, homothorax and extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech. Dev.* **91**: 279-291.
- Kalionis, B. & Farrell, P.H. (1993): A universal target sequence is bound *in vitro* by diverse homeodomains. *Mech. Dev.* **43**, 57-70.
- Kamath, R.S. *et al.* (2003) : Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-237.
- Kapila, J., de Rycke, R., van Montagu, M., Angenon, G. (1997): An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**, 101-108.

- Kerstetter, R. *et al.* (1994): Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like genes into two classes. *Plant Cell* **6**, 1877-1887.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., Jackson, D. (2003): Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in Arabidopsis. *Development* **130**, 4351-4362.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z., Jackson, D. (2002): Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4103-4108.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986): The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kragler, F., Monzer, J., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J. (2000): Peptide antagonists of the plasmodesmatal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J.* **19**, 2856-2868.
- Kusaba, S. *et al.* (1998): Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing the rice homeobox gene OSH1. *Plant Physiol.* **116**, 471-476.
- Li, S. *et al.* (2004): A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-543.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., Hake, S. (1994): A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-1876.
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B., Tanksley, S.D. (2002): A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13302-13306.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., Barton, M.K. (1996): A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Lucas, W.J. *et al.* (1995): Selective Trafficking of KNOTTED1 Homeodomain Protein and Its mRNA Through Plasmodesmata. *Science* **270**, 1980-1983.
- Markel, H., Chandler, J., Werr, W. (2002): Translational fusions with the engrailed repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucl. Acids Res.* **30**, 4709-4719.

- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1984): A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* **308**, 428-433.
- McGinnis, W. & Krumlauf, R. (1992): Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- Mercader, N.E. *et al.* (1999): Conserved regulation of proximodistal vertebrate limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* **402**, 425-429.
- Müller, J. *et al.* (2001): *In vitro* interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of *Knox* gene function. *Plant J.* **27**, 13-23.
- Müller, K.J. *et al.* (1995): The barley *Hooded* mutation is caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature* **374**, 727-730.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., Paddon, C. (1997): Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* **25**, 451-452.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L., Hake, S. (2000): Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-5532.
- Page, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Pereira-Leal, J.B., Enright, A.J., Ouzounis, C.A. (2004): Detection of functional modules from protein interaction networks. *Proteins* **54**, 49-57.
- Phillips, A.L. *et al.* (1995): Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**, 1049-1057.
- Quaedvlieg, N., Dockx, J., Rook, F., Weisbeek, P. Smeeckens, S. (1995): The Homeobox Gene *ATH1* of *Arabidopsis* Is Derepressed in the Photomorphogenic Mutants *cop1* and *det1*. *Plant Cell* **7**, 117-129.
- Ravasz, E., Somera, A.L., Mongru, D.A., Oltvai, Z.N., Barabasi, A.L. (2002): Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* **297**, 1551-1555.
- Ray, A. *et al.* (1994): *Arabidopsis* floral homeotic gene BELL (*BEL1*) controls ovule development through negative regulation of AGAMOUS gene (*AG*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5761-5765.

- Reiser, L. *et al.* (1995): The *BELL1* Gene Encodes a Homeodomain Protein Involved in Pattern Formation in the *Arabidopsis* Ovule Primordium. *Cell* **83**, 735-742.
- Reiser, L, Sánchez-Baracaldo, P, Hake, S. (2000): Knots in the family tree: evolutionary relationships and function of *knox* homeobox genes. *Plant Mol. Biol.* **42**, 151-166.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-ali, T., Harberd, N.P. (2001): How Gibberellin Regulates Plant Growth and Development: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 67–88.
- Rieckhof, G.E., Casares, F., Ryoo, H.D., Abu-Shaar, M., Mann, R.S. (1997): Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171-183.
- Rives, A.W. & Galitski, T. (2003): Modular organization of cellular networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1128-33.
- Roeder, A.H.K., Farrándiz, C., Yanofsky, M.F. (2003): The Role of the REPLUMLESS Homeodomain Protein in Patterning the *Arabidopsis* Fruit. *Curr. Biol.* **13**, 1630-1635.
- Rosso, M.G. *et al.* (2003): An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**, 247-259.
- Ryoo, H.D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., Mann, R.S. (1999): Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* **126**, 5137-5148.
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., Matsuoka, M. (2001): KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* **15**, 581-590.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., USA.
- Schaller, A. & Ryan, C.A. (1996): Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1073-1077.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., Amasino, R.M. (2003): Overexpression of a Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Decreases Gibberellin Levels and Creates Dwarf Plants. *Plant Cell* **15**, 151-163.

- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakaka, H., Machida, C., Machida, Y. (2001): The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Serikawa, K.A., Martinez-Laborda, A., Zambryski, P. (1996): Three *knotted1*-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 673-683.
- Shen, W.F. *et al.* (1997): AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6448-6458.
- Shang, Z. *et al.* (1994): DNA affinity cleaving analysis of homeodomain-DNA interaction: Identification of homeodomain consensus sites in genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 991-1002.
- Smith, L.G., Greene, B., Veit, B., Hake, S. (1992): A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* **116**, 21-30.
- Smith, H.M., Boschke, I., Hake, S. (2002): Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9579-9584.
- Smith, H.M. & Hake, S. (2003): The Interaction of Two Homeobox Genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, Regulates Internode Patterning in the *Arabidopsis* Inflorescence. *Plant Cell* **15**, 1717-1727.
- Söllick, T.R. & Uhrig, J.F. (2001): Development of an optimized interaction-mating protocol for large scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biol.* **2** (12), RESEARCH0052.
- Spirin, V & Mirny, L.A. (2003): Protein complexes and functional modules in molecular networks. *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* **100**, 12123-12128.
- Tanay, A., Sharan, R., Kupiec, M., Shamir, R. (2004): Revealing modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of highly heterogenous genomewide data. *Proc. Acad. Natl. Sci. U.S.A.* **9**, 2981-2986.
- Tong, A.H.Y. *et al.* (2004): Global Mapping of the Yeast Genetic Interaction Network. *Science* **303**, 808-813.
- Tsiantis, M. & Hay, A. (2003): Comparative Plant Development: The Time of the Leaf? *Nature* **4**, 169-180.

- Uetz, P. *et al.* (2000): A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Venglat, S.P. *et al.* (2002): The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4730-4735.
- Voinnet, O., Rivas, 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. *Plant J.* **33**, 949-956.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., Hake, S. (1991): The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**, 241-243.
- Wagner, A. (2002): Asymmetric functional divergence of duplicate genes in yeast. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1760-1768.
- Wagner, A. (2001): The Yeast Protein Interaction Network Evolves Rapidly and Contains Few Redundant Duplicate Genes. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1283–1292.
- Western, T.L. & Haughn, G.W. (1999): BELL1 and AGAMOUS genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 329-336.
- Winzeler, E.A. *et al.* (1999): Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.
- Wu, X. *et al.* (2003): Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* **130**, 3735-3745.
- Xu, Y.L., Wu, K., Peeters, A.J.M., Gage, D., Zeevaart, J.A.D. (1995): The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 6640-6644.
- Xu, Y.L., Gage, D.A., Zeevaart, J.A. (1997): Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Effects of photoperiod on expression of the GA4 and GA5 loci. *Plant Physiol.* **114**, 1471–1476.
- Ziegelbauer, J. *et al.* (2001): Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Mol. Cell* **8**, 339-349.

Anhang

A1. Unbestätigte Interaktions-Kandidaten aus den Hefe-zwei-Hybrid-Screens

AGI-Nr.	mögliche Funktion nach BLAST-Analyse	Name der Köder
At5g09270	hypothetisches Protein	BLH5
At3g04730	auxin-induziertes Protein	BLH5
At4g13850	GRP2 (glycin-reiches RNA-bindendes Protein2)	BLH8
At5g19630	exprimiertes Protein	BLH8
At5g39340	HP2-Protein	BLH8
At2g39700	mögliches Expansin	BLH8
At5g60980	unbekanntes Protein mit RNA-Erkennungs-Motiv	BLH8
At4g02520	mögliche Gluthation-S-Transferase	BLH2
At1g32920	exprimiertes Protein	BLH2
At3g27210	exprimiertes Protein	BLH2
At1g14740	exprimiertes Protein	BLH2
At5g06150	Cyclin1b	BLH3
At4g38510	vakuolare ATP-Synthase (Untereinheit B)	BEL1
At1g47860	Nicht-LTR Retrotransposon-Familie	BEL1
At3g03920	Protein mit Gar1-Protein RNA-Binderegion	BEL1
At5g61600	Ähnlichkeit zu AtERF5	BEL1
At5g01010	exprimiertes Protein	BLH10
At4g17880	bHLH-Protein	BLH10
At2g23070	mögliche Caseinkinase II (α -Kette)	BLH4
At5g42940	RING-Zink-Finger-Protein	BLH4
At5g21090	LLR-Protein	BLH4
At1g51630	exprimiertes Protein	BLH4
At4g33130	exprimiertes Protein	BLH9
At5g16840	Protein mit RNA-Erkennungs-Motiv	BLH9

A2. Liste der verwendeten Oligonukleotide

AD5:	GGATGTTTAATACCACTACAATGGATGATG
AD3:	GAAAGCAACCTGACCTACAGGAAAAGAG
AD_BD_recom_ACT:	TCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGGTCATATGGCCATGG AGGC
AD_BD_recom_GAD10:	TCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGATCTCTCGAGGATCC GAATTC
ATH-1:	ATGGACAACAACAACAACAACAACACTTTTAGTTCTC
ATH-4:	TGTTGTCTTATTTATGCATTGCTTGGCTCATCATAACAG
BEL-3:	AATAACAATCATCAGCATCATAATCATCATCAGTTTCAG
BELhom1-1:	ATGGCTGCTTTCTTTCTTGGAGAATCTGAAATGAG
BELhom1-3:	GGGAACAACTAAGGATATGGAAGCTAGGATCATTAC
BELhom1-4:	CTAATCCATGATTTGATAAGTTGAAGATGAATATATGG
BELhom2-1:	ATGGAGAATTATCCAGAAACACAGTTTATTCCCGG

BELhom2-2: CAAGCTTGAGGTTGCATAAAACCTCTTGTGTTGTCTTAAATG
BELhom2-3: CGTAAATGCCTTGGGGAACAACAAGATGGATCAGATGGG
BELhom2-4: AGCTACAAAATCATGTACCAATTGTGAAGAATTTATCCGG
BELhom3-1: ATGGATATGATAAAACCAGATTTTCAACAAATCCGAAG
BELhom3-4: AACCCACAAAAGTCATGAAACATTTGGCTTCCAGTTCC
BELhom4-1: ATGGCTGCTTACTTTCACGGAAACCCACCGGAG
BELhom4-2: CTCCAAGCATTATTGGAAGGATGTTGAATCATTCCC
BELhom5-3: CTCGAGGTACACAACGGCCGCAAGAGTTG
BELhom5-4: GCTTCTTGTCCATACCCATTTGATGAAACGCACGG
BELhom5-7: CACAGTTATATATAAATACTACAATATTAATTTATCACCCAAACCC
BELhom5-10: TTAATGTTGGATCTTAGACGGATGGCCTGTC
BELhom6-5: ATCCTAAGGTTTCTCTGTCTCTGCCTAACCTTCC
BELhom6-6: AATTTGAAGTTGAAATATACTAATGGATATTTGAAGCC
BELhom7-1: ATGGCCACTTATTACAAAACCTGGCTCAAGTGAG
BELhom7-2: GCTCAACCCCGTTTGTCTAGCGAGCATG
BELhom8-1: ATGGCTGTGATTACCCTAATAGTGTCCGCATGC
BELhom8-4: TTTAGACAACAAAGTCGTGAATTTGATGGGGATTAG
BELhom9-1: ATGGCTGATGCATACGAGCCTTATCATG
BELhom9-6: TCAACCTACAAAATCATGTAGAAAAGTATGATG
BELhom10-1: ATGGCAGTTTATTACACAAGTAATGTCCG
BELhom10-2: CAACGACTCTCCTCTTCTCCCAAG
JH001: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTGCTTCTTTCTTG
JH002: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGAGAATTATCCAG
JH003: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGATATGATAAAACC
JH004: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGCTGCTTACTTTC
JH005: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGGAATAACTAAAAC
JH006: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGGTTTAGCTACTAC
JH007: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCCACTTATTACAAAAC
JH008: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTGTGTATTACCCTAATAGTGTCCGCA
TG
JH009: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGCTGATGCATAC
JH010: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCAGTTTATTACACAAG
JH011: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGACAACAACAACAAC
JH012: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGCAAGAGATCAG
JH013: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGTTAACCCACAAAGTCATGAAAC
JH014: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTATTAATGTTGGATCTTAGACG
JH015: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTTTAAAAATCTCCAAAGTCTCTA
JH016: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTTTAAACAACAAGTCGTGTAA
JH017: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTTTAAACAACAAGTCGTGTAAAGT
JH018: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGGGACTAGTCTGCAG
JH019: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTCAAGCTACAAAATCATGTACC
JH023: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGGAAGAATACCAGCATG
JH024: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGATAGAATGTGTGG
JH025: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGCGTTTCATCAC
JH026: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGCGTTTCATAAC
JH027: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGTCGTTAACAGCTC
JH028: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGCAAGAAGCGGCACTAGG
JH029: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTACAATTTCCATTTCGGCCGGTG
JH030: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTGTAATACGACTCACTATAG
JH031: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGAGAGTGGTTCCAAC
JH036: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAACGACGATGACATCG
JH037: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGTGGCGTCTCACACGCG
JH038: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCAAGCAACTGCCTATTTG
JH039: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCAACCTGTGTTGCATACTCA
JH040: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGAGCCATGAACTCAACA
JH041: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCTCTGTGTTGCATACTCA
JH042: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTGAAACGGAGCAACAGAG
JH043: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTTGATCGGACAACAAATCTGC
JH044: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTACTCAAGCTCTTCCCATTCT
JH045: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTCTAGACGGATGGTGACG

JH048: GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
JH052: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTAATAACTATCGGTTTAAGCTATCG
GAGTTAATCCCTAACG
JH053: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGAATTATTTCTGAATGGGGTGGTGGAAAG
JH054: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCAACGAAAGTCGGGC
JH058: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAAGCTACAAAATCATGCAAC
JH062: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGATGGACCGAGACGATAAG
JH070: CTGTAACAACAATAAAGTGAGTGACCAC
JH072: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGAATTACAAGTTCAGAATTTTCAG
JH073: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACTTTGTTTTGTAAGTTGAAGCC
JH075: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTTCGATGCAAAATGTAGAGTTTATG
JH077: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGAGAGAGATAGAGAGTCTTG
JH078: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGAGATGGGGAAGAAAGAAACC
JH079: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAATGAAAATTAATAATCATTATGCACC
JH080: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACGAAACGTTTCAAATTAAG
JH081: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAACTCATCGTAGTCTGAGAG
JH084: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCGACTAAAAGCAAGAAGAAG
JH085: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGTAATAGTTATAGTAATCACGTGAC
JH086: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGCTGAATCTCCAAGCTAAG
JH087: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATTTGAAGAAGTTTGGTGTGAG
JH089: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGCTGATCCGGTGACCGTC
JH090: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGAAGAAGAAGATGAAACTC
JH091: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAACTCCGTTCTCTCTCC
JH092: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGCCAAAACCCATTGCAGAAATCG
JH093: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGTGCTACTCATGATCATCC
JH094: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAACTCCATTTCTAAACAAGAACC
JH095: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAACTAAAATCTCTTTAGTCTTCTC
JH096: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGCCAAAATCTTGTGGAAAAGCC
JH097: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGCATATCCGGCGTTCTTCC
JH108: GATCTTTGAGTCTGACACAGAGACC
JH115: TCGACTCCTTAAAGTCTCTCTCG
JH116: GCCGTAAGTTTCGTAACAACATCTCC
JH117: GAGAGAGGCATATCAAAGAAGCGG
JH128: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGCAAGAAGCGGCACTAGG
JH129: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTACAATTTCCATTCGGCCGGTG
JH131: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGAAGCACTTCTAGAAGATCA
JH133: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCGTAGAAGCAAATCAAGATCA
JH134: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATAGAAACAGCAGATGGAGGA
JH135: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACACCCCTCCACGCTTTG
JH136: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCAGAGATTGATGCCGTGTACG
JH139: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGTTTCTCCACGGTTTTACGC
JH141: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGATAATTACGATACTGCCACT
JH142: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGTTGCGGTGGGAGAAGATCGG
JH143: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAGAGGCAATCGAGATCCACC
JH144: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAAGCTACGAGCAAGCGAGAA
JH147: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGGGTCGAGGCTCAAGTTCCG
JH148: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTCCTTCATTTCTCCATG
JH153: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATGAAAATTAATAATCATTATGCACC
JH166: ATGGAGAAGGAAACGCCAATTAC
KNAT1-5: GGTATGGAAGAATACCAGCATGAC
KNAT1-3: GTCTTATGGACCGAGACGATAAGG
KNAT2-5: CCCGGTAATGGATAGAATGTGTGGTTTCCGC
KNAT3-5: ACGATGGCGTTTCATCACAATCATC
KNAT4-5: AAAACGATGGCGTTTCATAACAATCAC
KNAT4-3: ATCTCAACGGTCTCTCCGCTGTTTTCAC
KNAT7-5: ATGTACAATTTCCATTCGGCCGGTG
KNAT7-3: TCATTCTCGGTAAAGAATGATCCACTAG
KNAT6-5: ATGCAAGAAGCGGCACTAGGTATG
KNAT6-3: TTAGTGTTCGCGCTGGACTTCAAGG
LBI-GABI: CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC

PH7: AAAACCAAGCGTTAGGGATTA
RAN3_for: ACCAGCAAACCGTGGATTACCC
RAN3_rev: ATTCCACAAAGTGAAGATTAGCGTCC
RB1-GABI: CCAAAGATGGACCCACCCAC
RB-SALK: GATCAGATTGTCGTTCCCGCCTCAG
STM-5: ATGGAGAGTGGTTCCAACAGCAC
STM-3: TCAAAGCATGGTGGAGGAGATGTG
WRKY: GTGTGCCATGGGAATTCGACTCCTCCTGCTAACG

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Dr. Joachim Uhrig, der diese Arbeit betreute. Seine zahlreichen kreativen Ideen, auch wenn sie nicht alle verfolgt werden konnten, haben die praktische Arbeit stets vorangebracht. Auch die ständige Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen war ausgesprochen hilfreich. Danke!

Prof. Dr. Peter Schreier möchte ich für die Übernahme der formalen Aufgaben des Betreuers danken. Außerdem sei erwähnt, dass die Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe sowohl was die Arbeit als auch die zahlreichen Unternehmungen in der Freizeit angeht, stets Freude gemacht hat.

Herr Prof. Salamini und Prof. Korneef haben es mir ermöglicht, die Arbeiten meiner Dissertation in der Abteilung für Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung durchzuführen. Die Diskussionen mit Herrn Prof. Salamini haben meine Sichtweise auf die Biologie stets bereichert.

Herrn Prof. Werr und Herrn Prof. Hülkamp möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes danken.

Klaus Richter, der lange Zeit das Labor mit mir alleine teilen musste, hat mir in vielerlei Hinsicht geholfen. Dies reichte von der praktischen Unterstützung der Arbeit („Du Klaus, bist Du am Sonntag zufällig im Labor?“) über hilfreiche Diskussionen („Aber wenn das Protein weder im Pellet noch im Überstand ist, wo kann es dann sein?“) bis zur abwechslungsreichen Freizeitgestaltung („Was, schon wieder ein Kino-Film ohne Drachen?“). Hier sei auch gleich Christoph Rudolph erwähnt, der aufgrund des Fehlens eines Fernsehers auch nach langen Labortagen stets bereit war, sich die absurdesten Kinofilme anzusehen.

Meinen aktuellen und ehemaligen „Team“-Kollegen Ilona, Olaf, Tim, Anja, Ulrike, Wolfgang und Marc möchte ich für die nette Atmosphäre danken.

Judith Müller sei für die Bereitstellung der cDNA-Klone der TALE-Proteine gedankt.

Und zuletzt noch ein ganz besonderer Dank an Martin, der es geschafft hat, mich immer wieder aufzubauen und mit dem ich glücklich bin.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, in der Abteilung von Prof. Dr. Francesco Salamini (Abteilung für Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie), unter der wissenschaftlichen Anleitung von Dr. Joachim Uhrig angefertigt.

Die formalen Aufgaben eines Betreuers übernimmt Prof. Dr. Peter Schreier.

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 Dr. Joachim Uhrig und Prof. Dr. Peter Schreier betreut worden.

Teilpublikationen:

Hackbusch, J., Müller, J., Salamini, F., Uhrig, J.F.: A central role of AtOFP proteins in networking and localization of plant TALE homeodomain proteins. (eingereicht).