

Funktionelle Analyse des
ANGUSTIFOLIA-Gens aus *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stefanie Falk

aus Schwäbisch Hall

2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

06.07.2005

DANKE

sagen möchte ich vielen. Das erste große Dankeschön gilt Martin Hülskamp, der mir ein spannendes, zum Teil auch Nerven aufreibendes Projekt überlassen hat. Ohne die vielen Diskussionen und auch Motivationen hätte ich vielleicht irgendwann aufgegeben. Bei Prof. Dr. Werr möchte ich mich für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit bedanken.

Für die Bereitschaft sich alle ANGUSTIFOLIA Probleme unermüdlich anzuhören und mit mir neue Ideen zu diskutieren, möchte ich besonders Daniel Bouyer, Viktor Kirik und Martina Pesch danken. Für die Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Arp Schnittger, Daniel Bouyer, Joachim Uhrig, Katja Wester, Martina Pesch und Viktor Kirik.

All denen, die am reibungslosen Ablauf der Labororganisation beteiligt sind, sei es durch Bestellungen oder durch die Beaufsichtigung der Geräte möchte ich danken, besonders Uschi, ohne die in kürzester Zeit Chaos das Labor regiert.

Ohne Ulli wäre diese Doktorarbeit wahrscheinlich auch nie zustande gekommen. Ich weiß nicht wie viel Zeit er mit unseren Computern verbracht hat und noch verbringt. Ich weiß nur, dass sie wohl ohne ihn nicht mehr funktionieren würden. Schade, dass Du Dich nicht um Macs kümmerst.

Die nette Atmosphäre im Labor machte mir das Leben in Köln bedeutend leichter, und als Kellerkind hatte ich zusammen mit Martina und Christine (manchmal auch mit Paula und Jule) jede Menge Spaß. Auch dass mir die Abende in Köln nicht zu einsam wurden habe ich Daniel, Katja und Martina zu verdanken. Besonders Dir Martina, bin ich zu besonders großem Dank verpflichtet, Du hast Dich die letzten Wochen immer bereitwillig überreden lassen mit mir was trinken zu gehen, damit mir die Decke nicht auf den Kopf fällt. Ich werde mich revanchieren.

Joachim Weinmann möchte ich an dieser Stelle ein besonderes Dankeschön aussprechen. Ich glaube, Du hattest es nicht besonders leicht mit mir in den letzten Wochen. Aber jetzt kommen wieder bessere Zeiten.

Abstract	I
Zusammenfassung	II
Veröffentlichungen	IV
Abkürzungen	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII

TEIL A *ANGUSTIFOLIA* EIN ZELLAUTONOMES GEN, DAS AUF NICHT-ZELLAUTONOMEM WEG DIE BLATTFORM UND –GRÖÖE IN *ARABIDOPSIS* REGULIERT **1**

A 1. Einleitung	2
A 1.1. Die Kontrolle der Blattform und –größe kann durch kompensatorische Effekte erklärt werden	2
A 1.2. Chimären geben Aufschluss über die Regulation der Blattform und –größe	3
A 2. Ergebnisse:	6
A 2.1. Herstellung von transgenen Pflanzen mit gewebe-spezifischer Expression von AN	6
A 2.2. <i>ANGUSTIFOLIA</i> ist ein zellautonomes Protein	8
A 2.3. Subepidermale Expression von AN, nicht aber epidermale Expression rettet den Blatt Phänotyp	10
A 2.4. Die Anzahl der Epidermiszellen wird durch die Subepidermis kontrolliert	11
A 3. DISKUSSION	13
A 3.1. Die Rolle der L2 Schicht als formgebendes Gewebe in Arabidopsis	13
A 3.2. Die Epidermis reagiert auf das Wachstum der Subepidermis	14
A 3.3. Die Rolle von <i>ANGUSTIFOLIA</i> bei der Blatt-entwicklung	15

TEIL B *MOLEKULARE UND ZELLBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON ANGUSTIFOLIA* **17**

B 1. Einleitung	18
B 1.1. Zellmorphogenese	18
B 1. 2. Ausbildung von Polarität als Voraussetzung der Morphogenese	19
B 1.2.1. Pollenschläuche und Wurzelhaare	19
B 1.2.2. Epidermiszellen	20
B 1.3. Trichomentwicklung	21
B 1.3.1. Auswahl der Zellen, die Trichomschicksal annehmen sollen	21
B 1.3.2. Trichommorphogenese	22
B 1.3.3. Ausbildung der Verzweigungen	23
B 1.3.3.1. Endoreduplikationsmutanten mit Verzweigungsphänotyp	23
B 1.3.3.2. Verzweigungsmutanten ohne Endoreduplikationsdefekt	25
B 1.3.4. Molekulare Natur der Verzweigungs-Gene:	25
B 1.4. <i>ANGUSTIFOLIA</i>	26
B 1.4.1. PEST-Sequenz und Phosphorylierungs-Stelle	27
B 1.4.2. SUMOylierungs-Stellen	27
B 1.4.3. Retinoblastoma-Bindestelle	28
B 1.4.4. Dehydrogenasen	29
B 1.4.5. CtBP/BARS	29
B 1.5. Zielsetzung	31
B 2. Ergebnisse	32
B 2.1 Expressionsanalyse von AN	32
B 2.2. Intrazelluläre Lokalisation von AN	34
B 2.2. Molekulare Charakterisierung von <i>ANGUSTIFOLIA</i>	38
B 2.2.1 Ähnlichkeit zu anderen Proteinen	39
B 2.2.1.1. Dehydrogenasen	39

B 2.2.1.2. CtBP/BARS	39
B 2.2.1.3. Können CtBP/BARS ANGUSTIFOLIA ganz ersetzen?	40
B 2.2.2. Analyse der Sequenz-Motive	42
B 2.2.2.1. PEST-Sequenz und Phosphorylierungs-Stelle	42
B 2.2.2.2. Kernlokalisierungs-Sequenz	43
B 2.2.2.3. SUMOylierungs-Stelle	44
B 2.2.2.4. Retinoblastoma-Bindestelle	44
B 2.2.2.5. Ändert sich die intrazelluläre Lokalisation von AN durch die Deletion der Rb-Bindungsstelle?	46
B 2.3. Hefe Zwei-Hybrid Analysen von AN	48
B 2.3.1. Wirkt AN auf dieselbe Art und Weise wie CtBP?	48
B 2.3.2. AN und CtBP bilden Homodimere, gibt es auch Heterodimere?	49
B 2.3.3. Die Rb-Deletions-Version von AN dimerisiert nicht mit der wildtypischen Version	50
B 2.3.4. AN interagiert mit AtRBR1	50
B 2.3.5. Das pflanzliche Retinoblastoma Protein kann die Homodimerisierung von AN kompetitiv stören	51
B 2.3.6. Wird AN zellzyklusabhängig phosphoryliert?	52
B 2.4. Wird ANGUSTIFOLIA posttranslational modifiziert?	53
B 3. Diskussion	55
B 3.1. Expression und Lokalisation	55
B 3.1.1. Die zeitliche Expression von AN korreliert mit der Zell- und Blattmorphogenese	55
B 3.1.2. Die Lokalisation von AN in der Zellperipherie deutet auf eine Rolle in der Regulation des lokalen Wachstums einer Zelle hin	56
B 3.2. ANGUSTIFOLIA hat Sequenzähnlichkeiten zu Dehydrogenasen und CtBP/BARS	57
B 3.2.1. Die Dehydrogenase-Aktivität wird für die Funktion von AN nicht gebraucht	57
B 3.2.2. dCtBP substituiert AN funktionell	57
B 3.3. Funktionalität der verschiedenen AN-Protein Domänen	58
B 3.3.1. Die Lokalisierung von AN macht eine Funktion als CtBP unwahrscheinlich	59
B 3.3.2. AN wird nicht SUMOyliert	59
B 3.3.3. AN interagiert mit dem Retinoblastoma-Protein?	60
B 3.3.4. Wird AN phosphoryliert?	60
B 3.4. Ist ANGUSTIFOLIA ein transkriptioneller Corepressor oder übernimmt es die BARS-Funktion?	61
B 3.5. Wird AN posttranslational modifiziert?	62
B 3.6. Model zur Funktion von AN	64
MATERIAL UND METHODEN	67
Material	67
Chemikalien und Antibiotika	67
Enzyme	67
Antikörper	67
Primer	67
Primer mit Restriktionsschnittstellen	67
Primer für Ein-Topf-Ligation:	68
Primer für Fusions-PCR:	68
Primer für site directed mutagenesis	68
Primer mit attB-sites	68
Primer für RT-PCR	69
Sequenz-Primer	69
Linker:	70
Klonierungsvektoren	70
Pflanzenlinien	71
Bakterien- und Hefestämme	71
Methoden	73
Anzucht des biologischen Materials	73
Pflanzen	73

Bakterien und Hefen	73
Molekularbiologische Methoden	73
Klonierung:	73
DNA Präparationen	74
Plasmidpräparationen aus Bakterien	74
CTAB-Minipräparation genomischer Pflanzen-DNA	74
PCR und Sequenzreaktionen	74
Standard-PCR	75
Sequenzierung	75
RT-PCR	76
Fusions-PCR	76
Gezielte Mutagenese	76
RNA Präparation	77
Transformationen	77
Bakterien	77
Hefen	77
Stabile Pflanzentransformation	77
Transiente Pflanzentransformation	78
Hefe Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid	78
Protein-analytische Methoden	79
Expression von ANGUSTIFOLIA in verschiedenen Systemen	79
Lysophosphatylsäure Acyltransferase (LPAAT) assay	80
Proteinextraktion aus Arabidopsis unter denaturierenden Bedingungen	80
Proteinextraktion aus Arabidopsis unter nativen Bedingungen	81
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	81
Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	81
Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	82
Mikroskopie und zytologische Methoden	82
Propidiumiodid-Färbung	82
GUS-Färbung	82
Fixierung und Einbettung in Kunstharz	82
Toluidinblau-Färbung	83
Zellgröße und -Volumen:	83
Konstrukte	83
ENTRY-Konstrukte	83
Mutagenese-ENTRY-Konstrukt	84
Fusions-ENTRY-Konstrukte	85
L1- und L2-Promotor-Konstrukte	86
GUS-Reporterkonstrukte	86
Fluoreszenz-Konstrukte	86
Rettungskonstrukte	87
Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid Konstrukte	87
Beute-Konstrukte:	87
Köder-Konstrukte:	88
Three Hybrid-Konstrukt:	88
Konstrukte zur Proteinexpression:	88
LITERATUR	90
Liste der T1 Linien	100
Erklärung:	101
Lebenslauf:	102

Abstract

My PhD thesis consists of two parts, the control of organ formation and cell shape control of leaf hairs and epidermal pavement cells in *Arabidopsis thaliana*.

In vascular plants the shoot apical meristem consists of three tissue layers, the L1, L2 and the L3, that are kept separate during organ formation and give rise to the epidermis, the ground tissue and the vascular system. Using the narrow leaf phenotype of the *angustifolia* (*an*) mutant as a tool, I tested how different tissues layers interact and contribute to organ growth and shape. AN expressed in the epidermis or subepidermis was tested for the ability to rescue *an* mutant plants. My data show that AN acts cell autonomously and that expression in the subepidermis but not in the epidermis can rescue the narrow leaf phenotype in a non-cell-autonomous way. My data suggest that growth changes in the subepidermis are compensated in the epidermis by changes in cell number but not cell size.

Cell morphogenesis was studied using leaf hairs (trichomes) and epidermal pavement cells. *an* mutants differ from wildtype in the number of trichome branches and in that pavement cells are unlobed. AN encodes a protein with sequence similarities to a protein with a dual function, CtBP/BARS (the corepressor C-terminal binding protein and the Golgi regulating Brefeldin A ribosylated substrate) family. *an* mutants were fully rescued by the *Drosophila* CtBP. However, the corepressor function of the *Drosophila* CtBP is unlikely to be relevant in plants as AN did not bind to proteins containing the consensus motif *Drosophila* CtBPs are binding to. This suggest that AN is important for Golgi function. In support of this the AN:YFP fusion containing a dimerization deficient variant of AN shows a intracellular localization reminiscent to the distribution of the Golgi. The role AN in spatial regulation of cell morphogenesis was analyzed in epidermal pavement cells. AN:YFP was localized in the growth regions, the lobes suggesting that AN is involved in regional Golgi remodeling.

A mutational analysis of the AN protein revealed that a putative phosphorylation site is important for its function. As AN interacts with a protein kinase in the yeast two hybrid assay, it is likely that the activity of AN is controlled by its phosphorylation status.

Zusammenfassung

Meine Doktorarbeit besteht aus zwei Teilen, der Kontrolle der Organbildung und der Kontrolle der Zellform von Blatthaaren und Epidermiszellen aus *Arabidopsis thaliana*.

In vaskulären Pflanzen besteht das apikale Sproßmeristem aus drei Gewebeschichten, der L1, der L2 und der L3 Schicht. Die Schichten werden während der Organbildung getrennt gehalten und ergeben später die Epidermis, das Grundgewebe und das vaskuläre System. Ziel dieser Studie war unter zu Hilfenahme der *angustifolia (an)* Mutante, die sich durch einen schmalblättrigen Phänotyp auszeichnet, die Beteiligung der einzelnen Gewebeschichten an der Blatentwicklung aufzuschlüsseln. Meine Daten zeigen, dass AN ein zellautonomes Protein ist. Die Expression von AN in der Subepidermis, nicht aber die Expression in der Epidermis, rettet auf einem nicht zellautonomen Weg den schmalblättrigen Phänotyp. Aus meinen Beobachtungen schließe ich, dass Wachstumsänderungen, die durch die Subepidermis herbeigeführt werden, in der Epidermis durch Änderungen der Zellzahl und nicht der Zellgröße kompensiert werden.

Die Zellmorphogenese wurde anhand von Blatthaaren (Trichome) und Epidermiszellen untersucht. *an* Mutanten unterscheiden sich vom Wildtyp in der Anzahl der Trichomverzweigungen und durch das fehlende Auswachsen der Epidermiszellen. AN kodiert für ein Protein mit Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen, die sich durch zwei unterschiedliche Funktionen auszeichnen, der CtBP/BARS (der Corepressor „C-terminal binding protein“ und das Golgi regulierende „Brefeldin A ribosylated substrate“) Familie. *an* Mutanten werden durch CtBP aus *Drosophila* vollständig gerettet. Da jedoch Proteine, die das Konsensus-Motiv, welches das *Drosophila* CtBP bindet, AN nicht binden, ist es unwahrscheinlich, dass die Corepressor Funktion des CtBPs aus *Drosophila* in Pflanzen von Relevanz ist. Das deutet darauf hin, dass AN für die Funktion des Golgis wichtig ist. Die AN:YFP Fusion, die eine Version von AN enthält, die nicht mehr dimerisieren kann, unterstützt diese Vermutung, da die Lokalisierung der Golgi-Verteilung ähnelt. Die Rolle von AN bei der räumlichen Regulation der Zellmorphogenese wurde in Epidermiszellen analysiert. AN:YFP lokalisiert in den Wachstumsregionen, den Auswölbungen der Zellen, was darauf hindeutet, dass AN an der lokalen Umgestaltung des Golgis beteiligt ist. Mutationsanalysen des AN Proteins legen nahe, dass eine mögliche Phosphorylierungs-Stelle wichtig für die Funktion ist. Außerdem interagiert AN mit einer Proteinkinase im Hefe Zwei-Hybrid Tests, somit ist es

wahrscheinlich, dass die Aktivität von AN durch seinen Phosphorylierungsstatus reguliert wird.

Veröffentlichungen

The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton.

Folkers U, Kirik V, Schöbinger U, Falk S, Krishnakumar S, Pollock MA, Oppenheimer DG, Day I, Reddy AR, Jürgens G and Hülskamp M
EMBO J 2002, 21: 1280-1288

Falk S, Mathur J and Hülskamp M (2004): Polarity in single cells: root hairs, epidermal pavement cells and trichomes. *Annual Plant Reviews*, 12: 122-137

Abkürzungen

AN	ANGUSTIFOLIA
ANT	AINTEGUMENTA
At	Arabidopsis thaliana
AtML1	At meristem layer 1
AXR2	AUXIN-RESISTANT2
BARS	Brefeldin A ribosylated substrate
BOT	BOTERO
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cdc	Zellteilungskontrolle (cell division control)
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CtBP	C-terminal binding protein
CtIP	CtBP interacting protein
d. h.	das heißt
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ERH	ECTOPIC ROOT HAIR
FRA	FRAGILE FIBRE
FRC	FURCA
FS	FASS
GFP	green fluorescent protein
GL3	GLABRA 3
GUS	Glucoronidase
KAK	KAKTUS
KCBP	kinesin-like calmodulin binding protein
kDa	kilo Dalton
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
NLS	Kernlokalisierungssequenz (nuclear localization site)
NOK	NOECK
POR	PORCINO
PPB	Präprophaseband
P-Stelle	Phosphorylierungs-Stelle
Rb	Retinoblastoma
Rop	Rho of plants
S. luteum	Solanum luteum
STA	STACHEL
STI	STICHEL

Abkürzungen

SUMO	small ubiquitin-like modifiers
TFC	tubulin folding cofactor
TON	TONNEAU
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
ZWI	ZWICHEL

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Colchicin induzierte Polyploidie.....	4
Abbildung 2: Pfropfungsexperiment zwischen Tomate und <i>S. luteum</i>	5
Abbildung 3: Expressionsanalyse des pPCAL-Promotors	7
Abbildung 4: Analyse der Expressionsstärke mittels RT-PCR.....	7
Abbildung 5: Zellautonomie von AN	9
Abbildung 6: Gewebespezifische Rettung von AN	9
Abbildung 7: Trichomentwicklung.....	22
Abbildung 8: Genetische Interaktion der Verzweigungsgene.....	24
Abbildung 9: Expressionsanalyse von pAN:GUS.....	33
Abbildung 10: Intrazelluläre Lokalisation von AN unter der Kontrolle des 35S-Promotors..	35
Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von AN unter der Kontrolle des endogenen Promotors	37
Abbildung 12: Schematische Beschreibung von ANGUSTIFOLIA	38
Abbildung 13: Übersicht über die verschiedenen Deletionskonstrukte	41
Abbildung 14: RT-PCR von ANGUSTIFOLIA	45
Abbildung 15: Intrazelluläre Lokalisation von AN Δ Rb unter der Kontrolle des 35S- Promotors	47
Abbildung 16: Zwei-Hybrid Analysen	49
Abbildung 17: Westen blot Analyse von AN	54
Abbildung 18: Modell zur möglichen Wirkungsweise von AN.....	65
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Fusions-PCR.....	76
Tabelle 1: Anzahl der Trichome mit unterschiedlichen Verzweigungszahlen auf dem ersten und zweiten Blatt in Prozent.....	8
Tabelle 2: Komplexität der Epidermiszellen	10
Tabelle 3: Kotyledonen, erstes und zweites Blatt	11
Tabelle 4: Zellfläche und Zellvolumen	12
Tabelle 5: Anzahl der Zellen auf dem ersten und zweiten Blatt.....	12
Tabelle 6: Gegenüberstellung der molekularen Analysen von CtBP/BARS und AN	42

Teil A

ANGUSTIFOLIA

*Ein zellautonomes Gen, das
auf nicht-zellautonomem Weg
die Blattform und -größe in
Arabidopsis reguliert*

A 1. Einleitung

Blätter sind ein ausgezeichnetes Modell, um die Entwicklung von Organen zu untersuchen. Die Initiation der Blätter läuft nach einem vorhersagbaren Muster an der Peripherie des Sproßmeristems ab. Das Sproßmeristem liegt an der wachsenden Spitze einer Pflanze und ist eine sich erneuernde Struktur. Die in die lateralen Organe inkorporierten Zellen werden durch die Aktivität der Stammzellen ersetzt.

Die folgenden entwicklungsbiologischen Prozesse werden für die Ausbildung von Blättern benötigt. Als erstes müssen die Zellen ausgewählt werden, die später das Blattschicksal annehmen sollen, als nächstes nehmen die ausgewählten Zellen der Blattprimordien die Identität an, sich zu Blättern zu entwickeln, und drittens wächst das Blatt, durch Zellteilung und Zellexpansion, zu seiner bestimmten Größe und Form heran.

A 1.1. Die Kontrolle der Blattform und –größe kann durch kompensatorische Effekte erklärt werden

Es können zwei Hauptparameter, die das Organwachstum steuern, definiert werden: die Zellzahl und die Zellgröße. Ist einer dieser Parameter verändert, resultiert das oft in veränderter Organgröße oder –Form.

Z.B. führt eine gestörte Zellproliferation durch die Überexpression der CDK Inhibitoren zu zwergwüchsigen Pflanzen (Wang et al. 2000; De Veylder et al., 2001; Cleary et al., 2002). Auf der anderen Seite führt eine Überexpression von *AINTEGUMENTA* (*ANT*) über eine Zunahme der Zellteilungsrate zu vergrößerten Organen. (Mizukami and Fischer, 2000). Eine Reduktion der Zellgröße, während die Zellzahl unverändert bleibt, resultiert in *axr2* Mutanten zu einer Reduktion der Organgröße (Timpte et al., 1992).

Die Größe einer Zelle steht oft mit dem Ploidie-Niveau einer Zelle in Bezug. Die Zunahme des Ploidie-Niveaus z.B. in tetraploiden Pflanzen führt zu größeren Pflanzen mit größeren Organen (Kondorosi et al., 2000).

Zusätzlich zu den zellulären Parametern wurden Einflüsse, die den zellulären Parameter übergeordnet sind und das Organwachstum beeinflussen, beobachtet. Z.B. ist in der Mais-

Mutante *tangled1* die Anordnung der Zellwände unorganisiert und die Zellformen sind unregelmäßig. Trotzdem bilden die Pflanzen Blätter und andere Organe mit wildtypischer Form und Größe aus (Smith et al., 1996; Cleary and Smith 1998). Des Weiteren sind verschiedene Fälle beschrieben, wo sich Zellzahl und Zellgröße auf die Art und Weise kompensieren, dass die Organgröße im Prinzip erhalten bleibt. Kompensiert wird z.B. eine Reduktion der Zellzahl durch größere Zellen und ein vergrößertes Zellvolumen durch eine Reduktion der Zellzahl (Tsukaya, 2003). Eine Möglichkeit für diesen, den zellulären Parameter übergeordneten Einflüssen, könnte ein von Rolland-Lagen *et al.* postulierter Langstreckengradient sein (Rolland-Lagen et al. 2003). Daraus ergibt sich die Frage, wie Zellen diese übergeordneten Einflüsse interpretieren und ausführen, damit ihre Organe zu einer normalen Form und Größe heranwachsen.

A 1.2. Chimären geben Aufschluss über die Regulation der Blattform und –größe

Zwischen den zellulären Parametern und deren übergeordneten Einflüssen gibt es wahrscheinlich noch eine zusätzliche Komponente, die die Zellen organisiert; die Gewebe. Gewebe sind sich selbst erhaltende Einheiten. Die meisten Pflanzenorgane bestehen aus drei Gewebeschichten, die sich apikalen Sprossmeristem als L1-, L2- und L3-Schicht finden.

Periklinale Chimären lieferten den Beweis, dass die Position der Zellen im Meristem ihr späteres Schicksal bestimmt (Satina et al. 1940; Satina und Blakeslee 1941; Satina und Blakeslee 1943). *Datura*-Samen, mit Colchizin behandelt, das Polyploidie induziert, zeigten, dass die äußeren drei Lagen des Meristems (L1, L2 und L3) unabhängig voneinander betroffen werden. So wurden verschiedene stabile Linien entdeckt, wie zum Beispiel eine, in der die L2 einen vervierfachen ($8n$) Chromosomensatz aufwies, während die L1 und L3 diploid waren. Da die Zellen der L1- und L2-Schicht sich vorwiegend antiklinal teilen, kommt es zu keiner Vermischung der unterschiedlichen Zelllinien (Abbildung 1).

Aufgrund der vergrößerten Zellkerne konnten die polyploiden Zellen sowohl in den Meristemlagen, als auch in ausgewachsenen Organen erkannt werden. Derivate aller drei Zelllagen wurden in den Organen gefunden. Die meristematische L1-Schicht bildet später die

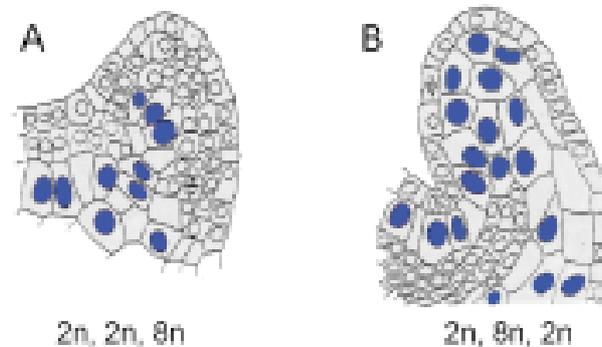


Abbildung 1: Colchicin induzierte Polyploidie

Schematische Darstellung vertikaler Schnitte durch Dautus-Blattprimordien. Die periklinale Chimären wurden durch Colchicin-Behandlung erzeugt. Die blau markierten Zellkerne zeigen einen erhöhten Ploidiegrad. (A) Zellen der L3-Schicht, sowie (B) Zellen der L2-Schicht bilden im Blatt das Mesophyll. (aus Satina 1941)

Epidermis des Blattes. Das Mesophyll stammt von der meristematischen L2- und L3-Schicht ab.

Aus Pfropfungsexperimenten von Jorgenson und Crane (1927) entstanden periklinale Chimären aus verschiedenen *Solanacea* Arten. Ein Set von Chimären wurde aus *Solanum luteum* und Tomate generiert. Die Blätter von *S. luteum* haben eine einfache Form, während die Blätter der Tomate gefiedert sind. Periklinale Chimären „TLL“ (T für Tomate und L für *S. luteum*) hatten wie *S. luteum* einfache Blätter und reziproke „LTT“ Chimären hatten gefiederte Blätter, wie die Blätter der Tomate. Die Trichome der Chimären entsprachen in Form und Muster den Pflanzen, von denen die L1-Schicht stammte und wurden nicht durch die darunter liegenden, genetisch andersartigen Schichten beeinflusst. (Abbildung 2).

Aus diesen Experimenten ergibt sich die Frage, wie die einzelnen Gewebeschichten miteinander interagieren. Pflanzen mit Mutationen im *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) Gen, das für ein homologes Protein der CtBP/BARS (Carboxy-terminal binding protein/Brefeldin A ribosylated substrate) Familie (Folkers et al., 2002; Kim et al., 2002) kodiert, wurden zur

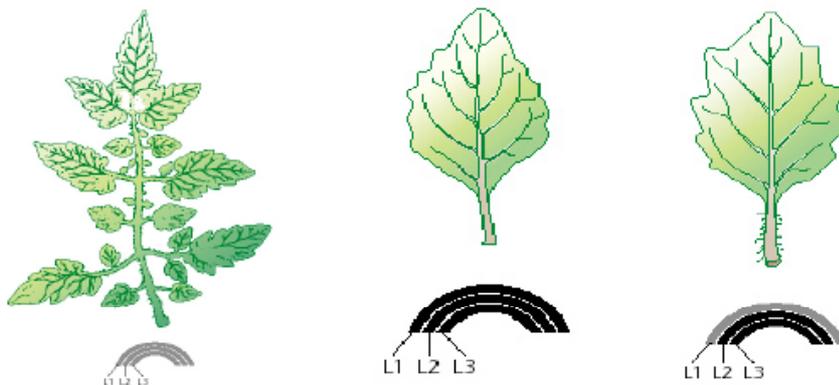


Abbildung 2: Pfropfungsexperiment zwischen Tomate und *S. luteum*

(A) Das Blatt einer Tomatenpflanze ist gefiedert und trägt Blatthaaren. (B) *S. luteum* Blätter sind einfach geformt und unbehaart. (C) Das Pfropfen der L1 Schicht der Tomate auf die L2 und L3 Schicht von *S. luteum* ergibt Blätter mit der Form von *S. luteum*, die behaart sind. (Abbildung aus Schnittger und Hülskamp, 2001)

Beantwortung dieser Frage benutzt. Mutationen im *AN* Gen resultieren in einem pleiotropen Phänotyp, der schmale Kotyledonen und Blätter, gedrehte Schoten, unterverzweigte Trichome und Epidermiszellen, die ihre Puzzelstück-Form verloren haben, umfasst (Koornneef et al., 1982; Hülskamp et al., 1994; Tsukaya et al., 1994; Tsuge et al., 1996). Die Schmalblättrigkeit kommt durch Veränderungen der Wachstumsrichtung der epidermalen Zellen und durch eine reduzierte Zellzahl in dieser Richtung zustande.

Für diese Studie wurden genetisch kreierte Chimären mit wildtypischen und mutanten Gewebeschichten generiert. Dazu wurde unter gewebespezifischen Promotoren wildtypisches *AN* in *an* mutanten Pflanzen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *AN* in der Epidermis die Zellformen der Epidermis retten kann, nicht aber die Blattform. Die Expression von *AN* in der Subepidermis rettet die Blattform, nicht aber die Zellformdefekte der Epidermis. Die durch die Subepidermis gesteuerte Expansion der Blätter wird durch zusätzliche Zellteilungen in der Epidermis kompensiert und nicht durch eine Zunahme der Zellgröße. Diese Rettung zeigt, dass *an* mutante Zellen laterale Zellteilungen durchführen können. D.h. dass *AN* nicht dafür da ist laterale Zellteilungen durchzuführen.

A 2. Ergebnisse:

A 2.1. Herstellung von transgenen Pflanzen mit gewebe-spezifischer Expression von AN

Um die Rolle von ANGUSTIFOLIA in verschiedenen Gewebeschichten zu analysieren wird die AN cDNA unter der Kontrolle des Epidermis spezifischen Promotors (pAtML1) und dem Subepidermis spezifischen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Promotor (pPCAL) von *Flaveria trinervia* exprimiert. Für *Flaveria* und Tabak ist gezeigt, dass der Promoter ausschließlich subepidermal exprimiert ist (Stockhaus et al., 1997). Mit dem Reporter-Konstrukt pPCAL:GUS konnte gezeigt werden, dass auch in *Arabidopsis thaliana* der Promotor die gleiche Gewebespezifität aufweist wie in *Flaveria* (Abbildung 3). In transversen Schnitten durch pPCAL:GUS Blätter weisen nur subepidermale Zellen, nicht aber Epidermiszellen eine Blaufärbung auf (Abbildung 3A). Expression des Promotors findet man in Kotyledonen, Rosettenblättern, Hochblättern und den Spitzen der Petalen. Die Wurzel, das Hypocotyl, die Schoten und die Basis der Petalen bleiben ungefärbt (Abbildung 3B-D). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man den Promotor als Instrument benutzen, um die Rolle von ANGUSTIFOLIA in Bezug auf die Kontrolle der Blattgröße und -form zu analysieren.

Die Konstrukte pAtML1:AN und pPCAL:AN wurden in *an*-mutanten Pflanzen exprimiert und die Fähigkeit den Blattphänotyp und den zellulären Phänotyp zu retten analysiert.

Um den Grad der Rettung zu deuten wurde das Expressionsniveau von ANGUSTIFOLIA im Wildtyp mit den transgenen Linien verglichen. In Abbildung 4 ist gezeigt, dass die Expression von pAtML1:AN und pPCAL:AN geringer ist als die Expression unter dem endogenen Promotor. Deshalb ist es denkbar, dass die phänotypische Rettung nicht bis zum Wildtyp reichen könnte.

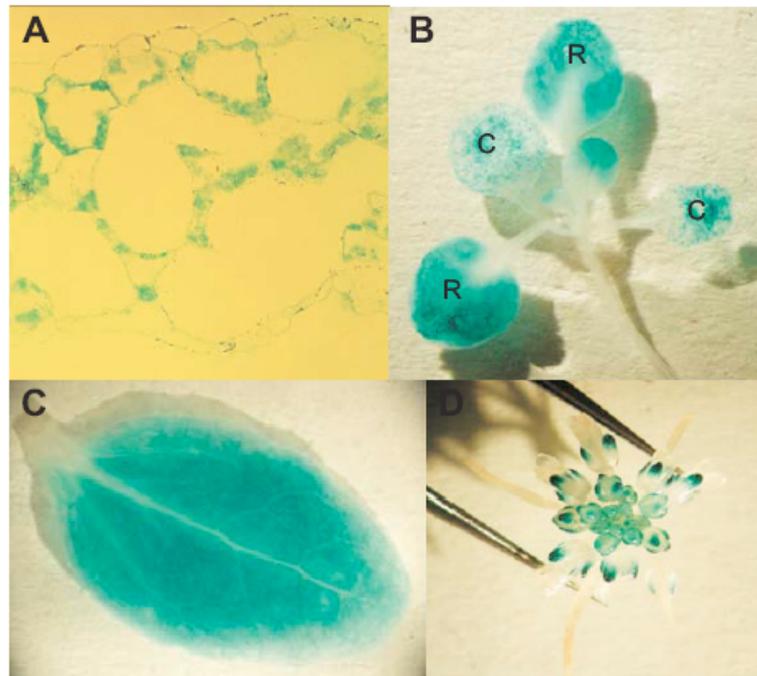


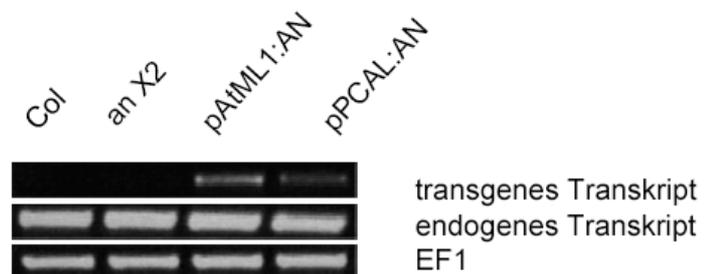
Abbildung 3: Expressionsanalyse des pPCAL-Promotors

Expressionsmuster des Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Promotors in *Arabidopsis thaliana*.
 (A) Der transverse Schnitt durch das erste Blatt zeigt die subepidermale Gewebespezifität des Promotors.

(B-D) Expression auf Pflanzenebene (B): C = Keimblätter; R = Rosettenblätter; (C): Hochblatt; (D): Inluoreszenz

Abbildung 4: Analyse der Expressionsstärke mittels RT-PCR

Vergleich der Expressionsstärken von *ANGUSTIFOLIA* unter der Kontrolle des endogenen Promotors (Reihe 2 nach 37 Zyklen) und dem epidermisspezifischen bzw. dem subepidermisspezifischen Promotor (Reihe1 nach 37 Zyklen).



A 2.2. ANGUSTIFOLIA ist ein zellautonomes Protein

Eine Voraussetzung für die Analyse der zelllagen-spezifischen Funktion von ANGUSTIFOLIA ist, dass weder Protein noch mRNA zwischen der Epidermis und den subepidermalen Schichten wandern kann. Die Analyse der Zellform der Epidermiszellen und der Trichome in *an*-mutanten Pflanzen, die die Konstrukte pAtML1:AN oder pPCAL:AN tragen zeigt, dass AN zellautonom sein muss. Vergleicht man die Trichome in *an*-mutanten Pflanzen mit wildtypischen sieht man, dass sie unterverzweigt sind. Trichome auf den ersten beiden Rosettenblättern des Ökotyps Columbia sind zu 1,9% zweiverzweigt, zu 82% dreiverzweigt und zu 16,1% vierverzweigt (Abbildung 5 E-H, Tabelle 1). In *an*-mutanten Pflanzen sind 3,8% unverzweigt und 92,2% zweiverzweigt. Wird AN in der Epidermis von *an*-mutanten Blättern exprimiert kann der Trichomverzweigungsphänotyp vollständig gerettet werden (2,4 % zweiverzweigt, 97,4 % dreiverzweigt, 0,2 % vierverzweigt). Die subepidermale Expression von AN führt hingegen zu keiner Rettung des Trichomverzweigungsphänotyps (1,3 % unverzweigt, 89,8 % zweiverzweigt, 8,9 % dreiverzweigt).

	unverzweigt	2-verzweigt	3- verzweigt	4- verzweigt
WT	0,0 (+/- 0,0)	1,9 (+/- 3,0)	82,0 (+/- 7,6)	16,1 (+/- 7,6)
<i>an</i> -X2	3,8 (+/- 3,2)	96,2 (+/- 3,2)	0,0 (+/- 0,0)	0,0 (+/- 0,0)
<i>an</i> -X2 pAtML1:AN	0,0 (+/- 0,0)	2,4 (+/- 3,9)	97,4 (+/- 3,9)	0,2 (+/- 0,8)
<i>an</i> -X2 pPCAL:AN	1,3 (+/- 4,0)	89,8 (+/- 6,7)	8,9 (+/- 6,2)	0,0 (+/- 0,0)

Tabelle 1: Anzahl der Trichome mit unterschiedlichen Verzweigungszahlen auf dem ersten und zweiten Blatt in Prozent (N = 20)

Wildtypische, epidermale Zellen haben eine sehr charakteristische Form. Sie zeichnen sich durch eine Puzzelstück-ähnliche Form, mit vielen Auswölbungen aus (Abbildung 5 A-D). Die Zahl der Auswölbungen bei *an* mutanten Epidermiszellen ist deutlich reduziert (Abbildung 5B). Um das Ausmaß des Phänotyps zu quantifizieren wurde die Komplexität der Zellen errechnet. Dazu wurde der Umfang der Zelle zu der Zellfläche ins Verhältnis gesetzt, unter Verwendung der Formel: Komplexität = (Umfang)² / 4 * π * Fläche (DeWitte et al.,

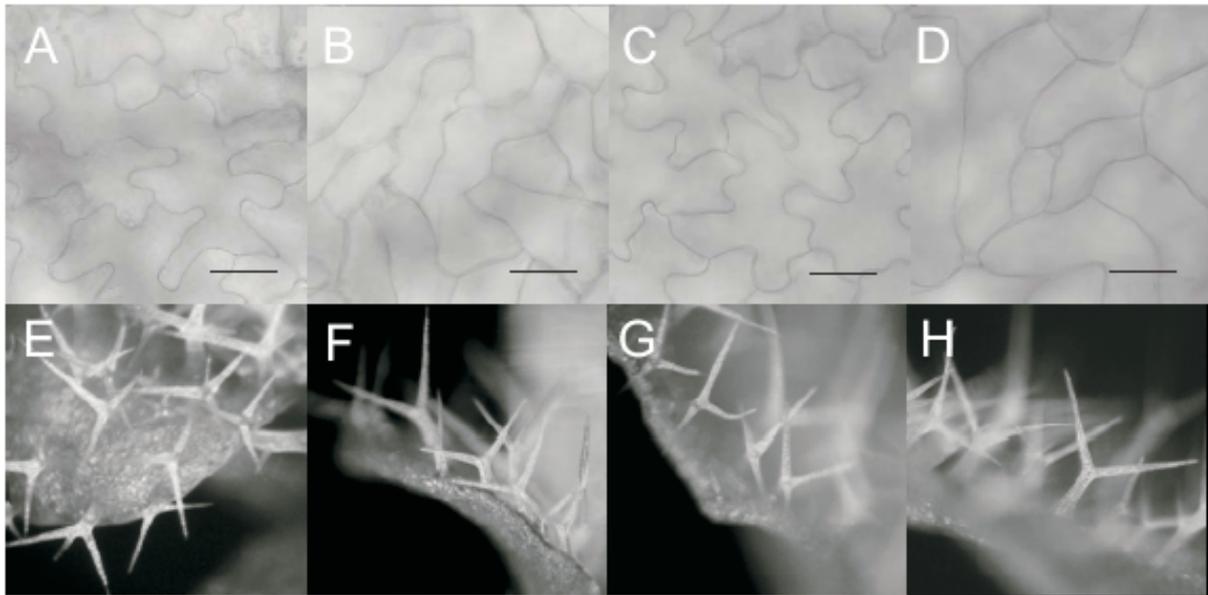


Abbildung 5: Zellautonomie von AN

Epidermiszellen (A-D) und Trichome (E-H) vom Wildtyp (A, E) *an-X2* (B, F), *an pAtML:AN* (C, G) and *an pPCAL:AN* (D, H). Der Eipdermiszellen Phänotyp und der Trichomphänotyp in *an* mutanten Pflanzen wird gerettet, wenn AN in der Epidermis exprimiert wird. Die beiden Phänotypen können aber nicht aus der Subepidermis gerettet werden.

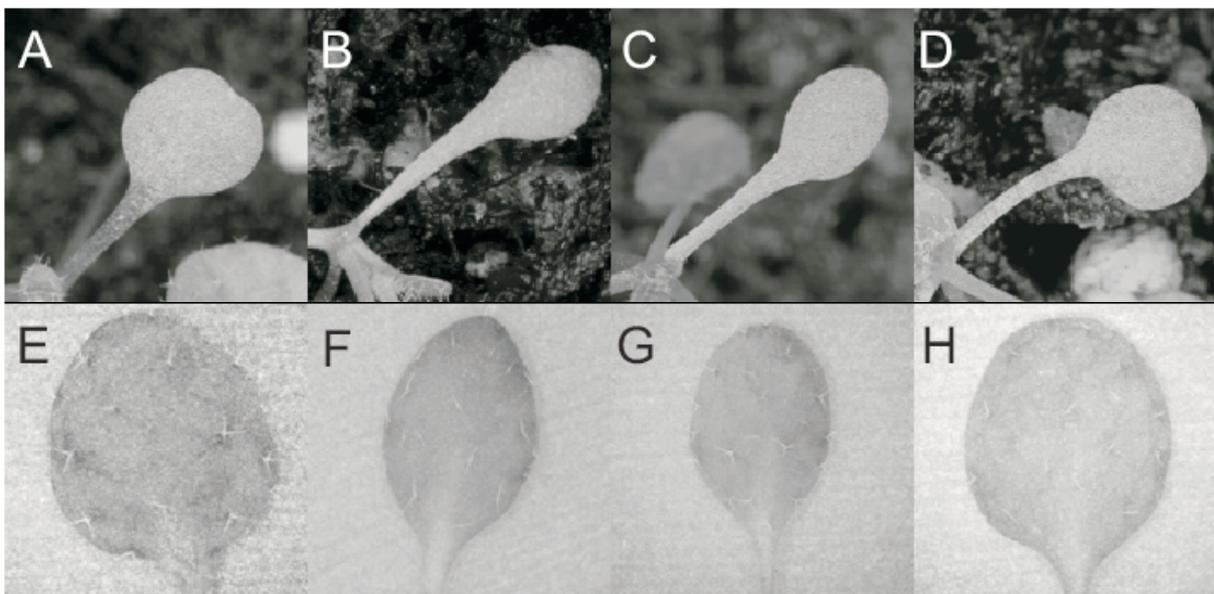


Abbildung 6: Gewebespezifische Rettung von AN

Kotyledonen (A-D) und das erste Paar Rosettenblätter (E-H) vom Wildtyp (A, E) *an-X2* (B, F), *an pAtML:AN* (C, G) and *an pPCAL:AN* (D, H). Die Kotyledonen und die Rosettenblätter in *an* mutanten Pflanzen werden gerettet, wenn AN in der Subepidermis exprimiert wird, nicht aber wenn AN in der Epidermis exprimiert wird.

2003). Die am wenigsten komplexe Form ist die des Kreises. Setzt man die Formeln zur Berechnung des Umfangs und der Fläche eines Kreises in die Komplexitätsformel ein bekommt man einen Wert von eins. Unregelmäßigkeiten in Form und Auswölbungen führen zu einem höheren Wert. In Tabelle 2 ist gezeigt, dass Wildtypzellen die höchste Komplexität besitzen, mit einem Wert von 3,49 während in *an* Mutanten die Komplexität reduziert ist ($K = 1,82$). Die Expression von AN in der Subepidermis rettet nicht die Komplexität der Epidermiszellen, während die epidermale Expression den Phänotyp der Epidermiszellen signifikant rettet. Daraus lässt sich auf eine zellautonome Funktion von AN schließen.

	WT	<i>an-X2</i>	<i>an-X2</i> pAtML1:AN	<i>an-X2</i> pPCAL:AN
Komplexität	3,49 (+/- 1,27)	1,82 (+/- 0,48)	2,60 (+/- 1,01)	1,74 (+/- 0,39)

Tabelle 2: Komplexität der Epidermiszellen (N = 50)

errechnet durch Komplexität = $(\text{Umfang})^2 / 4 * \pi * \text{Fläche}$

A 2.3. Subepidermale Expression von AN, nicht aber epidermale Expression rettet den Blatt Phänotyp

Die Kotyledonen und Rosettenblätter von *an* Mutanten sind schmaler, als die von Wildtyp-Pflanzen, während sich die Blattlängen nicht unterscheiden (Abbildung 6). Um dies zu quantifizieren wurde die Breite zur Länge des Blattes ins Verhältnis gesetzt. Die Kotyledonen des Wildtyps zeigten ein Breite/Länge Verhältnis von 1,05. Dieses Verhältnis ist in *an* mutanten Kotyledonen auf 0,71 reduziert (Tabelle 3). Mutante *an* Pflanzen, die AN in der Epidermis exprimieren zeigen keine Rettung des Blattphänotyps, (Breite/Länge Verhältnis von 0,65; Tabelle 3, Abbildung 6C). Wird im Gegensatz dazu AN in subepidermal exprimiert erhält man einen Wert, der sogar höher ist als der im Wildtyp beobachtete (Verhältnis von 1,33; Tabelle 3, Abbildung 6D).

Die ersten und zweiten Blätter zeigen einen ähnlichen Effekt, der nicht ganz so stark ausgeprägt ist. Mutationen in *an* resultieren in einem reduziertem Breite/Länge Verhältnis (0,65; Tabelle 3, Abbildung 6F) verglichen mit Wildtyp (0,94; Tabelle 3, Abbildung 6E).

Epidermale Expression von AN rettet den Blattphänotyp nicht signifikant (0,72; Tabelle 3, Abbildung 6G), während die subepidermale Expression eine moderate jedoch signifikante Rettung (0,82; Tabelle 3, Abbildung 6H) ergibt.

	Blatllänge in mm	Blattbreite in mm	Verhältnis Breite/Länge	Anzahl der Blätter
Kotyledonen				
WT	2,74 (\pm 0,35)	2,84 (\pm 0,24)	1,05	N=34
<i>an-X2</i>	2,65 (\pm 0,36)	1,87 (\pm 0,22)	0,71	N= 41
<i>an-X2 pAtML1:AN</i>	3,11 (\pm 0,43)	2,00 (\pm 0,24)	0,65	N= 50
<i>an-X2 pPCAL:AN</i>	2,52 (\pm 0,36)	3,31 (\pm 0,38)	1,33	N= 50
Erstes und zweites Blatt				
WT	5,70 (\pm 0,74)	5,37 (\pm 0,61)	0,94	N=27
<i>an-X2</i>	6,08 (\pm 0,72)	3,93 (\pm 0,49)	0,65	N=27
<i>an-X2 pAtML1:AN</i>	6,48 (\pm 0,64)	4,64 (\pm 0,51)	0,72	N= 50
<i>an-X2 pPCAL:AN</i>	6,71 (\pm 0,80)	5,57 (\pm 0,71)	0,83	N= 50

Tabelle 3: Kotyledonen, erstes und zweites Blatt

Messung der Längen und Breiten der Kotyledonen und Blätter in mm, die ins Verhältnis Breite zu Länge gesetzt wurden.

A 2.4. Die Anzahl der Epidermiszellen wird durch die Subepidermis kontrolliert

Da die Blattbreite durch die Expression von AN in der Subepidermis gerettet wird, muss sich entsprechend auch die Epidermis ausweiten. Im Prinzip kann die Vergrößerung der Blattfläche durch zusätzliche Zellteilungen, Vergrößerung der Zellen oder adaptive Zellformänderungen herbeigeführt werden.

In diesen Experimenten kann eine Kompensation durch adaptive Änderung der Zellform ausgeschlossen werden, da durch die subepidermale Expression von AN die Zellformen der Epidermis nicht gerettet werden können. Als nächstes wurde untersucht, ob eine Vergrößerung der Zellen das Breitenwachstum des Blattes kompensiert. Im Vergleich von Zellflächen und Zellvolumina zwischen Wildtyp, *an* Mutanten und den Linien, die AN in der Epidermis oder Subepidermis exprimieren, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4).

	Zellfläche in μm^2	Zellvolumen in μm^3	Anzahl der Zellen
WT	4310,38 (+/- 1938,17)	86890,35 (+/- 47543,12)	50
<i>an</i> X2	4335,48 (+/- 2297,83)	72073,95 (+/- 36002,27)	50
<i>an</i> -X2 pAtML1:AN	4569,95 (+/- 2515,19)	92356,27 (+/- 53048,94)	50
<i>an</i> -X2 pPCAL:AN	3602,36 (+/- 1959,05)	86279,90 (+/- 58990,63)	50

Tabelle 4: Zellfläche und Zellvolumen

Messung der Zellfläche und des Zellvolumens (Statistische Signifikanztests ergaben keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien)

	Zellzahl in Blattlängenrichtung	Zellzahl in Blattbreitenrichtung	Verhältnis Breite/Länge	Anzahl der Blätter
WT	89,1 (\pm 10,9)	89,3 (\pm 8,2)	1,01	N=22
<i>an</i> X2	88,1 (\pm 7,2)	68,4 (\pm 6,1)	0,78	N=20
<i>an</i> -X2 pAtML1:AN	83,0 (\pm 7,7)	68,4 (\pm 5,5)	0,83	N=21
<i>an</i> -X2 pPCAL:AN	96,8 (\pm 9,8)	86,0 (\pm 6,2)	0,89	N=20

Tabelle 5: Anzahl der Zellen auf dem ersten und zweiten Blatt

Auffallend ist jedoch die unterschiedliche Anzahl der Zellen. Während sich über die Blattlänge die Zellzahl in Wildtyp und *an* Mutanten nicht unterscheidet, ist die Zellzahl der Blattbreite in *an* Mutanten um 23,4%, im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Tabelle 5). Wird AN in der Epidermis exprimiert weisen die Pflanzen die gleiche Reduktion der Zellzahl auf. Wird dagegen AN subepidermal exprimiert wird der Zellzahlphänotyp der Epidermis gerettet. Damit kann gezeigt werden, dass auf die durch die Subepidermis gesteuerte Ausweitung des Blattes die Epidermis durch zusätzliche Zellteilungen reagiert.

A 3. DISKUSSION

A 3.1. Die Rolle der L2 Schicht als formgebendes Gewebe in Arabidopsis

Durch sogenannte Anlagepläne (Karten aus denen die klonale Abstammung einer Zelle hervorgeht) konnten drei meristematische Zellschichten im apikalen Sproßmeristem identifiziert werden. Das Schicksal einer Zelle hängt jedoch meistens von der Position und nicht von ihrem klonalen Ursprung ab (Furner und Pumfrey, 1992; Irish und Sussex, 1992; Dolan et al., 1993; Dolan et al., 1994; Schnittger et al., 1996). Die Rolle der einzelnen Gewebeschichten in Bezug auf die Organform wurde bisher in *Arabidopsis* noch nicht untersucht. Es gibt aber Beispiele aus anderen Pflanzen die der L2 Schicht eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Organform zuteilen (Stewart, 1978; Tilney-Bassett, 1986; Szymkowiak and Susse, 1996). Periklinale Chimären zwischen *Solanum luteum* (einfache Blätter) und *Solanum lycopersicum* (gefiederte Blätter) deuten darauf hin, dass der Genotyp der L2 Schicht die Form eines Blattes bestimmt (Jorgensen and Crane, 1928). Die L1 und L3 Schicht sind diesen Ergebnissen zur Folge nicht Form gebend. Im Gegensatz dazu kontrolliert jede Schicht unabhängig von den anderen die Differenzierung der entsprechenden Zellen. Mit periklinalen Tabakchimären wurden korrespondierende Ergebnisse erzielt (Marcotrigiano, 2001). Um die Rolle der Subepidermis und der Epidermis bei der Blattentwicklung abzuschätzen, wurden die Effekte auf den schmalen Blattphänotyp von *an* Mutanten, durch die Expression einer Wildtyp-Kopie von *AN* unter der Kontrolle des pAtML1 und pPCAL Promotors getestet. Der Blattphänotyp wurde dann gerettet, wenn *AN* in der Subepidermis exprimiert wurde. Expression von *AN* in der Epidermis führte zu keiner Rettung des Blattphänotyps.

Diese Daten legen nahe, dass die Subepidermis die bedeutendere Rolle in der Blattentwicklung in *Arabidopsis* spielt.

A 3.2. Die Epidermis reagiert auf das Wachstum der Subepidermis

Es gibt unterschiedliche Beweise dafür, dass das Organwachstum auf zellulärem Niveau kontrolliert wird oder, dass verändertes Wachstum auf übergeordnete Mechanismen zurückzuführen ist. (Fleming, 2002; Reinhardt and Kuhlemeier, 2002; Tsukaya, 2002). Mutationen im Mais Gen TANGLED haben ein unregelmäßiges Zellteilungsmuster zur Folge ohne dabei die Blattgröße oder Blattform zu beeinflussen. Die fehlgeleiteten Zellteilungen können auf Organniveau kompensiert werden (Smith et al., 1996). Kompensatorische Effekte wurden im Besonderen beobachtet als die Frage beantwortet werden sollte, ob eine Zunahme der Organgröße durch mehr Zellteilungen, oder durch ein vergrößertes Zellvolumen verursacht wird. (Fleming, 2002; Reinhardt and Kuhlemeier, 2002; Tsukaya, 2002). Zum Beispiel führt eine verringerte Zellteilungsrate in Tabakblättern nicht zu veränderten Blättern in Bezug auf Größe und Form, was auf die Zunahme des Zellvolumens zurückzuführen ist (Hemerly et al., 1995). Auf der anderen Seite beeinflusst eine beschleunigt Zellteilungsrate die Rate der Organinitiation, aber nicht die Blattform (Cockcroft et al., 2000). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Zellteilung oder das Zellwachstum in gleichem Maße das Wachstum beeinflussen und in gewissem Maße auch austauschbar sind. Hier konnte gezeigt werden, dass die endgültige Form und Größe eines Blattes in *Arabidopsis* von der Subepidermis kontrolliert wird. Die Epidermis hat zwei Möglichkeiten auf das Wachstum zu reagieren. Die eine ist, dass die Epidermis nicht auf das Wachstum der Subepidermis reagiert, was das Reißen der Epidermis zur Folge hätte, was nicht beobachtet wurde. Die zweite Möglichkeit ist, dass die Epidermis mitwächst. Dieses Mitwachsen kann durch vermehrte Zellteilung oder einer Zunahme des Zellvolumens zustande kommen. Die experimentellen Voraussetzungen erlaubten es, zwischen diesen beiden Reaktionsmöglichkeiten der Epidermis zu unterscheiden, die auf die durch *AN* induzierten Wachstumsveränderungen der Subepidermis zurückzuführen sind. Durch die Expression von *AN* in der Subepidermis kann der epidermale Phänotyp nicht gerettet werden. Daraus lässt sich schließen, dass *AN* ein zellautonomes Protein ist. Die Konsequenz daraus ist, dass Veränderungen der Epidermis nicht durch *AN* direkt hervorgerufen werden können.

Die Messungen, die hier gemacht wurden deuten darauf hin, dass in Pflanzen, die *AN* nur subepidermal exprimieren, die Zellzahl der Epidermis erhöht wird und nicht die Zellgröße der epidermalen Zellen.

A 3.3. Die Rolle von *ANGUSTIFOLIA* bei der Blattentwicklung

Alle Aspekte des *an* Phänotyps deuten drauf hin, dass *AN* an der Polaritätsetablierung beteiligt ist. Auf zellulärem Niveau zeigen die Epidermiszellen Veränderungen der Polarität und die ansonsten asymmetrischen Trichome sind symmetrisch. Auf Organniveau kontrolliert *AN* das Verhältnis zwischen Länge und Breite eines Blattes über zwei Wachstumsparameter, die Polarität der Zellen und die Zellteilungen. Die Reduktion der Zellzahl entlang der Blattbreitenachse könnte man im Prinzip auf die Zellteilungsprobleme der *an* Mutante entlang dieser Wachstumsrichtung zurückführen. Die Epidermis reagiert auf subepidermales, laterales Wachstum durch Zellteilungen entlang dieser Achse, auch in Abwesenheit von *AN*. D.h., da *AN* zellautonom ist wird durch *AN* die Zellteilung der L2 reguliert und die L1 reagiert passiv durch vermehrte Zellteilung, oder *AN* vermittelt der L1 durch Signaltransduktionsmechanismen die erhöhte Zellteilungsrate.

Ein interessanter Aspekt von *AN* in Bezug auf den Blattphänotyp ist die verminderte Zellzahl. Diese Reduktion könnte durch eine verminderte Teilungsgeschwindigkeit oder einen verschobenen Zeitpunkt, wann die Teilung der Zellen endet, zurückzuführen sein. Ist der meristematische Index zwischen *an* und Wildtyp unterschiedlich, könnte man *AN* Proteinen zuordnen, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind.

Teil B

*Molekulare und
zellbiologische
Charakterisierung von
ANGUSTIFOLIA*

B 1. Einleitung

B 1.1. Zellmorphogenese

Die Form einer Zelle ist eng mit ihren physikalischen Eigenschaften verknüpft. Der Prozess bis eine Zelle ihre endgültige Gestalt erreicht wird unter dem Begriff Zellmorphogenese zusammengefasst. Drei Schritte sind dafür nötig (Hülkamp et al., 1998).

1. Durch intrinsische und/oder extrinsische Signale wird die Morphogenese einer Zelle ausgelöst.
2. Durch diese Signale werden intrazelluläre Domänen, zur Steuerung interner Prozesse markiert, was eine Polarisierung der Zelle zur Folge hat. Dabei spielt zum Beispiel das Zytoskelett eine große Rolle.
3. Die polarisierte Zelle wächst zu ihrer eigentlichen Form und Größe heran. An diesem Prozess sind zum einen das Zytoskelett mit seinen akzessorischen Proteinen, um das Auswachsen bestimmter Zellregionen zu ermöglichen, sowie der sekretorische Apparat für die Bereitstellung von Membran- und Zellwandmaterial und/oder Enzyme zur Lockerung der Zellwand beteiligt.

Zellen, die sich unter diesem Gesichtspunkt gut untersuchen lassen sind z.B. Neuronen, polarisierte Epithelzellen und einzellige Organismen, wie *Dictyostelium* oder *S. cerevisiae* (Bäckerhefe).

Die Bäckerhefe wird schon seit über 50 Jahren für intensive Studien zum Aufbau von Zellpolaritäten benutzt. Der überwiegende Teil unseres Wissens, über die einzelnen Schritte, die zwischen dem Signal zur Polarisierung und der Gestaltänderung stehen, bezieht sich auf Studien dieses Modellorganismus.

Um zu verstehen wie die Polarisierung von Zellen und die darauf folgende Gestaltänderung in Pflanzen funktioniert wird *Arabidopsis* als Modellorganismus verwendet.

B 1. 2. Ausbildung von Polarität als Voraussetzung der Morphogenese

Vier Zelltypen des pflanzlichen Systems werden unter dem Aspekt Zellmorphogenese genauer untersucht, Pollenschläuche, Wurzelhaare, Epidermiszellen und Trichome (Aeschbacher et al., 1994; Marks et al., 1997; Oppenheimer et al., 1998; Hülskamp et al., 1999; Kost et al., 1999; Wilhelmi und Preuss 1999).

B 1.2.1. Pollenschläuche und Wurzelhaare

Polares Spitzenwachstum findet in wachsenden Pollenschläuchen und Wurzelhaaren statt. Das Wachstum der Wurzelhaare scheint durch intrinsische Mechanismen gesteuert zu werden, während das Wachstum der Pollenschläuche durch extrinsische Faktoren geleitet wird (Hülskamp et al., 1995; Ray et al., 1997). Bei der Bäckerhefe spielt Cdc42, eine kleine GTPase eine zentrale Rolle bei der Festlegung der Zellpolarität (Etienne-Manneville 2004). Kleine GTPasen sind monomere Guanin-Nukleotid bindende Proteine, die mit der α Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine verwandt sind. Sie gehören zur Ras-Superfamilie (Parada et al., 1982).

An der Induktion der Zellpolarität in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren scheinen ebenfalls kleine GTPasen beteiligt zu sein, da sie an den Stellen lokalisieren, an denen Aktinakkumulationen und späteres Auswachsen der Zellen zu finden sind (Fu et al., 2001).

Homologe zu den Ras-Proteinen gibt es in Pflanzen nicht (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Es wurde jedoch eine Protein-Familie gefunden, die mit einer Unterfamilie der Ras-Superfamilie, die Rho-Familie, verwandt ist: die ROPs (Roh of plants) (Li et al., 1998; Zheng und Yang 2002). Mitglieder dieser Familie wurden an der Spitze wachsender Pollen und Wurzelhaaren, wo das Wachstum stattfindet, entdeckt. In beiden Zelltypen sind ROPs an der Reorganisation des feinen Aktins beteiligt. Die Bildung dieser feinen Aktin-Filamente an den Spitzen ist absolut essentiell für das Fortschreiten des Wachstumprozesses. (Fu et al., 2001; Jones et al., 2002; Mathur et al., 2003a,b; Mathur und Hülskamp 2002).

B 1.2.2. Epidermiszellen

Adulte Epidermiszellen in *Arabidopsis* zeichnen sich durch ihre Puzzelstück-ähnliche Form aus. Um dieses stark verzahnte Muster anzunehmen, müssen die Epidermiszellen während ihrer Entwicklung verschiedene Wachstumspunkte aufbauen, die mit den Nachbarzellen koordiniert sein müssen.

Auch für diese Zellen gibt es Anhaltspunkte, dass ROPs und feines Aktin am lokalen Auswachsen beteiligt sind. Für ROP2 ist gezeigt, dass es in den sich bildenden Ausbuchtungen lokalisiert. Pflanzen, mit Überexpressionskonstrukten oder der dominant negativen Form von ROP2 weisen epidermale Phänotypen auf (Fu et al., 2001). Mittlerweile ist gezeigt, dass ROP2 über Aktivierung bzw. Inhibition von RIC4 bzw. RIC1 (ROP-interactive CRIB motif-containing proteins (Wu et al., 2001)) das lokale Auswachsen der Zellen über Aktin steuert und RIC1 über die Inhibition von ROP2 die Punkte der Zelle, die nicht auswachsen über die Mikrotubuli fixiert (Fu et al., 2005).

BRICK1 wurde bei genetischen Analysen zur Ausbildung der Auswölbungen in Mais gefunden. Die Epidermiszellen *brick1* mutanter Pflanzen haben ihre Auswölbungen verloren, stattdessen haben sie eine backsteinartige Form. Mittlerweile ist das Gen kloniert und konnte in die Gruppe der regulatorischen Genen des Aktins eingeordnet werden (Eden et al., 2002).

Mutationen in *SPIKE* führen in *Arabidopsis* dazu, dass keine Auswölbungen ausgebildet werden und die Trichome sich nicht verzweigen. Durch die Klonierung des Gens kann man *SPIKE* einer Protein-Familie zuordnen, die externe Signale detektieren (Qui et al., 2002).

Es ist aber nicht nur das Aktin, das am lokalen Auswachsen der Zellen beteiligt ist. Auch eine Veränderung der Mikrotubuli-Organisation hat zur Folge, dass eine korrekte Morphogenese der Epidermiszellen und Trichome nicht stattfinden kann. Mikrotubuli-Defekte führen in Trichomen zu einem unterverzweigten Phänotyp.

Zellen der *fass/tonneau2* (*fs/ton2*) Mutanten haben während der Interphase abnormal organisierte kortikale Mikrotubuli und sind nicht in der Lage ein PPB aufzubauen (Traas et al., 1995; McClinton and Sung, 1997). Das Gen kodiert für eine regulatorische Untereinheit der Type 2A Proteinphosphatase und ist wahrscheinlich in eine Phosphorylierungs-Kaskade involviert, die die dynamische Organisation des kortikalen Zytoskeletts in Pflanzenzellen kontrolliert. (Camillerie et al.2002).

Vermindertes Wachstum der Zellen ist in *fragile fibre2 (fra2)*, *botero1 (bot1)* und *ectopic root hair3 (ehr3)* Mutanten zu finden, was ebenfalls auf eine abnormale Organisation der Mikrotubuli zurückzuführen ist. Diese Gene kodieren für Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu Katanin, einem Protein das bei der Zerlegung von Mikrotubuli beteiligt ist (Burk et al., 2001; Bichet et al., 2001; Webb et al., 2002; McNally et al., 1993).

Schwache Allele von PORCINO und KIESEL wurden ebenfalls unter dem Gesichtspunkt der Trichomverzweigung gefunden. Die beiden Gene kodieren für „tubulin folding cofactors“ (TFC-A und TFC-C). TFC-A und TFC-C gehören zur Klasse von Proteinen, die mit α und β Tubulin-Monomeren nach deren Translation assoziieren und die Bildung von α -Tubulin-Dimeren herbeiführen (Steinborn et al., 2002; Kirik et al., 2002a,b).

D.h., dass sowohl das Aktin- als auch das Mikrotubuli-Zytoskelett am gerichteten Wachstum verschiedener Zellen beteiligt sind. Im Moment ist allerdings noch nichts über die Koordination beider Wege bekannt.

B 1.3. Trichomentwicklung

Ein weiterer Zelltyp, der sich für die Untersuchung von polarem Wachstum und Morphogenese gut eignen sind die Blatthaare (Trichome) von *Arabidopsis*. Da sie bei diesem Modellorganismus unter Laborbedingungen angezogen nicht essentiell sind, kann man ihre Entwicklung besonders gut untersuchen. In diversen genetischen Ansätzen wurden viele Gene entdeckt, die an der Trichomentwicklung beteiligt sind (Oppenheimer et al., 1998; Hülskamp et al., 1994). Nähere Analysen der mutanten Pflanzen zeigten jedoch, dass die meisten Gene nicht nur bei der Entwicklung von Trichomen eine Rolle spielen, sondern auch bei der Entwicklung der schon oben beschriebenen Zelltypen.

B 1.3.1. Auswahl der Zellen, die Trichomschicksal annehmen sollen

Trichome auf der Blattoberfläche sind in einem regelmäßigen Muster angeordnet. Dieses Muster wird schon etabliert, wenn das Blatt erst circa 100 μ m lang ist (Hülskamp et al., 1994; Larkin et al., 1996). Schon die Initiation ist streng kontrolliert, da sich zwischen den neu

ausgewählten Trichomen immer drei bis vier Zellen befinden, die sich nicht zu Trichomen differenzieren werden. Die Gene, die zur Ausbildung des regelmäßigen Musters benötigt werden sind kloniert und als Transkriptionsfaktoren identifiziert (Oppenheimer et al., 1991; Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003; Wada et al., 1997; Schellmann et al., 2002; Kirik et al 2004a; Kirik et al., 2004b).

B 1.3.2. Trichommorphogenese

Nachdem eine Zelle, die sich zum Trichom entwickeln soll ausgewählt ist, hört sie auf sich zu teilen. Die DNA-Replikation schreitet aber noch vier Runden fort (Endoreduplikation) (Hülkamp et al., 1994). Parallel zu dem fortschreitenden Ploidie-Niveau nimmt die Zelle an Größe zu (Abbildung 8). Sie fängt an ihre Polarität zu ändern und wächst aus der Epidermis aus. Nach zwei Replikationsrunden, was einem DNA-Gehalt von 8C entspricht, wird die erste Verzweigung initiiert. Sie wird in einem Winkel von 25° zur proximal-distalen Achse angelegt, was eine erneute Polaritätsänderung widerspiegelt. Die zweite Verzweigung wird auf dem ersten Ästchen in einem Winkel von 90° angelegt und deutet ebenfalls zur Blattspitze (Folkers et al., 1997; Hülkamp 1994). Nachdem die Verzweigungen angelegt sind erfolgt eine zweite Wachstumsphase, die durch rasche Vakuolisierung und einer schnellen Expansion der drei Äste charakterisiert ist (Schwab et al., 2000). Ausgewachsene Trichome sind ca. 200-400 µm groß und 40-60 µm an der Basis breit. Im Durchschnitt weisen sie einen DNA-Gehalt von ungefähr 32 C auf (Hülkamp et al., 1994).

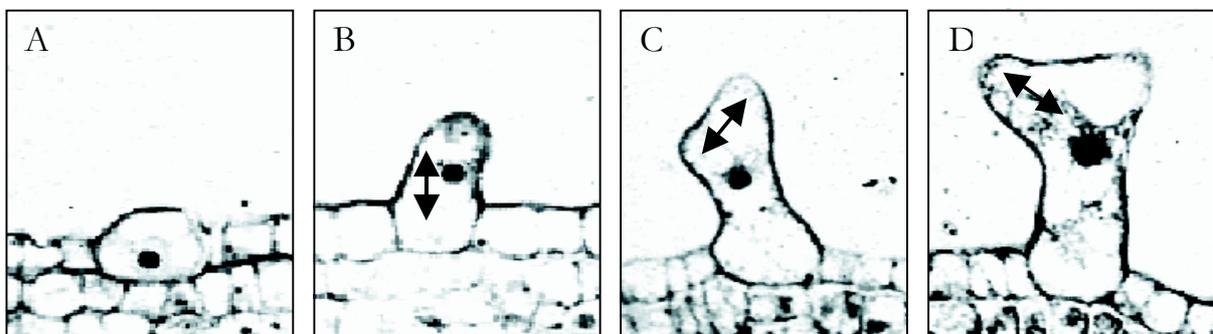


Abbildung 7: Trichomentwicklung

(A) Ausgewählte Zelle, die Trichomschicksal angenommen hat
(B) – (D) Der Pfeil stellt die verschiedenen Wachstumsrichtungen dar (modifiziert nach Hülkamp et al., 1994)

B 1.3.3. Ausbildung der Verzweigungen

Zahlreiche Gene wurden identifiziert, die die Anzahl der Verzweigungen regulieren. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen. In der einen Klasse wird die Zellgröße und damit die Verzweigungszahl über die Endoreduplikation reguliert. In der anderen ist die Anzahl der Verzweigungen verändert, aber nicht die Endoreduplikation (Hülkamp et al., 1994; Perazza et al., 1999; Kirik et al., 2000; Schnittger et al., 2003; Folkers et al., 1997; Luo and Oppenheimer 1999; Qui et al., 2002).

B 1.3.3.1. Endoreduplikationsmutanten mit Verzweigungsphänotyp

Mutanten, die einen veränderten DNA-Gehalt aufweisen sind auch in Zellgröße und Anzahl der Verzweigungen verändert (Hülkamp et al., 1994; Perazza et al., 1999; Kirik et al., 2001; Schnittger et al., 2003). *glabra3* Mutanten, deren DNA-Gehalt auf bis zu 16C reduziert ist, haben kleinere und unterverzweigte Trichome. Wird *GL3* unter dem starken, trichomspezifischen *GL2* Promotor exprimiert steigt der DNA-Gehalt auf ungefähr 128C und die Trichome sind überverzweigt (Hülkamp M et al., 1994; Kirik et al., 2004c). *GL3* kodiert für eine bHLH Transkriptionsfaktor. Ist der DNA-Gehalt erhöht, wie zum Beispiel in *triptychon* (ungefähr 64C), weisen die Trichome bis zu fünf Verzweigungspunkte in *Ler* auf. *TRY* codiert für einen MYB-ähnlichen Transkriptionsfaktor (Hülkamp et al., 1994; Schellmann et al., 2002). Mutanten der *kaktus* Gruppe (*kaktus1*, *kaktus2*, *rastafari* und *polychom*) zeichnen sich ebenfalls durch einen erhöhten Ploidiegrad aus (Perazza et al., 1999). Die Trichome dieser Mutantenklasse sind größer und überverzweigt (bis zu sieben Verzweigungen). Aus der Gruppe der *kaktus* (*kak*) Mutanten ist bisher nur *kak2* kloniert, das für eine putative E3-Ligase kodiert (Dowes et al., 2003; El Refi et al., 2003). D.h. dass nicht nur Transkriptionsfaktoren an Endoreduplikationsprozessen und darüber hinaus an der Festlegung der Verzweigungszahl beteiligt sind, sondern auch möglicherweise regulierter Proteinabbau die Morphogenese der Trichome beeinflusst. *SPINDLY*, dessen Genprodukt in den Gibberelinsäure-Weg involviert ist, weist in seiner mutanten Form ebenfalls einen erhöhten DNA-Gehalt und überverzweigte Trichome auf (Perazza et al., 1999). Einen weiteren Beweis für die Korrelation zwischen DNA-Gehalt und Verzweigungsanzahl lieferte

die Analyse von tetraploiden *Arabidopsis* Pflanzen. Bei ihnen liegt der DNA-Gehalt bei 64C und die Trichome bilden bis zu acht Verzweigungen aus (Perazza et al., 1999).

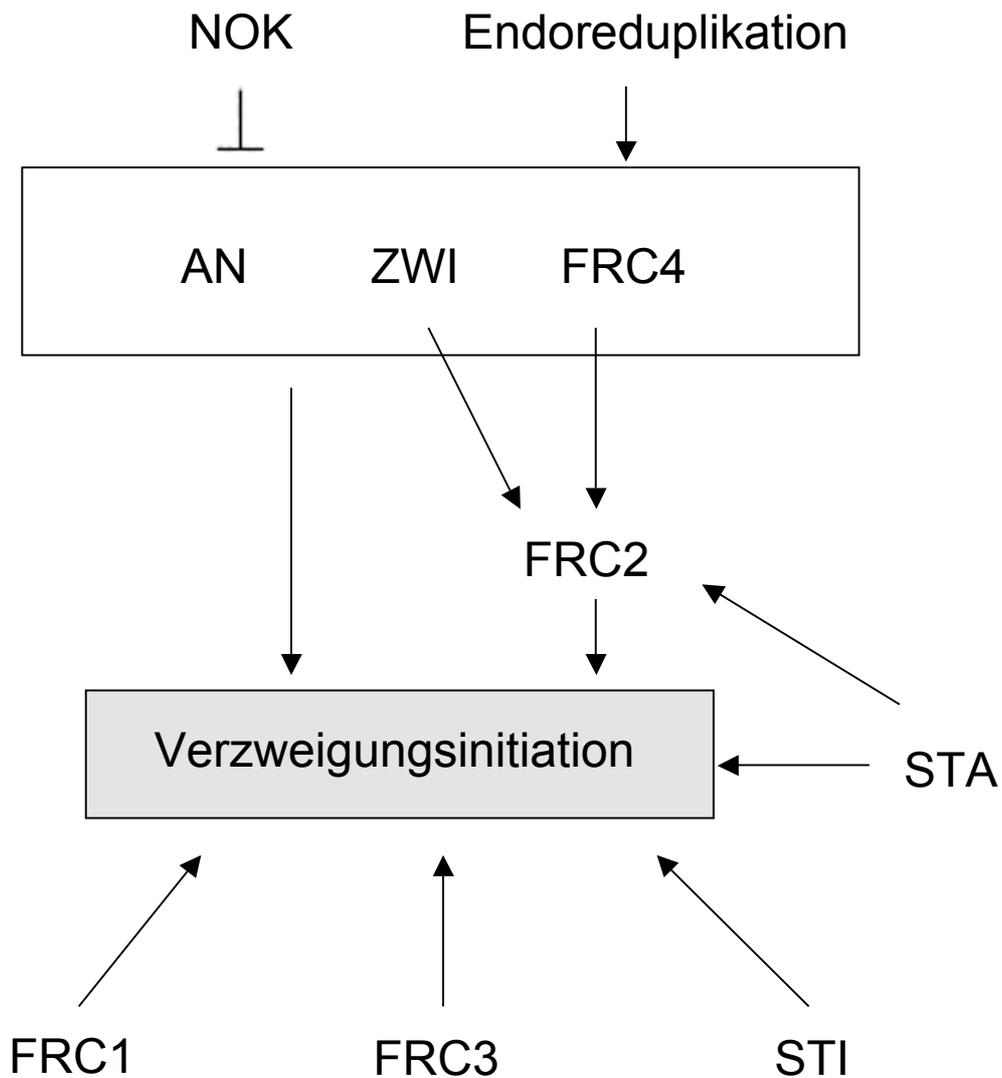


Abbildung 8: Genetische Interaktion der Verzweigungsgene

Die Interaktionen zwischen den meisten Verzweigungsgenen wurden durch genetische Analysen bestimmt. Pfeile und Repressionspfeile weisen auf positive bzw. negative Regulation hin. (Abbildung aus Falk et al., 2004)

B 1.3.3.2. Verzweigungsmutanten ohne Endoreduplikationsdefekt

Genetische Analyse der Verzweigungsmutanten:

In dieser Klasse finden sich Mutanten mit einer oder keiner Verzweigung (ANGUSTIFOLIA (AN), ZWICHEL (ZWI), FURCA1 bis FURCA4 (FRC1-4), STICHEL (STI) und STACHEL (STA) und eine Mutante mit bis zu acht Verzweigungen NOEK (NOK) (Folkers et al., 1997; Luo and Oppenheimer, 1999; Qui et al., 2002). Detaillierte genetische Analysen führten zu einem komplexen Netzwerk verschiedener unabhängiger Wege (Abbildung 2) (Falk et al., 2004). Jedoch können drei dieser Verzweigungs-Gene, ANGUSTIFOLIA, ZWICHEL und FURCA4 in den Weg, der Verzweigung über Endoreduplikation oder Zellgröße steuert, eingeordnet werden, da sie benötigt werden, um die Überverzweigung in Mutanten mit erhöhtem DNA-Gehalt zu erzeugen (Luo and Oppenheimer 1999).

Mittlerweile sind noch mehr Mutanten mit Trichomphänotyp identifiziert worden (SPIKE, FASS/TON2 und POR), die jedoch in Bezug auf die anderen Verzweigungs-Gene nicht genetisch analysiert sind und deshalb in Abbildung 2 nicht auftauchen (Traas et al., 1995; McClinton and Sung 1997; Torres-Ruiz and Jürgens 1994; Camilleri et al., 2002; Steinborn et al., 2002; Qui et al., 2002). Die Gene NOK, STA und FRC1-4 sind noch nicht kloniert.

B 1.3.4. Molekulare Natur der Verzweigungs-Gene:

Das ZWICHEL Gen (KCBP) gehört zu der Familie der Kinesine und enthält eine Calmodulin-Bindungsstelle (Oppenheimer et al., 1997; Reddy et al., 1996a,b; Song et al., 1997; Deavours et al., 1998). Kinesine sind Motor-Proteine der Mikrotubuli und spielen eine Rolle beim intrazellulären Transport und der Mikrotubuli-Organisation. Welche Rolle ZWI zu Teil wird ist unklar. Zellbiologische Analysen ergaben, dass ZWI in Zellzyklus-Prozesse involviert ist. Für das Protein konnte eine Kolo-kalisierung mit dem Präprophaseband (PPB) nachgewiesen werden (Bowser & Reddy, 1997). Das PPB markiert in pflanzlichen Zellen in Phragmoplast die Stelle, an der später die Zellteilung stattfinden wird. Außerdem führten Antikörperinjektionen zu einem Arrest während der Metaphase (Vos et al., 2000). Diese Ergebnisse bezeugen eine Rolle von ZWI während der Zellteilung, allerdings konnte ein solcher Phänotyp nicht festgestellt werden.

STICHEL ist ein Protein, das abhängig von seiner Dosis die Anzahl der Verzweigungen kontrolliert (Ilgenfritz et al., 2003). Abhängig von der Stärke des Allels schwankt die Verzweigungszahl zwischen unverzweigt und zweiverzweigt und Überexpression führt zu überverzweigten Trichomen. STICHEL kodiert für ein Protein, das eine Domäne mit hoher Sequenzähnlichkeit zur gamma Untereinheit der eubakteriellen Polymerase III hat. Im Moment ist es noch völlig unklar, wie der Phänotyp und die Proteinhomologie zu verknüpfen sind.

B 1.4. *ANGUSTIFOLIA*

Das *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) Gen ist nicht nur für die Verzweigung der Trichome wichtig, sondern auch für die Morphogenese einiger anderer Organe. In *an* Mutanten sind alle Blätter schmäler als beim Wildtyp und der Stamm und die Schoten sind gedreht (Redei 1962). Es konnte gezeigt werden, dass der schmalblättrige Phänotyp der Blätter auf einen Polaritätsdefekt der Blattzellen zurückzuführen ist (Tsuge et al. 1996). Die Zellen der Epidermis sind dicker und in ihrer lateralen Expansion reduziert. Außerdem ist die Anzahl der Zellen auf der Blattbreitenachse reduziert. Die Trichome sind in *an* Mutanten zweiverzweigt (Folkers et al. 1997).

Untersuchungen des Zytoskeletts ergaben, dass die Mikrotubuliorganisation gestört ist, worauf sich die Form der Epidermiszellen, die keine Puzzelstück-ähnliche Form aufweisen zurückzuführen ist (Kim et al 2002). Bei der genaueren Analyse von Trichomen stellte sich ebenfalls heraus, dass die Verteilung der Mikrotubuli in *an* Mutanten gestört ist. Die Dichte der Mikrotubuli an der Spitze wildtypischer Trichome ist viermal höher als an der Trichombasis, hingegen sind in *an*-mutanten Trichomen die Mikrotubuli gleich verteilt (Folkers et al., 2002).

ANGUSTIFOLIA kodiert für ein 636 Aminosäuren langes Protein, das zu 35% Sequenzidentität zu einer Proteinfamilie aufweist, die als C-terminale Corepressoren und zur Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur bekannt sind, die CtBP/BARS (Carboxy-terminal binding protein/ Brefeldin A ribosylated substrat) Familie. Sequenzanalysen ergaben, ein mögliches Kernlokalisationsmotiv (KKRH; Einbuchstabencode für die vier Aminosäuren) an

Position 424-427, ein PEST-Motiv an der Stelle 328-361 in dessen Nähe sich eine mögliche zellzyklusabhängige Phosphorylierungsstelle befindet (Folkers et al., 2002; Kim et al., 2002).

An der Aminosäureposition 26-30 befindet sich eine putative Retinoblastoma Bindungsstelle und an Position 409-413 eine putative SUMOylierungsstelle.

B 1.4.1. PEST-Sequenz und Phosphorylierungs-Stelle

Beim Vergleich von verschiedenen Proteinen, die sich alle durch einen schnellen Abbau auszeichnen (z.B. Myc, p53 etc.) wurde eine Region entdeckt, die sich durch einen erhöhten Gehalt an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) auszeichnete (PEST-Sequenz). Diese Regionen sind zumeist von Lysin (K), Argenin (R) oder Histidin (H) Resten flankiert. Nie befindet sich eine positiv geladene Aminosäure innerhalb der PEST-Sequenz. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, über die PEST-Proteine abgebaut werden können. Eine Möglichkeit ist, dass eine sich am Carboxy-Ende der PEST-Domäne befindende Phosphorylierungs-Stelle phosphoryliert wird. Diese Modifikationen sind nötig, um das Protein zu ubiquitinieren und so für den Abbau über den 26S Proteasomen Weg vorzubereiten (Rechsteiner and Rogers 1996).

Bei ANGUSTIFOLIA findet sich eine PEST-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 328-361. Innerhalb dieses Bereiches sind die letzten vier Aminosäuren als zellzyklus-abhängige Phosphorylierungs-Stelle erkannt worden, was auf einen zellzyklusabhängigen Abbau von AN hindeuten könnte (Folkers et al. 2002).

B 1.4.2. SUMOylierungs-Stellen

Zwei Hauptfunktionen werden der SUMOylierung zugeschrieben:

1. Verschiedene Beispiele sind bekannt, wo SUMOylierung die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle bestimmt. So wird zum Beispiel RanGAP1 aus Säugern wahrscheinlich durch SUMOylierung zu den Kernporen-Komplexen geleitet. Aus *Drosophila* ist ebenfalls ein indirekter Beweis vorhanden, dass SUMO bei Importprozessen in den Kern beteiligt ist. (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996; Johnson and Blobel, 1999)
2. Auf der anderen Seite wird SUMO auch die Rolle als Inhibitor von Ubiquitin zu geschrieben. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor der durch die Bindung seines Inhibitors

I κ B α inaktiv im Zytoplasma festgehalten wird. Durch die Stimulation mit Effektoren, was Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) sein können, wird I κ B α phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend abgebaut. Der vom Inhibitor freigelassene Transkriptionsfaktor NF- κ B kann nun in den Kern gelangen und seine Ziel-Gene aktivieren. SUMO konkurriert mit Ubiquitin um denselben Lysinrest in I κ B α . Der SUMOylierte Anteil an I κ B α wird vor dem TNF-induzierten Abbau geschützt (Saitoh et al., 1997; Desterro et al., 1998).

B 1.4.3. Retinoblastoma-Bindestelle

Das Retinoblastoma Protein Rb ist Teil eines konservierten Weges, der die Zellteilungsaktivität in tierischen Zellen kontrolliert. In Säugerzellen kontrollieren die Mitglieder der Rb-Familie, zu denen Rb, p107 und p130 gehören, den Übergang einer Zelle von G1 nach G1/S und reaktivieren G0 Zellen (Weinberg 1995; Helin 1998). Rb fungiert als Tumor Suppressor und als negativer Regulator der Zellproliferation. Die Funktion der Proteine der Rb-Familie hängt von der Assoziation mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zusammen. Durch sequenzielle Phosphorylierung von Rb durch verschiedene Cyclin-abhängige Kinase-Komplexe wird eine Dissoziation von Rb aus dem Rb/E2F-Komplex herbeigeführt (Sherr and Roberts 1995; Serrano 1996).

Über die Existenz eines analogen Weges in Pflanzen wurde lange Zeit spekuliert. Fortschreitende Studien über G1/S Regulatoren gaben weitere Anhaltspunkte, dass in Pflanzen ein Rb-ähnlicher Weg vorhanden sein könnte, der die Zellproliferation steuert. Die identifizierten Komponenten entsprechen weitgehend den schon aus dem tierischen System bekannten Komponenten. Die Isolation der homologen D-Typ Cycline aus *Arabidopsis* (Soni et al., 1995) und Alfalfa (Dahl et al., 1995) enthalten das LXCXE-Motiv, das schon aus menschlichen Zellen zur Bindung von Rb bekannt war. Ein zweiter Hinweis war die Isolation von Proteinen aus Geminiviren, die ebenfalls das LXCXE-Motiv enthalten. In diesen pflanzlichen Viren ist das Motiv für die Vollendung des viralen Replikations-Zyklus nötig (Xie et al., 1995).

Pflanzliche(s) Rb-Protein(e): Zu erst wurden zwei, mit Rb verwandte Gene aus Mais isoliert, RRB1 und RRB2 (Shen et al. 1994; Grafi et al., 1995; Xie et al., 1996; Ach et al., 1997a). Später wurden auch die Gene aus *Arabidopsis* (ein Gen), Tabak und *Chenopodium rubrum* kloniert (Gutiérrez 1998; Fountain et al., 1999; Inzé et al., 1999; Nakagami et al., 1999).

Die Struktur der Rb-Proteine: Die Analyse der Aminosäuresequenzen der Proteine der Rb-Familie, einschließlich der pflanzlichen, zeigte, dass einige Domänen stark konserviert sind. Rb-Proteine enthalten zwei Domänen, Box A und B (A/B „pocket“ Domäne), die innerhalb der Familie zu 50-65% Übereinstimmungen der Aminosäuren aufweisen. Die beiden Boxen sind von einem Carboxy- und Amino-terminalen Bereich flankiert. Innerhalb der Box B befindet sich das LXCXE-Motiv (Hu et al., 1990; Huang et al., 1990; Lee et al., 1998).

B 1.4.4. Dehydrogenasen

Der N-Terminus von AN weist Sequenzähnlichkeiten zu drei anderen Proteinen auf, Dehydrogenasen und der CtBP/BARS Familie. (Folkers et al., 2002; Kim et al., 2002).

Die Dehydrogenasen, zu denen AN große Sequenzähnlichkeiten aufweist, gehören zu den bakteriellen D-2-Hydroxysäure Dehydrogenasen, die die NADH-abhängige Reduktion von 2-Oxocarboxylsäuren zu ihren korrespondierenden 2-Hydroxycarboxylsäuren katalysieren. Jedoch sind die Aminosäuren des aktiven Zentrums (H296, D259 und E264) in AN nicht konserviert (Asryants et al., 1989; Stoll et al., 1996; Bernard et al., 1997).

B 1.4.5. CtBP/BARS

Das 48-kDa Phosphoprotein CtBP (Carboxy-terminal binding protein) wurde bei der Suche nach Interaktoren für das E1A Protein des Adenovirus mittels eines Hefe Zwei-Hybrids gefunden (Boyd et al., 1993; Schaeper et al., 1995). Diese Publikation zeigt, dass CtBP über die Interaktion mit E1A eine wichtige Rolle bei der Replikation des Virus spielt und damit auch in der Onkogenese. Einen ersten Hinweis, dass CtBP eine Rolle bei der Genrepression spielt gab es durch die Deletion des PXLDS-Motives in E1A. Ohne dieses CtBP-Bindungsmotiv steigert sich die transkriptionelle Aktivität von E1A (Sollerbrant et al., 1996). Aber nicht nur bei Vertebraten wurde das CtBP Gen gefunden. In *Drosophila* wurde dCtBP als Corepressor der Repressoren KRÜPPEL, KNIRPS und SNAIL identifiziert (Nibu et al., 1998). In einem weiteren Hefe Zwei-Hybrid (gegen Basic Krüppel Like Factor) wurde CtBP2 isoliert. CtBP2 erkennt ein ähnliches Motiv wie CtBP1, über welches es als Corepressor wirkt (Katsanis et al., 1998; Turner und Crossley 1998).

Bei der transkriptionellen Repression in ruhenden Zellen übernimmt der E2F-Rb-Weg eine kritische Rolle (Sherr, 1993; Hunter, 1993; Nevins, 1992; Helin und Harlow, 1993; Sherr und Roberts, 1995; Weinberg, 1995). Die mechanistische Basis der Rb-vermittelten Repression wurde über Zwei-Hybrid Analysen weiter aufgeschlüsselt. Diese Experimente zeigten, dass CtBP über das Brückenprotein CtIP (CtBP interacting protein) mit Rb interagiert und so über einen alternativen, Histondeacetylase unabhängigen Weg die Transkription reguliert (Meloni et al., 1999). Die Interaktion von Rb über CtIP mit CtBP stellt eine Funktion von Rb außerhalb der Kontrolle des Zellzyklus dar.

Ihrer Natur zu Folge, als transkriptionelle Repressoren, liegt der Wirkungsort der CtBPs im Kern. Auch für CtBPs konnte gezeigt werden, dass die SUMO-1 Modifikation für deren Lokalisation im Kern und die damit verbundene Genantwort nötig ist (Lin et al., 2003).

Bei Untersuchungen der Wirkung von Brefeldin A auf den Golgi-Apparat wurde ein weiteres Mitglied der CtBP-Familie gefunden (Di Girolamo et al., 1995; Mironov et al., 1997; Spano et al., 1999). Dabei stellte sich heraus, dass Brefeldin A zwei Proteine ribosyliert, ein 30 kDa großes (GAPDH) und ein 50 kDa großes, bisher unbekanntes Protein. Aus diesem Ergebnis wurde der Name des 50 kDa Proteins abgeleitet; Brefeldin A ribosylated substrate (BARS). Sequenzanalysen ergaben, dass BARS wahrscheinlich ein Homolog von CtBP1 ist, das alternativ prozessiert wird, es könnte aber auch durch ein eigenes Gen kodiert sein und wird deshalb CtBP3/BARS genannt.

Immunofluoreszenz Experimente haben den Hinweis bekräftigt, dass CtBP3/BARS in die Dynamik des Golgi-Apparates involviert ist (Weigert et al., 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass CtBP3/BARS Acyltransferase-Aktivität besitzt. CtBP3/BARS katalysieren die Acylierung von Lysophosphatylsäure zu Phosphatylsäure unter Verwendung des Substrates Acyl-CoA. Die bevorzugten Substrate für diese Reaktion sind ungesättigte Oleylfettsäuren. Die daraus resultierenden Lipide sind kegelförmig, was zu einer Krümmung der Membran führt und letztlich zur Abschnürung von Vesikeln. Das Edukt dieser Reaktion ist den Edukten der Dehydrogenase-Reaktion ähnlich. Dass CtBP/BARS auch Dehydrogenase-Aktivität besitzen wurde von Kumar et al. 2002 und Zhang et al 2002 gezeigt.

Im Gegensatz zu den CtBP/BARS, die in Säugern durch mindestens zwei Gene repräsentiert sind, gibt es in *Arabidopsis* kein weiteres Gen, das zu dieser Familie Homologien aufweist. Im Pflanzenreich ist ANGUSTIFOLIA hochkonserviert (Folkers et al., 2002).

B 1.5. Zielsetzung

Viele Aspekte der Zellmorphogenese sind noch nicht geklärt. Von Aktin-Studien ist bekannt, dass feines Aktin das lokale Auswachsen von Zellen vorantreibt. Auch sind mittlerweile Proteine identifiziert, die an der Organisation des Aktins beteiligt sind. Über die Auswahl der Wachstumspunkte und deren Fixierung weiß man nicht sehr viel.

AN kann, aufgrund des mutanten Phänotyps den Genen, die an der Polarisierung einer Zelle beteiligt sind, zugeordnet werden. In der folgenden Arbeit, soll die Rolle, die AN in der Zellmorphogenese übernimmt aufgeklärt werden. Dafür habe ich Expressionsanalysen durchgeführt und die intrazelluläre Lokalisierung studiert. Ich habe überprüft, ob das homologe Protein aus *Drosophila* CtBP die Potenz hat, die Funktion von AN in *Arabidopsis* zu übernehmen. Des Weiteren habe ich Deletionskonstrukte der gefundenen Motive angefertigt, um deren Funktionalität zu überprüfen. Diese Funktionalitäten konnte durch Interaktionsstudien verifiziert werden.

Anhand der erzielten Ergebnisse konnte ein Modell angefertigt werden, das die Rolle von AN während der Zellmorphogenese erklären könnte.

B 2. Ergebnisse

B 2.1 Expressionsanalyse von AN

RT-PCR Analysen zeigten, dass ANGUSTIFOLIA in der Wurzel, den Blättern, dem Stamm und in der Blüte exprimiert wird (Folkers et al., 2002; Kim et al., 2002). Um Rückschlüsse auf die zelluläre Auflösung zu bekommen wurde eine genauere Untersuchung der Expression mittels GUS-Reportergenanalyse durchgeführt. Dazu wurden 2 kb der AN 5' nicht-kodierenden, genomischen DNA vor das β -Glucuronidase-Gen kloniert und in *Ler* transformiert. Dieser Bereich, zusammen mit der kodierenden Sequenz von AN, reicht aus, um *an*-mutante Pflanzen zu retten. Das zu analysierende Gewebe wurde über Nacht in GUS-Lösung inkubiert und anschließend mit Ethanol entfärbt.

In jungen Blättern, wo die Differenzierung der Zellen noch nicht abgeschlossen ist, wurde eine starke Aktivität des AN-Promotors beobachtet (Abbildung 9 B). Bei der Untersuchung ältere Blätter, die aber noch nicht völlig ausgewachsen sind, ist die Promotor-Aktivität auf die Blattbasis beschränkt (Abbildung 9 B). Im distalen Bereich dieser Blätter kann nur noch in den Leitgeweben GUS-Färbung beobachtet werden. Untersucht man Blätter, bei denen keine Zellteilung mehr statt findet ist nur noch in den Leitgeweben GUS-Färbung festzustellen (Abbildung 9 C). Ebenso ist der AN-Promotor in jungen Trichomen aktiv (Abbildung 9 B) und erlischt beim Auswachsen der Verzweigung.

In der Wurzel ist nur Expression in den Meristemen nachweisbar, sowohl das Apikalmeristem, als auch die Seitenmeristeme zeigen Blaufärbung. (Abbildung 9 E und F) In Abbildung 9 ist zu sehen, dass die Expression die zukünftige Seitenwurzel markiert (D). Wurzeln die bis zu einer Länge von ca. 2 cm herangewachsen sind, zeigen eine starke Expression von AN im ruhenden Zentrum (Abbildung 9 E), die sich ab einer Länge von ungefähr 5 cm kaum noch nachweisen lässt (Abbildung 9 F) und danach vollständig erlischt. In der Region, in der sich die Zellen teilen, konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die Analyse der Inzidenz ergab, dass ANGUSTIFOLIA in den Schoten, den Spitzen der Petalen, den Embryonen und der Samenschale exprimiert wird (Abbildung 9 G-J).

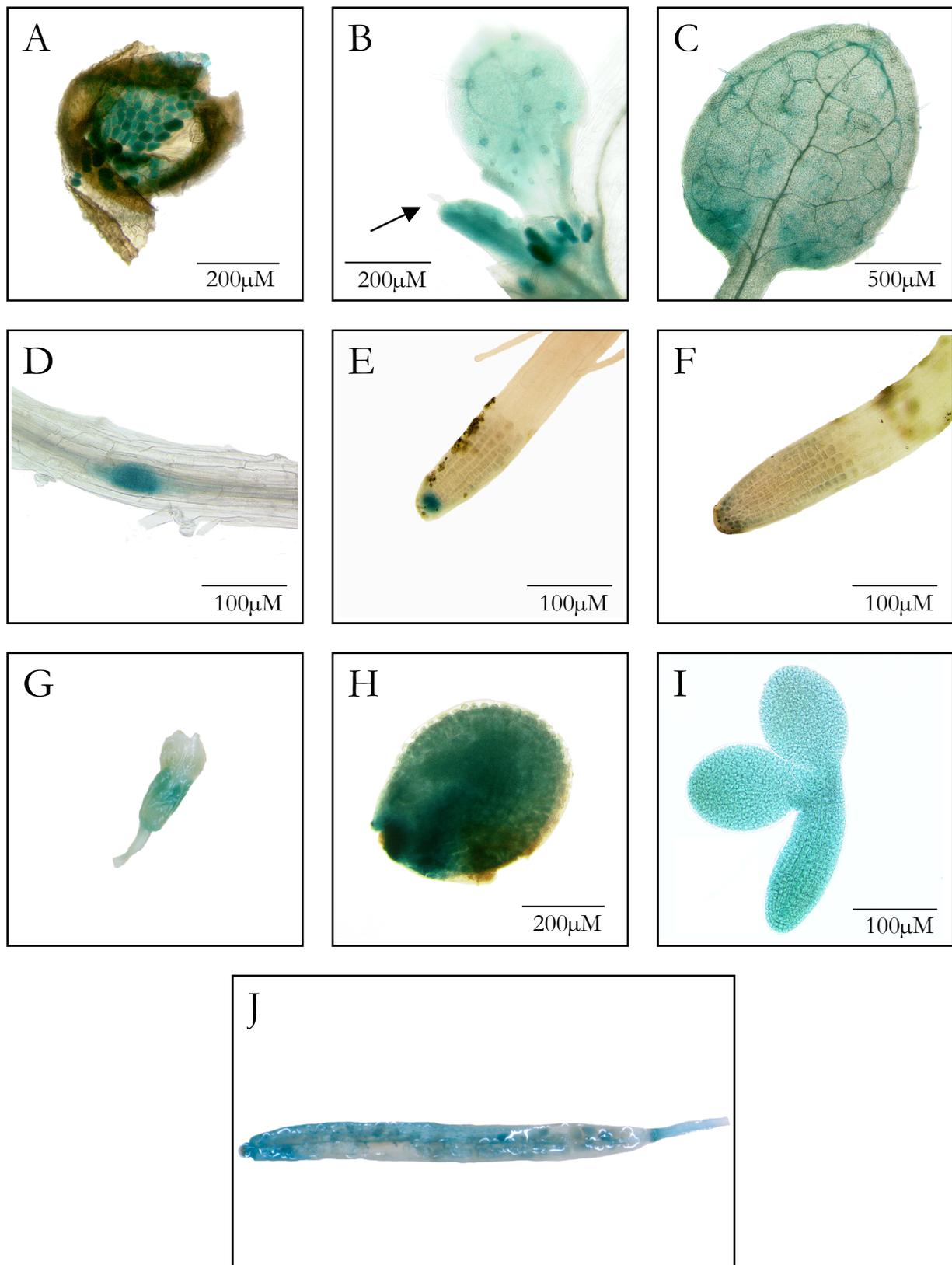


Abbildung 9: Expressionsanalyse von pAN:GUS. Beschreibung findet sich auf der nächsten Seite

B 2.2. Intrazelluläre Lokalisation von AN

Aufgrund der Sequenzhomologie zu dem transkriptionellen Co-Repressor CtBP und des vorhandenen Kernlokalisierungssequenz-Motivs könnte es möglich sein, dass das AN Protein im Kern lokalisiert ist. Unter der Kontrolle des 35S-Promotors wurde transient das GFP-AN Fusionskonstrukt in der Zwiebelepidermis exprimiert. Das GFP-AN Fusionsprotein konnte cytoplasmatisch sowie im Kern nachgewiesen werden (Folkers et al., 2002). Dieses Konstrukt, stabil in *Ler* transformiert, zeigte allerdings eine unerwartete Lokalisation. In jeder Zelle wurde eine singuläre Struktur gefunden, die nicht mit dem Kern assoziiert ist und sich im Zytoplasma frei bewegt. Da von diesem Konstrukt nur eine Pflanzenlinie zur Analyse zur Verfügung stand wurde mit einem neuen Konstrukt (35S:YFP:AN) die Transformation in *Ler* und *an* mutanten Hintergrund wiederholt. Das YFP-Konstrukt ist in mutantem Hintergrund vollständig in der Lage den Phänotyp zu retten. Diese Linien wurden unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) genauer analysiert. In sich teilenden und sehr jungen Zellen konnte kein YFP-Signal detektiert werden. Mit Beginn der Differenzierung wird sowohl im Blatt, wie auch in der Wurzel die singuläre Struktur in jeder Zelle sichtbar, die mit keiner bekannten pflanzlichen Struktur assoziiert zu sein scheint.

Abbildung 9: Expressionsanalyse von pAN

- (A): Leere Samenschale nachdem die Pflanze gekeimt ist
- (B): Junge Blätter zeigen sehr starke Expression, die immer schwächer wird, die Trichome zeigen zu Beginn ihrer Entwicklung starke Expression, in adulten Trichomen ist keine Expression mehr nachzuweisen (Pfeil), in Stipeln ist pAN stark aktiviert
- (C): Ausgewachsene Blätter zeigen basale Aktivität und im vaskularen Gewebe
- (D): Die Stelle, an der eine neue Seitenwurzel entsteht wird durch pAN markiert
- (E): Junge Wurzeln zeigen im Meristem starke GUS-Expression im Bereich des ruhenden Zentrums
- (F): Bei älteren Wurzeln nimmt die Expression von pAN ab
- (G): In der Blüte sind nur die Spitzen der Petalen blau gefärbt
- (H): Samen mit voll entwickeltem Embryo, das gesamte Gewebe ist gefärbt
- (I): Der Embryo ist gleichmäßig gefärbt
- (J): Schote mit deutlichem Signal

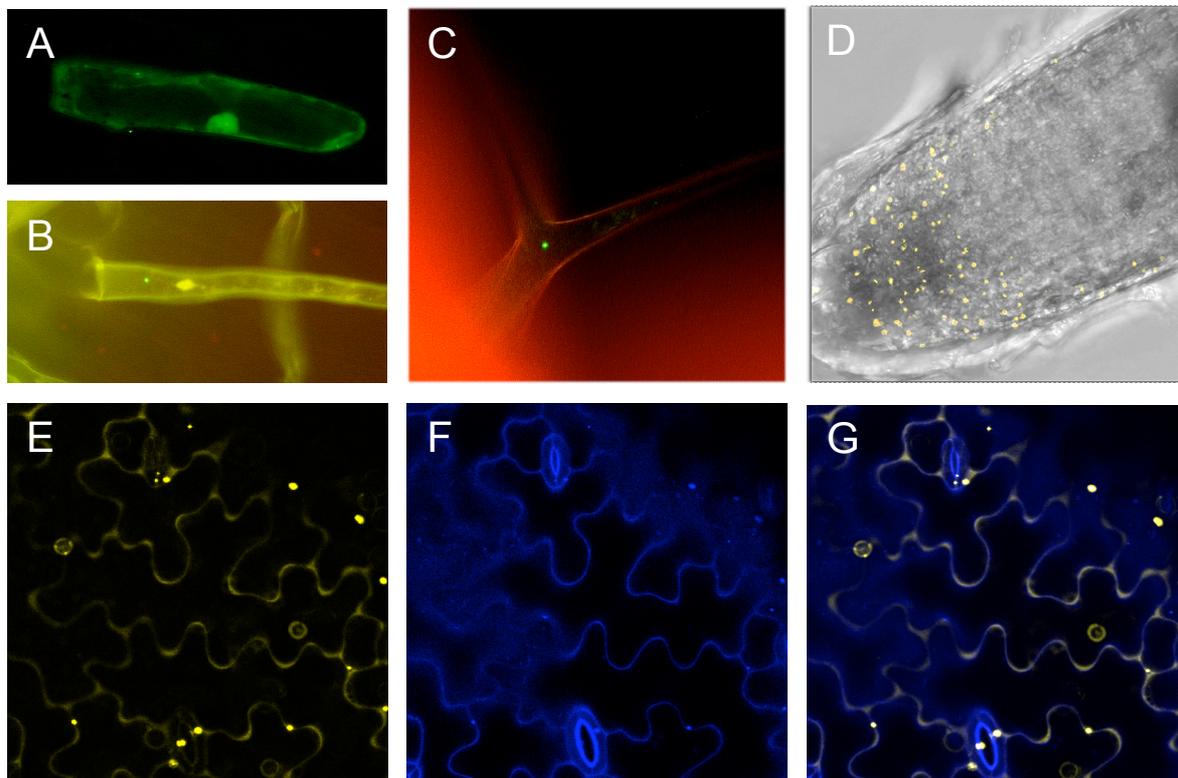


Abbildung 10: Intrazelluläre Lokalisation von AN unter der Kontrolle des 35S-Promotors

- (A): Transiente Expression von GFP-AN in der Zwiebelepidermis
(B): Wurzelhaar; Überexpressionsprotein GFP-AN lokalisiert mit dem Zellkern
(C): GFP-AN im Trichom
(D): YFP-AN in der Wurzel; die Zellen der Wurzelhaube zeigen alle die Proteinakkumulation, frische geteilte Zellen zeigen diese Struktur nicht
(E): YFP-AN ist in den Auswölbungen der Epidermiszellen lokalisiert
(F): Sichtbarmachung der Zellwand durch Propidiumjodid-Färbung
(G): Überlagerung der Bilder E und F

In ausdifferenzierten Blattbereichen war unter dem Konfokalen Laser Mikroskop das YFP-Signal in den Ausstülpungen der puzzelförmigen Epidermiszellen zu detektieren. Da in *an*-mutanten Pflanzen die Blattepidermiszellen keine Ausstülpungen haben, ist es durchaus denkbar, dass das Fusionsprotein, das in der Lage ist diesen Phänotyp zu retten, an diese Stelle lokalisiert. Diese Lokalisation korrespondiert mit dem *an*-mutanten Phänotyp. In adulten Pflanzenzellen nimmt die Vakuole 95% des zur Verfügung stehenden Raumes ein

(Stassburger, Lehrbuch der Botanik). Die Ausstülpungen der Epidermiszellen sind die Stellen einer Zelle, wo das Zytoplasma am wenigsten stark von der Vakuole gegen die Zellwand gedrückt wird. Deshalb wäre auch eine rein zytoplasmatische Lokalisation in den Bereichen der Ausstülpungen stärker sichtbar.

2000 bp 5' nichtkodierender, genomischer DNA von AN mit dem GUS-Reportergen fusioniert, zeigen ein deutliches Signal, deshalb wurde dieser Promotor-Bereich genommen, um die Lokalisation der 35S-Konstrukte zu überprüfen. Mit dem Konstrukt pAN:AN:YFP wurden sowohl Ler als auch *an*-mutante Pflanzen transformiert. *an*-mutante Pflanzen konnten gerettet werden, das heißt, dass die Fusion physiologisch wildtypische Aktivität besitzt.

Der zeitliche Rahmen, in dem das Genprodukt von AN, unter der Kontrolle des eigenen Promotors, in der Zelle durch die Fusion zu sehen ist, entspricht den Blattstadien, die auch die GUS-Reportergen-Linien zeigen (Vergleiche Abbildung 9 B und D). Zellen, die sich frisch geteilt haben, und noch nicht mit ihrem Determinierungs- bzw. Differenzierungsprogramm, innerhalb des Blattes begonnen haben, sind noch nicht vollständig vakuolisiert. D.h. während dieses Stadiums nimmt das Zytoplasma noch einen großen Raum in der Zelle ein. Da die AN-YFP nur an der Wand dieser noch sehr jungen zu sehen ist, kann man davon ausgehen, dass es sich bei ANGUSTIFOLIA nicht um ein zytoplasmatisches Protein handelt, sondern um ein Protein, das mit der Plasmamembran oder der Zellwand assoziiert ist (Abbildung 11). Wird YFP alleine konstitutiv exprimiert ist keinerlei zelluläre Struktur erkennbar (persönliche Mitteilung von Daniel Bouyer).

Die beiden Konstrukte mit unterschiedlichen Promotoren ergaben, dass AN wahrscheinlich ein Plasmalemma oder Zellwand-assoziiertes Protein ist. Bei der transienten Zwiebelexpression ist AN im Kern lokalisiert. Die stabile Überexpression in Arabidopsis führt zu einer Lokalisation von AN in den Auswölbungen und zu einer Akkumulation des Proteins in einer singulären Struktur.

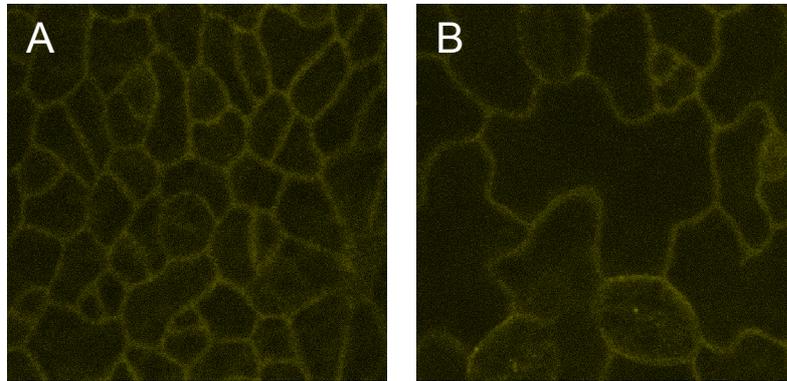


Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von AN unter der Kontrolle des endogenen Promotors

(A) und (B): AN:YFP lokalisiert an der Zellperipherie entweder mit der Zellwand oder dem Plasmalemma

B 2.2. Molekulare Charakterisierung von ANGUSTIFOLIA

Eine schematische Darstellung der Motive und Homologie ist in Abbildung 12 zu sehen.

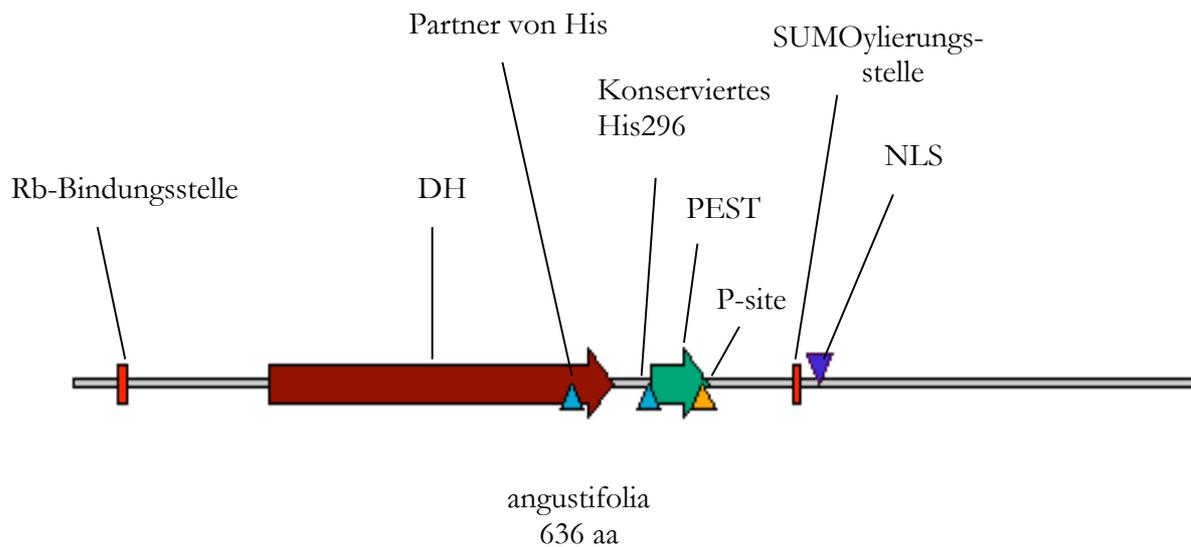


Abbildung 12: Schematische Beschreibung von ANGUSTIFOLIA

Rb-Bindungsstelle: Retinoblastoma- Bindungsstelle.

DH: Dehydrogenase Domäne, auch mit 35% Sequenzähnlichkeit zu CtBP/BARS.

PEST: Motiv, das in die Regulation der Proteinstabilität involviert ist

P-site: Zellzyklus spezifische Phosphorylierungsstelle

NLS: Motiv, das für die Kernlokalisation von Proteinen verantwortlich ist.

SUMOylation site: „small ubiquitin like modifiers“ sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt

Die beiden Aminosäuren Histidin und sein Partner (Arginin) sind wichtig für die Aktivität von Dehydrogenasen

B 2.2.1 Ähnlichkeit zu anderen Proteinen

B 2.2.1.1. Dehydrogenasen

Um zu überprüfen, ob die Dehydrogenase –Funktion für eine Rettung von *an* ausreicht, wurde diese Domäne (Aminosäuren 112-307; Konstrukt 35S:AN-DH in *Ler* und *an*-mutante Pflanzen transformiert. Es konnte keine Rettung erzeugt werden. Die Anzahl der erzeugten T1 Linien und deren Phänotypen ist für alle Konstrukte in Anhang aufgelistet.

Das aktive Zentrum der Dehydrogenasen weist sich durch drei Aminosäuren aus, einem Histidin-, einem Serin- und einem Asparagin-Rest. Sequenzvergleiche ergaben, dass das konservierte Histidin, das die Elektronen, die bei der Reaktion der Dehydrogenierung übertragen werden, übernimmt, bei ANGUSTIFOLIA fehlt. Erneute Alignments (siehe Anhang) zwischen AN und prokaryontischen D-2-Hydroxysäure Dehydrogenasen ergaben, dass H296 auch in AN konserviert ist (in AN H328). Mutagenesestudien haben ergeben, dass diese Dehydrogenasen ihre enzymatische Aktivität auf ein tausendstel reduzieren, wenn das Histidin durch einen Glutamin-Rest ersetzt wird (Tishkov et al., 1996).

Durch „site-directed mutagenesis“ wurde das Konstrukt 35S:AN H328Q erzeugt und in *Ler* und *an*-mutante Pflanzen transformiert. Die enzymatische Aktivität einer Dehydrogenase scheint für die Funktion von AN keine Rolle zu spielen, da sich die mutanten Pflanzen zu 100 % retten ließen. Auch auf wildtypische Pflanzen hatte dieses Konstrukt keine Auswirkung.

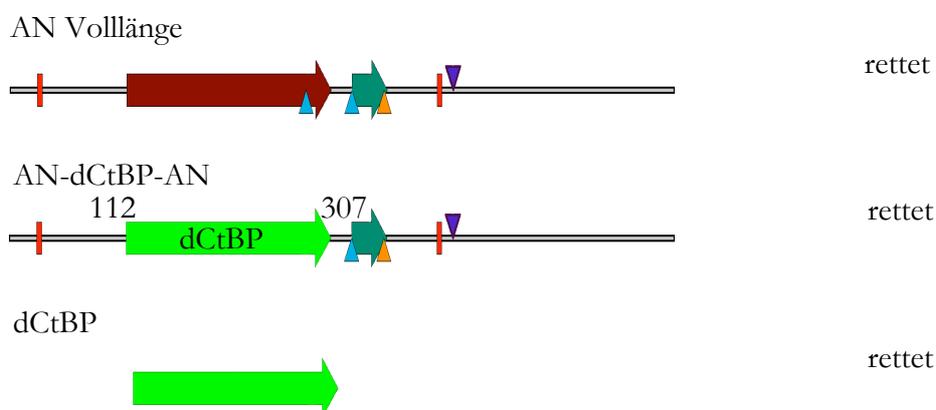
B 2.2.1.2. CtBP/BARS

Die Sequenzähnlichkeiten zu CtBP/BARS befinden sich in der gleichen Region des Proteins, wie die Sequenzähnlichkeiten zu den Dehydrogenasen, allerdings ist dieses Region deutlich größer. Die Sequenzähnlichkeiten umfassen die ersten 437 Aminosäuren von AN. Um zu testen, ob CtBP diesen Platz einnehmen kann, wurde die Dehydrogenase-Domäne von AN durch CtBP aus *Drosophila* ersetzt und unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *Ler* und *an*-mutante Pflanzen transformiert. Dieses Konstrukt (35S:AN:CtBP:AN) war in der Lage den mutanten Phänotyp komplett zu retten, auf die wildtypischen Pflanzen hatte das Konstrukt keinen Effekt. Daraus kann man schließen, dass CtBPs die Funktion der ersetzten

Region vollständig übernehmen können. Ob AN nach der Deletion der Dehydrogenase-Domäne noch die Potenz besitzt *an* mutante Pflanzen zu retten wurde nicht getestet, da davon auszugehen ist, dass eine Deletion von 196 Aminosäuren das Protein so stark verändert, dass mit einer Rettung nicht zu rechnen ist.

B 2.2.1.3. Können CtBP/BARS ANGUSTIFOLIA ganz ersetzen?

CtBP aus *Drosophila* wurde unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *an*-mutante Pflanzen und Wildtyp transformiert. Mit den Konstrukten pAMPAT 35S:dCtBP und pGREEN II 35S:dCtBP konnte *an* gerettet werden. Um sicherzustellen, dass es sich dabei nicht um ein falsch positives Ergebnis handelt wurde diese Linie, die mit pAMPAT 35S:dCtBP transformiert wurde, zum einen mit sequenzspezifischen Primern für CtBP auf die Insertion der T-DNA getestet und zum anderen mit Primern die zwischen wildtypischen und mutanten Pflanzen unterscheiden. Die beiden Kontrollen ergaben, dass es sich bei dieser Linie um *an*-Mutanten mit dem 35S:dCtBP-Konstrukt handelt. CtBP/BARS sind also nicht nur zwischen Ratten und Menschen (Spanfo et al., 1999) austauschbar, sondern auch zwischen *Drosophila* und *Arabidopsis*. Allerdings erwies sich diese Rettung im Gegensatz zu der Rettung mit dem Konstrukt 35S:AN:CtBP:AN als nicht besonders stabil. In der T3 Generation zeigen die geretteten *an*-Mutanten mit dem Konstrukt 35S:dCtBP wieder den *an* Phänotyp.



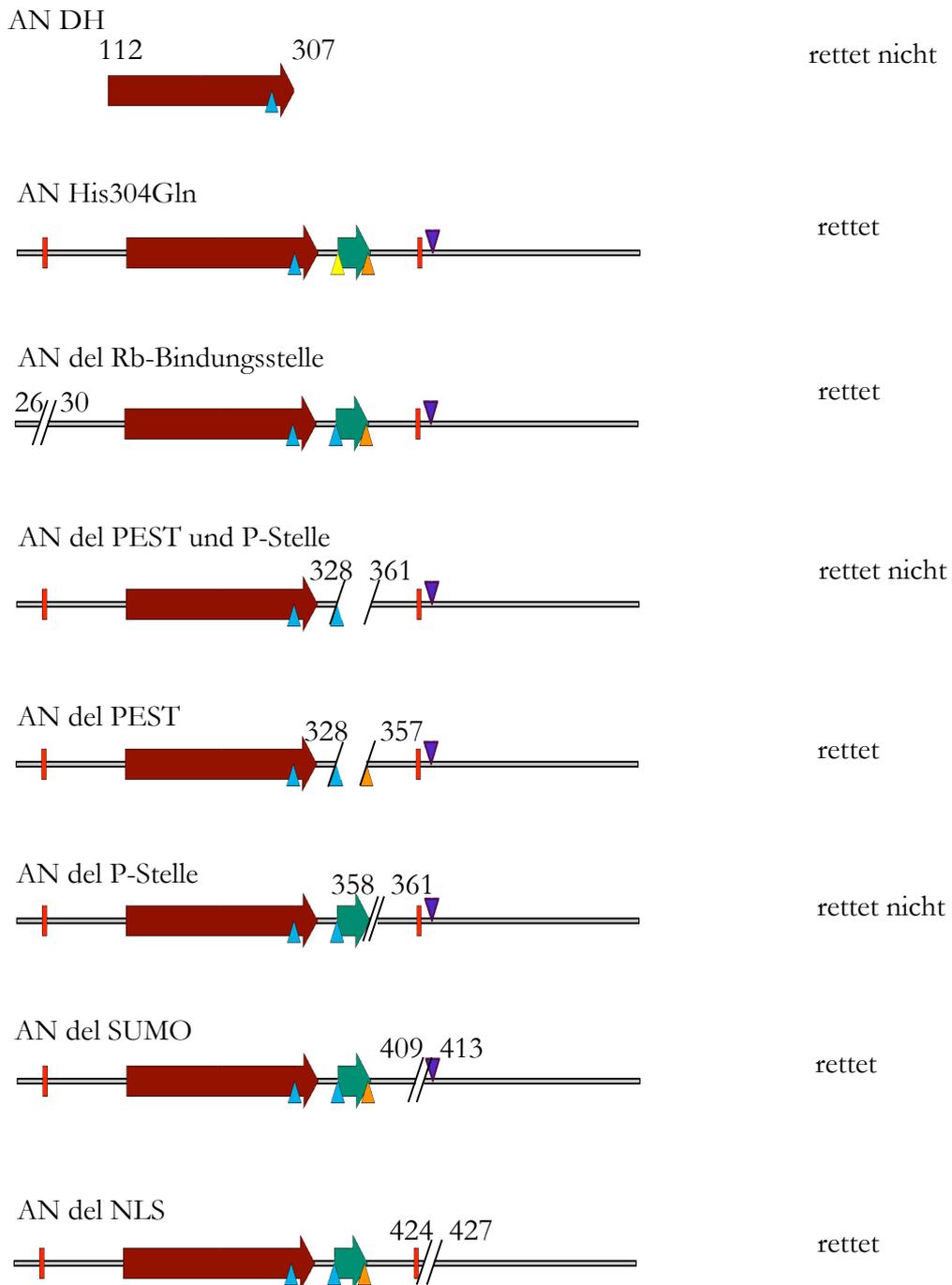


Abbildung 13: Übersicht über die verschiedenen Deletionskonstrukte

B 2.2.2. Analyse der Sequenz-Motive

In Tabelle 6 sind die Motive, Homologien und andere Übereinstimmungen zwischen ANGUSTIFOLIA und CtBP/BARS aufgelistet.

	CtBP/BARS	ANGUSTIFOLIA
DH-Homologie	Aktive NAD ⁺ Bindungsstelle und katalytisches His (Kumar et al., 2002; Zhang et al., 2002)	NAD ⁺ Bindungsstelle und konserviertes His sind vorhanden
Rb-Bindungsstelle	CtBP interagiert mit Retinoblastoma über CtIP (Meloni et al., 1999)	Rb-Bindungsstelle
Phosphorylierung	CtBP wird differentiell während des Zellzyklus phosphoryliert (Schaeper et al.,)	Zellzyklus abhängige Phosphorylierungsstelle
SUMOylierung	Ohne SUMOylation keine Kernlokalisation (Lin et al., 2003)	SUMOylierungs-Motiv
Interaktionen	Selbstassoziation Bindet das PLDLS-Motiv z.B. bei KNIRPS (Meloni et al., 1999)	Selbstassoziation 9 Proteine in <i>Arabidopsis</i> zeigen das PXDLS-Motiv

Tabelle 6: Gegenüberstellung der molekularen Analysen von CtBP/BARS und AN

Um zu überprüfen, ob die für CtBP/BARS funktionalen Domänen auch für AN relevant sind wurden verschiedene Deletionskonstrukte angefertigt.

B 2.2.2.1. PEST-Sequenz und Phosphorylierungs-Stelle

Bei ANGUSTIFOLIA findet sich eine PEST-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 328-361. Innerhalb dieses Bereiches sind die letzten vier Aminosäuren als zellzyklus-abhängige Phosphorylierungs-Stelle erkannt worden.

Um zu überprüfen in wie weit Abbau und Stabilisierung von AN für die Morphogenese wichtig sind, wurden drei verschiedenen Konstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors hergestellt und in *Ler* und *an*-mutante Pflanzen transformiert.

Eine Deletion der PEST-Sequenz, einschließlich der Phosphorylierungs-Stelle (Aminosäure 328-361), hatte auf *Ler*-Pflanzen keine Auswirkung. In *an* mutante Pflanzen transformiert zeigte sich, dass das Deletions-Protein allerdings die Potenz verloren hatte, den mutanten Phänotyp zu retten.

Im tierischen System ist gezeigt worden, dass die Phosphorylierung der PEST-Sequenz als Signal dient, das Protein für den Abbau frei zu geben. Eine Deletion der Phosphorylierungs-Stelle (Aminosäure 358-361) könnte das Protein also stabilisieren und sich auf den Phänotyp der Pflanze bzw. der Zelle auswirken. Das Konstrukt „35S:AN Δ P-site“ hatte im Wildtyp keine Auswirkung auf den Phänotyp, allerdings wurden an-mutante Pflanzen nicht vollständig gerettet.

Als drittes Konstrukt sollte überprüft werden, ob eine Deletion der PEST-Sequenz, wobei die Phosphorylierungs-Stelle nicht deletiert wurde (Aminosäure 328-358), einen Effekt zeigt. In Ler konnten keine transgenen Pflanzen erzeugt werden. Die Transformation in *an* mutante Pflanzen zeigte jedoch, dass dieses Konstrukt noch die Fähigkeit besitzt den mutanten Phänotyp zu retten.

Aus diesen drei Konstrukten lässt sich ableiten, dass die PEST-Sequenz für AN wahrscheinlich nicht wichtig ist. Wohingegen der putativen, zellzyklusabhängigen Phosphorylierungsstelle eine Schlüsselfunktion für ANGUSTIFOLIA zuzuordnen ist.

B 2.2.2.2. Kernlokalisierungs-Sequenz

Für den Aminosäure-Bereich 424-427 wird eine Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS) vorhergesagt (Folkers et al., 2002). Die Ergebnisse der transienten Expression in der Zwiebelepidermis (Folkers et al., 2002) und die Lokalisation von AN im Kern von Trichomen (Kim et al., 2002) deuten auf einen Transport in den Kern hin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *an*-mutanten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ungefähr 10 Gene stärker exprimiert werden, wohingegen kein Gen schwächer exprimiert wird (Kim et al., 2002). Die Deletion der NLS hatte aber keinen Effekt auf die Funktionalität des Proteins. Das NLS-Deletionskonstrukt (35S:AN Δ NLS) war in der Lage den mutanten Phänotyp zu retten. Die errechnete Wahrscheinlichkeit von PSORT, dass AN über die NLS in den Kern transportiert wird ist sehr niedrig und lag bei 0,3. Für die meisten Proteine, von denen bekannt ist, dass sie über dieses Motiv in den Kern transportiert werden, liegt der errechnete Wert bei 0,9 (Doktorarbeit U. Folkers). Es ist somit denkbar, dass AN, falls es im Kern lokalisiert, nicht über die vorhergesagte NLS in den Kern gelangt, sondern über einen anderen Mechanismus.

B 2.2.2.3. SUMOylierungs-Stelle

Die SUMOylierung eines Proteins erfolgt im Allgemeinen an einem Lysin das sich in der Konsensus-Sequenz ψ KxE befindet (ψ steht für eine aliphatische Aminosäure). In ANGUSTIFOLIA wurde beim Überprüfen der Sequenz eine SUMOylierungs-Stelle an der Aminosäure-Position 409-413 gefunden. Das SUMO-Deletionskonstrukt wurde unter der Kontrolle des 35S-Promotors in Ler und an Pflanzen transformiert. Im wildtypischen Hintergrund zeigte das Konstrukt keinen Effekt und in mutantem Hintergrund war es in der Lage den an-Phänotyp zu retten. Daraus lässt sich folgern, dass die SUMOylierungs-Stelle in ANGUSTIFOLIA funktionslos ist.

B 2.2.2.4. Retinoblastoma-Bindestelle

Bei der Suche nach bekannten Sequenzmotiven wurde in der ANGUSTIFOLIA Proteinsequenz das zur Retinoblastoma-Bindung nötige LXCXE-Motiv an der Aminosäureposition 26-30 gefunden. Das Deletionskonstrukt, dem die fünf Aminosäuren, die zur Rb-Bindung benötigt werden, fehlen, wurde unter der Kontrolle des 35S-Promotors in Ler und an mutante Pflanzen transformiert.

In *an* Pflanzen zeigte das Konstrukt in der T1 Generation keine Rettung, allerdings war die Population an T1 Pflanzen sehr niedrig. Die Analyse des Konstruktes in *Ler* Pflanzen führte bei 70% der erhaltenen T1 Pflanzen zu einem *an* Phänotyp. Diese Linien wurden in der T2 Generation genauer untersucht. Die Linien, die in der T1 noch vollständig, von den Kotyledonen bis zu den Schoten, den *an* Phänotyp zeigten, waren in der T2 Generation nur noch bis zum zweiten Rosettenblatt phänotypisch *angustifolia*. Ab dem dritten Rosettenblatt stellte sich wieder ein wildtypisches Erscheinungsbild ein.

Dieses Phänomen lässt sich durch zwei mögliche Szenarien erklären. Zum einen könnte der mutante Phänotyp durch Co-Suppression erklärt werden, allerdings dürfte dann in der T2 Generation ab dem dritten Rosettenblatt nur noch das Transgen ausgeschaltet sein. Wenn es sich um diese Möglichkeit handeln sollte, ist in den Kotyledonen und den ersten beiden Blättern weder endogenes noch transgenes Transkript nachzuweisen.

Die andere Möglichkeit besteht darin, dass es sich bei diesem Deletionskonstrukt um ein dominant negatives Allel von ANGUSTIFOLIA handelt, das dann allerdings in der zweiten

Generation ab dem dritten echten Blatt ausgeschaltet wird. Bei dieser Möglichkeit wird sowohl das endogene als auch das transgene Transkript in den Kotyledonen und den ersten beiden Blättern nachzuweisen sein.

Um zu testen um welche dieser beiden Szenarien es sich handelt wurde die Expression mittels RT-PCR getestet. Dazu wurden von Landsberg und den transgenen Landsberg Pflanzen aus den ersten beiden Blättern die RNA isoliert. Um sicher zu stellen, dass die zur RT-PCR eingesetzten cDNA-Mengen identisch sind wird zur Kontrolle die ubiquitär exprimierte EF1 cDNA amplifiziert (Liboz et al., 1990). Da es nur um die Frage ging, ob AN exprimiert ist oder nicht, und nicht zwischen endogenem und transgenem Transkript unterschieden werden sollte, wurden für die RT-PCR sequenzspezifische Primer genommen. Nach 45 Zyklen war sowohl in Ler als auch in Ler 35S:AN del Rb das Transkript sichtbar. Wird für eine RT-PCR für AN der gesamte Keimling eingesetzt ist das Transkript schon nach 38 PCR-Zyklen nachweisbar. Die Expressionsanalysen von AN haben gezeigt, dass AN in sehr jungen Blättern stark exprimiert wird. Sobald die Zellen der Blätter ihre Teilungsfähigkeit verloren haben und nur noch Zellwachstum stattfindet wird die Expression immer schwächer (Abbildung 10). Daher ist es also nicht verwunderlich, dass so viele Zyklen nötig sind AN in Ler nachzuweisen. Der 35S-Promotor, der das Deletionskonstrukt treibt sollte allerdings auch in diesem Blattstadium das Deletionsprotein stark exprimieren, ist aber auch erst nach 45 Zyklen nachzuweisen. Wenn es sich also um ein dominant negatives Allel handeln würde, müssten die Pflanzen mit dem 35S:AN Δ Rb-Konstrukt eine deutlich stärkere Bande liefern. Die RT-PCR lieferte somit den ersten Hinweis darauf, dass es sich um Co-Suppression handelt.

Abbildung 14: RT-PCR von ANGUSTIFOLIA

In Reihe eins sind die PCR-Produkte aus Ler-Pflanzen aufgetragen, in Reihe zwei die aus Ler 35S:AN Δ Rb Pflanzen



Einen weiteren Hinweis, dass es sich um Co-Suppression handeln könnte, und nicht nur die Stabilität des Transgens beeinflusst ist, lieferten Pflanzen die das Konstrukt 35S:YFP:AN Δ RB

trugen. Mit diesem Konstrukt wurden wildtypische Pflanzen und *an*-mutante Pflanzen transformiert. Von 40 analysierten Ler Pflanzen der T1-Generation, die dieses Konstrukt trugen, waren 50 % phänotypisch *an*, die anderen 50 % wildtypisch. Mit diesem Konstrukt erwies sich der mutante Phänotyp als stabil. Jeweils zwei Linien mit *an*-Phänotyp und wildtypischem Phänotyp wurden auf Fluoreszenz analysiert. Die Linien, mit *an*-Phänotyp, zeigten kein YFP-Signal, im Gegensatz zu den wildtypischen Linien, die ein sehr deutliches Signal zeigten. Auch die transformierten *an*-mutanten Pflanzen entsprachen diesem Ergebnis. 50% der Pflanzen ließen sich durch dieses Konstrukt retten. Die geretteten Linien zeigten auch ein sehr deutliches Fluoreszenz- Signal, die anderen 50 % wurden nicht gerettet und zeigten auch kein YFP-Signal.

B 2.2.2.5. Ändert sich die intrazelluläre Lokalisation von AN durch die Deletion der Rb-Bindungsstelle?

Die Lokalisation des Rb-Deletionskonstruktes unterscheidet sich von der des wildtypischen 35S:Konstruktes. In Abbildung 15 (A-C) sind Epidermiszellen desselben Stadiums wie in Abbildung 10 (E-G) zusehen. Das Konstrukt 35S:YFP:AN zeigt eine deutliche Lokalisation in den Auswölbungen der Epidermiszellen (Abbildung 10 E-G), wohingegen das Rb-Deletionskonstrukt 35S:YFP:AN Δ Rb zu einer filamentösen Struktur, die mit Vesikeln behaftet ist kolokalisiert (Abbildung 15 D-F). Dabei könnte es sich um eine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat handeln.

35S:YFP:AN Δ Rb ist zwar in der Lage den mutanten Phänotyp zu komplementieren, weist aber eine veränderte Lokalisation des Proteins und eine hohe Rate an Co-Suppression auf, die nie bei anderen AN-Konstrukten beobachtet wurde.

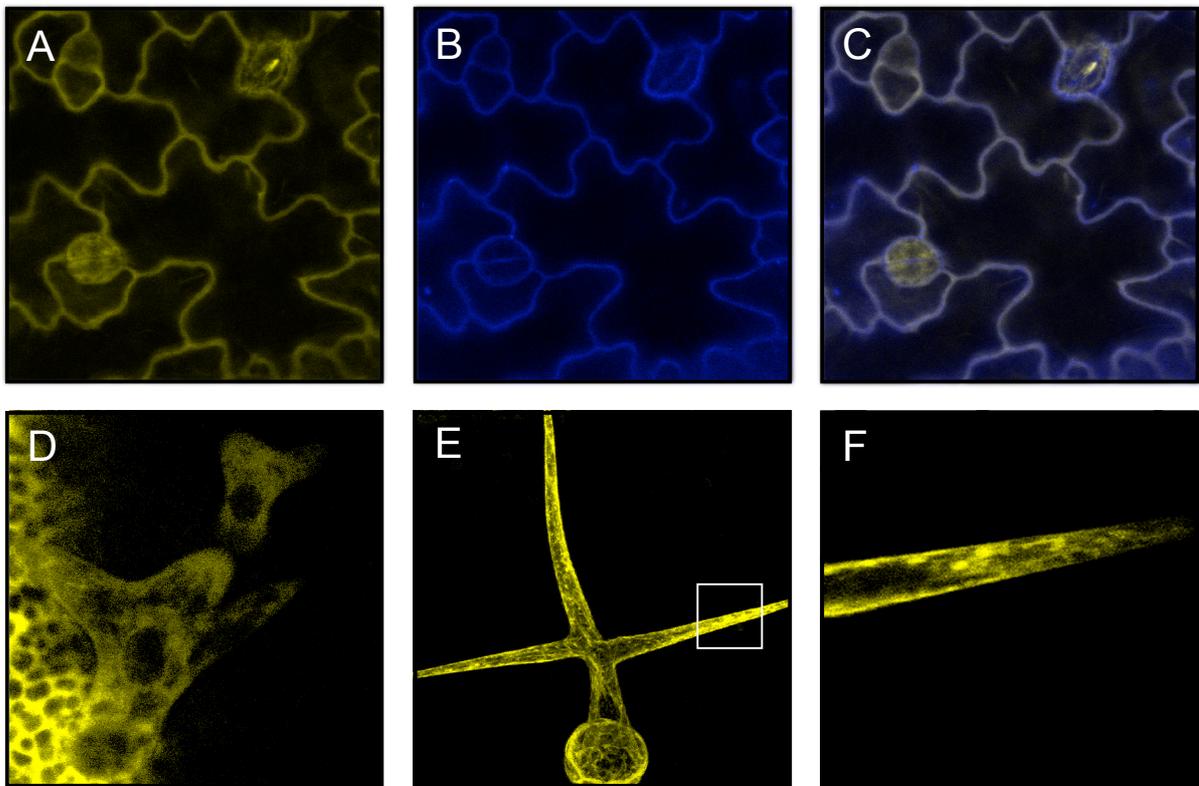


Abbildung 15: Intrazelluläre Lokalisation von ANΔRb unter der Kontrolle des 35S-Promotors

(A): Die Epidermiszellen haben ihre polare Lokalisation in den Auswölbungen durch die Deletion verloren

(B): Propidiumjodid-Färbung der Epidermiszellen

(C): Überlagerung von A und B

(D): junges Trichom, der Zellkern ist deutlich als nicht gefärbte Struktur zu erkennen

(E): adultes Trichom, die Lokalisation ist filamentös

(F): vergrößerter Ausschnitt aus E, die filamentöse Struktur ist mit fluoreszierenden Vesikeln behaftet

(D) und (E) sind Projektionen, die restlichen Bilder einzelne Schnitte

B 2.3. Hefe Zwei-Hybrid Analysen von AN

B 2.3.1. Wirkt AN auf dieselbe Art und Weise wie CtBP?

CtBPs aus Ratte wurden 1995 als Interaktoren einer C-terminalen Domäne des Adenoviruses E1A entdeckt (Schaeper et al., 1995). Nibu et al. zeigten drei Jahre später (Nibu et al., 1998), dass dasselbe Motiv (PXDLSEXK), über das in Säugern die Interaktion zwischen CtBP und dem E1A Protein, in *Drosophila* bei den Repressoren, Knirps Krüppel und Snail, essentiell für deren Interaktion mit dCtBP ist.

Da ANGUSTIFOLIA eine hohe Sequenzhomologie zu CtBP aufweist sollte überprüft werden, ob AN ebenfalls mit Knirps und Krüppel interagieren kann.

Dazu wurden Hefezellen mit den Konstrukten pAS AN und pGAD T7 Krüppel bzw. pAS AN und pGAD T7 Knirps kotransformiert. Zur Kontrolle wurde pAS dCtBP auch mit Knirps bzw. Krüppel transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Leucin/Tryptophan Mangelmedien ausgestrichen und dann auf Interaktionsplatten (L-/W-/H- 3mM 3-Amoniumtriazol) umgeimpft. Die Zellen die mit CtBP und Kni bzw. Krüppel transformiert wurden waren in Lage auf dem Interaktionsmedium zu wachsen, während die Zellen die mit AN und Knirps bzw. Krüppel transformiert waren nicht wachsen konnten (Abbildung 16 A).

Die Interaktionsdomäne (PXDLSEXK) von CtBP kommt im Arabidopsis-Genom in neun Proteine vor: At1g32010 (hypothetisches Protein mit Ähnlichkeiten zur schweren Myosinkette), At2g18700 (putative Trehalose-6-phosphat Synthase), At2g41070 (putativer bZIP Transkriptionsfaktor), At2g41790 (putative Zinkprotease), At3g54070 (putativer Vorläufer des Delta-Latroinsectotoxin Proteins), At3g54750 (putatives Protein), At3g56850 (ABA-Antwort-Element Bindungsprotein 3), At5g13500 (putatives Protein) und At5g35000 (putatives Protein). Von vier Genen (At2g41070, At3g54750, At3g56850 und At5g13500) waren bei RIKEN Vollängen cDNAs verfügbar. Diese wurden in pACT kloniert und mit ANGUSTIFOLIA in Hefe kotransformiert. Es konnte keine Interaktion festgestellt werden (die Klonierungen und die Zwei-Hybrids wurden von Cho-Chun Huang im Rahmen eines Rotations-Praktikums durchgeführt).

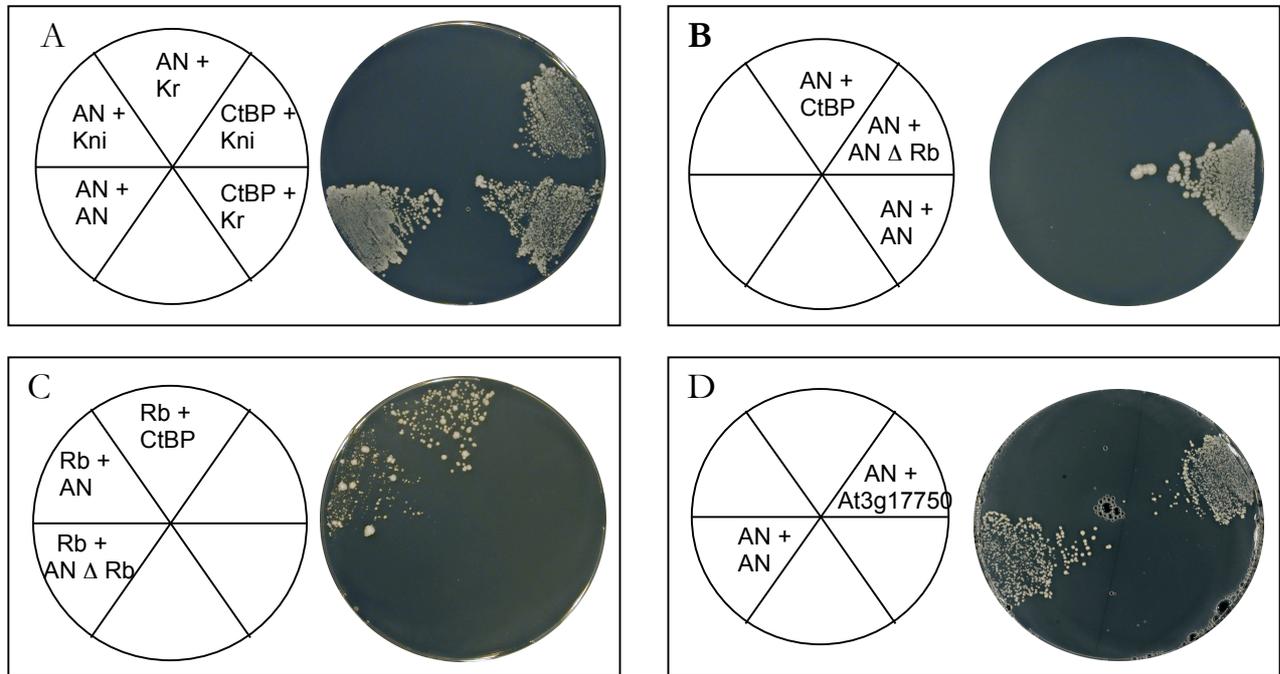


Abbildung 16: Zwei-Hybrid Analysen

(A): Interaktion zwischen dCtBP und knirps und krüppel, AN zeigt keine Interaktion, als positiv Kontrolle diente die Homodimerisierung

(B): AN bildet mit dCtBP kein Heterodimer und interagiert nicht mehr mit sich selbst, wenn die Rb-Bindungsstelle fehlt (AN+AN als positiv Kontrolle)

(C): AtRBR1 interagiert mit AN und CtBP, nicht aber mit dem Rb-Deletionskonstrukt

(D): AN interagiert mit einer putativen zellzyklusabhängigen Serin/Threonin Kinase

B 2.3.2. AN und CtBP bilden Homodimere, gibt es auch Heterodimere?

CtBP aus Drosophila (dCtBP; Poortinga et al., 1998) und aus Maus (mCtBP; Turner und Crossley, 1998) bilden Homodimere aus. Auch für AN ist gezeigt worden, dass es zur Selbst-Assoziation (Kim et al., 2002) in der Lage ist. Da CtBP aus Drosophila die Kompetenz hat *an* mutante Pflanzen zu retten sollte die Dimerisierung von AN und CtBP überprüft werden.

Als Köder wurde AN mit der Beute CtBP transformiert. Als Kontrolle dienten AN und CtBP, die jeweils als Köder- und Beute-Konstrukt zusammen transformiert wurden. Die Kontrollen bestätigten das Ergebnis der Homodimerisierung, eine Heterodimerisierung zwischen AN und CtBP konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 15 B).

B 2.3.3. Die Rb-Deletions-Version von AN dimerisiert nicht mit der wildtypischen Version

Die Transformation des oben beschriebenen Deletionskonstruktes ohne die Retinoblastoma Bindungsstelle hat ergeben, dass diese Version von AN nicht in der Lage ist *an* mutante Pflanzen zu retten und in Wildtyp transformiert den *an* Phänotyp hervorruft. Da AN sehr stark mit sich selber interagiert wurde überprüft, ob AN auch in der Lage ist mit AN Δ Rb Bindungsstelle zu interagieren. Das ist jedoch nicht der Fall, diese beiden Konstrukte kotransformiert führen zu keinem Wachstum auf Interaktionsplatten. D.h., dass der N-Terminus für die Dimerisierung notwendig ist.

B 2.3.4. AN interagiert mit AtRBR1

Beim Durchsuchen einer cDNA Bibliothek unter zu Hilfenahme des Hefe Zwei-Hybrids für das Retinoblastoma Protein ist ein Protein gefunden worden das als CtIP bekannt ist (Meloni et al., 1999). CtIP wurde in einem früheren screen schon als Interaktor von CtBP identifiziert (Schaeper et al., 1995). D.h. dass CtBP, das selbst keine Rb-binding site besitzt, über das Brückenprotein CtIP Retinoblastoma bindet und über diesen Komplex den E2F-Weg regulieren könnte (Meloni et al., 1999). Im Genom von *Arabidopsis* konnte kein homologes Protein zu CtIP gefunden werden.

Da AN eine Rb-Bindungsstelle aufweist wurde getestet, ob AN mit Retinoblastoma aus *Arabidopsis* interagieren kann. Eine verkürzte Version von Retinoblastoma, die die Rb-Boxen A und B enthält wurde mit AN in Hefe kotransformiert und auf Interaktionsplatten ausgestrichen. Den Platten wurde der Histidin-Inhibitor 3-Aminotriazol in den Konzentrationen 3 mM, 5 mM und 10 mM zugegeben. Im Gegensatz zu starken Interaktionen, die auch auf hohen Konzentrationen des Inhibitors wachsen, konnte hier nur

ein Wachstum bei 3 mM des Inhibitors beobachtet werden, was auf eine schwache Interaktion schließen lässt (Abbildung 15 C).

Retinoblastoma und RbIPs können über das LXCXE-Motiv interagieren. Es gibt aber auch Beispiele für LXCXE unabhängige Interaktionen. Läuft bei AN die Interaktion über dieses Motiv ab? Transformiert man AtRbR zusammen mit AN Δ Rb-binding site ist auf den Interaktionsplatten kein Hefewachstum möglich. D.h., dass die Interaktion von dem LXCXE-Motiv abhängig ist.

Da das homologe Protein von CtBP aus Arabidopsis ANGUSTIFOLIA mit dem pflanzlichen Retinoblastoma interagieren kann, wäre es möglich, dass CtBP mit Rb aus Arabidopsis interagiert. Die verkürzte Rb-Version aus Arabidopsis wurde mit CtBP aus Drosophila zusammen transformiert. Das Wachstum der doppelt transformierten Hefen entsprach dem der mit AN und RB transformierten. Damit konnte gezeigt werden, dass das Drosophila-Protein auf die gleiche Art und Weise reagiert wie sein pflanzliches Homolog, auch wenn es keine Rb-Bindungsstelle besitzt. Vielleicht handelt es sich in diesem Fall dann um eine LXCXE-Motiv unabhängige Interaktion.

B 2.3.5. Das pflanzliche Retinoblastoma Protein kann die Homodimerisierung von AN kompetitiv stören

Da ANGUSTIFOLIA mit AtRBR1 interagiert und die Dimerisierung von AN von der Rb Bindungsstelle abhängig ist kann es sein, dass Rb mit AN um die Bindung konkurriert. Um das zu überprüfen wurde ein Three Hybrid durchgeführt. Als Köder und Beute wurden die Konstrukte eingesetzt mit denen ich die Homodimerisierung überprüft habe. Zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten wurde ein drittes Konstrukt mit RRB (pVT102U RRB) transformiert. Die beiden Transformationen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Ansätze auf Selektions- und Interaktionsmedium ausgestrichen. Auf den Selektionsplatten zeigten sich zwischen Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid keine Wachstumsverzögerungen. Beim Vergleich der Interaktionsplatten wuchsen die Kolonien des Drei-Hybrides mit einer Verzögerung von zwei Tagen an. Es hat also den Anschein, dass AN und Rb um die Dimerisierung konkurrieren. Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden von beiden Selektionsplatten Kolonien gepickt, auf die gleiche optische Dichte eingestellt und erneut auf

Interaktionsplatten ausgestrichen. Jedoch war jetzt kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit mehr festzustellen.

Das könnte daran liegen, dass es sich bei den drei verwendeten Vektoren, um 2 μ Plasmide handelt. Diese Plasmide werden von Hefezellen bis zu 100mal repliziert und dann statistisch auf die Tochterzellen vererbt. Bei der Transformation wurden von allen drei Plasmiden die gleichen Mengen eingesetzt, d.h. jede frisch transformierte Zelle hatte die gleichen Mengen an Köderplasmid mit AN, Beuteplasmid mit AN und Brückenplasmid mit RBR. Über die vielen Teilungszyklen, die die Hefen auf den Selektionsplatten durch gemacht haben, könnte sich das Brückenplasmid, das nur zum Wachstum auf Uracil-Mangelmedium benötigt wird, im Gegensatz zu den Köder- und Beuteplasmiden, die sowohl für die Selektion als auch für die Interaktion benötigt werden, in soweit ausgedünnt haben, dass es nach dem die Kolonien auf Interaktionsmedium umgepickt wurden, nicht mehr in der Lage ist die Dimerisierung von AN zu stören. Deshalb kann man wahrscheinlich davon ausgehen, dass Rb die Dimerisierung von AN stört. Um wirklich sicher zu stellen, dass Rb mit AN um die Dimerisierung mit AN konkurriert müssen Vektoren eingesetzt werden, deren Anzahl pro Zelle stabil ist.

Obwohl das Rb-Deletionskonstrukt *an*-mutante Pflanzen retten kann, scheint diese Stelle eine Schlüsselrolle bei der Funktion des Proteins zu spielen. Darauf deutet der hohe Prozentsatz an Co-Suppression, die veränderte Lokalisation, die Interaktion mit Rb, der Verlust der Homodimerisierung und die Konkurrenz, um die Interaktion hin.

B 2.3.6. Wird AN zellzyklusabhängig phosphoryliert?

Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass sich an Position 358-361 eine putative zellzyklusabhängige Phosphorylierungs-Stelle befindet. In unabhängigen Zwei-Hybrid Analysen wurden mehrere Male Fragmente des Genes At3g17750, aus verschiedenen cDNA Bibliotheken gefunden (Diplomarbeit S. Falk und Diplomarbeit M. Kübbeler). Dieses Gen kodiert für eine zellzyklusabhängige Serin/Threonin-Kinase. Da man auf Grund von Fragmenten nicht auf eine tatsächliche Interaktion zweier Proteine schließen kann wurde ein Volllängen-Konstrukt der cDNA von At3g17750 als Beuteprotein für den Zwei-Hybrid hergestellt. Die Ergebnisse der Diplomarbeiten konnten mit dem Volllängen-Konstrukt

bestätigt werden (Abbildung 15 D). Nimmt man die Ergebnisse der Sequenzanalyse und des Zwei-Hybrids zusammen kann man postulieren, dass AN phosphoryliert wird.

B 2.4. Wird ANGUSTIFOLIA posttranslational modifiziert?

BARS-Proteine sind durch ihre Eigenschaft der Ribosylierung identifiziert worden, außerdem wurde gezeigt, dass sie Lysophosphatylsäure-Acyltransferase (LPAAT)-Aktivität besitzen.

Um zu testen, ob ANGUSTIFOLIA die enzymatische Aktivität der BARS besitzt und ribosyliert werden kann wurde eine Histidin-markierte Version von AN unter einem IPTG induzierbaren Promotor in *E. coli* transformiert. Im Vergleich zur positiv Kontrolle (von Michael Eicks, AG Flügge freundlicherweise zur Verfügung gestellt) zeigten die Proben mit induziertem ANGUSTIFOLIA auf dem mit Coomassie gefärbten Gel keine sauberen Banden. Da schon nach 10 Minuten Induktionzeit die *E. coli* Zellen starben, wurden verschiedene Wachstumsbedingungen ausprobiert. So wurden die Zellen nach der Induktion nicht bei 37°C geschüttelt sondern bei 30°C, was eine verminderte Stoffwechselaktivität zur Folge hat und damit auch eine verminderte Produktion von rekombinantem AN-Protein. Bevor die Proteine extrahiert wurden, wurde über die OD geprüft, ob überhaupt Wachstum stattgefunden hat. Da sich die OD nicht erhöhte wurde die Temperatur immer weiter gesenkt bis auf 4°C. Da auch bei dieser Temperatur kein Wachstum nach der Induktion erzeugt werden konnte wurde das System gewechselt. Aber auch Hefen waren nicht in Lage höhere Konzentrationen von AN zu tolerieren.

Mittels eines In Vitro Translations Kits konnte AN exprimiert werden. Mit der erhaltenen Proteinmenge wurde der „LPAAT assay“ durchgeführt. Da der In Vitro Translations Kit ein Lysat aus gereinigtem Kaninchenblut ist, enthält er nicht nur alle notwendigen Komponenten zur Translation sondern auch noch andere Zellbestandteile, zu denen auch Membranbruchstücke gehören. LPAATransferasen sind Proteine die mit Membranen assoziiert sind. Die im Kit vorhandene Membranfraktion hatte wahrscheinlich die Aufgabe, die unter Umständen AN ausüben sollte, übernommen. AN von der Membranfraktion zu reinigen war nicht möglich, da die Ausbeute der In Vitro Translation zu gering ausfiel. Um ausreichende Mengen Protein zu erhalten wurden Pflanzen mit einer C-terminal 3x HA-markierten Version von AN transformiert.

Beim Nachweis der Proteine durch Antikörperfärbung war eine deutliche Verschiebung der Bande, die dem Pflanzenextrakt entstammte, zu erkennen. Das durch die *In Vitro* Translation gewonnene Protein hatte genau, die vorhergesagte Größe von 70 kDa. Das aus Pflanze extrahierte AN war ungefähr 15 kDa größer als errechnet (Abbildung 17). Dieser Unterschied ist nicht auf die HA-markierte Version, die aus Pflanze isoliert wurde zurückzuführen, da die verwendete HA-Markierung nur zusätzliche zwei kDa liefert.

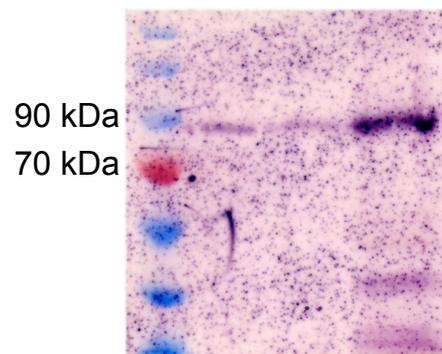


Abbildung 17: Westen blot Analyse von AN

In der ersten Reihe ist die Proteinleiter aufgetragen, in der zweiten die native Proteinisolation, in der dritten die unter Hochsalz-Bedingungen isolierte Protein-Fraktion. In der letzten Reihe wurden die restlichen Proteine unter denaturierenden Bedingungen von den Zellbruchstücken gelöst.

Diese Bandenverschiebung lässt sich durch mögliche Sekundär-Modifikationen des Proteins erklären. Das Vorhandensein einer PEST-Sequenz könnte auf einen Proteinabbau über Ubiquitinierung hindeuten, zumal Ubiquitin, mit einer Größe von 10 kDa, die Bandenverschiebung verursachen könnte, des Weiteren kann über Phosphorylierungen und Ribosylierungen spekuliert werden.

B 3. Diskussion

Die Formen von Pflanzenzellen, die durch die umgebenden Zellwände definiert sind, sind oftmals von Bedeutung für die Funktion der Zelle. Das Zytoskelett nimmt eine Schlüsselrolle bei der Determination der Form der Pflanzenzellen ein. Dies geschieht hauptsächlich über die Bereitstellung von Materialien, die für das Wachstum der Zelle gebraucht werden. Mittlerweile kennt man verschiedene Proteine, die die Form einer Zelle, über die Regulation der Organisation und Polymerisation der Filamente des Zytoskeletts, während des Wachstums steuern. Damit eine Pflanzenzelle ihre charakteristische Form annimmt müssen verschiedene Wachstumspunkte festgelegt werden. Über die Auswahl einer bestimmten Stelle, an der später Wachstum stattfinden soll, ist im Gegensatz zum eigentlichen Wachstum noch nichts bekannt.

Die Experimente die ich während meiner Doktorarbeit gemacht habe, könnten einen Schritt in die Richtung zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

B 3.1. Expression und Lokalisation

B 3.1.1. Die zeitliche Expression von AN korreliert mit der Zell- und Blattmorphogenese

Junge Blätter exprimieren über die gesamte Blattlamina AN. In ausdifferenzierten Blättern beschränkt sich die Aktivität des AN-Promotors auf das vaskuläre Gewebe. Blätter deren Zellen sich an der Basis noch teilen und an der Spitze differenziert sind, zeigen basal Aktivität, an der Spitze jedoch keine Aktivität des Promotors mehr, außer in Bereichen des Leitgewebes. Durch das Fusions-Konstrukt AN:YFP, das unter der Kontrolle des AN-Promotors exprimiert wurde, konnten die Expression des GUS-Reportergens bestätigt werden, da Fluoreszenz in den jungen Bereichen der Blätter nachgewiesen werden konnte. Die Expressionsanalyse zeigte, dass AN dann exprimiert wird, wenn bei Epidermiszellen die Auswölbungen gebildet werden und in Trichomzellen die Verzweigungen angelegt werden. In Zellen, deren Morphogenese-Programm abgeschlossen ist, konnte keine Expression von AN und kein Protein nachgewiesen werden.

B 3.1.2. Die Lokalisation von AN in der Zellperipherie deutet auf eine Rolle in der Regulation des lokalen Wachstums einer Zelle hin

Zellen, die sich neu geteilt haben, sind im Gegensatz zu ausgewachsenen Zellen nicht vollständig vakuolisiert. In diesen Zellen nimmt das Zytoplasma einen großen Teil des Volumens ein. Zytoplasmatische Proteine sind in diesem Zellstadium in der ganzen Zelle sichtbar. Die Lokalisation von AN beschränkt sich ausschließlich auf die Zellperipherie. Um zu unterscheiden, ob es sich bei AN um ein Zellwand- oder ein Plasmamembran-assoziiertes Protein handelt müsste man die Zellen plasmolysieren.

In frühen Stadien der Morphogenese von Epidermiszellen wachsen diese in alle Richtungen, später findet das Wachstum bevorzugt in den Auswölbungen statt. *an*-mutante Pflanzen weisen sich durch Epidermiszellen aus, deren Komplexität reduziert ist und somit ihre Puzzelstück-ähnliche Form nicht aufbauen können. Dieser Phänotyp ist auf das fehlende polare Auswachsen der Zellen zurückzuführen. Eine Lokalisation an dieser Stelle scheint somit nahe liegend zu sein. Nähere Analysen der Zellen, die konstitutiv das Fusionsprotein exprimieren, zeigten eine Lokalisation von AN in den Auswölbungen der Epidermiszellen, was in engem Zusammenhang mit dem mutantern Phänotyp steht.

Bei der Zellwand einer Pflanzenzelle handelt es sich um eine starre Struktur. Damit die Zelle sich ausdehnen kann, muss das starre Gebilde gelockert werden. Das geschieht unter anderem durch Ansäuerung der Zellwand (Stasburger, Lehrbuch der Botanik). Während meiner Diplomarbeit habe ich als weiteren Interaktor von AN ein als Plasmamembran-assoziiertes H^+ -ATPase annotiertes Protein gefunden (Diplomarbeit S. Falk). Es ist also durchaus denkbar, dass AN zusammen mit dieser H^+ -ATPase für die Lockerung der Zellwand zuständig ist und deshalb in frühen Zellstadien ubiquitär an der Zellwand lokalisiert ist und später durch die Überexpression sichtbar gemacht bevorzugt in wachstumsaktiven Regionen der Zelle zu finden ist.

B 3.2. ANGUSTIFOLIA hat Sequenzähnlichkeiten zu Dehydrogenasen und CtBP/BARS

B 3.2.1. Die Dehydrogenase-Aktivität wird für die Funktion von AN nicht gebraucht

Ob ANGUSTIFOLIA die enzymatische Aktivität einer Dehydrogenase aufweist ist weiterhin unklar. Sicher ist aber, dass diese Aktivität und besonders das konservierte Histidin für die korrekte Funktion des Proteins ohne Belang sind. Der Austausch der Aminosäure Histidin im aktiven Zentrum der Dehydrogenasen rettete *an* Mutanten vollständig.

CtBPs besitzen Dehydrogenase-Aktivität. Ob diese Aktivität von physiologischer Relevanz ist nicht klar. Wird das sich im aktiven Zentrum befindende Histidin durch ein Alanin ersetzt verliert das Protein diese Aktivität. Außerdem ist diese mutierte Version der CtBPs nicht mehr in der Lage mit E1A über das PXDLS-Motiv zu interagieren (Kumar et al., 2002; Zhang et al., 2002).

Die Interaktion zu Protein mit dem PXDLS-Motiv scheint für die Funktion von AN nicht von Relevanz zu sein, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass AN weder mit tierischen Vertretern, die dieses Motiv aufweisen interagiert (Knirps und Krüppel) noch mit pflanzlichen Vertretern, die ein solches Motiv aufweisen. Auch wurden beim Durchsuchen verschiedener cDNA-Bibliotheken in Zwei-Hybrid Tests (Diplomarbeit S. Falk, 2001; Diplomarbeit M. Kübbeler, 2004) keine Proteine identifiziert, die dieses Motiv aufwiesen.

B 3.2.2. dCtBP substituiert AN funktionell

Die Versuche zur Rettung *an*-mutanter Pflanzen durch das *Drosophila* Gen dCtBP bestätigten die Vermutung, das AN auch funktional zur Familie der CtBP/BARS gehört. In zwei unterschiedlichen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass dCtBP in der Lage ist den *an*-mutanten Phänotyp zu retten.

Diese Rettung verliert sich über die Generationen. Die T2 Generationen, die von geretteten *an* Pflanzen abstammten, weisen sowohl gerettete als auch nicht gerettete Pflanzen auf. In der T3 Generation war die Rettung völlig verschwunden. Diese nicht stabile Rettung ist vielleicht

auf die Dosis des CtBP-Proteins zurückzuführen, die ab einer kritischen Menge nicht mehr ausreicht, um die Funktion von AN zu übernehmen

Im Gegensatz dazu war die Fusion von dCtBP mit dem N- und C-Terminus von AN über verschiedene Generationen stabil. Daraus lässt sich schließen, dass entweder der N- oder der C-Terminus oder beide Termini Elemente enthalten müssen, die für die Funktion von AN von essentieller Bedeutung sind. Das Fusions-Konstrukt AN:CtBP:AN bietet die ideale Voraussetzung die Teile des Proteins zu identifizieren die AN funktionell von den restlichen Mitgliedern der CtBP/BARS-Familie unterscheidet. Auch die Lokalisation von AN an der Zellperipherie steht im Gegensatz zur Lokalisation der CtBP/BARS, die cytoplasmatisch und im Kern lokalisiert sind. Diese andere Lokalisation von AN legt nahe, dass die pflanzlichen Vertreter dieser Proteinfamilie nicht nur CtBP/BARS Funktion übernehmen.

B 3.3. Funktionalität der verschiedenen AN-Protein Domänen

AN und die Familie der CtBP/BARS weisen nicht nur Sequenzähnlichkeiten auf. Übereinstimmungen wurden auch in Bezug auf die Funktion des Proteins gefunden. So zeichnen sich beide Proteine durch Homodimerisierung aus (Folkers et al., 2002; Kim et al., 2002). CtBPs werden SUMOyliert (Lin et al., 2003), interagieren über ein Brückenprotein mit Rb (Meloni et al., 1999) und werden zellzyklusabhängig phosphoryliert (Schaeper et al., 1995). All diese Eigenschaften der CtBPs konnten in AN als Motive nachgewiesen werden. Außerdem enthält die Proteinsequenz von AN ein Kernlokalisationsmotiv und eine PEST-Sequenz.

Zur Untersuchung der Funktionalität der einzelnen Motive wurden Deletionskonstrukte angefertigt und unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert.

Da zu Beginn meiner Arbeit nur eine Version des AN-Promotors vorlag, der mit AN fusioniert nicht zu einer vollständigen Rettung des Trichomphänotyps führte (Doktorarbeit U. Folkers 2001) wurden die Deletionskonstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotor erstellt.

B 3.3.1. Die Lokalisierung von AN macht eine Funktion als CtBP unwahrscheinlich

Die gefundenen NLS könnte darauf hindeuten, dass AN im Kern lokalisiert ist. Die Ergebnisse der Deletion der NLS legen nahe, dass diese Deletion keine Auswirkungen auf die Funktion des Proteins hat. *an*-mutante Pflanzen ließen sich durch dieses Deletionskonstrukt retten. Diese Daten entsprechen auch den Daten der intrazellulären Lokalisation. Die in dieser Arbeit erstellten Konstrukte 35S:YFP:AN und pAN:AN:YFP zeigten in Arabidopsis keine Kernlokalisation und waren in der Lage *an* mutante Pflanzen zu retten.

Mit einer verwendeten GFP:AN Fusion unter der Kontrolle des 35S-Promotors konnte AN, wenn dieses transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert wurde, im Kern nachgewiesen werden (Folkers et al., 2002). Kim et al zeigte, mit einem anderen AN:GFP Fusionskonstrukt, sowohl in Zwiebelepidermiszellen als auch Trichomen eine Kernlokalisation (Kim et al., 2002). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Rolle von AN als CtBP hin. Jedoch wurden die Konstrukte nur transient exprimiert und somit keine Rettung gezeigt. Außerdem kann durch die transienten Expressionen durch Schießen die DNA zerbrechen, was als Konsequenz freies GFP zur Folge hätte und dann frei in den Kern diffundieren kann.

Meine Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die Hauptfunktion von AN außerhalb des Kerns liegt, was der erste Hinweis darauf ist, dass AN funktionell den BARS zuzuordnen ist.

B 3.3.2. AN wird nicht SUMOyliert

Für CtBP1 aus Säugern konnte gezeigt werden, dass es SUMOyliert wird und dass die SUMOylierung sowohl für die Lokalisation im Kern als auch für die Aktivität als Corepressor eine große Rolle spielt. Dem homologen Protein CtBP2 fehlt diese SUMOylierungs-Stelle und es wird auch nicht durch SUMO modifiziert (Lin et al., 2003).

AN scheint wie CtBP2 nicht SUMOyliert zu werden, da sich die Deletion der SUMOylierungs-Stelle nicht auf die Funktion von AN auswirkte. *an* mutante Pflanzen wurden durch das Deletionskonstrukt gerettet.

Dass AN nicht SUMOyliert wird ist der zweite Hinweis darauf, dass AN funktionell den BARS und nicht den CtBPs zuzuordnen ist.

B 3.3.3. AN interagiert mit dem Retinoblastoma-Protein?

Die Analyse der Retinoblastoma Bindungsstelle könnte einen Hinweis auf die Wirkungsweise von AN liefern. Das Deletionskonstrukt, mit YFP fusioniert, ist auf der einen Seite in der Lage den mutanten Phänotyp zu retten, auf der anderen Seite zeichnet sich dieses Konstrukt, mit oder ohne YFP-Fusion, dadurch aus, dass in wildtypischem Hintergrund ca. 50% der Pflanzen den *an*-mutanten Phänotyp ausweisen. Genauere Analysen dieser Linien zeigten, dass es sich um Co-Suppression handeln muss.

Die Zwei-Hybrid Experimente zeigten, dass AN mit Retinoblastoma interagiert und Rb wahrscheinlich die Homodimerisierung von AN stört. Dieses Experiment wurde mit Vektoren durchgeführt, die in Hefezellen in unterschiedlichen Anzahlen vorliegen. Aufgrund dessen könnte es sein, dass das RRB-Plasmid, auf dem nur ein Selektionsdruck lastet, im Verhältnis zu den beiden AN-Plasmiden, auf denen zwei Selektionsdrücke lasten, verdünnt wird und so die Interaktion nur gering stören kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Rb-Deletionsprotein nicht mehr mit dem Volllängenprotein interagieren kann.

Ist für die Funktion von AN die Dimerisierung oder die Interaktion mit Rb von Bedeutung? AN Δ Rb hat mit der Deletion seine Interaktionsdomäne zu Rb verloren, ist aber nach wie vor in der Lage *an* zu retten, daraus kann man schließen, dass die Interaktion mit Rb keine allzu große Rolle spielen kann.

Dass dieses Deletionsprotein kein Homodimer mehr ausbilden kann, scheint für die Funktion von AN allerdings von Bedeutung zu sein, da z.B. der Protein-Stabilität verändert ist, was aus den YFP-Daten hervorgeht.

B 3.3.4. Wird AN phosphoryliert?

Durch die Deletion der gefundenen Zellzyklus-abhängigen Phosphorylierungs-Stelle konnte gezeigt werden, dass diese Motiv für die Funktion von AN von Relevanz ist. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass AN mit einer Serin/Threonin Proteinkinase interagiert. Aus diesen beiden Ergebnissen lässt sich schließen, dass AN höchst wahrscheinlich phosphoryliert wird.

Die Serin/Threonin Proteinkinase Pak1 interagiert mit CtBP in menschlichen Zellen und beeinflusst sowohl die Funktion von CtBP als Co-Repressor als auch die enzymatischen Eigenschaften des Proteins (Barnes et al., 2003).

Es konnte noch kein Phosphorylierungsexperiment durchgeführt werden, weil AN sich unter den gegebenen Bedingungen nicht rekombinant exprimieren ließ. Durch die etablierten Pflanzenlinien, aus denen sich AN reinigen lässt, ist jetzt die Möglichkeit geschaffen über MALDI-TOF eine Phosphorylierung des Proteins nachzuweisen.

B 3.4. Ist ANGUSTIFOLIA ein transkriptioneller Corepressor oder übernimmt es die BARS-Funktion?

In Vertebraten gibt es drei CtBPs. CtBP1 und CtBP2 übernehmen die Aufgabe transkriptioneller Corepressoren.

CtBP3/BARS scheinen das Gleichgewicht zwischen tubulären und gestapelten Golgi-Apparat zu kontrollieren (Spanfo et al., 1999; Science Paper 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sie die Reaktion von Lysophosphatylsäuren zu Phosphatylsäuren katalysieren, was eine Krümmung der Membran und letztlich eine Abschnürung von Vesikeln zur Folge hat (Weigert et al., 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CtBP3/BARS für die Abschnürung der Golgi-Membranen während der Mitose verantwortlich und darüber hinaus für den G2-Prophase Übergang des Zellzyklus notwendig ist und damit auch für die Zellteilung (Carcedo et al., 2004).

Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen CtBPs (Turner und Crossley, 2001) ergaben, dass es sich bei CtBP3/BARS um eine N-terminal verkürzte Version von CtBP1 handeln könnte.

Die Proteine dieser Familie sind in ihrer Funktion sehr unterschiedlich. Die an der transkriptionellen Corepression beteiligten Gene haben ihren Wirkungsort im Zellkern, wohingegen BARS im Zytoplasma an der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur beteiligt sind. Da BARS aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zur Familie der CtBPs gehören überprüften Spanfo et al. (1999), ob CtBPs und BARS austauschbar sind. hCtBP1 und mCtBP2 konnten, durch Brefeldin A Behandlung, ADP-ribosyliert werden, was bedeutet, dass die CtBP1 und CtBP2 BARS sind. Da AN das erste bekannte pflanzliche Protein ist, das Homologien zur CtBP/BARS-Familie aufweist und auch keine weiteren Homologen in Arabidopsis annotiert

sind, könnte es sein, dass AN funktionell dieser Proteinfamilie zuzuordnen ist. Obwohl die Sequenzidentität zwischen AN und den CtBP/BARS nur 35% beträgt, reicht diese Übereinstimmung aus um AN dieser Protein-Familie zuzuordnen, da das homologe Protein aus *Drosophila* den *an*-mutanten Phänotyp retten kann und damit alle von dem Protein in Pflanze geforderten Aufgaben. Da CtBPs aber auch BARS-Funktion übernehmen reicht dieses Experiment nicht aus die Frage zu klären, ob AN die Rolle der CtBPs, der BARS, beide Rollen zugleich oder vielleicht doch eine völlig neue unbekannte Funktion übernimmt. Das Deletionskonstrukt AN Δ Rb könnte Hinweise über die Aufgabe von ANGUSTIFOLIA liefern.

Das Rb-Deletions-YFP-Fusionsprotein, weist eine veränderte intrazelluläre Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf. Diese veränderten Lokalisation des Rb-Deletions-Konstruktes könnte einen direkteren Hinweis auf die Funktion von AN als BARS liefern. Die Rb-Deletion-YFP-Fusion kolokalisiert mit einer filamentösen Struktur, die mit Vesikel behaftet ist. Dabei könnte es sich um das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi Apparat handeln, also den Ort in der Zelle wo die BARS ihren Einsatzort haben. Wenn das wildtypische AN die Funktion der BARS in Pflanzen übernimmt, sollte man auch die wildtypische AN-YFP-Fusion in solch einer filamentösen Struktur lokalisiert sehen. Da das nicht der Fall ist, bleibt zu untersuchen, ob sich das wildtypische Protein nur zu einer bestimmten Phase des Zellzyklus, mit dieser Struktur kolokalisiert und während des Zellwachstums eine andere Aufgabe übernimmt.

Um letztlich ganz zu unterscheiden, ob AN BARS- oder CtBP-Aktivität besitzt muss überprüft werden, ob das Rb-Deletionsprotein tatsächlich mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert. Außerdem würde man erwarten, dass der Golgi-Apparat eine veränderte Ultra-Struktur in *an*-mutanten Pflanzen aufweist

Ein weiteres Experiment zur Untersuchung der CtBP-Aktivität wäre, ob eine Fusion von AN mit einer starken NLS noch retten kann.

B 3.5. Wird AN posttranslational modifiziert?

Die vorhergesagte Größe von AN beträgt 70 kDA. Diese vorbestimmte Größe des Proteins konnte durch die In Vitro Translation bestätigt werden. Wird das Protein aus Arabidopsis

isoliert weist es eine Größe von 85 - 90 kDa auf. Dieser Größenunterschied könnte auf Ubiquitinierung und andere sekundär Modifikationen des Proteins hindeuten.

Proteine mit PEST-Sequenzen werden nach der Phosphorylierung, einer an deren C-terminalen Ende befindlichen Phosphorylierungsstelle, ubiquitiniert und somit dem Proteinabbau über das 26S-Proteasom zugeführt (Rechsteiner M and Rogers WR, 1996).

Mit den Deletionskonstrukte AN Δ PEST Δ P-site, AN Δ PEST und AN Δ P-site sollte überprüft werden, ob ein möglicher Abbau des Proteins über PEST-Sequenz stattfindet und ob die Regulation über die Phosphorylierungsstelle läuft. Die aus diesen Konstrukten resultierenden Rettung ergaben, dass AN nicht über die PEST-Sequenz abgebaut wird, die Phosphorylierungsstelle aber für das Protein wichtig ist. Beide Deletionsproteine, denen die Phosphorylierungsstelle fehlt können *an* nicht mehr retten.

Unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors konnte die Lokalisation von AN auch in Zellen deren Morphogenese abgeschlossen, ist analysiert werden. Die Überexpression des Proteins führt zu einer nicht erklärbaren singulären Struktur, die nicht mit dem Zellkern assoziiert ist. Bei dieser Struktur könnte es sich um Protein-Aggregate handeln, die so für den Abbau bereitgestellt werden. Dass Proteine akkumulieren ist z.B. für Phytochrom A gezeigt worden. Allerdings waren es im Fall des Phy A mehrere Akkumulationen unterschiedlicher Größe pro Zelle. Bei AN könnte es sich um eine veränderte Version der Akkumulation handeln.

Die Deletion der sich im N-Terminus befindenden Rb-Bindungsstelle führt nicht zur Bildung dieser singulären Struktur. Aber die mit 35S:YFP:AN Δ Rb transformierten Pflanzen, die Fluoreszenz zeigten, zeichneten sich durch eine viel stärkere Fluoreszenz aus im Vergleich zu Pflanzen, die mit 35S:YFP:AN transformiert wurden. Da es sich bei den beiden Konstrukten, um dieselben Vektoren handelt, die sich nur durch die Deletion der fünf Aminosäuren der Rb-Bindungsstelle unterscheiden, kann man die Fluoreszenzunterschiede quantitativ bewerten. Aus dieser intensiveren Fluoreszenz lässt sich ableiten, dass der Proteinabbau bei diesem Allel von AN vielleicht nicht mehr reguliert ist. Vielleicht wird eine der zwei sich im N-Terminus befindenden Lysin-Reste im wildtypischen Protein ubiquitiniert und ist durch die Modifikation des N-Terminus nicht mehr zugänglich.

Um zu testen, ob die regulatorischen Elemente für einen möglichen Abbau über Ubiquitin im N-terminalen Bereich des Proteins liegen und durch die Deletion der Rb-Bindungsstelle nicht

mehr zur Verfügung stehen müsste man überprüfen, ob das Deletionsprotein mit 3xHA-Tag fusioniert eine Größe von 85 – 90 kDa aufweist oder der Größe des In Vitro Translatates von 70 kDa entspricht. Außerdem müsste man die RNA-Menge und Protein-Menge von wildtypischem AN mit den Mengen des Rb-Deletionkonstruktes vergleichen, wobei die RNA-Menge die gleiche sein sollte, während sich die Protein-Menge unterscheiden sollte, wenn der Abbau des Rb-Deletionskonstruktes gestört ist.

B 3.6. Model zur Funktion von AN

Zusammenfassend kann man sagen, dass AN funktionell eher den BARS zuzuordnen ist als den transkriptionellen Corepressoren. Das für das Zellwachstum benötigte Material wird unter anderem durch Vesikelabschnürung vom Golgi-Apparat bereitgestellt. Wenn AN in pflanzlichen Zellen, die Aufgabe der BARS übernimmt, könnte AN auch LPAAT-Aktivität aufweisen. Über eine ähnlich ablaufende Reaktion könnte AN aber auch ROPs in der Membran verankern, um damit den Ort des lokalen Zellwachstums zu fixieren. ROPs enthalten bestimmte Motive, die von Enzymen erkannt werden, die Fettsäuren übertragen (Zheng und Yang, 2000; Li et al., 2001). Wenn AN die enzymatische Aktivität besitzt AcylCoA auf Lysophosphatylsäuren zu übertragen, ist es durchaus denkbar, dass AN auch, oder auch nur, die enzymatische Aktivität aufweist, ROPs mit Fettsäuren zu modifizieren und somit in der Membran zu verankern.

Über weitere Funktionen des pflanzlichen Vertreters der Protein-Familie der CtBP/BARS, die sich von den tierischen Homologen, unterscheiden, kann man aufgrund der möglichen Lokalisation an der Plasmamembran, bzw. Zellwand spekulieren. Das an der Zellwand ubiquitär lokalisierte AN Protein und die Interaktion mit einem als Plasmamembran gebundenen Protonen ATPase annotiertem Protein, führen zu der Schlussfolgerung, dass AN auch am Zellwachstum über die Ansäuerung der Zellwand beteiligt sein könnte (Abbildung 17).

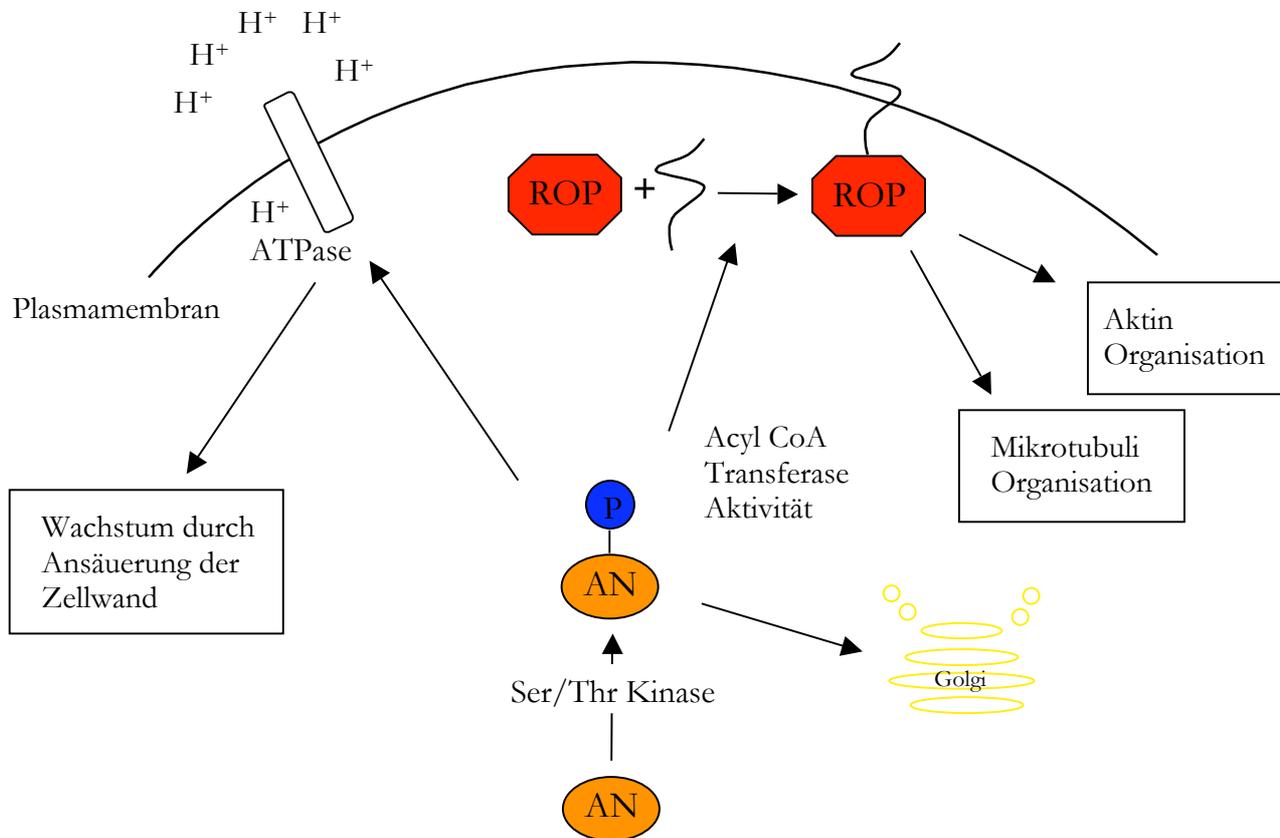


Abbildung 18: Modell zur möglichen Wirkungsweise von AN

Durch die Interaktion mit einer Kinase könnte AN phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Über die Interaktion mit einer Plasmamembran gebundenen Protonen ATPase könnte AN am Zellwachstum durch Ansäuerung der Zellwand beteiligt sein. Die mögliche AcylCoA Transferase Aktivität von AN kann zum einen zur Bereitstellung von Material durch Abschnürung von Golgi-Vesikel dienen und damit Zellwachstum fördern und/oder zum anderen ROPs in der Membran verankern, was die Fixierung verschiedener Wachstumspunkte zur Folge haben könnte.

Material und Methoden

Material

Chemikalien und Antibiotika

Alle verwendeten Chemikalien und Antibiotika wurden in analytischer Qualität von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Duchefa (Niederlande), Aventis Crop Science (Düsseldorf) und Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg) bezogen. Die für die Spurr-Einbettungen verwendeten Chemikalien stammen von der Firma Serva (Heidelberg). Medien für Bakterien, Hefen und Pflanzen wurden mit Produkten der Firmen Roth, Difco, Gibco, Invitrogen und Duchefa hergestellt.

Enzyme

Restriktionsenzyme, Polymerasen und DNA modifizierende Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas, Invitrogen, Stratagene, New England Biolabs (Frankfurt/Main) und Roche (Mannheim) bezogen.

Antikörper

Strep-Tactin AP conjugate (IBA, Göttingen)

Anti-HA High Affinity (Roche, Mannheim)

Anti-Rat IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate (Sigma, Steinheim)

Penta-His Antibody, BSA free (Quiagen, Hilden)

Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate (Sigma, Steinheim)

Primer

Die verwendeten PCR- und Sequenzier-Primer wurden von den Firmen Sigma Genosys (Steinheim) und Invitrogen synthetisiert.

Primer mit Restriktionsschnittstellen

AN-Acc65I-FOR	AAAGGTACCGAGCAAGATCCGTTTCGTCTGCG
AN-SalI-RW	AAAGTCGACAGCAAGATCCGTTTCGTCTGCG
BamHI-AN-FW	AAAGGATCCATGAGCAAGATCCGTTTCGTCTG
SacI-AN-REV	AAAGAGCTCTTAATCGATCCSSCGTGTGATACC
AtRBR1 trun BamHI for	AAAAGGATCCATGAGCTCACCTGCAAGGACATTTATAAGC
AtRBR1 trun XhoI rev	AAAACCTCGAGCTATGAATCTGTTGGCTC

Primer für Ein-Topf-Ligation:

Kni ohne AT for	GAACCAGACATGCAAAGT
Kni ohne Stop rev	GACACACACGAATATTCC
kr ohne AT for	GTCCATATCAATGCTTCAAGAC
kr ohne STOP rev	ATGTTGTTGATGGCCCAT
N500 for	
C600 rev	

Primer für Fusions-PCR:

PE2	CAGATTTTTGTCCATTACATGGACAAGTCGGAGAC
PE3	CGACTTGTCCATGTAATGGACAAAAATCTGATGATGCC
PE4	CACTGTAATCTGCACCTTTTTCTTGATTTGATATCA
PE5	AAATCAAGAAAAGAGTGCAGATTACAGTGAGGA
PE7	GCTAATTTCTCGTGCAAGATAGAGATAGCCTTCT
PE8	GGCTATCTCTATCTTGCACGAGAAATTAGCAATAGT
PE9	CGTGTGTTGCTAGGTGACAAGATAGAGATAGCCTTCT
PE10	GGCTATCTCTATCTTGTCCCTAGCAAACACGAGAA
PE11	ATTGCTAATTTCTCGTGTGTTCTTCTTCTTCACTTG
PE12	GAAGAAGAAGAACAACACGAGAAATTAGCAATAGTGG
PE13	GTATTTTTGCTGTGAGGCTTTCTTACCGGATCTGC
PE14	CCGGTAAGAAAAGCCTCACAGCAAAAATACATGCA
PE15	GCTCGAGCGCACAATCTGTAACGACGTGAGGCGACG
PE16	CCCGGTAAATCGATCCAACGTGTGA
PE17	CTTACCGGATCTGCTACGTCTTCCGGCAGTATTTTGAGAAA
PE18	CAGCAACACGTTTTCTCAAATACTGCCGGAAGACGTAGCAGATCC

Primer für site directed mutagenesis

DH-Mut His-Gln forw	GGGAGAAGGCTATCTCTATCTTGAATCATTTTTCTTAGATGGTG
DH-Mut His-Gln rev	CACCATCTAAGAAAAATGATTGCAAGATAGAGATAGCCTTCTCCC

Primer mit attB-sites

attB1 AN	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCAAGATCCGTTTCGTC
attB2 AN + Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAATCGATCCAACGTGTGA
attB2 AN - Stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATCGATCCAACGTGTGATAC
attB1 dCtBP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACAAAAAATCTGATG
attB2 dCtBP	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTACTTTTCTTGATTTGA
attB1 AN DH	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAGTGATACCTCAGGAGCCGAG
attB2 AN DH	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGCGAGGTAGAATTAACAC
attB1 AN 5' 2000bp	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGTTTTCTTGAATCTAATCG
attB2 AN 5' 2000bp	GGGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTCCTCTTCTTCGC
attB1 pda08228	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGGATTCGAGCTCTATCG
attB2 pda08228	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCAGATATGGGTTTCGT

Primer für RT-PCR

DH myb B	TGCAGATTACAGTGAGGAAGTATGG
DH F4	CGACATTCGTCCAGAGAACC
DH myb B4	CACTGAGATCGTACGTAGAGA
DH myb B4 rev	GGAAATTCGAGCTCCACC
EF1A4-RP	TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA
EF1A4-UP	ATGCCCCAGGACATCGTGATTTTCAT

Sequenz-Primer

At3g 17750:

pda8228 seq1200	ACTGGTTGTCTGTAAGTCACGG
pda8228 seq1200 rev	GTTTCCTCCACCAGCCATTT
pda8228 seq1600	CAAGCAAGCTGATTTGGTTG
pda8228 seq1600 rev	CTGCATCCATCAATTGCCCG
pda8228 seq2000	ATTTCCCTCTCCAGTAGCTGAT
pda8228 seq2000 rev	CTTTGGTTCATCACTTTCATTTCTC
pda8228 seq2400	GACCTTCAACCTGAAGATTGTTT
pda8228 seq250 rev	GATTACTCTCGTGTAAGTTATTGGC
pda8228 seq2500 rev	GTCATGTGCTTGTATTGCTTTG
pda8228 seq2800	TTCACTATGCCAAGATTGCAGT
pda8228 seq3000 rev	GGTAGGATCTAGACTGGACATAGGA
pda8228 seq3200	GATACATGCAAGTACTTCACCAAAA
pda8228 seq400	GATTTACCTCCCTGGAACCA
pda8228 seq700 rev	CAATGGTCTGGTGAAGCACC
pda8228 seq800	CACGTCAACAAAAGATAAATGGTGT

Knirps und krüppel:

kni seq 201 for	CAACGTGGGCATGTCGAA
kni seq 408 rev	TGATGGTGGTGCAAATGG
kni seq 749 for	GCCAGTCGCCCATCGATGT
kr seq 1006 rev	CATGTGACACCGTTCGCA
kr seq 1201 for	TCCGTCGACATGGAAAAAG
kr seq 201 for	GCTCTCACCTACCCAACCTTCTG
kr seq 411 rev	TTAATGGGTGCTTGCCACTA
kr seq 701 for	AGCACGTGCTTCAGAACCA

dCtBP:

CtBP seq 201 for	CAACGAGGCAGTGGGAGCT
CtBP seq 409 rev	GGATGAGGCACATCGTCC
CtBP seq 701 for	CACTGCATTGCACGCTCA

ANGUSTIFOLIA:

DH B2	TTTGGGTATCGTTGGCAG
DH F2	CTGTAATCTGCACTGCGAGG
DH F3	GCGATAATGAATTGTGCAGC
DH F4	CGACATTCGTCCAGAGAACC
DH myb B	TGCAGATTACAGTGAGGAAGTATGG
DH seq 1200	TTCTTACCGGATCTGCTACGTC
DH seq 300	ACATGGACAAGTCGGAGACC
DH seq 320	TGAAGTATCTACATGGACAAG
DH120	CCGACTCCGTCCCTCACCAGC
an seq 1466	GGAAAACACCTCTTGAAG
an seq 1757	GCCATAGTTTTGACGTGTGGGAG

Sequenzprimer für Vektoren:

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	ATTAACCCCTCACTAAAG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
pAM PAT seq for	TGGAGAGGACCTCGAGAAAGA
pAM PAT seq rev	CCATGGAACGGAGGATCAC
pQE31 for	CGGATAACAATTCACACAG
pQE31 rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG

Linker:

pEXSG linker 5' for	CGCGTTCGAACATATGACGCGT
pEXSG linker 5' rev	TCGAACGCGTCATATGTTTCGAA

Klonierungsvektoren

pBlueskript SK+ (Stratagene): wurde für Standard Subklonierungen benutzt.

pGEM T-easy (Promega): Subklonierung von PCR-Produkten.

pDONR201 und **pDONR207** (Invitrogen): Subklonierung von PCR-Produkten, um einen Gateway ENTRY zu generieren.

pAM PAT GW (GeneBank accession AY027531): Destination-Vektor, um Konstrukte unter dem CaMV 35S Promotor in Pflanzen zu exprimieren .

pAM PAT 35S::3HA (Noel Laurent D, AG Parker, MPIZ Koeln): pAM PAT GW mit 3x HA-tag

pARB (freundlicher Weise von Martina Pesch zur Verfügung gestellt): Binärer GUS-Destination-Vektor für Promotor-Analysen.

pENSG:YFP und **pEXSG:YFP** (freundlicher Weise von Marcel Wiermer (MPI) zur Verfügung gestellt): Binäre 35S-Destination-Vektoren für N-terminale (pENSG:YFP) oder C-terminale (pEXSG:YFP) YFP-Fusionen.

pGREEN: binärer Pflanzenvektor (Hellens et al., 2000)

pAS-GW (Clontech): Köderplasmid für den Hefe Zwei-Hybrid, in den die Gateway-kassette kloniert wurde (Ilona Zimmermann).

pACT-GW (Clontech): Beuteplasmid für den Hefe Zwei-Hybrid, in den die Gateway-kassette kloniert wurde (Ilona Zimmermann).

pUVT102 (von Klaus Harter zur Verfügung gestellt): Brückenplasmid für den Hefe Three Hybrid.

pQE31 (Quiagen): IPTG induzierbarer HIS-tag Vektor für *E. coli*

pYES 2NT/B (Invitrogen): Galaktose induzierbarer HIS-tag Vektor für *S. cerevisiae*

pGAD T7 (Clontech): Zwei-Hybrid-Vektor, der einen starken T7-Promotor hat und deshalb für in vitro Translation gut geeignet ist

Pflanzenlinien

Die in dieser Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Ökotypen waren *Landsberg erecta* (*Ler*) (im Teil B dieser Arbeit) und *Columbia* (*Col*) (im Teil A dieser Arbeit). Das verwendete *angustifolia*-Allel *an-EM6* ist in *Ler* induziert und stammt von M. Hülskamp, das andere *an*-Allel *an-X2* wurde von M. Koorneef hergestellt. Im Teil A dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Allel *an-X2* gearbeitet; im Teil B dieser Arbeit bezieht sich „*an*-mutant“ auf *an-EM6*; wurde *an-X2* verwendet ist es ausdrücklich erwähnt (Folkers et al., 2002).

Bakterien- und Hefestämme

Escherichia coli:

DH5a und XL1 blue wurden für Standardtransformationen verwendet. Der Stamm DB3.1 ist *cddB* resistent zur Transformation von Gateway-Plasmiden

Agrobacterium tumefaciens:

Der Agrobakterienstamm pGV3101 mit pMP90RK-virulenz Plasmid wurde zur Transformation von binären Gateway-Plasmiden verwendet.

Material und Methoden

Saccharomyces cerevisiae:

Der Hefestamm AH109 wurde für die Zwei- und Drei-Hybrid Analysen verwendet, der Stamm Inv Sc1 zur rekombinanten Expression.

Methoden

Anzucht des biologischen Materials

Pflanzen

Aussaat auf Erde und Aufzucht: Die Samen wurden auf feuchte in Plastiktöpfchen ausgebracht. Die Aussaat wurde mit einer Haube bedeckt und vier Tage im Dunklen bei 4°C gelagert. Danach wurden sie in Pflanzenräumen bei 25°C bzw. 18°C unter Langtag-Bedingungen kultiviert. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Hauben entfernt.

Samensterilisation: Vor dem Ausbringen auf sterilen MS-Platten (1 x Murashige-Skoog-Salze, 1 % Saccharose, 0,7 % Agar, pH 5,7, ggf. Antibiotika oder Ammoniumglufosinate) wurden die Samen oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie 5 Minuten in 95% Ethanol und anschließend 10 Minuten in 4% Natrium Hypochlorid, 0,01% Triton x 100 inkubiert. Danach wurden die Samen zweimal mit 0,01% Tween gewaschen.

Bakterien und Hefen

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte in LB-Medium (Sambroock et al., 1989). *A. tumefaciens* wurde in YEB-Medium (Vervliet et al., 1975) angezogen. Hefe wurden entweder in dem Vollmedium (YPD; Ausubel et al., 1989) oder in Mangelmedium (CD dropout; Invitroge) angezogen.

Molekularbiologische Methoden

Klonierung:

Klassische Klonierungen wurden wie in den Protokollbüchern (Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 2001) beschrieben durchgeführt. Die Ein-Topf-Ligation ist eine Variante der konventionellen Ligation. Dafür werden Ligase und Restriktionsendonuklease in denselben Reaktionsansatz pipettiert. Um diese Reaktion durchführen zu können muss der Zielvektor eine einmal vorkommende gerade (blunt) Schnittstelle besitzen. Das Insert muss blunt sein, darf diese Schnittstelle nicht aufweisen und darf die Schnittstelle nicht komplettieren.

BP- und LR-Reaktionen des Gateway-Systems wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Invitrogen).

Alle auf PCR-Produkten basierenden Vektoren wurden sequenziert.

DNA Präparationen

Plasmidpräparationen aus Bakterien

Plasmidpräparationen aus *E. coli* zur qualitativen Analyse erfolgten aus 5 ml einer stationären Bakterienkultur nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim (Birnboim und Dooley 1979). Für Sequenzierungen oder präoperative Zwecke wurden Plasmide aus 5 ml Übernachtskultur mit pQE-Lab MiniI Säulen (Peq-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen) isoliert.

Plasmidpräparationen aus *Agrobacterium tumefaciens* wurden mit Quiagen Mini Säulen durchgeführt.

CTAB-Minipräparation genomischer Pflanzen-DNA

Genomische DNA für PCR-Analysen wurde nach einer modifizierten Methode von Rogers und Bendich präpariert (Rogers et al., 1988). Ein bis zwei Rosettenblätter wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem kleinen Pistill gemörsert. Das Homogenat wurde in 200 µl 2xCTAB-Puffer aufgenommen, für ca. 15 sec. gevortext und 30 bis 60 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach der Chloroform-Extraktion wurde die DNA aus dem wässrigen Überstand mit 200 µl Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl 10mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen. Zur anschließenden PCR-Analyse wurde 1 µl eingesetzt.

2xCTAB: 2 % Cetyltriethylammoniumbromid; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA ; 1,4 M NaCl; 1 % Polyvinylpyrolidon

PCR und Sequenzreaktionen

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki et al., 1988) für DNA-Konstrukte wurde entweder *Pfu* Polymerase und Hifi Enzym-Mix von MBI fermentas oder von Stratagen Turbo

Pfu Polymerase verwendet. Für alle anderen Zwecke wurde die im Labor aufgereinigte *Taq* Polymerase benutzt. PCR-Reaktionen wurden in einem Eppendorf Mastercycler oder Eppendorf Mastercycler Gradiente ausgeführt.

Geeignete Primer wurden mit Vector NTI ermittelt. Für die *Taq* Polymerase und den Hifi Enzym-Mix wurde eine Minute pro kb DNA Fragment und zwei Minuten für die *Pfu* und Turbo *Pfu* Polymerase angenommen.

Standard-PCR

Standard PCR-Reaktion 50µl:

Stammlösung	eingesetztes Volumen
PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
je Primer (10 µM)	1 µl
Polymerase (5U)	0,3 - 0,5 µl
DNA (200-500 nM/µl)	5 µl

Standard PCR-Programm:

1 Zyklus	Denaturierung	2 Minuten	94°C
35 Zyklen	Denaturierung	45 Sekunden	94°C
	Annealing	30 Sekunden	53°C - 63°C
	Extension	1kb/min <i>Taq</i> 500bp/min <i>Pfu</i>	72°C
1 Zyklus	Extension	5 Minuten	72°C

Sequenzierung

Sequenzierungen (Sanger et al., 1977) wurden mit einem ABI 310 Sequenzierer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster city, CA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzreaktionen wurde das BigDye-Kit V1.1 bzw. 3.1 von Applied Biosystems verwendet. PCR-Produkte zur Herstellung von Konstrukten wurden nach Subklonierung in pGEM T-easy mit T7 und Sp6 Primern, nach Subklonierung in pBlueskript SK plus mit T3 und T7 Primern, nach BP-Reaktion mit pDONR201 mit attL1 und attL2 Primern und gegebenenfalls mit internen genspezifischen Primern sequenziert. Für die Sequenzreaktionen wurden ca. 150-200 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Sequenzprimer wurden mit der Software VectorNTI-Suite 7.1 (Informax, Paisley PA 9RF, United Kingdom) konstruiert.

RT-PCR:

Für eine semi-quantitative RT-PCR wurden unterschiedlich viele Zyklen genommen, um sicher zu stellen, daß man sich innerhalb der linearen Steigung der Primer befindet. *AN* wurden mit 35 Zyklen durch die folgenden Primer amplifiziert: DH myb B und DH F4 für endogenes; und DH myb B4 und DH myb B4 rev für transgenes. Als Kontrolle wurde der Translations-Elongations-Faktor EF1 mit 25 Zyklen mit den Primern EF1A4-RP und EF1A4-UP amplifiziert (Liboz et al., 1990).

Fusions-PCR

Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurden ein je ca. 40 bp langer Forwärts- und Rückwärts-Primer entwickelt, die in der Mitte die gewünschte Deletion hatten. Mit entsprechenden am Anfang und Ende des Gens liegenden Forwärts- und Rückwärts-Primern wurden zwei primäre DNA-Deletions-Fragmente amplifiziert, die ca. 40 bp überlappen. Je 1µl der primären, gereinigten PCR-Produkte werden für die Fusion eingesetzt. Einem initialen Denaturierungs-, Annealing- und Extensionsschritt folgte das Standard PCR-Programm.

Diese Methode wurde verwendet, um die Konstrukte AN Δ PEST, AN Δ PEST Δ P-site, AN Δ P-site, AN Δ NLS, AN Δ Rb, AN Δ SUMO (mit den Primern 1-4 auf Abbildung 19) und AN-CtBP-AN (mit den Primer 1-6) zu kreieren

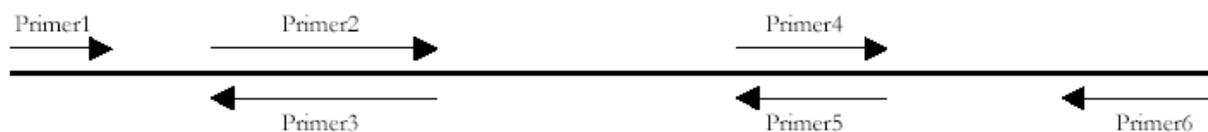


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Fusions-PCR

Gezielte Mutagenese

Die site-directed mutagenesis (Ausubelet al., 1987) wurde verwendet, um gezielt eine oder zwei Basen auszutauschen. Mit dieser Methode wurde das konservierte Histidin gegen Glutamin ausgetauscht.

RNA Präparation

RNA-Präparationen für wurden mit TRIzol-Reagens von Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Transformationen

Bakterien

Zur Transformation von *E. coli* wurden die Stämme DH5 α und DB3.1 eingesetzt, von *Agrobacterium tumefaciens* die Stämme GV3101 und GV3101 mit dem Helferplasmid MP90RK DH5 α -Zellen wurden chemisch transformiert, DB3.1-Zellen und die beiden Agrobakterienstämme durch Elektroporation mit dem Genepulser (Biorad). Die Geräteeinstellungen waren: 2,5 kV, 400 Ω , 250 μ F.

Hefen

Für Hefetransformationen wurden die Stämme AH109 und Inv Sc1 verwendet. Die Transformation erfolgte wie auf <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.htm> beschrieben. Als Autoaktivierungs-Kontrolle wurden die Köderkonstrukte mit den leeren Beutekonstrukten transformiert und umgekehrt.

Stabile Pflanzentransformation

Es wurde die „Floral Dip“-Methode angewand (Clough et al., 1998). Zur Transformation wurden möglichst kräftige, ca. 5 Wochen alte Pflanzen eingesetzt. Vier Tage vor der Transformation wurde eine Vorkultur des Agrobakterienklons in YEB mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und 48 Stunden bei 30°C geschüttelt. 400 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 5 ml dieser Vorkultur angeimpft und 48 Stunden bei 30°C geschüttelt, bis die Bakterien sehr dicht gewachsen waren. Die Bakterien wurden 15 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert und in 600 ml 5 % Saccharose-Lösung resuspendiert. Kurz vor dem Tauchen der Blüten wurde Silwett L-77 zugegeben (Endkonzentration 0,05 %). Die Blüten wurden für 20 Sekunden in die Agrobakteriensuspension getaucht und über

Nacht liegend und mit einer Haube bedeckt gelagert. Anschließend wurden die Pflanzen normal weiterbehandelt.

Transiente Pflanzentransformation

Die GFP-Fusion von AN unter 35S-Kontrolle in pBAR (von Ulrike Folkers hergestellt) wurde transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert (Scott et al., 1999). Dazu wurden 20 µl einer 60 mg/ml Stammlösung von Goldpartikeln mit 5 µg DNA beladen und die Zwiebelepidermis damit in einer Biorad Partikelkanone beschossen. Die Proben wurden nach 12 Stunden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Hefe Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid

Das Hefe Zwei-Hybrid-System nutzt Hybridgene, um Protein-Protein-Interaktionen über die Aktivierung einer Reporterexpression zu detektieren. Die Reporterexpression ist das Resultat der Wiederherstellung eines funktionalen Transkriptionsfaktor durch die Interaktion von Zwei-Hybridproteinen. Um die Interaktion zweier Proteine festzustellen wird eine cDNA (Köder) mit dem kodierenden Bereich der DNA-Bindungsdomäne eines bekannten Transkriptionsfaktors (GAL4) fusioniert. Das Gen, das für einen möglichen Interaktionspartner (Beute) des Köderproteins kodiert, wird mit dem kodierenden Bereich der Transkriptionsaktivierungs-Domäne (von GAL4) fusioniert. Das DNA-Bindungsdomänen-Hybrid und das Aktivierungsdomänen-Hybrid werden in einen Hefestamm, der unter anderem auxothroph für die Aminosäuren Histidin, Leucin, Uracil und Tryptophan ist, kotransformiert. Durch Interaktion zwischen Köder und Beute gelangt die Aktivierungsdomäne in die Nähe der DNA-Bindungsdomäne, was zur Transkription des *HIS3*-Reporter genes führt.

Der Drei-Hybrid ist eine Variation des Zwei-Hybrids. Diese Variation wird benutzt werden, wenn zwei Proteine über ein drittes interagieren, oder die Interaktion zweier Proteine durch ein drittes gestört wird.

Protein-analytische Methoden

Expression von ANGUSTIFOLIA in verschiedenen Systemen

E.coli:

Um AN rekombinant zu exprimieren wurde eine IPTG induzierbare AN-Histidin-Fusion (pQE31-AN) hergestellt. Das Konstrukt wurde in E.coli XL1 blue Zellen transformiert. Eine 50ml Kultur wurde in LB Amp¹⁰⁰ Tet¹⁵ auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 angezogen und durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert und weitere 5 Stunden wachsen gelassen. Es wurde eine uninduzierte Probe, eine direkt nach der Induktion und jede weitere Stunde eine Probe entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert und in denaturierendem Auftragspuffer aufgenommen, 10 Minuten gekocht und auf das SDS-Polyacrylamid aufgetragen und durch Coomassie-Färbung analysiert.

Hefe:

Das Plasmid pYES-AN wurde in den Hefestamm Inv Sc1 transformiert. Aus einer Übernachtskultur, die in Selektionsmedium mit Glucose angezogen wurden, wurden die Zellen gesammelt und mit Wasser gewaschen. Selektionsmedium, mit Galaktose und Raffinose zur Induktion wurde mit den gewaschenen Hefezellen auf eine OD₆₀₀ = 0,4 angeimpft. Zum Zeitpunkt 0, 4, 8, 12, 16 und 24 h nach der Induktion wurden Proben gezogen und pelletiert. Bis zum Aufschluss der Zellen wurden sie bei -80°C gelagert. Die geernteten Zellen wurden in 500µl breaking buffer resuspendiert und durch glass beads (425-600 µm Durchmesser; Sigma) aufgebrochen. Die beads und Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford wurden die Proben so verdünnt, dass etwa die gleichen Mengen auf das Gel geladen wurden. Die Gele wurden durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot analysiert

Breaking buffer: 50mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4
 5% Glycerol
 1mM PMSF

In vitro translation:

Um AN in vitro zu translatieren wurde die cDNA in den Vektor pGAD T7 kloniert. Die in vitro Translation erfolgte nach Angabe des Herstellers (Promega). Zur Markierung des Proteins wurde Biotin-Labeled-Lysyl-tRNA (Promega) zum Ansatz gegeben. Die Sichtbarmachung des Proteins auf dem Western Blot erfolgte durch den mit Alkaliner-Phosphatase gekoppelten Streptavidin Antikörper.

Lysophosphatylsäure Acyltransferase (LPAAT) assay

Ein Aliquot [¹⁴C]Oleoyl-CoA (10 ± 15 mCi mol⁻¹, Moravек Biochemicals) in 50 % Ethanol gelöst wurde in der SpeedVac getrocknet und anschließend in 50 µl PBS-Puffer aufgenommen und zwei Minuten im Sonicator behandelt. Der Reaktionsansatz wurde durch die Zugabe von 1,5 µl 1mM Lysophosphatylsäure (LPA) (hergestellt durch 10fache Verdünnung einer 10 mM Stocklösung in LPA-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.1mM EDTA, 25mM sucrose; 0.05% (w/v)) und 20 µl Lysat (aus der In vitro Translation von AN) und PBS-Puffer auf ein Endvolumen von 150 µl gebracht.

Die Reaktion erfolgte für 20 Minuten bei 37 °C und wurde durch die Zugabe von 150 µl eiskaltem 0,8 M KCl, 0,2 M H₃PO₄ gestoppt. Der Ansatz wurde mit 450 µl Chloroform/Methanol (2:1) gemischt und 2 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde gesammelt, getrocknet und in 35 µl Chloroform/Methanol/Wasser (2:1:1) resuspendiert. Zusammen mit einem [¹⁴C] Phosphatylsäure Standard von NEN wurde die Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgelmatrix durchgeführt, als Laufmittel diente Chloroform/Pyridin/Ameisensäure (50:30:7), und durch Phosphoimaging analysiert. (Weigert et al., 1999; Schmidt et al., 1999).

Proteinextraktion aus Arabidopsis unter denaturierenden Bedingungen

Frisch geerntetes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde für 10 min in denaturierendem Auftragspuffer (Verhältnis Pulver:Puffer = 1:1 bis 2:1) bei 95°C denaturiert und 30 min bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und kann bei -20°C gelagert werden. Der Gesamtextrakt kann direkt über SDS-PAGE untersucht werden.

denaturierender Auftragspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH6,8)
2% (w/v) SDS
36% (w/v) Harnstoff (8M)
30% (v/v) Glycerin
5% (v/v) β -Mercaptoethanol
0,5% (w/v) Bromphenolblau

Proteinextraktion aus Arabidopsis unter nativen Bedingungen

Um die löslichen Proteine zu extrahieren wurde 1 g Pflanzenmaterial im gleichen Volumen Lyse-Puffer suspendiert und 30 min (4°C; 13000 x g) zentrifugiert. Zur Extraktion der wand gebundenen Proteine wurden die Zelltrümmer in High salt Puffer resuspendiert und 30 min (4°C; 13000 x g) zentrifugiert. Die Proteine, die auf diese Weise nicht zu extrahieren sind wurden unter denaturierenden Bedingungen gelöst.

Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
1 mM EDTA
auf 10 ml Puffer eine Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)

High salt Puffer: 500 mM NaCl
1 % Nonidet P-40
50 mM Tris pH 8,0

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in diskontinuierlichen Gelsystemen nach Laemmli (1970) mit 8 %igen (w/v) Trenngelen. Als Molekulargewichtsmarker wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder von MBI fermentas verwendet. Die Gele wurden zum Proteinnachweis mit Coomassie gefärbt.

Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine aus SDS-PAGE-Gelen auf PVDF-Membranen (Roth) wurde nach der Semidry-Methode von Towbin et al. (1979) durchgeführt. Die elektrophoretische Übertragung erfolgte bei 0,6 mA /cm² im PHERO-multiblot (Biotec-

Fischer, Reiskirchen). Die verwendeten Puffer (Kathoden- und Anodenpuffer 10 x) wurden von der Firma Roth bezogen und nach deren Angaben angesetzt.

Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Zur Immunodetektion spezifischer Proteine wurde die Membran durch einstündige Inkubation in Blocking-Puffer (Roth) blockiert. Anschließend wurde der erste Antikörper (in TBST 1:2000; 1h Inkubation) gebunden. Nach viermaligem Waschen mit TBST wurde der zweite Antikörper (in TBST 1:10000; 1h Inkubation) an den ersten gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit TBST und zweimaligem mit TBS wurde die Farbreaktion mit Western Rapid Blue von Promega durchgeführt. Die Reaktion wurde durch waschen in Wasser gestoppt.

Mikroskopie und zytologische Methoden

Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff der bei lebenden Zellen die Zellwände färbt. Für die Färbung wurden Blätter in einer Propidiumiodid-Lösung, 100 µg/ml für 10-15 Minuten im Vakuum inkubiert, danach mit Wasser gewaschen und unter der Confocalen-Laser-Mikroskop (Anregungswellenlänge: 538 nm) analysiert.

GUS-Färbung

Zum Nachweis der Glucoronidase Aktivität in pAN:GUS und pPCAL:GUS wurde Pflanzenmaterial in 500 µl einer Lösung, die 0,2% Triton X-100, 50 mM Natriumphosphat, 2mM Kalium-Ferrocyanid, 2 mM Kalium-Ferricyanid und 2 mM X-Gluc enthielt, bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit Ethanol wurde das Chlorophyll entfärbt und anschließend die Proben unter dem Binocular oder Mikroskop analysiert.

Fixierung und Einbettung in Kunstharz

Das GUS-gefärbte Blattmaterial wurde mit einer Alkoholreihe (30%, 40% und 50% Ethanol) für je eine Stunde entwässert. Die Fixierung wurde mit FAA + Glutaraldehyd (50% Ethanol, 5% Formaldehyd, 1% Glutaraldehyd und 10% Eisessig) über Nacht durchgeführt.

Anschließend wurde mit 80%, 90% und 95% Ethanol für je eine Stunde und mit 100% über Nacht entwässert.

Die Einbettung in Kunstharz erfolgte nach Spurr {Spurr, 1969 #486}. ERL-4206 wurde durch das Epoxydharz ERL-4221 D ersetzt und in den gleichen Konzentrationen wie von Spurr beschrieben eingesetzt.

Toluidinblau-Färbung

Am Mikrotom wurden Semidünnschnitte angefertigt, die auf Objektträger fixiert wurden. Zur Sichtbarmachung unter dem Mikroskop wurden sie mit Toluidinblau (1% Toluidinblau, 1% Borax) angefärbt.

Zellgröße und –Volumen:

Die Zellgrößen und –Volumina wurden auf dem ersten und zweiten Blatt von drei bis vier Wochen alten Pflanzen gemessen. Um die Zellgröße und den Zellumfang, zur Errechnung der Komplexität, zu quantifizieren wurden die Blätter in 70% EtOH entfärbt und unter dem Leica DM RA2 Mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) analysiert. Die DISKUS-Software (Carl H. Hilgers-Technisches Büro, Königswinter, Germany; Version 4.30.19) wurde verwendet, um die einzelnen Zellen zu umfahren und damit den Umfang und die Fläche der Zellen zu berechnen. Zur Quantifizierung der Zellvolumina wurde die Zellwand mit Propidiumjodid gefärbt. Optische Schnitte zwischen zwei und drei μm Dicke wurden mit dem Leica TCS-SP2 konfokalen Mikroskop und der Leica-Software (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) angefertigt und umrandet, um die Zellfläche jedes Schnittes zu messen. Die Flächen der Schnitte wurden addiert und mit der Schnittdicke multipliziert, um das Volumen einer Zelle zu errechnen.

Konstrukte

ENTRY-Konstrukte

201 AN +Stop: Die cDNA von an wurde mit den Primern attB1 AN und attB2 AN+ Stop amplifiziert und in pDONOR201 rekombiniert.

201 AN –Stop: Die cDNA von an wurde mit den Primern attB1 AN und attB2 AN –Stop amplifiziert und in pDONOR201 rekombiniert.

201 dCtBP: Die cDNA von dCtBP (freundlicher Weise von Dr. Jeremy Turner (Univ. of Sydney) zur Verfügung gestellt) wurde mit den attB1 CtBP und attB2 CtBP amplifiziert und in pDONOR201 rekombiniert.

201 AN-DH: Die Domäne von AN die Sequenzähnlichkeiten zu Dehydrogenasen (Aminosäure 112-307) aufweist wurde von der cDNA mit den Primern attB1 AN-DH und attB2 AN-DH amplifiziert und in pDONOR201 rekombiniert.

201 At3g17750: Die von Riken unter der Nummer pda 08228 geführte cDNA (At3g17750; putative Serin-Threonin-Kinase) wurde in mit den Primern attB1 pda8228 und attB2 pda8228 amplifiziert und in pGEM T-easy subkloniert. Die Rekombination in pDONOR201 wurde mit den Vektorenverhältnissen einer LR-Reaktion durchgeführt.

201 pAN: 2000 bp des genomischen 5´Bereich von ANGUSTIFOLIA wurden aus der genomischen DNA von *Ler* mit den Primern attB1 5´2000 und attB2 5´2000 amplifiziert und in pDONOR201 rekombiniert.

Mutagenese-ENTRY-Konstrukt

207 AN H-E: Die cDNA von AN wurde mit den Primern BamHI-AN-FW und SacI-AN-RW amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle BamHI und SacI in das 35S-Kassetten-Plasmid von pGREEN II kloniert. 35S:AN wurde über EcoRV aus dem 35S-Kassetten-Plasmid ausgeschnitten und über diese Schnittstelle in pGREEN II kloniert. Mit den Primern DH-Mut His-Gln forw und rev wurde auf pGREEN 35S:AN die site-directed mutagenesis durchgeführt. Mit den Primern attB1 AN und attB2 AN+ wurde das mutagenisierte AN-Allel amplifiziert und über die BP-Reaktion in den Vektor pDONR207 gebracht.

Fusions-ENTRY-Konstrukte

Unter Punkt 2.2.2.4 wurde die Methode der Fusions-PCR beschrieben. Primer 1-4 bzw. 1-6 beziehen sich auf das dort angegebene Schema. Die PCR-Produkte wurden direkt in pDONOR 201 rekombiniert.

201 AN-CtBP-AN	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE2 Primer 3: PE3 Primer 4: PE4 Primer 5: PE5 Primer 6: attB2 AN +Stop
201 AN Δ PEST Δ P-site	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE7 Primer 3: PE8 Primer 4: attB2 AN +Stop
201 AN Δ PEST	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE9 Primer 3: PE10 Primer 4: attB2 AN +Stop
201 AN Δ P-site	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE11 Primer 3: PE12 Primer 4: attB2 AN +Stop
201 AN Δ NLS	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE13 Primer 3: PE14 Primer 4: attB2 AN +Stop
201 AN Δ Rb-site	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE15 Primer 3: PE16 Primer 4: attB2 AN +Stop
201 AN Δ SUMO	Primer 1: attB1 AN Primer 2: PE17 Primer 3: PE18 Primer 4: attB2 AN +Stop

L1- und L2-Promotor-Konstrukte

pAtML1:AN und **pPCAL:AN** wurden von Arp Schnittger hergestellt

GUS-Reporterkonstrukte

pPCAL:GUS wurde von Arp Schnittger hergestellt

pAN:GUS: Zur GUS-Reporteranalyse von *ANGUSTIFOLIA* wurden 2kB genomische DNA vor dem Translationsstart amplifiziert. Der 5' Promotor-Bereich wurde mit attB-Primern amplifiziert und mittels BP-Reaktion in pDONR201 rekombiniert. Der entstandene Entry-Klon 201:5'2000 wurde in einer LR-Reaktion mit pARB zu dem GUS-Vektor pARB2000 rekombiniert.

Fluoreszenz-Konstrukte

35S:GFP:AN wurde von Ulrike Folkers hergestellt

35S:YFP:AN AN⁺ Stop wurde aus 201AN⁺ durch LR-Reaktion in pENSG-YFP rekombiniert.

35S:YFP:AN Δ Rb: AN del Rb aus 201AN del Rb wurde durch LR-Reaktion in pENSG-YFP rekombiniert

5'2000:AN:YFP pEXSG-YFP wurde mit AscI und XhoI aufgeschnitten und mit einem Linker, der die beiden Schnittstellen zerstört und eine AsuII-Schnittstelle einführt ligiert (pEXSL-YFP). 2 kB des 5' Bereiches wurden amplifiziert und in pGEM T-easy subkloniert und mit AsuII und MluI ausgeschnitten und in pEXSL-YFP kloniert (pEX2000-YFP). AN- aus 201AN- wurde durch LR-Reaktion in pEX2000-YFP rekombiniert

Rettungskonstrukte

Die unten angegebenen ENTRY-Konstrukte wurden für LR-Reaktionen mit dem binären Vektoren pAM PAT GW (pAM PAT 35S) eingesetzt.

201 AN+	pAM PAT 35S:AN
201 CtBP	pAM PAT 35S:CtBP
201 AN-CtBP-AN	pAM PAT 35S:AN-CtBP-AN
201 AN Δ PEST Δ P-site	pAM PAT 35S:AN Δ PEST Δ P-site
201 AN Δ PEST	pAM PAT 35S:AN Δ PEST
207 AN Δ P-site	pAM PAT 35S:AN Δ P-site
201 AN Δ NLS	pAM PAT 35S:AN Δ NLS
201 AN Δ Rb-binding-site	pAM PAT 35S:AN Δ Rb-binding-site
201 AN Δ SUMO	pAM PAT 35S:AN Δ SUMO
201 AN-DH	pAM PAT 35S:AN-DH
207 AN H-Q	pAM PAT 35S:AN H-Q

pGREEN II 35S:dCtBP: Über die aufgefüllten Schnittstellen Acc65I und SacI wurde die 35S-Kassette, aus dem 35S-Kassetten-Vektor mit EcoRV ausgeschnitten, in pGREEN II kloniert. pBS-SK(+) dCtBP (freundlicher Weise von Montserrat Sutrias-Grau zur Verfügung gestellt) wurde mit Acc65I geschnitten und über die Linker PL3 und PL4 wurden die Schnittstellen BamHI eingebracht. Über BamHI wurde dCtBP in pGREEN II 35S: gebracht.s

Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid Konstrukte

Beute-Konstrukte:

pAS AN Durch LR-Reaktion zwischen 201 AN +Stop und pAS-GW wurde der Klon pAS AN hergestellt.

pAS RBR1: pAS RBR1 wurde mir freundlicher Weise von W.Gruissem zur Verfügung gestellt. Die cDNA dieses Klons ist trunkiert und enthält die Rb-Box A und B

Köder-Konstrukte:

pACT AN wurde durch LR-Reaktion zwischen 201 AN +Stop und pACT GW hergestellt

pACT AN Δ Rb-binding site wurde durch LR-Reaktion zwischen 201 AN Δ Rb-binding site und pACT GW hergestellt

pACT CtBP wurde durch LR-Reaktion zwischen 201 dCtBP und pACT GW hergestellt

pACT pda 8228 wurde durch LR-Reaktion zwischen 201 pda 8228 und pACT GW hergestellt

pGAD T7 knirps: Die knirps cDNA von Drosophila wurde mit den Primern Kni ohne AT for und Kni ohne STOP amplifiziert und über Ein-Topf-Ligation in die Schnittstelle Sma I von pGAD T7 kloniert

pGAD T7 krüppel: Die krüppel cDNA von Drosophila wurde mit den Primern kr ohne AT for und kr ohne STOP amplifiziert und über Ein-Topf-Ligation in die Schnittstelle SmaI von pGAD T7 kloniert

Three Hybrid-Konstrukt:

pVT 102U-Rb: Mit den Primern AtRBR1 trun BamHI for und AtRBR1 trun XhoI rev wurde das schon im Zwei-Hybrid eingesetzte AtRBR1-Fragment amplifiziert und direkt über die Schnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pVT 102U kloniert.

Konstrukte zur Proteinexpression:

pQE31-AN: Die cDNA von AN wurde mit den Primern AN-Acc65I-FOR:und AN- SalI-RW amplifiziert und in pGEM T-easy subkloniert und über ACC65I und SalI in pQE31 kloniert.

pYES-AN: Die cDNA von AN wird über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI aus pQE31 ausgeschnitten und über BamHI und XhoI in pYES 2NT/B kloniert.

pGAD T7-AN: Die cDNA von ANGUSTIFOLIA wurde mit den Primern N500for und C600rev (ohne die Basen A und T des Start-Codons) amplifiziert und blunt in den Vektor pGAD T7, über die Restriktionsstelle EcoRI kloniert.

pAMPAT 35S:AN:3HA: 201 AN –Stop wurde mit dem Destination-Vektor pAM PAT 35S::3HA zu pAMPAT 35S:AN:3HA rekombiniert.

Literatur

Ach RA, Drufee T, Miller AB, Zambryski PC, Hanley-Bowdoin L and Gruissem W (1997a): *RRB1* and *RRB2* encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol*, 17: 5077-5086

Ach RA, Taranto P and Gruissem W (1997b): A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein both in plants and animals. *Plant Cell*, 9: 1595-1606

Aeschbacher R, Schiefelbein JW and Benfey PN (1994): The genetic and molecular basis of root development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45: 25-45

Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815

Asryants RA, Kuzminskaya EV, Tishkov VI, Douzhenkova IV and Nagradova NK (1989): An examination of the role of arginine residues in the functioning of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 997: 159-66

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Bernard N, Johnsen K, Gelpi JL, Alvarez JA, Ferain T, Garmyn D, Hols P, Cortes A, Clarke AR, Holbrook JJ and Delcour J (1997): D-2-hydroxy-4-methylvalerate dehydrogenase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. II. Mutagenic analysis of catalytically important residues. *Eur J Biochem*, 244:213-9.

Bichet A, Desnos T, Turner S, Grandjean O, Höfte H (2001): *BOTERO1* is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion. *Plant J*, 25: 137-148

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.

Bouyer D, Kirik V and Hülskamp M (2001): Cell polarity in *Arabidopsis* trichomes. *Semin Cell Dev Biol*, 12: 353-356

Bowser J and Reddy ASN (1997): Localisation of a kinesin-like calmodulin-binding protein in dividing cells of *Arabidopsis* and tobacco. *Plant J*, 12: 1429-1437

Boyd JM, Subramanian T, Schaeper U, La Regina M, Bayley S and Chinnadurai G (1993): A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J*, 12(2):469-78.

Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH and Ye ZH (2001): A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell*, 13: 807-827

Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O and Bouchez D(2002): The *Arabidopsis* *TONNEAU2* Gene Encodes a putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell*, 14: 833-845

- Cleary, A.L., and Smith, L.G. (1998):** The Tangled1 gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* 10: 1875-1888.
- Cleary AL, Fowke LC, Wang H and John PCL (2002):** The effect of ICK1, a plant cyclin-dependent kinase inhibitor, on mitosis in living plant cells. *Plant Cell Rep*, 20: 814–820
- Clough, S., and Bent, A. (1998):** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743.
- Cockcroft, C.E., den Boer, B.G., Healy, J.M., and Murray, J.A. (2000):** Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405: 575-579.
- Dahl M, Meskiene I, Bögre L, Ha DTC, Swoboda I, Hudmann R, Hirt H and Heberle-Bors E (1995):** The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. *Plant Cell*, 7: 1847-1857
- Deavours BE, Reddy AS Walker RA (1998):** Ca²⁺/calmodulin regulation of the *Arabidopsis* kinesin-like calmodulin-binding protein. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 40: 408-416
- Desterro JM, Rodriguez MS and Hay RT (1998):** SUMO-1 modification of IκBα inhibits NF-κB activation. *Mol. Cell*. 2: 233-239
- De Veylder L, Beemster GT, Beeckman T and Inze D (2001):** *CKS1At* overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J*, 6: 617-26.
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JM, Jacquard A, Kilby NJ and Murray JA (2003):** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin *CYCD3*. *Plant Cell*, 15:79-92.
- Di Girolamo M, Silletta MG, De Matteis MA, Braca A, Colanzi A, Pawlak D, Rasenick MM, Luini A and Corda D.(1995):** Evidence that the 50-kDa substrate of brefeldin A-dependent ADP-ribosylation binds GTP and is modulated by the G-protein beta gamma subunit complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 7065-9.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993):** Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Dolan, L., Duckett, C.M., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poethig, S., and Roberts, K. (1994):** Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120: 2465-2474.
- Dowes BP, Stupar RM, Gingerich DJ and Viersta RD (2003):** The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J*, 35: 729-742
- El Refy A, Perazza D, Zekraoui L, Valay JG, Bechtold N, Brown S, Hülskamp M, Herzog M and Bonneville JM (2003):** The *Arabidopsis KAKTUS* gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol Genet Genomics*, 270: 403-414
- Etienne-Manneville S (2004):** Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, 117: 1291-300.
- Falk S, Mathur J and Hülskamp M (2004):** Polarity in single cells: root hairs, epidermal pavement cells and trichomes. *Annual Plant Reviews*, 12: 122-137

- Fleming, A.J. (2002):** The mechanism of leaf morphogenesis. *Planta* 216: 17-22.
- Folkers U, Berger J and Hülskamp M (1997):** Cell morphogenesis of trichomes in *Arabidopsis*: differential control of primary and secondary branching by branch initiation regulators and cell growth. *Development*, 124: 3779-3786
- Folkers U, Kirik V, Schöbinger U, Falk S, Krishnakumar S, Pollock MA, Oppenheimer DG, Day I, Reddy AR, Jürgens G and Hülskamp M (2002):** The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *EMBO J*, 21: 1280-1288
- Fountain MD, Murray JAH and Beck E (1999):** Isolation and characterisation of a plant retinoblastoma-related gene from a photoautotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum* L., *Plant Physiol*, 199: 363
- Frank MJ, Cartwright HN and Smith LG (2003):** Three *Brick* genes have distinct functions in a common pathway promoting polarized cell division and cell morphogenesis in the maize leaf epidermis. *Development*, 130: 753-762
- Fu Y, Wu G and Yang Z (2001):** Rop GTPase-dependent dynamics of Tipp-localized F-actin controls Tipp growth in pollen tubes. *J Cell Biol*, 152: 1029-1032
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, and Yang Z (2005):** *Arabidopsis* Interdigitating Cell Growth Requires Two Antagonistic Pathways with Opposing Action on Cell Morphogenesis. *Cell*, 120: 687-700.
- Furner, I.J., and Pumfrey, J.E. (1992):** Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 115: 755-764.
- Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins Ba, DeCaprio JA, Sellers WR and Kaelin WG (1996):** A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 8962-8967
- Gutiérrez C (1998):** The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 492-497
- Hanania U, Furman-Matarasso N, Ron M and Avni A (1999):** Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *Plant J.*, 19: 533-541
- Helin K and Harlow E (1994):** Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 is required for binding to the adenovirus E4 (ORF6/7) protein. *J Virol*, 68: 5027-5035.
- Helin K (1998):** Regulation of cell proliferation by the E2F transkription factors. *Curr. Opin. Genetics Dev*, 9: 1149-1163
- Hemerly A, Engler A, Bergounioux C, Van Montagu M, Engeler G, Inzé D and Ferreira P (1995):** Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J*, 14:3925-3936
- Hidalgo Carcedo C, Bonazzi M, Spano S, Turacchio G, Colanzi A, Luini A and Corda D.(2004):** Mitotic Golgi partitioning is driven by the membrane-fissioning protein CtBP3/BARS. *Science*, 305: 93-6
- Hu QJ, Dyson N and Harlow E (1990):** The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J*, 9: 1147- 1155

- Huang S, Wang NP, tseng BY Lee WH and Lee EH (1990):** Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV 40 T antigen. *EMBO J*, 9: 1815-1822
- Hülkamp M, Misera S and Jürgens G (1994):** Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, 76:555-566
- Hülkamp M, Schneitz K and Pruitt RE (1995):** Genetic evidence for a long range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 7: 57
- Hülkamp M, Folkers U and Grini P (1998):** Cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *BioEssays*, 20: 20-29
- Hülkamp M, Folkers U and Schnittger A (1999):** Trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Int Rev Cytol*, 186: 147-178
- Huntley R, Healey S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makkerh J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzaride T, Gutiérrez C, Doonan JH and Murray JAH (1998):** The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin (D-type) proteins. *Plant Mol Biol*, 37:155-169
- Ilgenfritz H, Bouyer D, Schnittger A, Mathur J, Kirik V, Schwab B, Chua NH, Jürgen G and Hülkamp M (2003):** The *Arabidopsis* *STICHEL* gene is a regulator of trichome branch number and encodes a novel protein. *Plant Physiol.*, 131: 643-655
- Inzé D, Gutiérrez C and Chua NH (1999):** Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell*, 11: 991-994
- Irish, V.F., and Sussex, I.M. (1992):** A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* 115: 745-753.
- Jefferson, R.A. (1987):** Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt NG, Shillito R and Binns A (1998):** Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-Binding Protein1. *Science*, 282: 1114-1117
- Jones MA, J-J S, Fu Y, Yang Z and Grierson CS (2002):** The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell*, 14: 763-776
- Johnson ES and Blobel G (1997b):** Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.*, 272: 26799-26802
- Jorgensen, C.A., and Crane, M.B. (1928):** Formation and Morphology of *Solanum* Chimaeras. *J. of Genetics* 18: 247-273.
- Katsanis N, Fisher EM (1998):** A novel C-terminal binding protein (CtBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics*. 47: 294-9
- Kim GT, Shoda K, Tsuge T, Cho KH, Uchimiya H, Yokoyama R, Nishitani K and Tsukaya H (2002):** The *ANGUSTIFOLIA* gene of *Arabidopsis*, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of gene involved in cell-wall formation. *EMBO J*, 26:1267-1279
- Kirik V, Bouyer D, Schöbinger U, Bechtold N, Herzog M, Bonneville JM and Hülkamp M (2001):** *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Curr Biol*, 11: 1891-1895

- Kirik V, Simon M, Hülkamp M and Schiefelbein J (2004a):** The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol*, 268: 506-513
- Kirik V, Simon M, Schiefelbein J and Hülkamp M (2004b):** *ENHANCER OF TRY AND CPC2 (ETC2)* reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 55: 389-98
- Kirik V, Lee MM, Wester K, Herrmann U, Schiefelbein J and Hülkamp M (2004c):** Functional diversification of AtMYB23 and GL1 in trichome morphogenesis and initiation. *Development*, 132:1477-85
- Kondorosi, E., Roudier, F., and Gendreau, E. (2000):** Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol*, 3: 488-492.
- Koornneef, M., Dellaert, L.W.M., and Veen, J.H.v.d. (1982):** EMS-and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research*, 93: 109-123.
- Kost B, Mathur J and Chua NH(1999):** Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 462-470
- Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR, Rosenfeld MG, Aggarwal AK (2002):** Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Mol Cell*, 10: 857-69
- Larkin JC, Young N, Prigge M and Marks MD (1996):** The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development*, 122: 997-1005
- Larkin JC, Brown ML and Schiefelbein J (2003):** How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol*, 54:403-30.
- Li H, Wu G, Ware D, Davis KR, Yang Z (1998):** *Arabidopsis* Rho-related GTPases: Differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol*, 118: 407-417
- Li Y, Seals DF, Randall SK, Yang Z (2001):** Dynamic localization of Rop GTPases to the tonoplast during vacuole development. *Plant Physiol*, 125: 241-251
- Liboz, T., Bardet, C., Thai, A.L.V., Axelos, M., and Lescure, B. (1990):** The four members of the gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha are actively transcribed. *Plant Mol. Biol.* 14: 107-110.
- Lin X, Sun B, Liang M, Liang YY, Gast A, Hildebrand J, Brunnicardi FC, Melchior F, Feng XH (2003):** Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell*, 11: 1389-96
- Luo D and Oppenheimer DG (1999):** Genetic control of trichome branch number in *Arabidopsis*: the role of the *FURCA* loci. *Development*, 126:5547-5557
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L and Melchior F (1997):** a small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear core complex protein RanBP2. *Cell*, 88: 97-107
- Marcotrigiano, M. (2001):** Genetic mosaics and the analysis of leaf development. *Int J Plant Sci*, 162: 513-525.

- Marks MD (1997):** Molecular genetic analysis of trichome development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 137-163
- Mathur J and Hülskamp M (2002):** Signal transduction: rho-like proteins in plants. *Curr Biol*, 12: R526-528
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B and Hülskamp M (2003a):** Mutations in actin related protein 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 15: 1632-1645
- Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP and Hülskamp M (2003b):** Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, 130: 3137-3146
- Matunis MJ, Coutavas E and Blobel G (1996):** A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.*, 135: 1457-1470
- McClinton RS and Sung ZR (1997):** Organization of cotical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta*, 201: 573-577
- McNelly F, Vale RD (1993):** Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubule. *Cell*, 75: 419-429
- Meloni AR, Smith EJ and Nevins JR. (1999):** A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 9574-9.
- Mironov A, Colanzi A, Silletta MG, Fiucci G, Flati S, Fusella A, Polishchuk R, Mironov A Jr, Di Tullio G, Weigert R, Malhotra V, Corda D, De Matteis MA and Luini A (1997):** Role of NAD⁺ and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure. *J Cell Biol*, 139: 1109-18.
- Mizukami Y and Fischer RL (2000):** Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:942-947
- Nakagami H, sekine M, Murakami H and Shinmyo A (1999):** Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J*, 18: 243-127
- Nevins JR (1992):** Transcriptional regulation A closer look at E2F. *Nature*, 358: 375-376
- Nibu Y, Zhang H and Levine M (1998):** Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo. *Science*, 280: 101-4.
- Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch JJ and Marks MD (1991):** A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell*, 67: 483-493
- Oppenheimer DG, Pollock MA, vacik J, szymanski DB, Ericson B, Feldmann K and Marks MD (1997):** Essential role of a kinesin-like protein in Arabidopsis trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6261-6266
- Oppenheimer D (1998):** Genetics of plant cell shape. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 520-524
- Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA (1982):** Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvy carcinoma viruns Ras gene. *Nature*, 291: 474-478

- Payne C, Zhang F and Lloyd AM (2000):** *GL3* encodes a bHLH protein that regulated trichome development in arabidopsis through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics*, 156: 1349-1362
- Perazza D, Herzog M, Hüskamp M, Brown S, Dorne AM and Bonneville JM (1999):** Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutation in at least five genes. *Genetics*, 152: 1349-1362
- Qui JL, Jilk R, Marks MD and Szymanski DB (2002):** The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell*, 14: 101-118
- Ray S, Park S and Ray A (1997):** Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development*, 124: 2489-2498
- Rechsteiner M and Rogers WR (1996):** PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS*, 21: 267-271
- Reddy AS, Narasimhulu SB, Safadi F and Golovki M (1996a):** A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *Plant J*, 10:9-21
- Reddy ASN, Safadi F, Narasimhulu SB, Golovki M and Hu X (1996b):** A novel plant calmodulin-binding protein with a kinesin heavy chain motor domain. *J. Biol. Chem.*, 271: 7052-7060
- Redei GP (1962):** single locus heterosis. *Z. Vererbungslehre*, 93: 164-170
- Reinhardt, D., and Kuhlemeier, C. (2002):** Plant architecture. *EMBO Rep*, 3: 846-851.
- Rolland-Lagan, A.G., Bangham, J.A., and Coen, E. (2003):** Growth dynamics underlying petal shape and asymmetry. *Nature*, 422: 161-163.
- Saitoh H, Pu RT and Dasso M (1997):** SUMO-1 wrestling with a newubiquitin-related modifier. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 374-376
- Sambrook and Russel. (2001).** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satina, S., Blakeslee, A.F., and Avery, A.G. (1940):** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.*, 27: 895-905.
- Satina, S., and Blakeslee, A.F. (1941):** Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Amer. J. Bot.*, 28: 862-871.
- Satina, S., and Blakeslee, A.F. (1943):** Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development of the carpel. *Amer. J. Bot.*, 30: 453-462.
- Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T and Chinnadurai G (1995):** Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10467-71
- Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, Wada T, Okada K, Beermann A, Thumfahrt J, Jürgens G and Hülskamp M (2002):** *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 21: 5036-5046
- Schnittger A., Grini, P.E., Folkers, U., and Hulskamp, M. (1996):** Epidermal fate map of the Arabidopsis shoot meristem. *Dev Biol*, 175: 248-255.

- Schnittger A and Hülskamp M (2001):** Plant tissues. *Encyclopedia of life science*
- Schnittger A, Weigl C, Bouyer D, Schöbinger U and Hülskamp M (2003):** Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK/KRP1 in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell*, 15: 303-315
- Schwab B, Folkers U, Ilgenfritz H and Hülskamp M (2000):** Trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Phil Trans R Soc Lond B Biol*, 355: 879-883
- Serrano M (1996):** The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*, 237: 7-13
- Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M. (1999):** The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal*, 20: 259-263.
- Shen B, carneiro N, Torrez-Jerez I, stevenson B, Mc Creery T, Helentjaris T, Baysdorfer C, Almira E, Ferl RJ, Habben JE and Larkins B (1994):** Partial sequencing and mapping of clones from two maize cDNA libraries. *Plant Mol Biol*, 26: 1085-1101
- Sherr CJ (1993):** Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73: 1059-65
- Sherr CJ and Roberts JM (1995):** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 8:28-35
- Smith, L.G., Hake, S., and Sylvester, A.W. (1996):** The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development*, 122: 481-489.
- Sollerbrant K, Chinnadurai G and Svensson C (1996):** The CtBP binding domain in the adenovirus E1A protein controls CR1-dependent transactivation. *Nucleic Acids Res*, 24: 2578-84.
- Song H, Golovki M, Reddy AS and Endow SA (1997):** In vitro motility of AtKCBP, a calmodulin-binding kinesin protein of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 322-360
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH and Murray JAH (1995):** A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interacting motif. *Plant Cell*, 7: 85-103
- Spano S, Silletta MG, Colanzi A, Alberti S, Fiucci G, Valente C, Fusella A, Salmona M, Mironov A, Luini A and Corda D (1999):** Molecular cloning and functional characterization of brefeldin A-ADP-ribosylated substrate. A novel protein involved in the maintenance of the Golgi structure. *J Biol Chem*, 274: 17705-10
- Spurr, A.P. (1969):** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res*, 26: 31-43.
- Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, Geiges B, Kuttner F, Lepiniec L, Stierhof YD, Schwarz H, Jürgens G and Mayer U (2002):** The *Arabidopsis* PILZ group genes encodes tubulin-folding cofactor orthologues required for cell division but not cell growth. *Genes Dev*, 16: 959-971
- Stewart, R.N. (1978):** Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. In *The Clonal Basis of Development*, S. Subtelny and I.M. Sussex, eds (New York, San Francisco, London: Academic Press), pp. 131-160.

- Stockhaus, J., Poetsch, W., Steinmuller, K., and Westhoff, P. (1994):** Evolution of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase promoter of the C4 dicot *Flaveria trinervia*: an expression analysis in the C3 plant tobacco. *Mol Gen Genet*, 245: 286-293.
- Stockhaus J, Schlue U, Koczor M, Chitty JA, Taylor WC, Westhoff P (1997):** The Promoter of the Gene Encoding the C4 Form of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Directs Mesophyll-Specific Expression in Transgenic C4 *Flaveria* spp. *Plant Cell*, 4: 479-489.
- Stoll VS, Kimber MS and Pai EF (1996):** Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase. *Structure*, 4: 437-47.
- Szymanski DB, Lloyd AM and Marks MD (2000):** Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 5: 214-219
- Szymkowiak, E.J., and Susse, I.M. (1996):** What chimeras can tell us about plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 351-376.
- Tilney-Bassett, R.A.E. (1986):** Plant Chimeras. (Edward Arnold Publishers Ltd.).
- Timpte, C.S., Wilson, A.K., and Estelle, M. (1992):** Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. *Planta*, 188: 271-278.
- Torrez-Ruiz RA and Jürgens G (1994):** Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development*, 120: 2967-2978
- Traas J, Bellini C, Nacry P, Kronenberger J, Bouchez D and Cabche M (1995):** Normal differentiation pattern in plants lacking microtubular preprophase band. *Nature*, 375: 676-677
- Tsuge T, Tsukaya H and Uchimiya H (1996):** Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development*, 122: 1589-1600
- Tsukaya, H., Tsuge, T., and Uchimiya, H. (1994):** The cotyledon: a superior system for studies of leaf development. *Planta*, 195: 309-312.
- Tsukaya H (2002):** Interpretation of mutants in leaf morphology: genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theory. *Int Rev Cytol*, 217:1-39
- Tsukaya H (2003):** Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 6:57-62
- Turner J and Crossley M (1998):** Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J*, 17: 5129-40.
- Vos JW, Safadi F, Reddy AS and Heppler PK (2000):** The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *Plant Cell*, 12: 979-990
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y and Okada K (1997):** Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by Myb homolog, *CPC*. *Science*, 277: 979-990
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blandell TL, Esch JJ, Marks MD and Grey JC (1999):** The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and antocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 11: 1337-1349

- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C. (2000):** Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J*, 24: 613-623.
- Webb M, Jouannic S, Foreman J, Linstead P, Dolan L (2002):** Cell specification in the *Arabidopsis* root epidermis requires the activity of root hair 3, a katanin-p60 protein. *Development*, 129: 123-131
- Weigert R, Silletta MG, Spano S, Turacchio G, Cericola C, Colanzi A, Senatore S, Mancini R, Polishchuk EV, Salmons M, Facchiano F, Burger KN, Mironov A, Luini A and Corda D (1999):** CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature*, 402: 429-33
- Weinberg RA (1995):** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330
- Wilhelmi LK and Preuss D (1999):** The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. *Curr Opin Plants Biol*, 2: 18-22
- Wu G, Gu Y, Li S and Yang Z (2001):** A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell*, 13: 2841-2856
- Xie Q, Suarez-Lopez P and Gutierrez C (1995):** Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J*, 14: 4073-4082
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ and Gutierrez C (1996):** Plant cell contains a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J*, 15: 4900-4908
- Zhang Q, Piston DW, Goodman RH (2002):** Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, 295:1895-7
- Zhang F, Gonzales A, Zhao M, Payne CT and Lloyd A (2003):** A network of redundant bHLH proteins function in all *TTG1*-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130: 4859-4869
- Zheng ZL and Yang Z (2000):** The Rop GTPase: An emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol*, 44: 1-9

Liste der T1 Linien

Ler	pAMPAT 35:AN-3HA	Phänotyp der T1 Linien			
		wildtypisch	an	sti	Summe
Ler	pAMPAT 35:AN-3HA	25	2		27
an X2	pAMPAT 35:AN-3HA	5		6	11
anEM6	pAMPAT 35:AN-3HA	2	1	1	4
Ler	pAMPAT 35:AN	36			36
an X2	pAMPAT 35:AN	2	1		3
anEM6	pAMPAT 35:AN	2			2
Ler	pAMPAT 35:AN(H-G)	12			12
an X2	pAMPAT 35:AN(H-G)	3		1	4
anEM6	pAMPAT 35:AN(H-G)	8	1		9
Ler	pAMPAT 35:AN DH	21			21
an X2	pAMPAT 35:AN DH		21		21
anEM6	pAMPAT 35:AN DH		7		7
Ler	pAMPAT 35:AN1	21			21
an X2	pAMPAT 35:AN1	6			6
anEM6	pAMPAT 35:AN1	8			8
Ler	pAMPAT 35:AN2	20			20
an X2	pAMPAT 35:AN2		8		8
anEM6	pAMPAT 35:AN2		1		1
Ler	pAMPAT 35:AN3				0
an X2	pAMPAT 35:AN3	1			1
anEM6	pAMPAT 35:AN3	2			2
Ler	pAMPAT 35:AN4	26	1		27
an X2	pAMPAT 35:AN4	7			7
anEM6	pAMPAT 35:AN4	1	1	3	5
Ler	pAMPAT 35:AN5	27			27
an X2	pAMPAT 35:AN5	17	2	10	29
anEM6	pAMPAT 35:AN5		2	1	3
Ler	pAMPAT 35:AN6	20	20		40
an X2	pAMPAT 35:AN6		5		5
anEM6	pAMPAT 35:AN6		7		7
Ler	pAMPAT 35:AN7	21			21
an X2	pAMPAT 35:AN7	1			1
anEM6	pAMPAT 35:AN7	8			8
Ler	pAMPAT 35:CtBP	40			40
an X2	pAMPAT 35:CtBP		4		4
anEM6	pAMPAT 35:CtBP	1	6		7

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stelle 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 von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Hülskamp betreut worden.

Stefanie Falk

Veröffentlichungen:

The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton.

Folkers U, Kirik V, Schöbinger U, Falk S, Krishnakumar S, Pollock MA, Oppenheimer DG, Day I, Reddy AR, Jürgens G and Hülskamp M
EMBO J 2002, 21: 1280-1288

Lebenslauf:

Name: Stefanie Falk
Geburtsdatum: 20.12.73
Geburtsort: Ilshofen

Schulische Ausbildung:

9/80 - 7/84 Grundschule Schwäbisch Hall-Steinbach
9/84 – 5/93 Erasmus Widmann Gymnasium Schwäbisch Hall

Akademisch Ausbildung:

10/93 – 7/94 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 Diplom VWL/BWL
10/94 – 7/95 Universität Stuttgart
 Diplom Maschinenbau
10/95 – 4/01 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 Diplom Biologie
10/95 - 11/97 Vordiplom Biologie
11/ 97 - 4/01 Diplom Biologie
 1. Hauptfach: Pflanzenphysiologie
 2. Hauptfach: Genetik
 Nichtbiologisches Nebenfach: Biochemie
 Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsgenetik der
 Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Gerd Jürgens
 zum Thema:
 Suche nach Interaktionspartnern der Trichom-
 Verzweigungsmutanten ANGUSTIFOLIA aus *Arabidopsis*
 thaliana
5/01 – 7/05 Universität zu Köln
 Doktorarbeit am Institut für Botanik Lehrstuhl III der
 Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Martin
 Hülskamp zum Thema:
 Funktionelle Analyse des ANGUSTIFOLIA-Gens aus
 Arabidopsis thaliana