

**Funktionelle Charakterisierung von  
SBP-Box-Genen mit Hilfe der  
Modellpflanze *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln  
Vorgelegt von

**Ulrike S. Unte**  
aus Uslar

Köln, 2001

Berichtersatter:

Prof. Dr. Heinz Saedler

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle des Blütenbauplans der Angiospermen.....	1
1.2 Die Rolle der MADS-Domänen-Proteine bei der floralen Transition.....	2
1.3 SBP-Box-Gene .....	3
1.3.1 Die Isolation der ersten SBP-Box-Gene aus <i>Antirrhinum majus</i> .....	3
1.3.2 Die Identifikation von <i>SPL</i> -Genen.....	4
1.3.3 Die konstitutive Expression von <i>SPL3</i> verursacht frühe Blüte in <i>A. thaliana</i> .....	5
1.3.4 <i>LIGULELESS1 (LG1)</i> ist ein SBP-Box-Gen aus <i>Zea mays</i> .....	6
1.4 Transport in und aus dem Zellkern - eine Möglichkeit der Regulation der Funktion von Transkriptionsfaktoren .....	7
1.4.1 Der Import in den Zellkern.....	7
1.4.2 Der Export aus dem Zellkern.....	8
1.5 Ziele der Arbeit.....	9
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Material.....	10
2.1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial.....	10
2.1.2 Lösungen zur Transfektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten.....	11
2.1.3 Lösungen zur Transfektion von <i>Nicotiana tabaccum</i> Protoplasten.....	12
2.1.4 Verwendete Bakterienstämme.....	14
2.1.5 Verwendete Hefestämme.....	15
2.1.6 Verwendeter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm zur Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
2.1.7 Verwendete Vektoren.....	15
2.1.8 Oligonukleotide.....	16
2.1.9 Enzyme.....	16
2.1.10 Chemikalien und sonstige Materialien.....	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	17
2.2.2 Sequenzierungen.....	17
2.2.3 Sequenzanalysen und Datenbanksuchen.....	17
2.2.4 Southern Transfer.....	17

2.2.5 Extraktion von Gesamt-RNA.....	17
2.2.6 Northern Transfer.....	18
2.2.7 Radioaktive Hybridisierungen.....	18
2.2.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	18
2.2.9 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin.....	18
2.2.10 <i>In situ</i> -Hybridisierungen.....	19
2.2.11 Standard PCRs.....	19
2.2.12 RT-PCR (Reverse Transkriptions PCR).....	19
2.2.13 TAIL-PCR ( <i>Thermal asymmetric interlaced</i> -PCR).....	21
2.2.14 SMART <sup>TM</sup> -PCR.....	21
2.2.15 Klonierung von PCR-Produkten.....	21
2.2.16 Isolation von BAC-DNA.....	22
2.2.17 Minipräparation von genomischer Pflanzen-DNA für PCR-Analysen.....	22
2.2.18 Präparation von Pflanzen-DNA für Southern-Analysen.....	22
2.2.19 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente.....	23
2.2.20 Expression von Fusionsproteinen mit Histidin-tag in <i>E. coli</i> .....	23
2.2.21 <i>Target-detection-assay</i> (Thiessen und Bach, 1990).....	24
2.2.22 Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen.....	24
2.2.23 Transfektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten.....	24
2.2.24 Transfektion von <i>Nicotiana tabaccum</i> -BY2-Protoplasten.....	26
2.2.25 Färbung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Infloreszenz-Querschnitten mit Toluidinblau nach Sakai.....	27
2.2.26 Mikroskopische und fotografische Analyse.....	28
2.2.27 Die Identifizierung von <i>spl</i> -Mutanten mit Transposon-Insertionen - „reverse Genetik“.....	28
2.2.28 Die Herstellung bestimmter Plasmid-Konstrukte.....	31
2.2.29 Die Herstellung der verwendeten Gensonden-Fragmente.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Allgemeine Analyse aller <i>SPL</i> -Gene und deren Genprodukte sowie <i>CRSBP1</i> .....	37
3.1.1 Analyse der <i>SPL</i> -Gene und der Phylogenie aller <i>SPL</i> -Proteine.....	37
3.1.2 Die zelluläre Lokalisation von <i>SPL9</i> und <i>SPL3</i> .....	42
3.1.3 Expression von <i>SPL3</i> , <i>SPL8</i> und <i>SPL9</i> in <i>E. coli</i> .....	43
3.2 Die Isolation von <i>CRSBP1</i> aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	45
3.3 Die Identifizierung von <i>spl</i> -Mutanten.....	47

3.3.1 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon außerhalb der offenen Leserahmen von <i>SPL</i> -Genen enthalten.....	48
3.3.2 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon innerhalb des offenen Leserahmens von <i>SPL9</i> enthalten.....	50
3.3.3 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon innerhalb des offenen Leserahmens von <i>SPL8</i> enthalten.....	50
3.4 Die Charakterisierung des <i>SPL9</i> -Gens und der <i>spl9</i> Mutante.....	52
3.4.1 Die Expression von <i>SPL9</i> .....	52
3.4.2 Genotypische Untersuchung der <i>spl9</i> -Mutante.....	55
3.4.2.1 Isolation einer stabilen <i>spl9</i> -Mutante.....	57
3.4.2.2 Klonierung der flankierenden Bereiche des zweiten <i>En-I</i> -Elements aus der Pflanzenlinie 30100.....	59
3.4.3 Phänotypische Untersuchung der <i>spl9</i> -Mutante.....	60
3.4.4 Überexpressionsstudien von <i>SPL9</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
3.4.6 <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Experimente mit <i>SPL9</i> .....	62
3.5 Die Identifikation und Charakterisierung von <i>SPL15</i> .....	65
3.5.1 Die Isolation der <i>SPL15</i> -cDNA.....	67
3.5.2 Die Expression von <i>SPL15</i> .....	68
3.5.3 Überexpressions- und <i>antisense</i> Expressionsstudien von <i>SPL15</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	70
3.6 Die Charakterisierung des <i>SPL8</i> -Gens und der <i>spl8</i> -Mutante.....	71
3.6.1 Die Expression von <i>SPL8</i> .....	72
3.6.2 Genotypische Untersuchung der <i>spl8</i> -Mutanten.....	73
3.6.3 Phänotypische Untersuchungen der <i>spl8</i> -Mutante.....	73
3.6.4 Der Vergleich der <i>spl8</i> -Mutante mit der <i>myb26-1A</i> -Mutante.....	82
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>85</b>
4.1 Allgemeine Analyse der <i>SPL</i> Gene.....	85
4.2 Isolation eines SBP-Box-Gens ( <i>CRSBP1</i> ) aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	90
4.3 <i>SPL8</i> , <i>SPL9</i> und <i>SPL15</i> werden in verschiedenen Teilen von <i>Arabidopsis thaliana</i> unterschiedlich exprimiert.....	92
4.4 Die Suche nach <i>spl</i> -Mutanten.....	93
4.5 <i>SPL9</i> konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in bestehende Netzwerke eingeordnet werden.....	95
4.6 Die Beteiligung von <i>SPL</i> -Proteinen an Apomixis.....	98

4.7 Die <i>spl8</i> -Mutante weist eine reduzierte männliche Fertilität auf.....	101
4.8 <i>LIGULELESS1</i> ist mit <i>SPL8</i> verwandt.....	104
4.9 Ausblick.....	105
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>6. English abstract.....</b>	<b>108</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>9. Nomenklatur.....</b>	<b>117</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>118</b>
Anhang A: Die genomische Sequenz von <i>SPL8</i> .....	118
Anhang B: Die genomische Sequenz von <i>SPL9</i> .....	120
Anhang C: Die genomische Sequenz von <i>SPL15</i> .....	123
Anhang D: <i>En-1</i> -Insertionen in <i>SPL</i> -Genen.....	126
Anhang E: Verwendete Oligonukleotide.....	128
Eidesstattliche Erklärung.....	132
Danksagung.....	133
Lebenslauf.....	134

## 1. Einleitung

Nicht alle Gene eines Organismus sind gleichzeitig aktiv, sondern werden den Erfordernissen des Entwicklungszustandes, des Zell- oder Gewebetyps und den Umweltbedingungen entsprechend in ein Genprodukt umgesetzt. Für die Aktivierung oder Reprimierung von Genen sind Transkriptionsfaktoren verantwortlich. In einem komplexen Netzwerk regulieren sie somit die Expression von Genen, so daß der entsprechende Organismus die, den jeweiligen Anforderungen entsprechend benötigten Genprodukte in der in der richtigen Menge zur Verfügung hat.

Mutation der Gene, die Transkriptionsfaktoren kodieren, hat oft dramatische Auswirkungen auf den entsprechenden Organismus. Gut untersuchte Beispiele sind Mutationen in Genen der Mitglieder der Homöobox-Transkriptionsfaktoren-Familie. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Individualentwicklung der Tiere. Ein bekanntes Beispiel, das den Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die Individualentwicklung gut veranschaulicht und deswegen aus vielen Lehrbüchern bekannt ist, ist der Ausfall des *ANTENNAPEDIA*-Gens in *Drosophila melanogaster*, wodurch Fliegen entstehen, die Beine anstelle von Antennen am Kopf tragen (Gehring *et al.*, 1992; McGinnis und Kuziora, 1994; Gehring, 2001).

Auch in Pflanzen regulieren Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen. Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren wird auch dadurch verdeutlicht, daß im *Arabidopsis thaliana*-Genom 1533 Gene vorhanden sind, die Transkriptionsfaktoren kodieren, was 5,9 % des gesamten Genoms entspricht (Riechmann *et al.*, 2000). Eine der am besten untersuchten Familien pflanzlicher Transkriptionsfaktoren sind die MADS-Domänen-Proteine, durch die unter anderem die Architektur von Blüten bestimmt wird (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Theißen und Saedler, 1995). Aus diesem Grund soll an dieser Stelle ausführlicher auf sie eingegangen werden.

### 1.1 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle des Blütenbauplans der Angiospermen

Besonders gut untersucht sind homöotische Blütenmutanten der Modellpflanzen *Antirrhinum majus* (*A. majus*) und *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994).

Die Identität der Blütenorgane dieser Modellpflanzen und vermutlich aller höheren Angiospermen wird über das kombinatorische Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren festgelegt (Theißen und Saedler, 1995). Die Funktion der Entwicklungskontrollgene wird in Pflanzen weitestgehend von Mitgliedern der MADS-Box-Genfamilie übernommen (zusammenfassend behandelt von Riechmann und Meyerowitz, 1997; Theißen *et al.*, 2000). Es können drei verschiedene Klassen von Blütenorganidentitätsfunktionen unterschieden werden, die mit A, B und C bezeichnet werden. Die A-Funktion spezifiziert die Sepalen; die A- und die B-Funktion zusammen werden benötigt, damit Petalen gebildet werden; die B-Funktion zusammen mit der C-Funktion legt die Identität der Staubblätter fest und die C-Funktion alleine schließlich spezifiziert die Identität der Karpelle (Haughn und Sommerville, 1988; Weigel und Meyerowitz, 1994). Zu den A-Funktionsgenen in *A. thaliana* zählen *APETALA1* (*API*; Mandel *et al.*, 1992) und *APETALA2* (*AP2*), wobei *AP2* kein MADS-Box-Gen ist, sondern zu der Gruppe der *AP2*-ähnlichen Gene gehört (Jofuku *et al.*, 1994). B-Funktionsgene sind die *Arabidopsis*-Gene *APETALA3* (*AP3*; Jack *et al.*, 1992) und *PISTILLATA* (*PI*; Goto und Meyerowitz, 1994) bzw. die *Antirrhinum*-Gene *DEFICIENS* (*DEF*; Sommer *et al.*, 1990; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992) und *GLOBOSA* (*GLO*; Tröbner *et al.*, 1992). Als C-Klassengene werden *AGAMOUS* (*AG*) aus *Arabidopsis* (Yanofsky *et al.*, 1990) bzw. *PLENA* (*PLE*) sowie *FARINELLI* (*FAR*) aus *Antirrhinum* (Bradly *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1999) bezeichnet.

Außer in *A. thaliana* konnten bislang keine A-Funktionsverlustmutanten identifiziert werden. Diese Funktion ist möglicherweise nicht auf andere Pflanzen übertragbar. Das *API*-Genprodukt erfüllt in der Entwicklung von *A. thaliana* neben der A-Funktion auch die Aufgabe eines floralen Meristemidentitätsgens. Diese letzte Funktion wird in *A. majus* durch das zu *API* orthologe Gen *SQUAMOSA* (*SQUA*; Huijser *et al.*, 1992) erfüllt.

## 1.2 Die Rolle der MADS-Domänen-Proteine bei der floralen Transition

Die Umschaltung von der vegetativen Phase in die generative Phase der Individualentwicklung einer Pflanze wird als florale Transition bezeichnet. Diese wird durch äußere Faktoren wie Licht und Temperatur und durch genetische Faktoren beeinflusst. In *A. thaliana* ist die florale Transition gut untersucht worden. Viele Mutanten, in denen der Zeitpunkt der Umschaltung von vegetativem zu generativem Wachstum verändert ist, sind in der Literatur beschrieben worden (zusammengefaßt durch Levy und Dean, 1998).



*FLOWERING LOCUS C* (*FLC*; Michaels und Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999) *FLOWERING LOCUS M* (*FLM*; Scortecci *et al.*, 2001) und *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*; Hartmann *et al.*, 2000) gehören auch zu der Familie der MADS-Box-Gene und ihre Genprodukte agieren als Repressoren der floralen Transition.

Der Übergang von vegetativem zu generativem Wachstum ist mit grundlegenden Veränderungen im Bauplan einer Pflanze verbunden. Die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Voraussetzung für den Eintritt in die generative Phase und die Bildung von Blüten, ist die Änderung der Identität der Sproßapikalmeristeme. Am vegetativen Sproßapex von *A. thaliana* bilden sich Primordien, aus denen Blätter entstehen. In den Achseln der Rosettenblätter wiederum befinden sich undeterminierte laterale sekundäre Sproßmeristeme. Nach der Umschaltung zum generativen Wachstum entstehen an den Flanken der Sproßapikalmeristeme florale Meristeme, die Blütenprimordien bilden. Florale Meristeme zeichnen sich im Gegensatz zu vegetativen- und Infloreszenzmeristemem durch determiniertes Wachstum aus (zusammengefaßt durch Ma, 1998).

Die Identität von Meristemen wird genetisch durch Meristemidentitätsgene bestimmt. *SQUAMOSA* ist ein florales Meristemidentitätsgen aus *A. majus* (*SQUA*; Huijser *et al.*, 1992). Das orthologe *A. thaliana*-Gen ist *API* (Mandel *et al.*, 1992). Funktionsverlustmutanten in Meristemidentitätsgenen zeichnen sich durch den Verlust des determinierten Wachstums und die Rückkehr zu Infloreszenz-ähnlichem indeterminierten Wachstum aus.

### 1.3 SBP-Box-Gene

Die Genprodukte von SBP-Box-Genen (S*QUAMOSA* P*PROMOTER* B*INDING* P*ROTEIN*) stellen im Gegensatz zu MADS-Domänen-Proteinen eine unbekannte Familie putativer Transkriptionsfaktoren dar.

#### 1.3.1 Die Isolation der ersten SBP-Box-Gene aus *Antirrhinum majus*

*SBP1* und *SBP2* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN1* bzw. 2) wurden von Klein *et al.* (1996) aufgrund der Fähigkeit ihrer Genprodukte, an ein Sequenzmotiv im Promotor des MADS-Box-Gens *SQUAMOSA* zu binden aus *A. majus* isoliert. *SBP1* und *SBP2* sind Mitglieder eine neuen Genfamilie putativer Transkriptionsfaktoren, deren

Genprodukte sich durch die hohe Konservierung der DNA-Bindedomäne, die als SBP-Domäne bezeichnet wird, auszeichnen (Klein *et al.*, 1996). Obwohl im Laufe der letzten Jahre viele Genome tierischer Organismen und von Hefe komplett sequenziert wurden (Adams, 2000; Blattner *et al.*, 1997; Goffeau *et al.*, 1996; Mewes *et al.*, 1997; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), konnten SBP-Box-Gene bisher ausschließlich in höheren Pflanzen identifiziert werden (Cardon *et al.*, 1999). 45 % aller im *A. thaliana*-Genom vorhandenen Transkriptionsfaktoren sind pflanzenspezifisch. Meist sind sie aber Mitglieder großer Genfamilien, wie z. B. der MADS-Box-Genfamilie (Riechmann *et al.*, 2000). Die SBP-Box-Genfamilie hingegen ist eine relativ kleine Genfamilie. Schätzungen zufolge besteht sie in *A. thaliana* aus 18 Genen (Cardon *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Die Identifikation von *SPL*-Genen

Die zu den SBP-Genen aus *A. majus* homologen Gene aus *A. thaliana*, *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*-Gene (*SPL*-Gene), wurden von Cardon *et al.* (1997 und 1999) isoliert. Ebenso wie SBP sind auch die *SPL*-Proteine in der Lage, ein Sequenzmotiv in dem Promoter von *SQUA* und auch von *API*, dem putativen *SQUA*-Ortholog aus *A. thaliana*, *in vitro* zu binden (Cardon *et al.*, 1997). Von Cardon *et al.* (1999) konnten zwölf vollständige und zwei unvollständige *SPL*-Gene aus *A. thaliana* isoliert werden. Außer auf Chromosom 4 sind sie über das gesamte *Arabidopsis*-Genom verteilt zu finden. Außerhalb der hoch konservierten SBP-Box weisen sie nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zueinander auf. Bemerkenswert allerdings ist die Tatsache, daß es Paare von Genen gibt, die eine größere Ähnlichkeit zueinander erkennen lassen, als zu den anderen Mitgliedern der Familie. Neben der Ähnlichkeit auf Sequenzebene, ist auch die Position der Introns, sowie die Anzahl der Introns in den Genen dieser Paare konserviert (Cardon *et al.*, 1999).

Die Anzahl der Introns reicht von einem bis zu neun Introns pro Gen, wobei die SBP-Box immer an der gleichen Stelle von einem Intron unterbrochen wird. Der Vergleich der Introns in der SBP-Box zwischen den einzelnen *SPL*-Genen zeigte, daß diese, sowohl bezüglich der Größe als auch der Sequenzähnlichkeit variabel sind. Eine phylogenetische Analyse aller bislang bekannten SBP-Box-Gene, basierend auf der Sequenz in der SBP-Box, unterstützt die Hypothese der Gruppenbildung innerhalb der *SPL*-Gene. *SPL*-Gene, die eine ähnliche Exon-Intron Struktur aufweisen, scheinen phylogenetischen Analysen zufolge ähnlicher zu sein, als

solche mit einer voneinander abweichenden Exon-Intron-Verteilung (Cardon *et al.*, 1999). In Northernblot-Analysen zeigen *SPL*-Gene mit größerer Sequenzähnlichkeit zueinander auch ein ähnliches Expressionsmuster. Einige *SPL*-Gene werden entwicklungspezifisch reguliert, während andere konstitutiv exprimiert werden. Durch Northernblot-Analysen konnte gezeigt werden, daß sowohl *SPL4* als auch *SPL5* in Infloreszenzen exprimiert werden, also ein gleiches Expressionsmuster aufweisen. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungs-Experimenten konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Transkript von *SPL4* im Flankenmeristem lokalisiert ist, wohingegen das von *SPL5* im Infloreszenzapikalmeristem und in jungen Blüten zu finden ist (Cardon *et al.*, 1999). Die Transkripte ähnlicher *SPL*-Gene können also in verschiedenen Abschnitten von Geweben lokalisiert sein.

### 1.3.3 Die konstitutive Expression von *SPL3* verursacht frühe Blüte in *A. thaliana*

SBP-Box-Gene wurden isoliert, um mehr über die florale Transition zu erfahren. Wie oben beschrieben sind sie in der Lage, ein Sequenzmotiv im Promotor von *SQUA* zu binden. *SPL*-Gene wiederum erkennen und binden ebenfalls ein Sequenzmotiv im *API*-Promotor, dem *SQUA* Ortholog aus *A. thaliana*. Durch die konstitutive Überexpression von *SPL3*, dem möglichen Ortholog von *SBP1*, sollte nachgewiesen werden, daß *API* ein Zielgen des *SPL3*-Proteins ist (Cardon *et al.*, 1997).

Die konstitutive Überexpression von *SPL3* unter der Kontrolle des 35S-Promoters des Blumenkohl-Mosaikvirus in *A. thaliana* führt zu früh blühenden Pflanzen (Cardon *et al.*, 1997). Auch die Überexpression von *API* resultiert in diesem Phänotyp (Mandel und Yanofsky, 1995). *SPL3* wird in Wildtyppflanzen im Infloreszenzapikalmeristem sowie in Blütenprimordien exprimiert aber auch im vegetativen Apikalmeristem, Blattprimordien und in der Infloreszenzachse (Cardon *et al.*, 1997). Das putative Zielgen vom *SPL3*-Genprodukt, *API*, wird in Wildtyppflanzen hingegen in jungen Blütenprimordien und in späteren Stadien in den Petalen exprimiert (Mandel *et al.*, 1992). *SPL3* wird somit teilweise in den gleichen Geweben wie *API* exprimiert, desweiteren ist sein Genprodukt in der Lage an ein Sequenzmotiv im *SQUA*-Promotor zu binden und die konstitutive Überexpression beider Gene führt in *A. thaliana* zu früher Blüte. Expressionsstudien von *API* in Pflanzen, die *SPL3* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promoters des Blumenkohl-Mosaikvirus exprimieren verdeutlichten aber, daß *API* nicht wie erwartet ein direktes Zielgen von *SPL3* sein kann. Die Expression von *API* weicht in *SPL3* konstitutiv exprimierenden

*A. thaliana*-Pflanzen nicht von dem im Wildtyp beobachteten Expressionsmuster ab (Cardon *et al.*, 1997). Die Funktion von *SPL*-Genen bleibt demzufolge weiterhin unklar.

#### **1.3.4 *LIGULELESS1 (LG1)* ist ein SBP-Box-Gen aus *Zea mays***

Auch in andern Pflanzen ist wenig über die Funktion von SBP-Box-Genen bzw. ihrer Genprodukte bekannt. Die einzige bislang in der Literatur beschriebene Mutante für ein SBP-Box-Gen ist die Funktionsverlustmutante *liguleless1* aus *Zea mays* (Moreno *et al.*, 1997). *lg1*-Pflanzen zeichnen sich durch das Fehlen von Ligulen und Aurikeln am Maisblatt aus, außerdem ist die Grenze zwischen der Blattscheide und der Blattspreite in *lg1*-Mutanten nicht mehr so eindeutig erkennbar wie im Wildtyp. Als Ligulen (Blatthäutchen) werden nach Rothmaler, Exkursionsflora, Anhängsel an der Übergangsstelle zwischen der Oberseite der Blattscheide und der Blattspreite bezeichnet. Sie stellen Nebenblätter dar. Aurikel (Öhrchen) hingegen sind krallenförmige oder lappige, stets von der Blattspitze weggerichtete Anhängsel verschiedenen Ursprungs. Durch sie liegt das Maisblatt nicht in seiner ganzen Länge am Stengel an. Von Mooney und Freeling (1997) wurde über die Homologie von Ligulen und Stipeln spekuliert. Stipeln sind Nebenblätter, die in *A. thaliana* schon früh in der Blattentwicklung zurückgebildet werden. Nach Cardon *et al.* (1999) ist *SPL8* das ähnlichste Gen zu *LG1*. Allerdings kann keine klare Sequenzähnlichkeit außerhalb der SBP-Box festgestellt werden.

In der SBP-Domäne von *LG1* und auch allen *SPL*-Proteinen befindet sich ein gut konserviertes zweiteiliges Kernlokalisationsignal (Moreno *et al.*, 1997; Cardon *et al.*, 1997 und 1999). Durch translationale Fusionen von *LG1* mit GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN aus *Aequorea victoria*; Prasher *et al.*, 1990) wurde von Moreno *et al.* (1997) gezeigt, daß *LG1* in den Zellkernen von *Allium cepa*-Protoplasten (Zwiebel) lokalisiert ist. Allerdings ist das *LG1::GFP*-Protein auch nach der Deletion des basischen zweiteiligen Kernlokalisationssignals ausschließlich in den Zellkernen nachweisbar. Dies wird von Moreno *et al.* (1997) als Hinweis darauf gewertet, daß ein weiteres, nicht so leicht zu identifizierendes, Kernlokalisationsignal in *LG1* vorhanden ist.

## 1.4 Transport in und aus dem Zellkern - eine Möglichkeit der Regulation der Funktion von Transkriptionsfaktoren

### 1.4.1 Der Import in den Zellkern

Makromoleküle müssen zwischen den Kompartimenten der eukaryotischen Zelle transportiert werden. Alle kernkodierte Proteine werden im Cytoplasma synthetisiert und diejenigen, die im Zellkern eine Funktion haben, müssen anschließend dorthin transportiert werden. Prinzipiell können Proteine bis zu einem Durchmesser von 9 nm und einem Molekulargewicht von 60 kDa durch Diffusion in den Zellkern gelangen. Von dieser Möglichkeit wird aber kaum Gebrauch gemacht. Die meisten Proteine werden aktiv von speziellen Transportproteinen durch die Kernporen in den Zellkern transportiert (zusammenfassend behandelt von Mattaj und Englmeier, 1998; Nakielny und Dreyfuss, 1999).

Bei dem aktiven Transport von Proteinen durch die Kernporen spielt der RAN-GTPase-Zyklus eine entscheidende Rolle. RAN, ein kleines GTP-bindendes Protein, ist vor allen Dingen im Zellkern nachweisbar. RAN alleine hat nur eine geringe Nukleotidaustausch- und Hydrolyseaktivität (Melchior und Gerace, 1998; Moore, 1998). Stimuliert werden diese Aktivitäten durch das *GTPASE ACTIVATING PROTEIN* (RANGAP) und einen Nukleotidaustauschfaktor (RANGEF). RANGAP ist vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Mahajan *et al.*, 1998), RANGEF hingegen ist überwiegend im Zellkern zu finden (Ohtsubo *et al.*, 1989). Das im Zellkern vorliegende RAN ist demzufolge vorwiegend mit GTP beladen (RANGTP), das cytoplasmatische hingegen mit GDP (RANGDP). RANGTP sorgt im Zellkern dafür, daß die Importtransporter von den transportierten Proteinen dissoziieren (Rexach und Blobel, 1995; Gorlich *et al.*, 1996; Hieda *et al.*, 1999).

Proteine, die in den Zellkern importiert werden, besitzen ein Kernlokalisierungssignal. Verschiedenste Arten von Kernlokalisierungssignalen sind in der Literatur beschrieben. Die wohl bekanntesten sind die einfachen basischen wie im großen SV40-Antigen und die zweiteilig basischen von Nucleoplasminen (zusammengefaßt von Mattaj und Englmeier, 1998 und siehe auch Verweise dort). SPL-Proteine besitzen wahrscheinlich zweiteilig basische Kernlokalisierungssignale (Cardon *et al.*, 1997 und 1999).

Der Transportprozeß von Proteinen in den Zellkern bietet Raum für Regulationsmechanismen (zusammengefaßt von Mattaj und Englmeier 1998; Hood und Silver, 1999). Wo in der Zelle ein bestimmtes Protein zu welchem Zeitpunkt, Entwicklungsstadium oder Umweltbedingung lokalisiert ist, ist entscheidend für seine Funktion. Transkriptionsfaktoren und andere DNA-bindende Proteine müssen, um ihre Aufgabe erfüllen zu können, in den Zellkern transportiert werden. Durch Phosphorylierungen der Proteine kann die Affinität zu den Transportern modifiziert werden. Manche Proteine werden durch Phosphorylierungen vom Import in den Zellkern ausgeschlossen, wie z. B. das ADENOMATOUS-POLYPOSIS-COLI-Protein (Zhang *et al.*, 2000). Andere wiederum müssen phosphoryliert werden, damit sie in den Kern transportiert werden. Ein Beispiel für letzteres sind die SMAD-Proteine, die von einer Serin-Threonin-Rezeptorkinase phosphoryliert werden. SMAD leitet sich von *MAD* und *SMA* her, welche Signaltransduktionsproteine aus *Xenopus* sind. *SMAD*-Gene werden als die Wirbeltierhomologen zu den beiden *Xenopus*-Genen gesehen (zusammengefaßt durch: Heldin *et al.*, 1997; Wrana und Attisano, 2000).

Das MADS-Domänen-Protein AGL15 (AGAMOUS-like15) wird in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium von *A. thaliana* in den Zellkern transportiert und ist an reproduktiven Vorgängen beteiligt. Vor der Fertilisierung ist AGL15 im Cytoplasma zu finden, in frühen Stadien der Embryonalentwicklung von *A. thaliana* hingegen akkumuliert es im Zellkern (Perry *et al.*, 1996).

#### **1.4.2 Der Export aus dem Zellkern**

Exporttransporter arbeiten mit entgegengesetztem Mechanismus wie die oben beschriebenen Importtransporter. Sie binden Makromoleküle, wenn RANGTP vorhanden ist und exportieren Makromoleküle aus dem Zellkern ins Cytoplasma (Kutay *et al.*, 1997).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus auf den hier kurz eingegangen werden soll, ist der Export von RNAs in das Cytoplasma. RNAs werden in Form von RNPs (Ribonukleoproteinpartikel) transportiert. Die Cap-Struktur der mRNAs und die Poly-A-Schwänze scheinen eine Rolle bei dem Export zu spielen (Jarmolowski *et al.*, 1994). Ungespleißte RNAs werden im Allgemeinen ebensowenig aus dem Zellkern transportiert wie die gespleißten Introns selbst. Auf der Ebene des differentiellen Spleißens kann demzufolge in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand, des Organs oder der Umwelt die Synthese von Proteinen reguliert werden (auch zusammengefaßt von Simpson und Filipowicz, 1996).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen von SBP-Domänen-Proteinen mit Hilfe des Modellorganismus *A. thaliana* aufgeklärt werden.

Durch die Technik der „reversen Genetik“ sollten hierzu vorrangig Mutanten aus bestehenden mutagenisierten Populationen von *A. thaliana*-Pflanzen identifiziert werden. Anschließend sollten die identifizierten Mutanten genotypisch und phänotypisch untersucht werden.

Des Weiteren sollte die zelluläre Lokalisation von SPL-Proteinen untersucht werden. Um außerdem mehr über die Funktion von SPL-Proteinen zu erfahren, sollten mögliche Zielgene von SPL-Proteinen identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

##### Arabidopsis thaliana

Für alle Experimente wurde *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia-0 verwendet (im Folgenden als *A. thaliana* bzw. *Arabidopsis* bezeichnet). Die Pflanzen wurden in Klimakammern (Conviron) oder im Gewächshaus mit Zusatzlicht in Plastikschaalen kultiviert. Als Substrat diente Erde (Typ ED73, Werkverband EV). Als Wachstumsbedingungen wurden Langtag (16 Stunden Licht) oder Kurztag (acht Stunden Licht), entsprechend der aktuellen Fragestellung gewählt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Pflanzen durch Selbstbefruchtung vermehrt.

##### Verwendete *A. thaliana* Pflanzenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Ursprung
5APB95	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion in der Nähe von <i>SPL3</i>	ZIGIA-Population
6AQ4	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion in der Nähe von <i>SPL4</i>	ZIGIA-Population
5AQB88	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion in der Nähe von <i>SPL5</i>	ZIGIA-Population
6AAH110	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion in der Nähe von <i>SPL6</i>	ZIGIA-Population
7AR25	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion in der Nähe von <i>SPL12</i>	ZIGIA-Population
5AVB	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im ersten Intron von <i>SPL9</i>	ZIGIA-Population
5ABA11	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im ersten Exon von <i>SPL9</i>	ZIGIA-Population
5ABA33	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im ersten Exon von <i>SPL9</i>	ZIGIA-Population
7AT39	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im zweiten Exon von <i>SPL8</i>	ZIGIA-Population
5ATA20	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im zweiten Exon von <i>SPL8</i>	ZIGIA-Population
30213	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im ersten Exon von <i>SPL8</i>	SLAT-Kollektion
30214	hat unter anderem eine <i>En-1</i> -Insertion im ersten Exon von <i>SPL8</i>	SLAT-Kollektion



Bezeichnung	Genotyp	Ursprung
30100	hat eine vier Basenpaar-Insertion im ersten Exon von <i>SPL9</i> und eine <i>En-1</i> -Insertion in einem Gen unbekannter Funktion	ZIGIA-Population
30215 bis 30219	enthalten nur eine vier Basenpaar-Insertion im ersten Exon von <i>SPL9</i>	ZIGIA-Population
30220 bis 30222	enthalten nur ein Insertion in dem Gen mit unbekannter Funktion	ZIGIA-Population
30103	35S:: <i>SPL9sense</i> T0-Generation	T-DNA Transformation
30104 bis 30115	35S:: <i>SPL9sense</i> T1-Generation	T-DNA Transformation
30157 bis 30181	35S:: <i>SPL9sense</i> T2-Generation	T-DNA Transformation
30130	35S:: <i>SPL15sense</i> T0-Generation	T-DNA Transformation
30131	35S:: <i>SPL15antisense</i> T0-Generation	T-DNA Transformation
30211	<i>En-1</i> im MYB26-1A-Gen	ZIGIA-Population

#### A. thaliana-Zellsuspensionskultur At7

Die Kultivierung der Zellkultur erfolgte wie bei Trezzini *et al.* (1993) beschrieben.

#### Nicotiana tabaccum Zellsuspensionskultur BY2 (freundlicherweise von Dr. G. Jach, (MPIZ) zur Verfügung gestellt)

Die Zellen wurden in einem Murashige und Skoog (MS) Pflanzenmedium (Murashige und Skoog, 1962) kultiviert.

### **2.1.2 Lösungen zur Transfektion von A. thaliana Protoplasten**

#### B5-Lösung + 0,4 M Saccharose

Gamborg`s B5 Medium (Sigma)      eine Packung für einen Liter

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure      1 mg/l

Saccharose      136 g/l

pH 7,5, mit NaOH eingestellt

sterilfiltriert

#### Enzymlösung

Zellulase Onozuka R10      11,7 U/ml

Mazerozym R-10      0,25 %

CaCl<sub>2</sub>      0,24 M

sterilfiltriert

PEG-Lösung

PEG 6000	25 %
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	100 mM
Mannitol	450 mM
pH 9,0, mit KOH eingestellt	
sterilfiltriert	

**2.1.3 Lösungen zur Transfektion von *Nicotiana tabaccum* Protoplasten**

Murashige und Scoog-Medium, dem folgende Substanzen zugefügt wurden:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l
Myo-Inositol	100 mg/l
Thiamin-HCl	1 mg/l
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,2 mg/l
Saccharose	30 g/l
MES	2 g/l

Der pH wurde mit KOH auf 5,8 eingestellt.

Enzymlösung zum Zellwandverdau

1 % Zellulase Onezuka RS  
0,1 % Pectolyase  
0,4 M Mannitol  
pH 5,5, mit HCl eingestellt  
sterilfiltriert

W5-Medium

154 mM NaCl  
125 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
5 mM KCl  
5 mM Saccharose  
0,1 % MES  
pH 5,8

Mannitol-Magnesium-Medium

450 mM Mannitol

15 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 % MES

pH 5,6, mit KOH einstellen

PEG-Lösung

25 % PEG 1500

0,1 M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

0,45 M Mannitol

0,02 M HEPES

pH 6,0

Protoplasten Kulturmedium K<sub>3</sub>

Makro Elemente:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	250 mg/l
KNO <sub>3</sub>	2500 mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	900 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	250 mg/l
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	133 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	150 mg/l

Mikro Elemente:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 mg/l
Ma <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
KJ	0,75 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l

Vitamine:

Nicotinsäure	1 mg/l
Pyridoxin-HCl	1 mg/l
Thiamin-HCl	10 mg/l

Hormone:

NAA	1 mg/l
Kinetin	0,2 mg/l

Fe-EDTA:

10 ml von Sigma

Myo-Inositol	100 mg/l
Xylose	250 mg/l

Saccharose 0,1 M (ca. 200 mOs)  
0,4 M (ca. 580 mOs)

pH 5,6, mit KOH eingestellt und sterilfiltriert

#### 2.1.4 Verwendete *E. coli* K12 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$  (life technologies, USA)

Genotyp: *F<sup>-</sup> Phi80<sup>?</sup>lacZ<sup>?</sup>M15<sup>?</sup>(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>) deoR thi-1 supE44 I-*gyrA96 relA1**

DH10 $\beta$  (life technologies, USA)

Genotyp: *F<sup>-</sup> mcrA<sup>?</sup>(mrr<sup>-</sup>hsdRMS<sup>-</sup>mcrBC)F80dlacZ<sup>?</sup>M15<sup>?</sup>lacX74 endA1 recA1 deoR<sup>?</sup>(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL<sup>?</sup>*

M15[pREP4] (Gottesmann *et al.*, 1981)

Genotyp: *Nal<sup>s</sup> Str<sup>s</sup> Rif<sup>s</sup> laq<sup>-</sup> Ara<sup>+</sup> Gal<sup>+</sup> Mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> RecA<sup>+</sup> Uvr<sup>+</sup> Lon<sup>+</sup>*

Bestandteil des QIAexpressionist<sup>TM</sup> Systems (Qiagen, Hilden)

SGJ13009[pREP4] (Gottesmann *et al.*, 1981)

Genotyp: *Nal<sup>s</sup> Str<sup>s</sup> Rif<sup>s</sup> laq<sup>-</sup> Ara<sup>+</sup> Gal<sup>+</sup> Mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> RecA<sup>+</sup> Uvr<sup>+</sup> Lon<sup>+</sup>*

Bestandteil des QIAexpressionist<sup>TM</sup> Systems (Qiagen, Hilden)

JM109

Genotyp: *e14-(McrA<sup>-</sup>) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>) supE44 relA1<sup>?</sup>(lac-proAB) [F<sup>-</sup> traD36 proAB lac<sup>f</sup>Z<sup>?</sup>M15]*

GM2163 (Woodcock *et al.*, 1989)

Genotyp: *Farar14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galT22 supE44 hisG4 rps136 (Strr) Xyl-5 mtl-1 dam13 Tn9 (Can<sup>r</sup>) dcm6 mcrB1 hsdR2 (rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) mcrA*

### 2.1.5 Verwendete Hefestämme

#### AH109

Genotyp: *MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4 ?gal80 ?LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-ADE2 URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

(James *et al.*, 1996; A. Holtz, unveröffentlicht)

#### Y190

Genotyp: *MATa ura3-52 his3-2000 lys2-801 ade2-101 try1-901 leu2-3 112 gal4? gal80? cyh<sup>r</sup>2 LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

(Bestandteil des Matchmaker2- bzw. Matchmaker3-Systems der Firma Clontech)

### 2.1.6 Verwendeter *Agrobacterium tumefaciens* Stamm zur Transformation von *A. thaliana*

GV3101[pMP90] (Koncz und Schell, 1986)

Rifampicin- und Gentamycin-resistent

### 2.1.7 Verwendete Vektoren

Vektor	Selektionsmarker	Referenz bzw. Firma
pBAR35S	Kanamycin	
pTOPO Zero blunt	Kanamycin	Invitrogen
pTOPO TA	Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen
pAVA393	Ampicillin	Von Arnim <i>et al.</i> , 1998
pAS2-1	Ampicillin	Clontech
pGBKT7	Kanamycin (Bakterien), Tryptophan (Hefe)	Clontech
pGADT7	Ampicillin (Bakterien), Leucin (Hefe)	Clontech
pQE60	Ampicillin	Qiagen
pQE16	Ampicillin	Qiagen
pQE9	Ampicillin	Qiagen

### **2.1.8 Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Life science (Neu-Isenburg) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang E aufgelistet.

### **2.1.9 Enzyme**

Enzyme wurden von New England Biolabs (USA), Promega (USA), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Alle enzymatischen Reaktionen wurden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

### **2.1.10 Chemikalien und sonstige Materialien**

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Aventis (Hattersheim), BIOMOL (Hamburg), BioRad (USA), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Duchefa (Niederlande), Faust (Köln), Fluka (Schweiz), Invitrogen (Niederlande), Life Science (Neu-Isenburg), MBI Fermentas (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (USA), Promega (Heidelberg), Riedel de Haën (Hannover), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Nylon Membranen von Amersham-Buchler (Braunschweig), Hybond N+, sowie von Roche (Mannheim), ebenfalls positiv geladen, kamen zum Einsatz. Die verwendeten Radioisotope ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) wurden von Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen und hatten eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol. Die verwendeten Antibiotika wurden von Bayer (Leverkusen) bzw. Duchefa (Niederlande) bezogen. Säulen von Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim) sowie Macherey und Nagel (Düren) wurden für die Aufreinigung von DNA verwendet. Röntgenfilme der Firma Kodak (USA) kamen für die Autoradiogramme zum Einsatz. 3 MM Papier wurde von Schleicher und Schuell (Düren) bzw. Whatman (England) bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989 und 2001) durchgeführt.

### 2.2.2 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden von der ADIS-Einheit (*Automatic DNA Isolation and Sequencing*) des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung durchgeführt.

### 2.2.3 Sequenzanalysen und Datenbanksuchen

Die erforderlichen Sequenz- und Phylogenie-Analysen wurden mit dem GCG-Package Version 10 (*Genetics computer group*, Wisconsin, USA) für digital UNIX bzw. mit dem Programm MacVector 6.5<sup>TM</sup> (*Oxford Molecular Group*) durchgeführt. Sequenzvergleiche mit Nukleinsäure- bzw. Proteindatenbanken mit BLAST (Nakai und Kanehisa, 1992) wurden im *world wide web* (www) unter den Adressen: <http://www.genome.ad.jp/> sowie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ausgeführt. Analysen von Proteinmotiven und Phosphorylierungsstellen wurden mit PSORT <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp> bzw. NetPhos 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> durchgeführt.

### 2.2.4 Southern-Transfer

DNA wurde mittels *Downwards-Alkali-Blotting* (Koetsier *et al.*, 1993) auf positiv geladene Membranen übertragen. Der verwendete Transferpuffer besteht aus 0,4 M NaOH. Die Übertragung erfolgte für mindestens drei Stunden bis über Nacht.

### 2.2.5 Extraktion von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *A. thaliana* wurde mit dem *BIOMOL Total RNA Reagent* der Firma BIOMOL (Hamburg) extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst unter flüssigem

Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und dann in Falcon Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.6 Northern-Transfer**

Der Northern-Transfer wurde nach Sommer *et al.* (1990) durchgeführt.

### **2.2.7 Radioaktive Hybridisierungen**

Alle radioaktiven Hybridisierungen, sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden bei einer Temperatur von 65°C über Nacht durchgeführt. Der verwendete Hybridisierungspuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

6 x SSC

0,5 % SDS

5 x *Denhardt`s* Solution

1 mg Heringssperma DNA

10 % Dextransulfat

### **2.2.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Radioaktiv markierte Sonden wurden in der Regel mittels *random priming* mit  $\text{E}^{32}\text{P}$ -adCTP nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Wurde eine strangspezifische Sonde benötigt, wurde diese durch lineare PCR, das heißt unter Verwendung nur eines Oligonukleotids mit einem Standard-PCR-Programm synthetisiert.

### **2.2.9 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin**

Um Digoxigenin-markierte Sonden herzustellen, wurde der *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* von Roche (Mannheim) verwendet und den Angaben des Herstellers Folge geleistet.



### 2.2.10 *In situ*-Hybridisierungen

*In situ*-Hybridisierungen wurden nach Huijser *et al.* (1992) und Samach *et al.* (1997) durchgeführt. Hierzu wurden *A. thaliana* Infloreszenzen mit einem Microtom (Jung, Autocut 2055) in 8µm dicke Längsschnitte zerlegt. Abweichend von dem Originalprotokoll wurden Digoxigenin-markierte RNA-Sonden (Roche Mannheim) verwendet. Um diese herzustellen, wurden PCR-Fragmente hergestellt, die an ihrem 5`-Ende den T7-Promotor enthalten (Logel *et al.*, 1992). Auf diese Weise hergestellte Matrizen wurden für eine *in vitro*-Transkription eingesetzt, die gemäß der Vorschrift des Herstellers der verwendeten RNA-Polymerase (Roche, Mannheim) durchgeführt wurde.

### 2.2.11 Standard-PCRs

Polymerase-Kettenreaktionen wurden in programmierbaren Thermoblöcken mit beheizbarem Deckel - PTC 200 - der Firma MJ Research durchgeführt. Die *Annealing*-Temperaturen variierten zwischen 55°C und 65°C. Die Syntheszeiten waren von der verwendeten Polymerase und der zu erwarteten Fragmentgröße abhängig. Die verwendeten Bedingungen sind im Folgenden aufgelistet:

PCR-Zyklen		Reaktionsgemisch	
94°C	2 Min	25 mM dNTPs	0,5 µl
94°C	30 Sek	10 x Puffer	5 µl
60°C	30 Sek	33 x	Primer (20 pmol/µl)
72°C	30 Sek		DNA-Polymerase
72°C	10 Min		Matrize
			50 ng genomische DNA
			1 – 5 ng Plasmid DNA
15°C	unendlich	Wasser	ad 50 µl

### 2.2.12 RT-PCR (Reverse Transkriptions PCR)

Die RT-PCRs wurden gemäß den Vorgaben von Fermentas durchgeführt, deren Reverse-Transkriptase verwendet wurde. Für die Erststrangsynthese wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Teilen von *A. thaliana*-Pflanzen isoliert (Schote, Infloreszenzspitze samt

Blüten, Sproßachse, Hochblatt sowie Rosettenblatt). Diese diente zunächst als Matrize für eine PCR um festzustellen, ob DNA-Verunreinigungen in den Präparationen vorhanden waren. Wurde in diesem Experiment DNA nachgewiesen, erfolgte eine DNase-Verdau. Dann wurde die RNA mit RNeasy Säulen (Qiagen) aufgereinigt. War in einer PCR mit der so behandelten RNA keine DNA mehr nachweisbar, wurde die RNA für die Erststrangsynthese eingesetzt. Die anschließende PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Zyklen		Reaktionsgemisch	
94°C	2 Min	25 mM dNTPs	0,5 µl
94°C	30 Sek	39 x	10 x Puffer (Roche)
60°C	30 Sek		10 x Puffer (Roche)
60°C	30 Sek		Primer (20 pmol/µl)
72°C	30 Sek		Taq Polymerase (Roche)
72°C	10 Min		1,25 Units
72°C	10 Min		cDNA Erststrang
15°C	unendlich		2 µl
			Wasser
			ad 50 µl

Nach 25 Zyklen der PCR wurden 5 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und die amplifizierten Fragmente elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dann wurde die DNA mittels Southernblotting auf eine positiv geladene Membran übertragen und anschließend mit genspezifischen Sonden unter Standardbedingungen (2.2.7) hybridisiert. Weitere 5 µl wurden nach 40 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen und die amplifizierten Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Diese wurden anschließend nicht auf eine Nylonmembran übertragen.

Die für die RT-PCRs verwendeten Oligonukleotide sind im Folgenden aufgeführt:

Gen	Oligonukleotide	Verwendung
<i>ACTIN1</i>	GC682/GC683	RT-PCR
<i>RAN3</i>	GC709/GC710	RT-PCR
<i>SPL8</i>	GC633/GC634	RT-PCR
<i>SPL8</i>	GC637/GC344	Standard Gensonde für <i>SPL8</i>
<i>SPL9</i>	GC485/GC632	RT-PCR
<i>SPL9</i>	GC483/GC632	Standard Gensonde für <i>SPL9</i>
<i>SPL15</i>	GC664/GC665	RT-PCR
<i>SPL15</i>	GC664/GC665	Standard Gensonde für <i>SPL15</i>

### 2.2.13 TAIL-PCR (*Thermal asymmetric interlaced-PCR*)

TAIL-PCRs zur Klonierung flankierender genomischer Sequenzen von Fremd-DNA-Insertionen in *A. thaliana*-Pflanzen wurden nach Liu *et al.* (1995) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Anhang E aufgelistet (SH35 bis SH42).

### 2.2.14 SMART<sup>TM</sup>-PCR

Für die Isolation von cDNAs wurde ein SMART<sup>TM</sup>-Pool (Clontech) verwendet (freundlicherweise von Dr. U. Hartmann zur Verfügung gestellt). Der SMART<sup>TM</sup>-Pool wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers aus *A. thaliana*-Gesamt-RNA, die aus Infloreszenzspitzen bzw. Rosettenblättern isoliert wurde, hergestellt. Die Methode basiert auf einer Reversen-Transkription von Gesamt-RNA oder polyA<sup>+</sup>-RNA. Die Hersteller versprechen die Reverse-Transkription der RNAs in vollständige cDNAs, einschließlich der schwer zu übersetzenden 5'-Enden. Für die Erststrangsynthese wird ein Oligo(dT)-Oligonukleotid verwendet. Wenn die Reverse-Transkriptase den 5'-Bereich der mRNA erreicht, fügt sie aufgrund ihrer Terminalen-Transferase-Aktivität Nukleotide, bevorzugt Desoxycytosine an das 3'-Ende der cDNA ein. Das SMART<sup>TM</sup>-Oligonukleotid, das in der folgenden Reaktion zum Einsatz kommt zeichnet sich durch das Vorhandensein von einer Oligo(G)-Sequenz an seinem 3'-Ende aus (siehe auch GC361 im Anhang E). Dieser Bereich des SMART<sup>TM</sup>-Oligonukleotids kann mit dem Desoxycytosine-Bereich hybridisieren und so eine verlängerte Matrize für die Reverse-Transkriptase bilden. Diese wechselt dann die Matrize und repliziert das Ende des SMART<sup>TM</sup>-Oligonukleotids. In einer folgenden PCR mit Oligonukleotiden die mit den verbleibenden Teil des SMART<sup>TM</sup>-Oligonukleotids (hier GC362) bzw. des Oligo(dT)-Oligonukleotides hybridisieren (hier GC360), können die synthetisierten cDNA-Einzelstränge amplifiziert werden. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang E aufgeführt.

### 2.2.15 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem TOPO TA- bzw. dem TOPO-*Zero blunt* -Vektor der Firma Invitrogen kloniert. Die Ligation erfolgt in diesem Fall mit Hilfe einer Topoisomerase. Es wurde den Herstellerangaben Folge geleistet.

### **2.2.16 Isolation von BAC-DNA**

BAC-DNA (*Bacterial artificial chromosomes*, Mozo *et al.*, 1998) wurde nach folgendem Protokoll isoliert: Eine Einzelkolonie *DH10 $\beta$* -Zellen, die den entsprechenden BAC enthalten, wurde in 5 ml LB Medium mit 50 $\mu$ g/ml Kanamycin über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde daraufhin in 400 ml LB-Medium mit 50 $\mu$ g/ml Kanamycin überführt und abermals bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden dann durch 20minütige Zentrifugation bei 6000 x g und 4°C geerntet. Anschließend wurden die Maxipräparationssäulen der Firma Qiagen für die weitere Aufreinigung verwendet. In Abwandlung vom Originalprotokoll wurden 50 ml Puffer P1, P2 und P3 verwendet und die Elution der DNA am Ende erfolgte mit 5 x 3 ml auf 65°C vorgewärmten Puffer QF.

### **2.2.17 Minipräparation von genomischer Pflanzen-DNA für PCR-Analysen**

Die Extraktion genomischer DNA, die ausschließlich für PCR-Experimente verwendet wurde, erfolgte nach Edwards *et al.* (1991).

### **2.2.18 Präparation von Pflanzen-DNA für Southern-Analysen**

Etwa 1g Pflanzenmaterial wurde unter Stickstoff gemörsert, dann wurden 10 ml 1 x CTAB-Puffer (Cetyltrimethylammoniumbromid-Puffer) hinzugefügt und der Ansatz 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Chloroform zugefügt und der Ansatz vorsichtig über Kopf geschwenkt. Nach einen anschließenden 30minütigen Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm in der Untertischzentrifuge (Heraeus) wurde die obere wäßrige Phase in ein neues Gefäß überführt und 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat sowie 0,8 Volumenteile Isopropanol zugegeben. Dann erfolgte ein erneuter 30minütiger Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm in der Untertischzentrifuge (Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde nach dem Trocknen in 1880  $\mu$ l TE aufgenommen. Nach einem RNase-Verdau (10 mg/ml) wurden 120  $\mu$ l 5 M NaCl zugegeben und die DNA-Lösung mit Qiagen Tip20-Säulen gemäß der Anleitung des Herstellers (für Plasmid-DNA) aufgereinigt.

### CTAB-Puffer

100 mM Tris/HCl, pH 8,0

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

2 % CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)

TE

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

### **2.2.19 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente**

Für die Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente wurden das Matchmaker2-System und das Matchmaker3-System von Clontech verwendet und der Anleitung des Herstellers Folge geleistet. Hierbei wird das Protein von Interesse als Fusionsprotein mit der GAL4-Bindedomäne exprimiert, während die möglichen interagierenden Proteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind. Interagieren die Proteine miteinander, wird die Transkription von vier Reportergenen (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ*, *MEL1*) aktiviert, wodurch das Wachstum der Hefezellen ermöglicht wird. Der Genotyp des verwendeten Hefestammes AH109 ist in 2.1.5 beschrieben.

*ADE2*: AH109-Zellen brauchen kein Adenin im Medium

*HIS3*: AH109-Zellen brauchen kein Histidin im Medium

*LacZ*<sup>+</sup>: AH109-Zellen sind positiv für  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

*Mel1*<sup>+</sup>: AH109-Zellen sind positiv für  $\alpha$ -Galactosidase-Aktivität

### **2.2.20 Expression von Fusionsproteinen mit Histidin-tag in *E. coli***

Zur Überexpression von Proteinen in *E. coli* wurde das pQE-System von Qiagen verwendet. Die cDNAs wurden in den Vektor pQE60 ligiert. Die exprimierten Proteine besitzen einen C-terminalen Histidin-tag (sechs Histidinreste in Folge). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Nickel-Agarose-Säulen gemäß den Herstellerangaben. Die Qualität und Quantität der so gewonnenen Proteine wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und anschließender Coomassie-Färbung (Coomassie Brilliant blue R-250) überprüft. Um die

Proteine zu renaturieren, wurden sie an die Matrix von NAP-Säulen (Pharmacia) gebunden und anschließend mit Phosphatpuffer von den Säulen eluiert.

Phosphatpuffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300mM NaCl

pH 7,8, mit NaOH eingestellt

### **2.2.21 Target-detection-assay (Thiessen und Bach, 1990)**

Ziel des *target-detection-assays* (Thiessen und Bach, 1990) ist die Bestimmung der Konsensussequenz des Sequenzmotivs von DNA-bindenden Proteinen.

Hierzu werden aufgereinigten Proteine mit einem 75-Basen-langem radioaktiv markiertem Oligonukleotid vermischt. Dies zeichnet sich dadurch aus, daß es an den Enden je 25 Basen determinierter Sequenz besitzt und dazwischen eine degenerierte Sequenz (25 Mal „N“) liegt. Nach Auftrennung auf einem Retardierungsgel werden die Fragmente ausgeschnitten und als Matrize für eine PCR verwendet. Die PCR-Produkte werden in einer folgenden Runde wieder mit dem Protein vermischt und der Zyklus sieben Mal wiederholt. Nach der letzten PCR werden die so gewonnenen Fragmente schließlich kloniert und anschließend sequenziert. Nach Alignment einer großen Anzahl Sequenzen kann so auf die Konsensussequenz der DNA-Bindung der entsprechenden Proteine geschlossen werden.

### **2.2.22 Herstellung transgener *A. thaliana*-Pflanzen**

Transgene *A. thaliana*-Pflanzen wurden nach dem Prinzip des *floral dip* (Clough und Bent, 1998) hergestellt. Die Selektion erfolgte durch das Sprühen der Keimlinge mit einer 0,1 %igen BASTA-Lösung (Aventis). Für 11 Pflanztöpfe mit 12 cm Durchmesser wurden 500 ml BASTA-Lösung gesprüht.

### **2.2.23 Transfektion von *A. thaliana*-Protoplasten**

Anzucht der *A. thaliana*-Protoplasten

Die Protoplasten wurden aus der Zelllinie At7 gewonnen. Eine fünf Tage alte Kultur wurde zunächst im Dunkeln in modifiziertem B5- (Kombrink und Hahlbrock, 1986) sowie

MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) kultiviert. Nach weiteren fünf Tagen konnten die Zellen zur Isolation von Protoplasten verwendet werden.

#### Gewinnung von *A. thaliana*-Protoplasten

(modifiziert nach Dangl *et al.*, 1987)

Die Protoplasten wurden aus einer fünf Tage alten Zellsuspensionskultur (s.o.) gewonnen, indem diese zunächst pelletiert (Minifuge RF, 2000 rpm, 5 min, RT) und anschließend in 30 ml 0,24 M  $\text{CaCl}_2$  Lösung resuspendiert wurden. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (Minifuge RF, 1500 rpm, 5 min, RT) wurden die Zellen in 60 ml Enzymlösung aufgenommen und auf zwei Petrischalen ( $\varnothing$  14,5 cm) verteilt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 26°C unter kontinuierlichem Schütteln (20 rpm) im Dunkeln. Anschließend wurden die Protoplasten noch mal 20 min bei 40 rpm geschüttelt und daraufhin pelletiert (Minifuge RF, 1500 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde mit 0,24 M  $\text{CaCl}_2$  gewaschen und in B5 + 0,4 M Saccharose in einem Endvolumen von 15 ml resuspendiert. Intakte Protoplasten wurden durch eine 8minütige Zentrifugation (Minifuge RF, 800 rpm, 5 min, RT) flotiert und vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Der Flotierungsschritt wurde einmal wiederholt und die so gewonnenen Protoplasten wurden direkt für die Transformationsexperimente verwendet.

#### Transfektion von *A. thaliana*-Protoplasten mittels Polyethylenglykol (PEG)

In 10 ml Zentrifugenröhrchen wurden 200 $\mu$ l Protoplastensuspension vorgelegt und anschließend die zu transfizierende DNA (20  $\mu$ g/40 $\mu$ l, dam $\bar{c}$ ) sowie 200  $\mu$ l PEG Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA-Aufnahme durch die Zugabe von 5 ml 275mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung, pH6,0 gestoppt. Im Anschluß daran wurden die Protoplasten pelletiert (Minifuge RF, 800 rpm, 7 min, RT) und das Pellet in 7 ml B5 + Saccharose aufgenommen. Der Ansatz wurde in den Zentrifugationsröhrchen in waagerechter Position acht Stunden bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Protoplasten fünf Minuten bei 800 rpm zentrifugiert und die flotierenden Protoplasten mit einer Pipette mit weiter Öffnung vorsichtig abgenommen.

## 2.2.24 Transfektion von *Nicotiana tabaccum*-BY2 -Protoplasten

### Gewinnung von *N. tabaccum*-Protoplasten

Die Protoplasten wurden aus einer drei bis vier Tage alten 100-ml-Subkultur geerntet. Hierzu wurden 40 ml der Subkultur durch eine Gaze filtriert und die Zellen mit 10 ml 0,45 M Mannit gewaschen. Anschließend wurden 40 ml Enzymlösung zugegeben und die Zellen in eine Petrischale überführt. Der Verdau der Zellwand erfolgte auf einem Schüttler bei 50 Umdrehungen pro Minute und 26°C im Dunkeln für ein bis zwei Stunden. Daraufhin wurde die Protoplastensuspension in acht Zentrifugenröhrchen aliquotiert und je 6 ml W5-Medium zugegeben. Nach kurzem Durchmischen der Suspension erfolgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 100 x g bei RT. Der Überstand wurde dekantiert und die Protoplasten sofort resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Nach Zugabe von W5-Medium zu einem Endvolumen von 10 ml wurde die Anzahl der Protoplasten (eine 1:10 Verdünnung) in einer Zählkammer bestimmt. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (100 x g, RT, zwei Minuten) wurde die Konzentration der Protoplasten mit Mannitol-Magnesium-Medium auf  $2 \times 10^6$  Protoplasten pro 300  $\mu$ l eingestellt.

### Transfektion von *N. tabaccum*-Protoplasten mittels Polyethylenglycol (PEG)

$2 \times 10^6$  Protoplasten in 300  $\mu$ l Mannitol-Magnesium-Medium werden in eine Petrischale überführt und 600  $\mu$ l 25 % PEG 1500 sowie 10 bis 20  $\mu$ g DNA hinzugegeben und anschließend alles miteinander vermischt. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurde zunächst 1 ml W5-Medium zugegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Anschließend wurden weitere 9 ml W5 Medium zugefügt und der Ansatz vorsichtig vermischt. Die Protoplasten Suspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und vier Minuten bei 100 x g und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 5 ml K<sub>3</sub>, 0,4 M Saccharose resuspendiert. Nach Überführung der Protoplastensuspension in Petrischalen wurden diese mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 26°C im Dunkeln inkubiert.



### 2.2.25 Färbung von *A. thaliana*-Infloreszenz-Querschnitten mit Toluidinblau nach Sakai

*A. thaliana*-Infloreszenzen von unter Langtagbedingungen kultivierten Pflanzen wurden mit Alkohol-Formaldehyd-Eisessig (A) bzw. Formaldehyd (B) nach folgenden Protokollen fixiert:

A.	Ethanol (96 %)	65,6 ml
	Eisessig	5 ml
	Formaldehyd (37 %, Methanol stabilisiert)	5,4 ml

Die Fixierung erfolgte über Nacht bei 4°C.

B.	Formaldehyd (10 %) frisch angesetzt	
	in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0	8 ml
	0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0	4 ml
	Wasser	8 ml

Die Fixierung erfolgte für vier Stunden bei 4°C.

Anschließend wurden die Infloreszenzen in Paraffin eingebettet (Huijser *et al.*, 1992) und mit einem Mikrotom (Jung, Autocut 2055) in 8 µm dicke Querschnitte zerlegt und auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) übertragen. Die Färbung erfolgte während die Schnitte sich noch in dem Paraffin befanden. Hierzu wurde eine wäßrige 0,05 % Toluidinblau-Lösung hergestellt und die Objektträger zwei Minuten in der Färbelösung belassen. Durch einen anschließenden Waschschrift mit demineralisiertem Wasser wurde überschüssige Färbelösung entfernt und die Schnitte gut getrocknet. Im Anschluß daran erfolgte die Entfernung des Paraffins durch dreimalige Inkubation in Histoclear für je drei Minuten. Zum Abschluß wurden die Schnitte mit Entellan überschichtet und mit einem Deckglas versehen.

### 2.2.26 Mikroskopische und fotografische Analyse

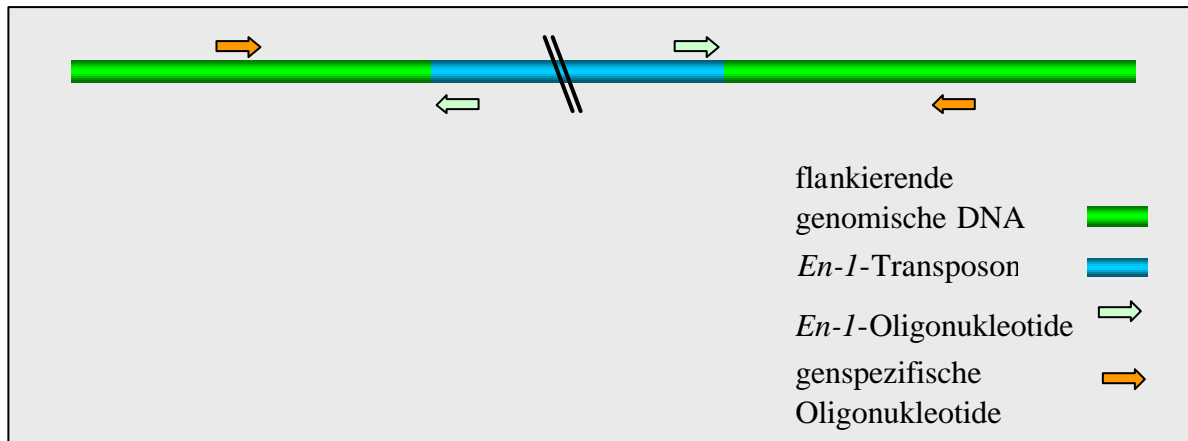
Fotografische Aufnahmen wurden mit einer digitalen Kamera der Firma Canon (Power Shot Pro 70) gemacht und im JPEG-Format gespeichert.

Für die lichtmikroskopischen Analyse wurde ein Mikroskop der Firma Zeiss (Axiophot) sowie ein binokuläres Mikroskop (FluoIII<sup>TM</sup>) der Firma Leica verwendet. Die Dokumentation erfolgte mittels einer mitgelieferten digitalen Kamera (JVC 3 DCC bzw. Diagnostic Instruments INC). Die Bilder wurden elektronisch im TIFF-Format gespeichert.

Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss DSM940 durchgeführt. Dieses Mikroskop war mit einer *Cryo*-Scanning-Funktion ausgestattet, wodurch die Analyse von frischem Pflanzenmaterial ohne vorhergehende chemische Fixierung möglich war. Die Proben wurden lediglich unmittelbar vorher in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die erhaltenen Bilder wurden digitalisiert und im TIFF-Format gespeichert.

### 2.2.27 Die Identifizierung von *spl*-Mutanten mit Transposon-Insertionen - „reverse Genetik“

Um *spl*-Mutanten zu identifizieren, wurde eine bestehende Population von *A. thaliana* Pflanzen durchsucht, die mit dem autonomen Mais-Transposon *En-1* mutagenisiert waren (Wisman *et al.*, 1998). Die Identifikation von mutanten Pflanzen erfolgte durch eine auf der PCR-Technik basierenden Methode (Baumann *et al.*, 1998), die im folgenden beschrieben wird. Hierzu kamen Oligonukleotide mit einer Länge von 27 Basen zum Einsatz (siehe Tabelle unten und Anhang E). Es wurden jeweils zwei Oligonukleotide verwendet, die in dem entsprechenden Gen binden, sowie zwei, die in der Sequenz des *En-1*-Transposons binden (Abb. 2-1).



**Abbildung 2-1:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation von *En-1*-Transposoninsertionen in *SPL*-Genen. Die relativen Größenverhältnisse sind in dieser Abbildung nicht eingehalten.

In Abwandlung des Originalprotokolls wurden pro Ansatz zwei *En-1*-spezifische Oligonukleotide verwendet, da das Transposon in beiden Orientierungen in das Gen integriert sein kann und die Verwendung von drei Oligonukleotiden die Spezifität der PCR nicht erniedrigt, wohl aber die Anzahl der PCR-Reaktionen halbiert. Die Amplifikation eines PCR-Produkts war nur dann möglich, wenn ein Transposon in dem Gen oder in unmittelbarer Nähe integriert war oder wenn zwei Transposons in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander im Genom vorhanden waren. Da die PCR-Produkte auf einem Agarosegel nicht sichtbar waren und um Falschpositive, wie in dem Fall zueinander benachbarter Transposons zu identifizieren, wurden die Gele geblottet und die Filter anschließend mit einer gensepezifischen Gensonde hybridisiert. In einem ersten Schritt wurden *Pools* von ca. 100 verschiedenen Pflanzen untersucht. Die DNA wurde freundlicherweise von der ZIGIA-Gruppe zur Verfügung gestellt. Konnte ein positives Signal in einem der *Pools* identifiziert werden, wurden *Subpools* untersucht, bis auf eine Einzelpflanze geschlossen werden konnte. Nachkommen dieser Pflanze wurden ausgesät und DNA extrahiert. Mittels PCR wurde dann das Ergebnis verifiziert. Konnte die Transposoninsertion bestätigt werden, erfolgte eine Reamplifikation des PCR-Produkts mittels weiter innen liegender Oligonukleotide. Dieses wurden dann sequenziert. In dieser letzten PCR wurden die *En-1*-spezifischen Oligonukleotide nicht mehr gemeinsam in einem Ansatz verwendet.

Da die Gene *SPL1* und *SPL12* bzw. *SPL10* und *SPL11* eine große Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen, wurden für die Durchsuchung der ZIGIA-Population Oligonukleotide entworfen, die in je beiden Genen binden.

Außerdem wurde die Datenbank der SLAT-Kollektion (<http://www.jic.bbsrc.ac.uk/sainsbury-lab/jonathan-jones/SINS-database/sins.htm>; Tissier *et al.*, 1999) des Sainsbury Labors, Norwich, auf *spl*-Mutanten hin untersucht.

Im Folgenden sind die für die Durchsuchung der ZIGIA-Population und die für die Arbeit mit den SLAT-Linien verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Gen	Bezeichnung	Verwendungszweck
<i>SPL1/12</i>	GC626	Transposoninsertionssuche
	GC627	Transposoninsertionssuche
	GC628	Gensondenherstellung
	GC629	Gensondenherstellung
<i>SPL2</i>	GC334	Transposoninsertionssuche
	GC335	Transposoninsertionssuche
	GC127	Gensondenherstellung
	GC333	Gensondenherstellung
<i>SPL3</i>	GC324	Transposoninsertionssuche
	GC325	Transposoninsertionssuche
	GC241	Gensondenherstellung
	GC268	Gensondenherstellung
<i>SPL4</i>	GC336	Transposoninsertionssuche
	GC338	Transposoninsertionssuche
	GC338	Gensondenherstellung
	GC189	Gensondenherstellung
<i>SPL5</i>	GC339	Transposoninsertionssuche
	GC340	Transposoninsertionssuche
	GC113	Gensondenherstellung
	GC340	Gensondenherstellung
<i>SPL6</i>	GC346	Transposoninsertionssuche
	GC560	Transposoninsertionssuche
	GC345	Gensondenherstellung
	GC561	Gensondenherstellung
<i>SPL7</i>	GC347	Transposoninsertionssuche
	GC587	Transposoninsertionssuche
	GC588	Transposoninsertionssuche
	GC589	Transposoninsertionssuche
	GC315	Gensondenherstellung
	GC348	Gensondenherstellung
	GC587	Gensondenherstellung
	GC589	Gensondenherstellung
<i>SPL8</i>	GC633	Transposoninsertionssuche
	GC634	Transposoninsertionssuche
	GC637	Gensondenherstellung
	GC344	Gensondenherstellung
<i>SPL9</i>	GC442	Transposoninsertionssuche
	GC632	Transposoninsertionssuche
	GC409	Gensondenherstellung
	GC483	Gensondenherstellung
<i>SPL10/11</i>	GC622	Transposoninsertionssuche
	GC623	Transposoninsertionssuche
	GC624	Gensondenherstellung
	GC625	Gensondenherstellung

Gen	Bezeichnung	Verwendungszweck
<i>En-1</i>	En205	Transposoninsertionsuche, 5`-Ende
	GC516	Transposoninsertionsuche, 5`-Ende
	GC521	Transposoninsertionsuche, 3`-Ende
	En8130	Transposoninsertionsuche, 3`-Ende
	GC517	Gensondenherstellung; 5`-Sonde
	GC524	Gensondenherstellung; 5`-Sonde
	GC519	Gensondenherstellung; 3`-Sonde
	GC522	Gensondenherstellung; 3`-Sonde
<i>dSpm</i>	GC688	Transposoninsertionsuche, 3`-Ende
	GC689	Transposoninsertionsuche, 3`-Ende
	CG690	Transposoninsertionsuche, 5`-Ende
	GC691	Transposoninsertionsuche, 5`-Ende

Für den Nachweis einer Neuintegration eines Transposons nach der Mobilisierung desselben wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet, die in entgegengesetzter Richtung, relativ zur bekannten Insertionsstelle, verlängert wurden. So wurden nur dann Fragmente amplifiziert, wenn das Transposon in Richtung zu dem Gen hin neu inseriert war.

### 2.2.28 Die Herstellung bestimmter Plasmid-Konstrukte

Im Folgenden wird die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte beschrieben. Die verwendeten Vektoren sind im Abschnitt 2.1.7 aufgelistet und die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide im Anhang E. Die DNA-Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden, wurden nach ihrer Klonierung vollständig sequenziert. Für alle Konstrukte mit Ausnahme von *SPL9*-Konstrukten wurden die cDNAs aus dem *A. thaliana*-Ökotyp „Columbia“ verwendet. Die cDNAs für die *SPL9*-Konstrukte stammen aus dem *A. thaliana*-Ökotyp „Landsberg“ (*errecta*). Die *SPL3*- und *SPL9*-cDNAs wurden freundlicherweise von Dr. G. Cardon zur Verfügung gestellt.

#### Konstrukte für die zelluläre Lokalisation von SPL-Proteinen

##### **pUU7: pAVA393::*SPL3***

Mittels PCR wurde die *SPL3*-cDNA mit den Oligonukleotiden GC647 und GC659 amplifiziert. Die Oligonukleotide enthalten beide eine *NcoI*-Schnittstelle. Nach der Amplifikation erfolgte die Spaltung der Fragmente mit *NcoI*. Danach wurden sie in den ebenfalls mit *NcoI* gespaltenen pAVA393 kloniert.

**pUU5:** pAVA393::*SPL9*

Für die Herstellung dieses Konstrukts wurde die *SPL9*-cDNA vom ATG bis ein Triplet vor dem Stopkodon mit den Oligonukleotiden GC642 und GC655 amplifiziert. Beide Oligonukleotide enthalten eine eingefügte *NcoI*-Schnittstelle und wurden vor der Klonierung in den mit *NcoI* gespaltenen pAVA39 ebenfalls mit *NcoI* gespalten.

Konstrukte für die Expression von *SPL*-Genen in *E. coli*

**pUU4:** pQE60::*SPL3*

Die *SPL3*-cDNA wurde mit den Oligonukleotiden GC647 und GC188 amplifiziert. Das Oligonukleotid GC647 enthält eine *NcoI*-Schnittstelle, das Oligonukleotid GC188 eine *BglII*-Schnittstelle. Anschließend erfolgte die Klonierung in den ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BglII* gespaltenen pQE60-Vektor.

**pUU28:** pQE60::*SPL8*

Die Klonierung erfolgte wie für pUU4 beschrieben. Es kamen die Oligonukleotide GC707 (mit *NcoI*-Schnittstelle) und GC708 (mit *BglII*-Schnittstelle) zum Einsatz. Die *SPL8*-cDNA wurde aus einem SMART-Pool amplifiziert, der freundlicherweise von Dr. U. Hartmann zur Verfügung gestellt wurde (siehe auch 2.2.14).

**pUU16:** pQE60::*SPL9*

Die Klonierung der *SPL9*-cDNA erfolgte wie für pUU4 beschrieben. Es kamen die Oligonukleotide GC642 (enthält eine *NcoI*-Schnittstelle) und GC643 (enthält eine *BglII*-Schnittstelle) zum Einsatz.

*CRSBP1*-Konstrukte

**pUU19:** TOPOblunt::*CRSBP1*-cDNA-Fragment (enthält nur die SBP-Box)

Das *CRSBP1*-cDNA-Fragment wurde mit den Oligonukleotiden GC678 und GC679 mittels einer Topoisomerase-Reaktion in die *EcoRI*-Schnittstelle des TOPOblunt-Vektors kloniert.

**pUU20:** TOPO-blunt::*CRSBP1*-(genomische)-DNA-Fragment (enthält nur die SBP-Box)

Das genomische Fragment von *CRSBP1* wurde wie für pUU19 beschrieben, unter Verwendung der gleichen Oligonukleotide kloniert.

### Konstrukte zur Überexpression von *SPL*-Genen in Pflanzen

#### **pUU2:** pBAR-35S:: *SPL9sense*

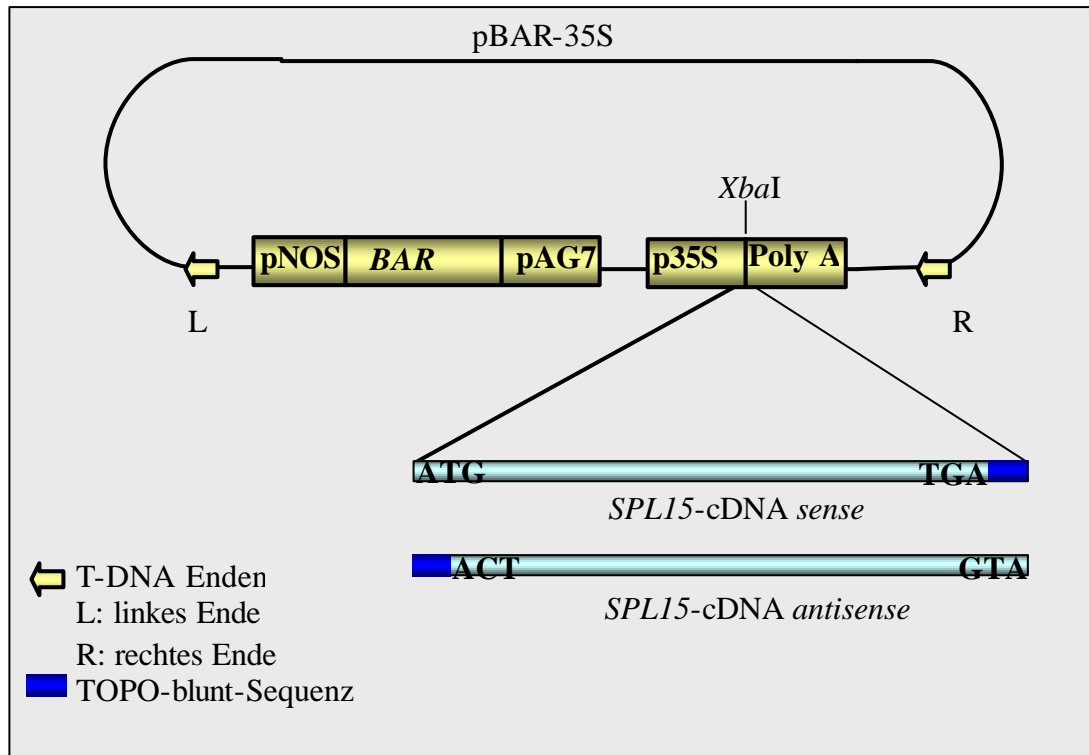
Die *SPL9*-cDNA wurde in *sense* Orientierung mit den Oligonukleotiden GC650 und GC651, die beide eine *Xba*I-Schnittstelle enthalten in den ebenfalls mit *Xba*I gespaltenen pBAR-35S-Vektor kloniert.

#### **pUU14:** pBAR-35S:: *SPL15sense*

Die *SPL15*-cDNA wurde aus dem Plasmid pUU1 (siehe unten) mit den Oligonukleotiden GC668 und GC669 (beide mit *Xba*I-Schnittstelle) in den ebenfalls mit *Xba*I gespaltenen pBAR-35S-Vektor kloniert. Die Restriktionsendonuklease hat die Schnittstelle in dem Oligonukleotid GC669 nicht geschnitten, da *Xba*I ein dam-Methylierungssensitives Enzym ist und unglücklicherweise an dieser Stelle durch das Einfügen der *Xba*I-Schnittstelle eine dam-Methylierungsstelle geschaffen wurde (TGATCTAGA). So wurde lediglich die in dem Plamid pUU1 (Basis: TOPO-blunt) erkannt und geschnitten. Demzufolge enthält pUU14 noch 63 Basenpaare des Plasmids pUU1 (siehe auch Abb. 2-2).

#### **pUU15:** pBAR-35S:: *SPL15antisense*

Die Klonierung erfolgte für pUU14 beschrieben. Da die Klonierung nicht gerichtet erfolgte, konnten auf die beschriebene Art sowohl *sense*- als auch *antisense*-Konstrukte hergestellt werden.



**Abbildung 2-2:** Schematische Darstellung des Konstrukts pBAR-35S::*SPL15-sense* und pBAR-35S::*SPL15-antisense*. Die relativen Größenverhältnisse sind in dieser Darstellung nicht eingehalten.

### Konstrukte für die Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente mit *SPL9*

#### **pUU3:** pAS2-1::*SPL9*

Hierzu wurde der offene Leserahmen *SPL9*-cDNA mit den Oligonukleotiden GC642 (enthält eine *Nco*I Schnittstelle) und GC646 (mit einer *Eco*RI Schnittstelle) amplifiziert und das Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Eco*RI gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation in den Vektor pAS2-1 aus dem Matchmaker2-System (Clontech).

#### **pUU12:** pGBKT7::*SPL9* (Deletionskonstrukt)

Dieses Konstrukt enthält einen Teil der *SPL9*-cDNA ohne den 5'-Bereich und die SBP-Box. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden GC648 (mit *Nco*I Schnittstelle) und GC646 (mit einer *Eco*RI Schnittstelle). Die Fragmente wurden in den ebenfalls mit *Nco*I und *Eco*RI gespaltenen pGBKT7 des Matchmaker3-Systems (Clontech) kloniert.



**pUU23:** pGBKT7::*SPL9* (Deletionskonstrukt)

Die Klonierung erfolgte wie für pUU12 beschrieben. Aber es kamen die Oligonukleotide GC648 und GC699 zum Einsatz.

**pUU24:** pGBKT7::*SPL9* (Deletionskonstrukt)

Die Klonierung erfolgte wie für pUU12 beschrieben. Aber es kamen die Oligonukleotide GC698 und GC701 zum Einsatz.

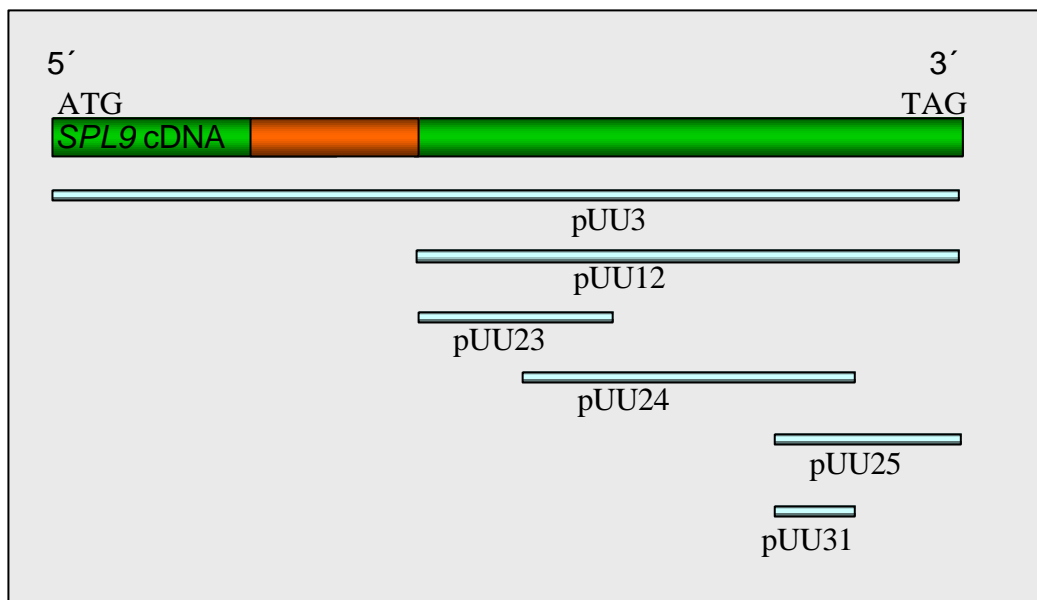
**pUU25:** pGBKT7::*SPL9* (Deletionskonstrukt)

Die Klonierung erfolgte wie für pUU12 beschrieben. Aber es kamen die Oligonukleotide GC646 und GC700 zum Einsatz.

**pUU31:** pGBKT7::*SPL9* (Deletionskonstrukt)

Die Klonierung erfolgte wie für pUU12 beschrieben. Aber es kamen die Oligonukleotide GC700 und GC701 zum Einsatz.

Siehe auch Abbildung 2-3 für die schematische Darstellung der relativen Position der Deletionskonstrukte pUU12, pUU23 bis pUU25 sowie pUU31 in der *SPL9*-cDNA.



**Abbildung 2-3:** Schematische Darstellung der für die Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente verwendeten Konstrukte.

Sonstige Plasmide**pUU1:** TOPO-blunt::*SPL15*-cDNA

Die Klonierung erfolgte mit den Oligonukleotiden GC668 und GC669 (beide mit einer *Xba*I-Schnittstelle) mittels einer Topoisomerase-Reaktion in den Vektor TOPO-blunt. Die *SPL15*-cDNA wurde aus einem SMART-Pool amplifiziert, der freundlicherweise von Dr. U. Hartmann zur Verfügung gestellt wurde (siehe auch 2.2.14).

**2.2.29 Die Herstellung der verwendeten Gensonden-Fragmente**

Alle verwendeten Gensonden wurden mittels PCR hergestellt und über Gelelektrophorese und anschließender Elution aus dem Gel hergestellt.

Gen (bzw. Transposon)	verwendete Oligonukleotide
<i>SPL1/12</i>	GC628/GC629
<i>SPL2</i>	GC127/GC333
<i>SPL3</i>	GC241/GC268
<i>SPL4</i>	GC338/GC189
<i>SPL5</i>	GC113/GC340
<i>SPL6</i>	GC345/GC561
<i>SPL7</i>	GC315/GC348 GC587/GC589
<i>SPL8</i>	GC637/GC344 ( <i>En-1</i> -Suche) GC633/GC634
<i>SPL9</i>	GC409/GC483 ( <i>En-1</i> -Suche) GC485/632 GC652/GC406 ( <i>in situ</i> -Hybridisierungs-Sonden, <i>antisense</i> ) GC654/GC409 ( <i>in situ</i> -Hybridisierungs-Sonden, <i>sense</i> )
<i>SPL10/11</i>	GC624/GC625
<i>SPL15</i>	GC665/GC666
<i>En-1</i>	GC517/GC524 (5`-Ende) GC519/GC522 (3`-Ende)
<i>ACTIN1</i>	GC682/GC683
<i>RAN3</i>	GC709/GC710

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeine Analyse aller *SPL*-Gene und deren Genprodukte sowie *CRSBP1*

SBP-Box-Gene (SQUAMOSA PPROMOTER BINDING PROTEIN) sind Mitglieder einer erst seit kurzem bekannten Genfamilie. Sie konnten bislang ausschließlich aus Pflanzen isoliert werden und kodieren putative Transkriptionsfaktoren (Klein *et al.*, 1996). Mit *A. thaliana* als Modellsystem sollte die Funktion dieser Gene bzw. ihrer Genprodukte untersucht werden. *A. thaliana* SBP-Box-Gene werden als *SPL*-Gene (SQUAMOSA PPROMOTER BINDING PROTEIN LIKE) bezeichnet (Cardon *et al.*, 1997).

##### 3.1.1 Analyse der *SPL*-Gene und der Phylogenie aller *SPL*-Proteine

Eine wichtige Voraussetzung für die funktionelle Analyse einer Genfamilie ist das Wissen über die Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen Mitglieder zueinander. Genprodukte, die eine große Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen, können, müssen aber nicht ähnliche Funktionen haben. Insbesondere bei der Charakterisierung von Mutanten spielt Redundanz der Genprodukte oft insofern eine Rolle, als daß Mehrfachmutanten wie z. B. im Fall der *SEPALLATA*-MADS-Box-Gene hergestellt werden müssen, bis sich ein mutanter Phänotyp ausprägt (Pelaz *et al.*, 2000).

Zwölf *SPL*-Gene wurden von Cardon *et al.* (1999) isoliert und analysiert. Ihre Genprodukte zeichnen sich alle durch die hohe Konservierung der 76 Aminosäuren langen SBP-Domäne aus (Cardon *et al.*, 1999). Da die Sequenz des *A. thaliana*-Genoms nunmehr bekannt ist (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), war es durch das Durchsuchen von DNA- und Proteindatenbanken (siehe Abschnitt 2.2.3) möglich, vier weitere vollständige *SPL*-Gene zu identifizieren (*SPL13* bis *SPL16*). *SPL14* und *SPL16* wurden bereits in der Arbeit von Cardon *et al.* (1999) beschrieben, jedoch nicht als Vollängenkclone und wurden dort aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu *SPL1* als *SPLIR2* (*SPL1-related2*) bzw. *SPLIR3* (*SPL1-related3*) bezeichnet. Die Genbankzugriffsnummern (*accession numbers*) der BACs auf denen die vier neuen *SPL*-Gene lokalisiert sind, sind in der Tabelle 3-1 aufgelistet.

Gen	Genbankzugriffsnummern (BACs)
<i>SPL13</i>	AB025619
<i>SPL14</i>	AC007369
<i>SPL15</i>	AL132977
<i>SPL16</i>	ATAC015450

**Tabelle 3-1:** Tabellarische Auflistung der Genbankzugriffsnummern der BACs, auf denen die vier neu identifizierten *SPL*-Gene liegen.

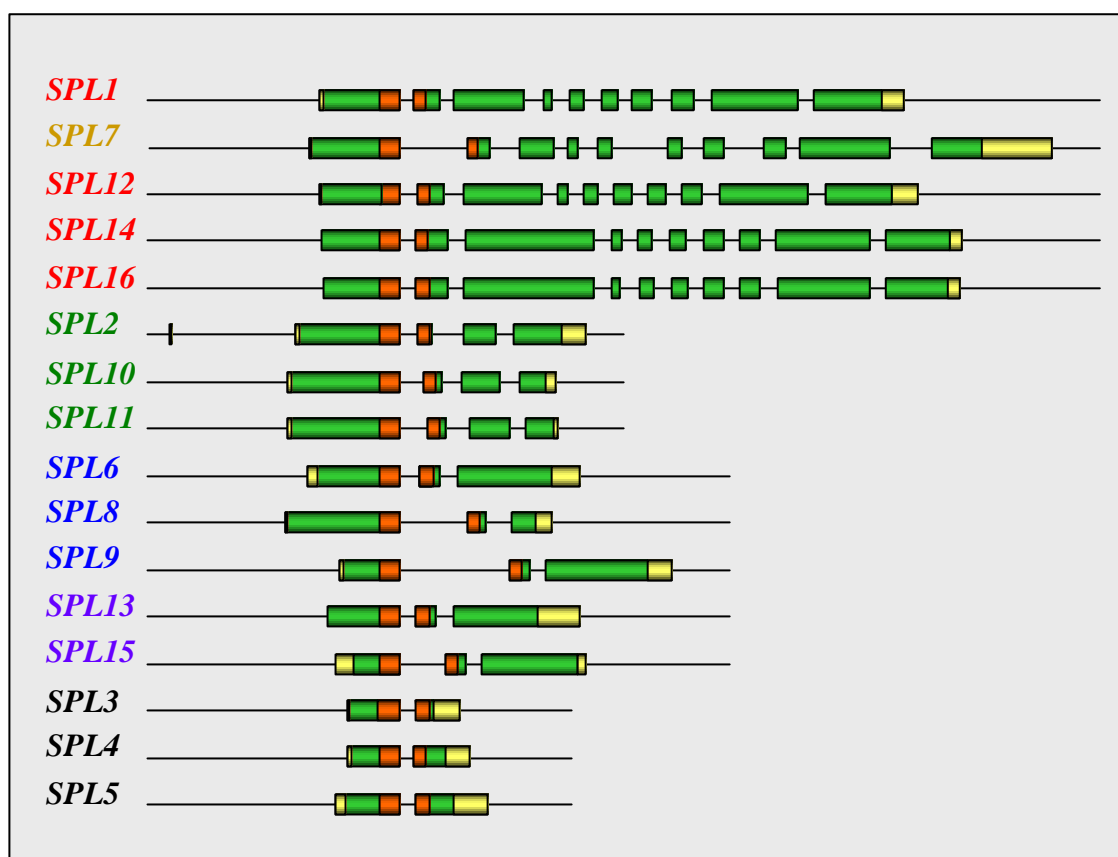
Insgesamt sind demzufolge 16 *SPL*-Gene im Genom von *A. thaliana* vorhanden. In Abbildung 3-1 ist ein Vergleich der SBP-Boxen aller 16 *SPL*-Proteine dargestellt.

	25	50	75
SPL1	CQVENCEADLSKVKDYHRRHKVCEMHSKATSATVGGILQRF	QCCSRFHLLQEFDEGKRS	CRRLLAGHNKRRRKT
SPL2	CQVEGCNLDLSSAKDYHRKHRI	CENHSKFPKVVVSGVERRFCQQ	CSRFHCLSEFDEKRS
SPL3	CQVESTADMSKAKQYHKRHKVCQF	HAKAPHVRI	SGLHQRFCQQCSRFHALSEFDEAKRS
SPL4	CQVDRCTADMKEAKLYHRRHKVCEV	HAKASSVFLSGLNQRFCQQ	CSRFHDLQEFDEAKRS
SPL5	CQVDRCTVNLTEAKQYRRHRVCEV	HAKASAATVAGVQRFCQQ	CSRFHELPEFDEAKRS
SPL6	CQVYGCSKDLSSSKDYHKRHRVCEA	HSKTSVVI	VNGLEQRFCQQCSRFHFLSEFDDGKRS
SPL7	CQVPDCEADISELKGYHKRHRVCLRC	ATASFVVLDGENKRYCQQ	CGFHLPLDFDEGKRS
SPL8	CQAEGCNADLSHAKYHRRHKVCEFH	SKASTVVAAGLSQRFCQQ	CSRFHLLSEFDNGKRS
SPL9	CQVEGCGMDLTNAKGYSRHRVCGV	HSKTPKVTVAGIEQRFCQQ	CSRFHQLPEFDLEKRS
SPL10	CQIDGCELDLSSSKDYHRKHRCETH	SKCPKVVVSGLERRFCQQ	CSRFHAVSEFDEKRS
SPL11	CQIDGCELDLSSAKGYHRKHVC	EKHSKCPKVS	VSGLERRFCQQCSRFHAVSEFDEKRS
SPL12	CQVDNCGADLSKVKDYHRRHKVCEI	HSKATTALVGGIMQRFCQQ	CSRFHVLEEFDEGKRS
SPL13	CLVDGCDSDFSNCREYHKRHKVCDV	HSKTPVVTINGHKQRFCQQ	CSRFHLEEFDEGKRS
SPL14	CQVDNCTEDLSHAKYHRRHKVCEV	HSKATKALVGKQMRFCQQ	CSRFHLLSEFDEGKRS
SPL15	CQVEGCRMDLSNVKAYYSRHKVCCI	HSSKVI	VSGLHQRFCQQCSRFHQLSEFDLEKRS
SPL16	CQVDNCKEDLSIAKDYHRRHKVCEV	HSKATKALVGKQMRFCQQ	CSRFHLLSEFDEGKRS
	* * * * *	* * * * *	** * * * *

**Abbildung 3-1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der SBP-Boxen aller *SPL*-Proteine. Durch \* sind konservierte Aminosäuren gekennzeichnet. Grün unterlegt ist das in allen *SPL*-Proteinen konservierte Serin. Gelb unterlegt ist das putative zweiteilige Kernlokalisationsignal (Cardon *et al.*, 1997 und 1999). Die Aminosäuresequenzen der SBP-Boxen der Proteine *SPL1* bis *SPL12* wurden Cardon *et al.* (1999) entnommen.

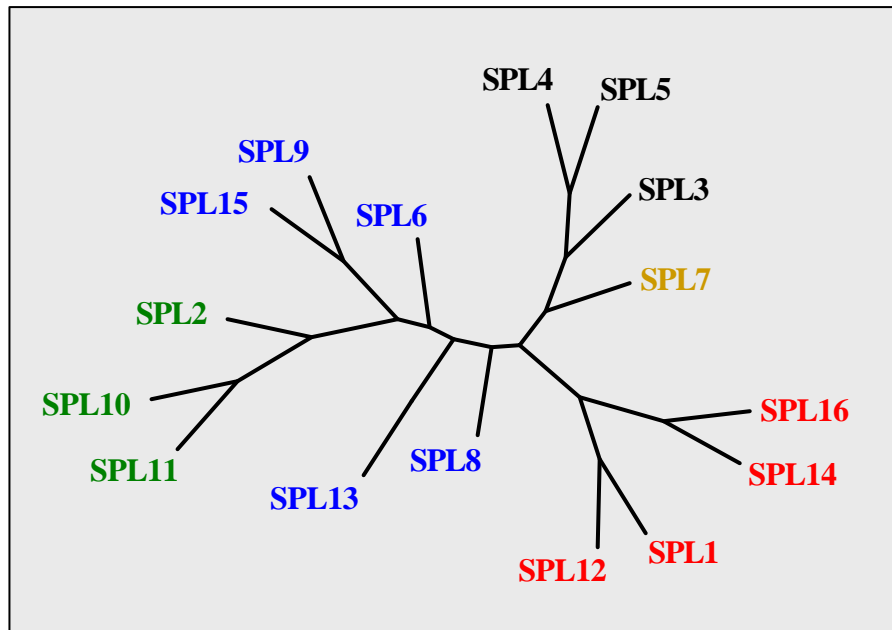
24 Aminosäuren sind in allen *SPL*-Proteinen absolut konserviert. Hierzu gehören unter anderem Teile des putativen zweiteiligen Kernlokalisationssignals (Cardon *et al.*, 1997 und 1999), in der Abbildung 3-1 gelb unterlegt, sowie ein Serin, grün unterlegt. Das Serin kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (*score* 0.903) phosphoryliert werden (Blom *et al.*, 1999; NetPhos 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). Die SBP-Domäne beginnt immer mit einem Cystein.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der ersten zwölf isolierten SPL-Proteine außerhalb der SBP-Box (Cardon *et al.*, 1999) ergab, daß mehrere SPL-Proteinpaare zu finden sind, die eine größere Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen als zu anderen SPL-Proteinen. Die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten *SPL*-Gene haben die folgende Anzahl Introns: *SPL13* und *SPL15* haben jeweils zwei Introns, während *SPL14* und *SPL16* jeweils neun Introns besitzen. In der Abbildung 3-2 ist die Exon-Intron-Struktur aller *SPL*-Gene schematisch dargestellt. Farblich hervorgehoben sind die Gruppen von *SPL*-Genen, welche die gleiche Anzahl Introns im offenen Leserahmen besitzen.



**Abbildung 3-2:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur aller *SPL*-Gene. Die Gene wurden entsprechend der Anzahl der Introns in Gruppen eingeteilt und farblich hervorgehoben: schwarz: ein Intron; blau: zwei Introns; grün: drei Introns; rot und orange: neun Introns. Die Gene mit den wenigsten Introns sind unten abgebildet. Die SBP-Box ist rot, translatierte Bereiche der Exons sind grün und untranslatierte Bereiche der Exons sind gelb dargestellt. Die Sequenzen der *SPL1*- bis *SPL12*-Gene sind Cardon *et al.* (1999) entnommen.

Das Resultat einer phylogenetischen Analyse (siehe 2.2.3), die auf den Aminosäuresequenzen der SBP-Boxen aller SPL-Proteine basiert, unterstützt die Einteilung der SPL-Proteinfamilie in verschiedene Kladen (Abb. 3-3).

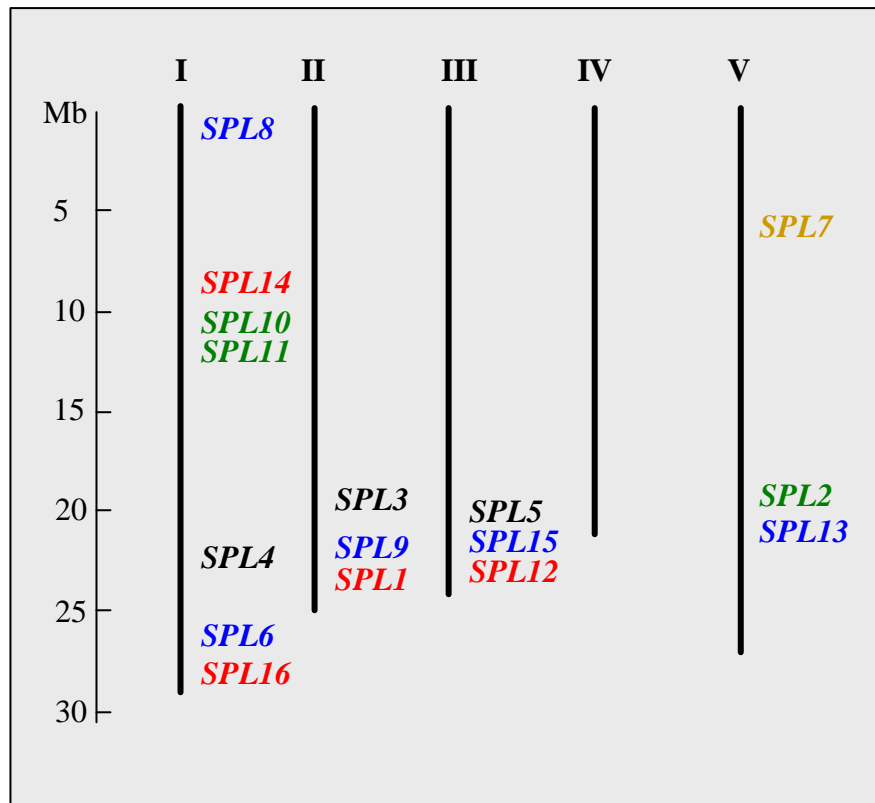


**Abbildung 3-3:** Phylogenetische Rekonstruktion der Verwandtschaftsbeziehungen aller SPL-Proteine zueinander, basierend auf der Aminosäuresequenz der SBP-Domäne. SPL-Proteine, deren korrespondierende Gene die gleiche Intronanzahl besitzen, sind in derselben Farbe dargestellt: schwarz: ein Intron; blau: zwei Introns; grün: drei Introns; rot und orange: neun Introns.

SPL-Proteine, deren entsprechende Gene die gleiche Intronanzahl besitzen, tendieren auch in phylogenetischen Analysen zur Gruppenbildung. Während SPL1, SPL12, SPL14 und SPL16 eine Klade bilden, besteht eine weitere Klade aus SPL3, SPL4 und SPL5 bzw. aus SPL2, SPL10 und SPL11. Eine weitere, allerdings nicht so deutlich zu erkennende Gruppe, deren Gene jeweils drei Introns haben, besteht aus SPL6, SPL8, SPL9, SPL13 und SPL15. Der oben beschriebenen Paarbildung näher miteinander verwandter SPL-Proteine (Cardon *et al.*, 1999) können nun weitere Paare zugefügt werden: SPL14 und SPL16 sowie SPL9 und SPL15. Die Identität auf Aminosäureebene beträgt in dem Falle von SPL14 und SPL16 71 % und die von SPL9 und SPL15 64 %.

Nach der vorliegenden phylogenetischen Rekonstruktion erscheint SPL7 als verwandtes Protein zu der SPL3/SPL4/SPL5-Gruppe. Das *SPL7*-Gen hat aber neun Introns. Aus diesem Grund ist SPL7 in den Abbildungen 3-2 bis 3-4 in orange dargestellt.

Das Ergebnis der Analyse der Verteilung aller *SPL*-Gene im Genom von *A. thaliana* ist in der Abbildung 3-4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-4:** Schematische Darstellung der Verteilung der *SPL*-Gene im Genom von *A. thaliana*. Die *A. thaliana*-Chromosomen sind als schwarze Balken dargestellt. Die Nummern der Chromosomen sind in römischen Zahlen angegeben. Gene mit gleicher Intronanzahl sind in gleicher Farbe dargestellt: schwarz: ein Intron; blau: zwei Introns; grün: drei Introns; rot und orange: neun Introns. Die Sequenzdaten der Gene *SPL1* bis *SPL12* sind Cardon *et al.* (1999) entnommen.

Keines der neu identifizierten Gene ist auf Chromosom 4 lokalisiert. *SPL13* befindet sich auf Chromosom 5; *SPL14* und *SPL16* sind auf Chromosom 1 und *SPL15* auf Chromosom 3 zu finden (Abb. 3-4). Cardon *et al.* (1999) haben die Position von *SPL6* auf Chromosom 2, zwischen den Genen *SPL3* (weiter in Richtung Centromer) und *SPL9* weiter telomer gelegen, angegeben. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der BAC, auf dem *SPL6* lokalisiert ist (IGF-BAC: F4N3; Mozo *et al.*, 1998), befindet sich auf Chromosom 1 (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Somit sind die *SPL*-Gene auf allen Chromosomen außer auf Chromosom 4 zu finden.

*SPL4* und *SPL5* bzw. *SPL1* und *SPL12* werden als Paare bezeichnet (Cardon *et al.*, 1999), das gleiche gilt für *SPL9* und *SPL15* (siehe oben). Es wurde festgestellt, daß die Bereiche der Sequenzhomologien zwischen *SPL4* und *SPL5* bzw. *SPL9* und *SPL15* sich auch in die umliegenden Sequenzen hinein erstrecken. Dies zeigte ein Vergleich der BAC-Sequenzen, auf

denen die Gene lokalisiert sind (ohne Abbildung). Die BACs hingegen auf denen *SPL1* bzw. *SPL12* lokalisiert sind, weisen außerhalb der *SPL*-Gene keine Ähnlichkeit zueinander auf. In der Tabelle 3-2 sind die Genbankzugriffsnummern der entsprechenden BACs aufgelistet.

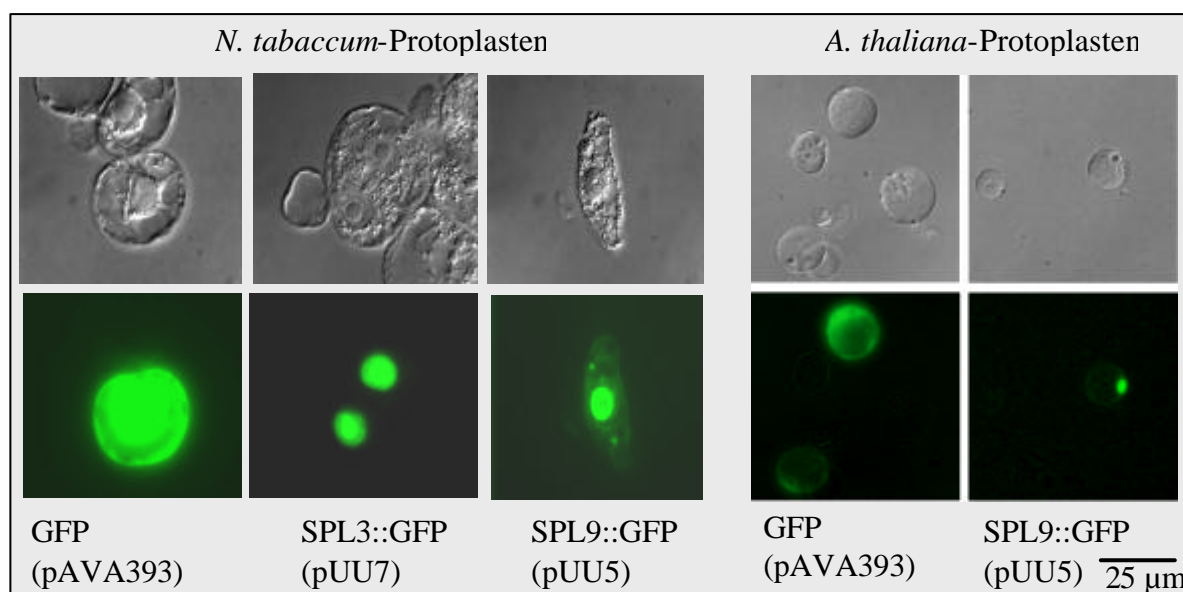
Gen das auf dem BAC liegt	Genbankzugriffsnummern
<i>SPL1</i>	AC004411
<i>SPL12</i>	ATF24G16 und ATT209
<i>SPL4</i>	AC022520
<i>SPL5</i>	AC023839
<i>SPL9</i>	AC002561
<i>SPL15</i>	ATT10K17

**Tabelle 3-2:** Liste der Genbankzugriffsnummern von BACs, auf denen *SPL1*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL9*, *SPL12* und *SPL15* liegen.

### 3.1.2 Die zelluläre Lokalisation von *SPL9* und *SPL3*

*SPL*-Gene kodieren putative Transkriptionsfaktoren (Klein *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß sie nach der Translation im Cytoplasma in den Zellkern transportiert werden. Für *LIGULELESS1* (*LG1*), einem SBP-Domänen-Protein aus *Zea mays*, konnte die Translokation in den Zellkern von *Allium cepa*-Protoplasten mittels GFP-Fusionsanalysen (*GREEN FLUORESCENT PROTEIN* aus *Aequorea victoria*; Prasher *et al.*, 1990) nachgewiesen werden (Moreno *et al.*, 1997). Durch eine Fusion der *SPL3*-cDNA sowie der *SPL9*-cDNA mit der GFP-cDNA und anschließender transienter Expression in *N. tabaccum*- bzw. *A. thaliana*-Protoplasten (siehe auch 2.2.23, 2.2.24 und 2.2.28), sollte die zelluläre Lokalisation dieser *SPL*-Proteine festgestellt werden. In der Abbildung 3-5 sind die entsprechenden Protoplasten in der oberen Reihe in Durchlichtmikroskopie zu sehen, während das GFP in denselben Protoplasten der unteren Reihe durch Blaulicht angeregt wurde und grün fluoresziert. Im Kontrollexperiment, Transfektion der Protoplasten mit dem leeren Vektor (pAVA393), ist das GFP-Protein im Cytoplasma der gesamten Zelle und im Zellkern vorhanden. Die Fusionsproteine *SPL9::GFP* und *SPL3::GFP* hingegen werden in den Zellkern sowohl der *N. tabaccum*- als auch der *A. thaliana*-Protoplasten transportiert. Der *N. tabaccum*-Protoplast, in dem *SPL3::GFP* exprimiert wird, befindet sich gerade in dem Stadium der Zellteilung.





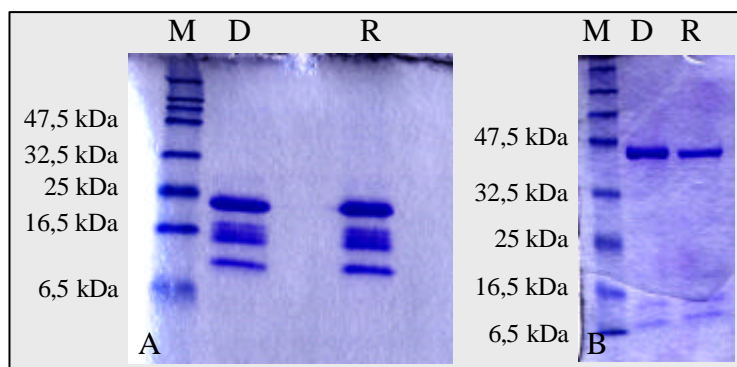
**Abbildung 3-5:** Analyse der zellulären Lokalisation von SPL3::GFP und SPL9::GFP in *N. tabaccum*-Protoplasten (links) bzw. *A. thaliana*-Protoplasten (rechts). In der oberen Reihe sind die entsprechenden Protoplasten in Durchlichtmikroskopie dargestellt. In der unteren Reihe wurde das GFP derselben Protoplasten durch Bestrahlung mit Blaulicht angeregt. Als Kontrolle diente GFP (pAVA393) alleine.

### 3.1.3 Expression von *SPL3*, *SPL8* und *SPL9* in *E. coli*

Durch einen *target-detection-assay* (Thiessen und Bach, 1990) sollten die Konsensussequenzen der DNA-Bindungszielsequenzen von SPL-Proteinen bestimmt werden (siehe auch 2.2.21). Um möglichst nicht eng miteinander verwandte Proteine für die Durchführung des Experiments zu verwenden, wurden SPL3, SPL8 und SPL9 ausgewählt.

Die cDNAs wurden in *E. coli* exprimiert und die Proteine über Nickel-Agarose-Säulen aufgereinigt (siehe auch 2.2.20). Die hierzu fusionierten sechs Histidine (6xHis) befanden sich am C-terminalen Ende der Proteine. So wurde sichergestellt, daß nur vollständig translatierte Proteine aufgereinigt wurden. Die so gewonnenen Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt, um Menge und Qualität der exprimierten Proteine zu bestimmen.

Stellvertretend ist das Gel des aufgereinigtem SPL3-Proteins dargestellt (Abb. 3-6).



**Abbildung 3-6:** Gelelektrophoretische Auftrennung von SPL3::6xHis (A) sowie 6xHis::DHFR::SPL3 (B) auf einem 15%igen SDS Gel und anschließender Coomassie Blau Färbung der Proteine. M: Größenstandard, D: Proteine in Urea Puffer, R: Proteine in Phosphatpuffer (nach der Renaturierung).

SPL3::6xHis hat ein zu erwartendes Molekulargewicht von ca. 16,3 kDa. In der Abbildung 3-6 A ist in der Spur D SPL3::6xHis in einem denaturierenden Harnstoffpuffer gelöst aufgetragen wohingegen in der Spur R SPL3::6xHis nach der Renaturierung in Phosphatpuffer aufgetragen wurde (siehe auch 2.2.20). Es ist zunächst auffallend, daß vier Banden mit einer Größe von ca. 25 kDa, 18 kDa, 15 kDa und 10 kDa zu sehen sind, sowohl vor als auch nach der Renaturierung der Proteine. Mehrere Banden wurden auch in dem Fall SPL8::6xHis und SPL9::6xHis beobachtet.

Zusätzlich hat keine der Banden bei der Expression von SPL3::6xHis das zu erwartende Molekulargewicht von ca. 16,5 kDa. Um zu testen, ob die Banden auf eine Instabilität des Proteins zurückzuführen sind, wurde ein von S. Höhmann (MPIZ, Köln) freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Konstrukt, das ein Fusionsprotein 6xHis::DHFR::SPL3 kodiert (erwartetes Molekulargewicht: 42,5 kDa), ebenfalls in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nach Auftrennung von 6xHis-DHFR-SPL3 mittels SDS-PAGE war nur eine prominente Bande (ca. 45 kDa) und lediglich zwei weitere sehr schwach sichtbare, zusätzliche Banden geringeren Molekulargewichts (ca. 12 kDa und 6,5 kDa) zu sehen (Abb. 3-6 B).

Ob die Menge und Größe der zusätzlichen Banden, die bei der Expression von SPL8::6xHis bzw. SPL9::6xHis entstehen, auch durch die Fusion der Proteine mit DHFR reduziert werden können, wurde nicht getestet.

Da die Expression aller drei Konstrukte nicht zweifelsfrei gelang, wurden die *target-detection*-Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Bindeeigenschaften der SPL-Proteine an ihre Zielsequenzen würden möglicherweise durch einerseits das DHFR und andererseits durch mögliche Verunreinigungen der Proben mit Proteinfragmenten beeinflusst und ein falsches Bindemotiv würde vielleicht identifiziert werden.

### 3.2 Die Isolation von *CRSBP1* aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Cardon *et al.* (1999) hatten angenommen, daß SBP-Box-Gene ausschließlich in höheren Pflanzen vorkommen. Durch BLAST-Analysen mit SPL-Gensequenzen konnte jedoch ein EST aus *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), einer einzelligen Grünalge, identifiziert werden (Genbankzugriffsnummer: AV393371), welches Ähnlichkeiten zu Sequenzen der SBP-Boxen anderer SBP-Box-Gene aufweist. Das dazugehörige Gen wird im Folgenden als *CRSPB1* (*Chlamydomonas reinhardtii* *SBP1*) bezeichnet.

Aufgrund der Sequenz des ESTs wurden Oligonukleotide entworfen, welche die Amplifikation der SBP-Box aus sowohl einer genomischen- als auch einer cDNA-Lambda-Phagen-Bibliothek aus *C. reinhardtii* erlaubten (freundlicherweise von Prof. Dr. M. Goldschmidt-Clemond, Universität Genf, zur Verfügung gestellt) (Abb. 3-7). Für die PCR wurden die Oligonukleotide GC678 und GC679 verwendet. Die Sequenzen sind im Anhang E aufgeführt.

Durch den Vergleich der genomischen- mit der cDNA-Sequenz konnte die Position des Introns in der SBP-Box von *CRSBP1* bestimmt werden. In allen bislang bekannten SBP-Box-Genen ist ein Intron an einer konservierten Position, 140 Basen nach Beginn der SBP-Box, inseriert (Cardon *et al.*, 1999). *CRSBP1* hingegen enthält ein Intron 56 Basenpaare nach Beginn der putativen SBP-Box (Abb. 3-7 und 3-8).

```

1 TGTGCCAAGTTGACAAGTGCAACCAGGCGATGGCGTGCCAACAGGAGCAGTATCAGCGGT
  C Q V D K C N Q A M A C Q Q E Q Y Q R
61 GAGCTTGGCAGTACAAAAAGTACTGTAGCTTTTGTCTTGANAGCGATCTGGTGCCGGGC
121 ATGTTTGGCGCCGGTCCCCTGCACTATGTCANAATGCCTAGGCACAACGCTTTTCAGTTTC
181 CTGTAGCCGCTCATAACGGTTTTNAATAATTCATGTTTTTATGTGCTTGCCATGTAGGCT
  L
241 TCGGATATGTGAGCACCCTACCACGCGCTGGAGGTGAGCATGAGGGCATGCGGCAAAG
  R I C E H H Y H A L E V Q H E G M R Q R
301 GTTCTGCCAGTCGTGCGGTCGCTTGACCCAGTGGAGGAGTTTCGAGTCGAAACATGCACGC
  F C Q S C G R L H P V E E F E S N M H A
361 GTGTCGTGCACGATGCGGCGTGGACAGCCGGCAGCGGAAGCGTTT
  C R A R C G V D S R Q R K R

```

**Abbildung 3-7:** Teilsequenz von *CRSBP1*. Die Intronsequenz ist unterstrichen dargestellt.

Ein Vergleich aller SPL-Proteine und *CRSBP1*, basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz der SBP-Domäne, ist in Abbildung 3-8 dargestellt.

	25	50	75
SPL1	CQVENCEADLSKVKDYHRRHKVCEMHSKATSATVGGILQRFQCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLAGHNKRRRKTN		
SPL2	CQVEGCNLDLSSAKDYHRKHRI CENHSKFPKVVVSGVERRFCQCSRFLHLLSEFDEKKRSCRRRLSDHNARRRKP		
SPL3	CQVESCTADMSKAKQYHRRHKVCQFHAKAPHVRSGLHQRFCQCSRFLHLLSEFDEAKRSCRRRLAGHNERRRST		
SPL4	CQVDRCTADMKEAKLYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEAKRSCRRRLAGHNERRRST		
SPL5	CQVDRCTVNLTEAKQYRRHRVCEVHAKASAATVAGVRQRFQCQCSRFLHLLQEFDEAKRSCRRRLAGHNERRRST		
SPL6	CQVYGCSDLSSSKDYHRRHKVCEAHSKTSVIVNGLEQRFCQCSRFLHLLSEFDDGKRSCRRRLAGHNERRRST		
SPL7	CQVPDCEADISELKGYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLERHNNRRRKP		
SPL8	CQAEGCNADLSHAKHYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLSEFDEGKRSCRRRLADHNRRRKP		
SPL9	CQVEGCGMDLTNAKGYYSRHRVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLAGHNERRRKP		
SPL10	CQIDGCELDLSSSKDYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLSHHNARRRKP		
SPL11	CQIDGCELDLSSAKGYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLSHHNARRRKP		
SPL12	CQVDNCGADLSKVKDYHRRHKVCEIHSKATTALVGGIMQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLAGHNKRRRST		
SPL13	CLVDGCDSDFSNCREYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLDGHNNRRRKP		
SPL14	CQVDNCTEDLSHAKDYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLAGHNERRRST		
SPL15	CQVEGCRMDLSNVKAYYSRHRVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLAGHNERRRKP		
SPL16	CQVDNCKEDLSIAKDYHRRHKVCEVHAKASSVFLSGLNQRFCQCSRFLHLLQEFDEGKRSCRRRLDGHNNRRRST		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *
CRSBP1	CQVDKCNQAMACQEQYQLRICEHHYHALEVQHEGMRQRFQCQSGRLHPVEEFESNMHACRARCGVDSRQRKRLR		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *

**Abbildung 3-8:** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der SBP-Boxen aller SPL-Proteine sowie *CRSBP1*. Durch \* sind konservierte Aminosäuren gekennzeichnet. Der rote Pfeil kennzeichnet die Position der Introns in den SBP-Boxen aller *SPL*-Gene, der blaue Pfeil die Position des Introns in *CRSBP1*.

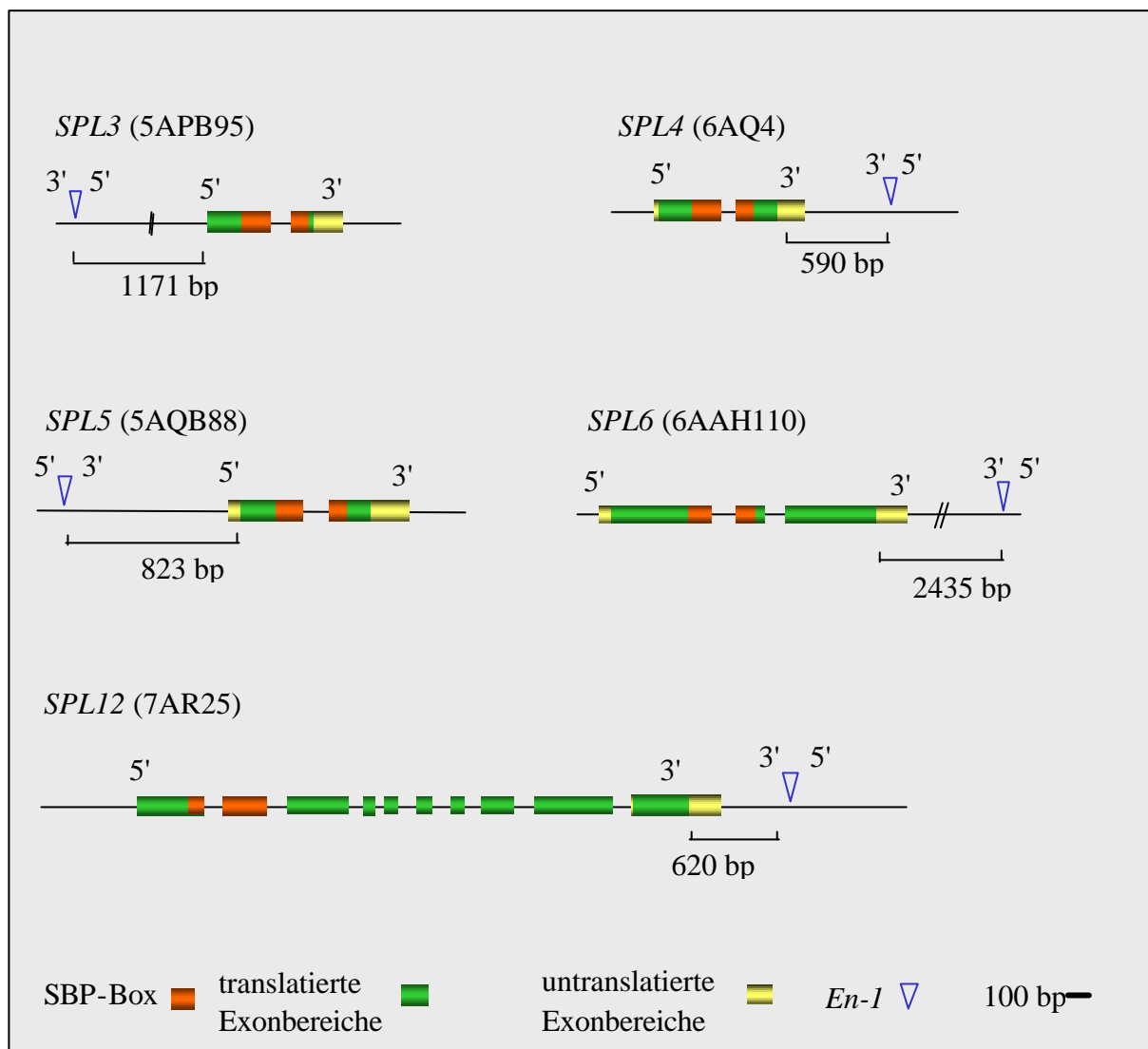
Die zwischen *C. reinhardtii* und *A. thaliana* konservierten zwölf Aminosäuren sind durch Sternchen unterhalb der CRSBP1-Sequenz gekennzeichnet. Einige Aminosäuren sind in der CRSBP1-Sequenz als auch in den Sequenzen aller anderen SPL-Proteine konserviert. Die SBP-Domäne beginnt auch in CRSBP1-Sequenz mit einem Cystein. Das zweiteilige Kernlokalisierungssignal und das Serin, das in allen 16 SPL-Proteinen konserviert ist (siehe 3.1.1), ist in der SBP-Domänen-Sequenz von CRSBP1 hingegen nicht vorhanden (PSORT, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>). An der Stelle des putativ phosphorylierbaren Serins an der Position 60 steht ein Alanin. Analysen der abgeleiteten CRSBP1-Aminosäureteilsequenz ergaben weiterhin, daß das Serin an der Position 68 mit einem *score* von 0,762 (das heißt mit einer Wahrscheinlichkeit von 76,2 %) phosphoryliert werden kann. Des weiteren können den Vorhersagen nach die Tyrosine an den Positionen 16 und 25 phosphoryliert werden. Der *score* beträgt 0,622 bzw. 0,742 (Blom *et al.*, 1999). Da die Sequenz des Vollängenproteins nicht bekannt ist, wurde die Lokalisation des CRSBP1-Protein-Fragments in der Zelle errechnet. Dies sollte einen Hinweis darauf liefern, ob möglicherweise ein anderes Kernlokalisierungssignal in dem CRSBP1-Fragment vorhanden ist. Mit einem *score* von 0,65 wird die Lokalisation des CRSBP1-Fragments als cytoplasmatisch angegeben (Blom *et al.*, 1999).

### 3.3 Die Identifizierung von *spl*-Mutanten

Da die Funktion von SBP-Domänen-Proteinen weitgehend ungeklärt ist, sollten vor allen Dingen Mutanten für die, zu Beginn dieser Arbeit bekannten, zwölf *SPL*-Gene identifiziert werden. Hierzu wurde eine vorhandene, mit dem autonomen Mais Transposon *En-1* mutagenisierte Population von *A. thaliana* (ZIGIA-Population - Wisman *et al.*, 1998) auf Insertionen von Transposons in den Genen hin untersucht (Baumann *et al.*, 1998 und siehe auch 2.2.27). Es konnten fünf Pflanzenlinien identifiziert werden, die Transposons außerhalb der offenen Leserahmen von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* sowie *SPL12* enthalten (Abschnitt 3.3.1). Außerdem wurden in dieser Population fünf Pflanzenlinien identifiziert, die Transposons in den offenen Leserahmen von *SPL9* bzw. *SPL8* enthalten (Abschnitte 3.3.2 und 3.3.3).

### 3.3.1 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon außerhalb der offenen Leserahmen von *SPL*-Genen enthalten

In der ZIGIA-Population konnten fünf verschiedene Pflanzenlinien identifiziert werden, die Transposoninsertionen nahe der offenen Leserahmen von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* und *SPL12* enthalten. In der Abbildung 3-9 sind die Integrationsorte schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung von Transposoninsertionen außerhalb der offenen Leserahmen von *SPL*-Genen. Die translatierten Bereiche der Exons sind grün dargestellt, untranslatierte Exonbereiche gelb, die SBP-Box rot. Die Bezeichnungen der Pflanzenlinien sind in Klammern gesetzt. Die Transposons sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Weitere Erklärungen im Text.

In der Pflanzenlinie 5ABP95 konnte eine Insertion eines *En-1*-Elements 1171 Basenpaare stromaufwärts des offenen Leserahmens von *SPL3* detektiert werden.

590 Basenpaare stromabwärts des offenen Leserahmens von *SPL4* ist in der Pflanzenlinie 6AQ4 ein *En-1*-Element im Genom inseriert.

In der Pflanzenlinie 5AQB88 wurde 823 Basenpaare stromaufwärts des offenen Leserahmens von *SPL5* eine Transposonintegration bestätigt.

In dem Fall von *SPL6* (Pflanzenlinie 6AAH110) ist ein *En-1*-Element 2435 Basenpaare stromabwärts des offenen Leserahmens lokalisiert.

In der Pflanzenlinie 7AR25 ist 620 Basenpaare vom 3'-Ende des offenen Leserahmens von *SPL12* ein *En-1*-Transposon inseriert.

In der nächsten Pflanzengeneration konnten nur die Integrationsorte der Transposons der Linien mit *En-1*-Elementen nahe *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* und *SPL12* mittels PCR bestätigt werden. In der Pflanzenlinie 5APB95 hingegen, die ursprünglich ein Transposon in der Nähe von *SPL3* enthielt, konnte in der folgenden Pflanzengeneration kein Transposon mehr an dieser Position gefunden werden. Im Anhang D sind die Integrationsorte in den Sequenzen der entsprechenden Loci dargestellt.

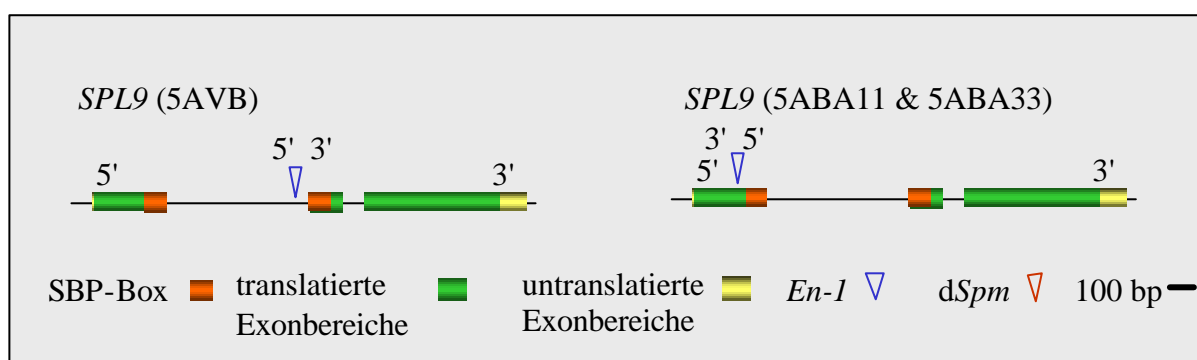
Die Analyse der Pflanzen unter Kurz- und Langtagbedingungen ergab, daß keine der Linien einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp aufwies.

*En-1* ist ein autonomes Element, das auch in *A. thaliana* aktiv ist. Neuintegrationen geschehen oft in räumlicher Nähe zu der vorhergehenden Integrationsstelle (Cardon *et al.*, 1993). Durch die Analyse einer genügenden Menge Nachkommenpflanzen kann eine Neuintegration gefunden werden. In dem Fall von *SPL4*, *SPL5* und *SPL6* wurde versucht die jeweiligen Transposons zu mobilisieren (siehe auch 2.2.27). Zuvor wurde durch PCR nachgewiesen, daß die repetitiven Enden der Transposons, die für die Mobilisierung essentiell sind, in den entsprechenden Elementen vorhanden sind (ohne Abbildung). In allen 1500 untersuchten Nachkommenpflanzen der ursprünglich identifizierten Pflanzenlinien, befand sich, wie durch PCR-Analysen nachgewiesen wurde, ein Transposon noch an der ursprünglich detektierten Stelle im Genom.

Da keine Pflanzen identifiziert werden konnten, die Transposoninsertionen in den offenen Leserahmen von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* bzw. *SPL12* enthielten, wurde die Arbeit mit den entsprechenden Pflanzenlinien eingestellt.

### 3.3.2 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon innerhalb des offenen Leserahmens von *SPL9* enthalten

Während, wie oben beschrieben, im Fall von *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* bzw. *SPL12* Transposons außerhalb der offenen Leserahmen identifiziert wurden, konnten in verschiedenen Pflanzenlinien zwei unabhängige *En-1*-Integrationen im offenen Leserahmen von *SPL9* detektiert werden. In der Abbildung 3-10 sind die Integrationsorte der entsprechenden Transposons schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-10:** Schematische Darstellung von Transposoninsertionen im *SPL9*-Gen. Die translatierten Exon-Bereiche sind grün dargestellt, die SBP-Box rot, untranslatierte Exon-Bereiche gelb. Die Bezeichnungen der Pflanzenlinien sind in Klammern gesetzt. Die Transposons sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Ein *En-1*-Element ist im ersten Intron, das die SBP-Box unterbricht, 917 Basenpaare stromabwärts des ATGs in 5' → 3'-Orientierung lokalisiert, während ein weiteres in einer anderen Pflanzenlinie am Ende des ersten Exons von *SPL9* zu finden ist. Dieses Transposon ist 210 Basenpaare stromabwärts des ATGs in 3' → 5'-Orientierung gelegen (Abb. 3-10) und siehe auch Anhang B.

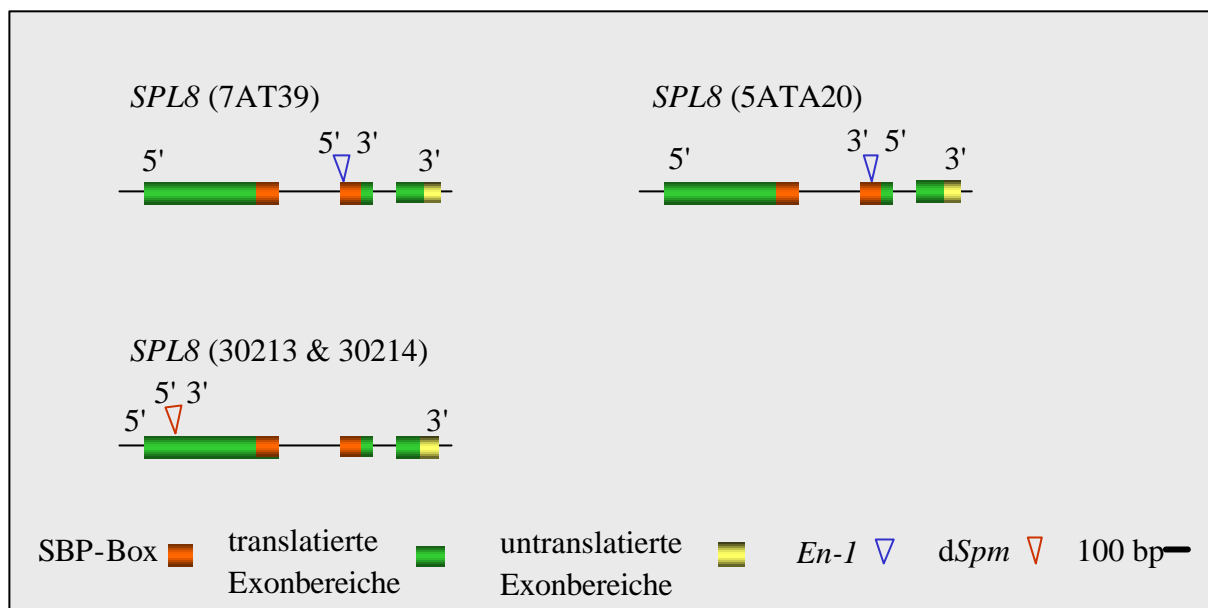
### 3.3.3 Die Identifikation von Pflanzen, die ein Transposon innerhalb des offenen Leserahmens von *SPL8* enthalten

Das Sainsbury Labor in Norwich besitzt eine Kollektion von *A. thaliana*-Pflanzen (SLAT Kollektion), die mit einer nicht autonomen Form des *Zea mays* Transposons *Spm* (*dSpm*) mutagenisiert wurde. Das verwendete Transposon kodiert keine Transposase und enthält ein *PHOSPHINOTHRICIN-HERBIZID-RESISTENZGEN* (*BAR*-Gen) (Tissier *et al.*, 1999). Die flankierenden Bereiche der Transposons wurden kloniert und diese Sequenzen in einer Datenbank veröffentlicht (<http://www.jic.bbsrc.ac.uk/sainsbury-lab/jonathan-jones/SINS->



[database/sins.htm](http://database/sins.htm)). Mutanten, die aus dieser Population isoliert werden, sind solange stabil, bis eine Transposase in das Genom eingeführt wird. Außerdem wurde durch die Art der Transformation und Selektion sichergestellt, daß jede Pflanze mit einer großen Wahrscheinlichkeit nur ein *dSpm* Element enthält. Durch das Durchsuchen dieser Datenbank mit verschiedenen *SPL*-Gen-Sequenzen konnte eine *spl8*-Mutante identifiziert werden.

Üblicherweise werden auf Anfrage *Pools* von Samen verschickt, welche auch die gesuchte Pflanze enthalten. Diese müssen dann, wie unter 2.2.27 für *En-1* beschrieben, identifiziert werden. Hierzu wurden zunächst 100 Pflanzen in zwei Pflanzschalen ausgesät, je ein Blatt von allen Pflanzen einer Pflanzschale geerntet und daraus gesammelt genomische DNA extrahiert (2.2.18). Für die PCR wurden die im Abschnitt 2.2.27 aufgeführten *dSpm* und *SPL8*-Oligonukleotide verwendet. Die Agarosegele wurden in Abwandlung von dem unter 2.2.27 für *En-1* beschriebenen Protokoll nicht geblottet. In dem versendeten Pool von *A. thaliana*-Samen wurden zwei Pflanzen identifiziert, die ein Transposon in *SPL8* enthalten (Abb. 3-11).



**Abbildung 3-11:** Schematische Darstellung von Transposoninsertionen im *SPL8*-Gen. Die translatierten Exonbereiche sind grün dargestellt, untranslatierte Exonbereiche gelb, die SBP-Box rot. Die Bezeichnungen der Pflanzenlinien sind in Klammern gesetzt. Die Transposons sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Das Transposon ist in diesen Pflanzenlinien (30213 sowie 30214) 102 Basenpaare vom ATG entfernt, im ersten Exon noch vor Beginn der SBP-Box, inseriert (Abb. 3-11).

Außerdem wurden von Dipl. Biol. P. Pesaresi (MPIZ Köln, AG Dr. D. Leister) zwei weitere Linien, in denen *SPL8* mutiert ist, in der ZIGIA-Population identifiziert (siehe 2.2.27). Diese

wurden uns freundlicherweise für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Eine der beiden Linien (7AT39) enthält in *SPL8* ein *En-1*-Transposon in 5' → 3' Orientierung, 1039 Basenpaare vom ATG entfernt in der SBP-Box, während in der zweiten Linie (5ATA20) ein *En-1*-Element in 3' → 5' Orientierung, 1112 Basenpaare stromabwärts des ATGs von *SPL8*, ebenfalls in der SBP-Box, enthalten ist (Abb. 3-11).

Im Anhang sind die Teilsequenzen aller *SPL*-Gene mit Transposoninsertionen außerhalb und innerhalb der offenen Leserahmen mit den genauen Integrationsstellen der Transposons zu finden. In den Abschnitten 3.4 bzw. 3.6 sind die anschließenden Charakterisierungen der *spl9*- bzw. der *spl8*-Mutante beschrieben.

### **3.4 Die Charakterisierung des *SPL9*-Gens und der *spl9*-Mutante**

Da in der ZIGIA-Population mutante *SPL9*-Allele identifiziert werden konnten, wurde *SPL9* sowie sein Genprodukt in dieser Arbeit genauer analysiert.

*SPL9* (Genbankzugriffsnummern: AJ011640, AC002561 bzw. B27659) zählt zu den *SPL*-Genen, dessen Expressionsrate sich im Laufe der Entwicklung steigert (Cardon *et al.*, 1999). Es hat zwei Introns und ist auf dem unteren Abschnitt des Chromosoms 2 lokalisiert (Abb. 3-2 und 3-4). Der offene Leserahmen hat eine Länge von 1128 Basenpaaren und abgeleitete Protein besteht aus 375 Aminosäuren. Die cDNA-Sequenz ist unter den Zugriffsnummern AJ011638 (Ökotyp Columbia-0) bzw. AJ011639 (Ökotyp Landsberg) in der Genbank zu finden.

#### **3.4.1 Die Expression von *SPL9***

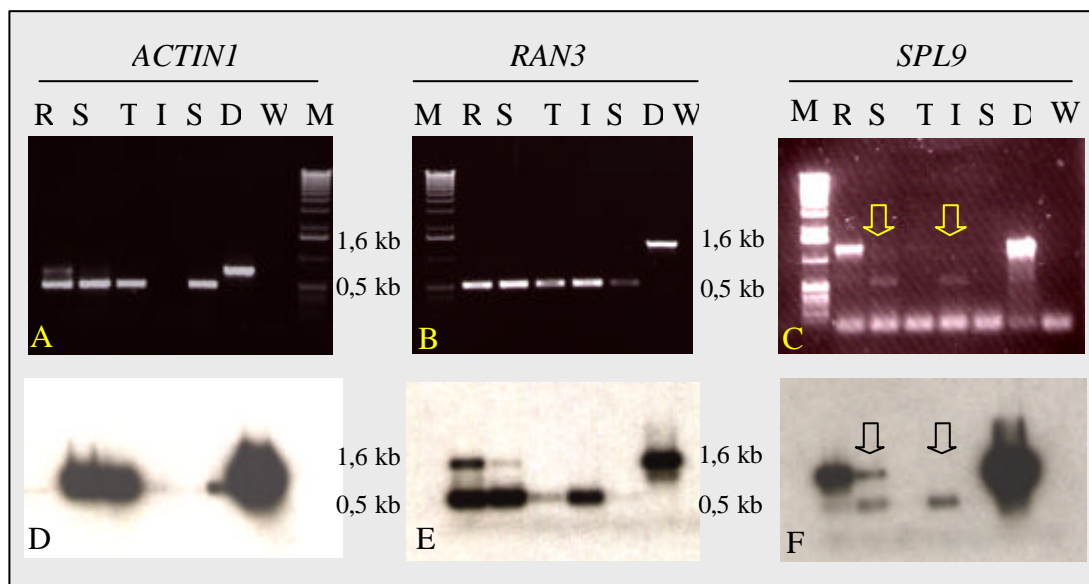
Durch Northernblot-Experimente wurde von Cardon *et al.* (1999) nachgewiesen, daß *SPL9*-Expression in ein bis drei Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen nachweisbar ist, aber die Transkriptmenge in Infloreszenzen deutlich zunimmt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression von *SPL9* genauer untersucht werden. Um herauszufinden, in welchen Teilen von *A. thaliana* das *SPL9*-Transkript nachweisbar ist, wurden folgende Ansätze verfolgt.

##### RT-PCR-Experimente

Einerseits wurde die Expression von *SPL9* durch RT-PCR-Experimente untersucht (siehe auch 2.2.12). Hierzu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen oberirdischen Teilen von

*A. thaliana* isoliert (Schoten, Infloreszenzspitzen samt Blüten, Sproßachsen sowie Rosettenblätter).

In den Abbildungen 3-12 A bis C sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR Fragmente nach 40 Zyklen gezeigt und in 3-12 D bis F sind die nach 25 Zyklen amplifizierten und hybridisierten Fragmente dargestellt.



**Abbildung 3-12:** Expressionsanalyse von *SPL9* (C und F) durch RT-PCR Experimente. Nach 40 PCR-Zyklen wurden die Fragmente auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (A-C). Als Kontrollen dienten *ACTINI* (A und D) und *RAN3* (B und E). In C und F ist das Ergebnis der RT-PCR mit *SPL9*-spezifischen Oligonukleotiden dokumentiert. Die Pfeile kennzeichnen die cDNAs der erwarteten Größe. In D bis F sind die Autoradiogramme der Southern-Hybridisierungen der PCR-Produkte nach 25 Zyklen mit einer jeweils genspezifischen Sonde dargestellt. Die Filme wurden drei Stunden bei RT exponiert. Es bedeuten: M: Größenstandard; R: Rosettenblätter; Sp: Sproßachsen; T: Tragblätter; I: Infloreszenzspitzen; S: Schoten; D: genomische DNA; W: Wasser.

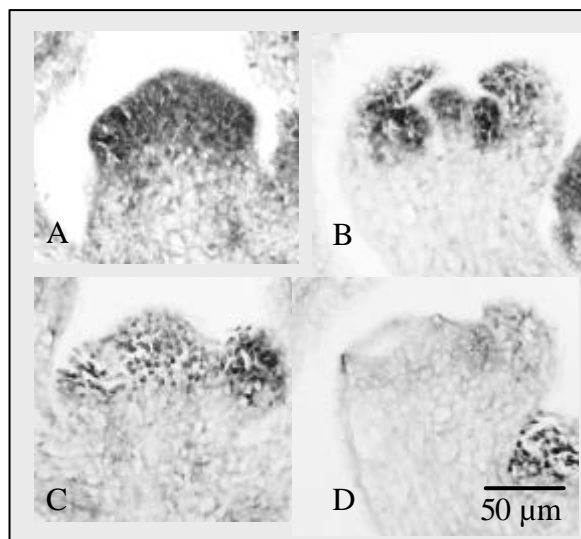
Als Kontrollen dienten *ACTINI* (Genbankzugriffsnummer: U39449) (Abb. 3-12 A und D) und *RAN3* (Abb. 3-12 B und E) ein Gen, das ein kleines RAS ähnliches GTP-Bindeprotein kodiert (Genbankzugriffsnummer: U73810) und deren Transkripte in allen Geweben mehr oder weniger gleichmäßig vorhanden sein sollten. Außerdem wurde in je einem Ansatz genomische DNA als Matrize für die PCR-Reaktion verwendet. So konnte die Größe der aus cDNA und genomischer DNA amplifizierten Fragmente verglichen werden. Die Amplifikation von *ACTINI* war in Infloreszenzspitzen nicht erfolgreich. In allen anderen Teilen von *A. thaliana* ist die cDNA nach 40 Zyklen in relativ gleichmäßiger Menge vorhanden. In der Rosettenblätter-cDNA wurden auch cDNAs der Größe genomischer DNA amplifiziert, die restlichen Fragmente entsprechen der Größe der cDNA ohne

Intronsequenzen. Das gleiche gilt für die aus Rosettenblätter-cDNA und Sproßachsen-cDNA amplifizierte *RAN3*-cDNA nach 25 Zyklen. Die *RAN3*-cDNA konnte in allen Reaktionen amplifiziert werden, wenngleich in der Schoten-cDNA eine etwas geringere Menge amplifiziert wurde.

Wie in Abbildung 3-12 C und F gezeigt, wird *SPL9* in Rosettenblättern, Sproßachsen, und Infloreszenzspitzen exprimiert. Die Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide liegen stromauf- bzw. stromabwärts des ersten Introns von *SPL9*. Die erwartete Größe des amplifizierten cDNA-Fragments beträgt 567 Basenpaare. In den Ansatz, in dem cDNA aus Rosettenblättern verwendet wurde, ist ein Fragment mit einer Größe von ca. 1,3 kb vorhanden, was der Fragmentgröße genomischer DNA entspricht (Abb. 3-12 C und F). Auch nach der Hybridisierung der amplifizierten Fragmente, die nach 25 Zyklen entnommen wurden, ist keine Bande der erwarteten Größe von 0,56 kb zu sehen (Abb. 3-12 F). Im Gegensatz dazu sind nach Hybridisierung des Ansatzes mit cDNA aus Sproßachsen deutlich zwei Banden zu detektieren. Eine hat die erwartete Größe von 0,56 kb, die andere ist 1,3 kb groß. Die Stärke der beiden Banden ist ungefähr gleich. In dem Ansatz mit Infloreszenzspitzen-cDNA hingegen ist nur eine Bande zu sehen. Diese hat eine Größe von 0,56 kb.

### In situ-Hybridisierungen

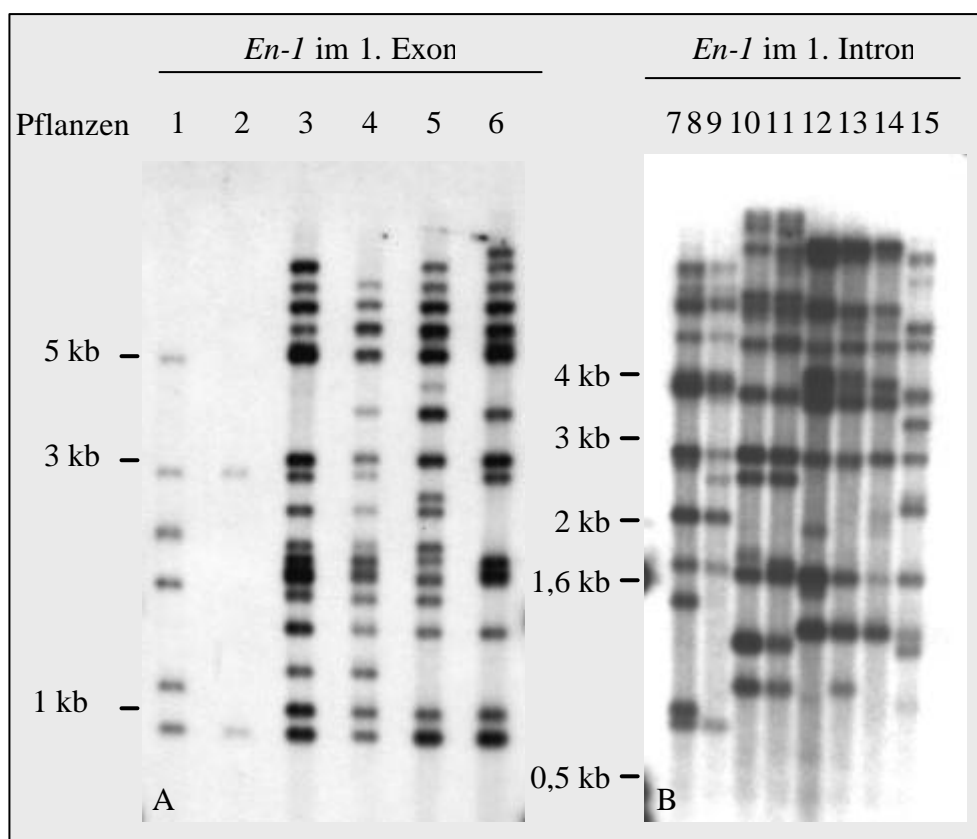
Andererseits wurden detailliertere Studien der räumlichen Expression von *SPL9* in *A. thaliana*-Infloreszenzen mittels *in situ*-Hybridisierungs-Experimenten durchgeführt. Wie in Abbildung 3-13 A ersichtlich, ist das *SPL9*-Transkript im Infloreszenzapikalmeristem lokalisiert, wobei am meisten RNA in den Primordien detektiert wurde. Des Weiteren wurde *SPL9*-Transkript in jungen Petal- und Stamenprimordien von jungen Blüten des Stadiums 4 (Smyth *et al.*, 1990) nachgewiesen (Abb. 3-13 B). Als Negativkontrolle diente *in vitro* transkribierte *SPL9-sense*-RNA (Abb. 3-13 C und D).



**Abbildung 3-13:** *In situ*-Lokalisation der *SPL9*-RNA im Infloreszenzapikalmeristem (A) und jungen Blüten (B) des Stadiums 4 (Smyth *et al.*, 1990) von *A. thaliana*. In A und B wurde *in vitro* transkribierte *antisense*-RNA als Sonde verwendet, während in C und D *in vitro* transkribierte *sense*-RNA als Sonde eingesetzt wurde und als Negativkontrolle diente.

### 3.4.2 Genotypische Untersuchung der *spl9*-Mutante

Wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben, konnten zwei mutante *SPL9*-Allele in der ZIGIA-Population identifiziert werden. Durch Southernblot-Experimente wurde die Anzahl der *En-1*-Transposons im Genom von verschiedenen Linien von *spl9*-Mutanten bestimmt (Abb. 3-14).



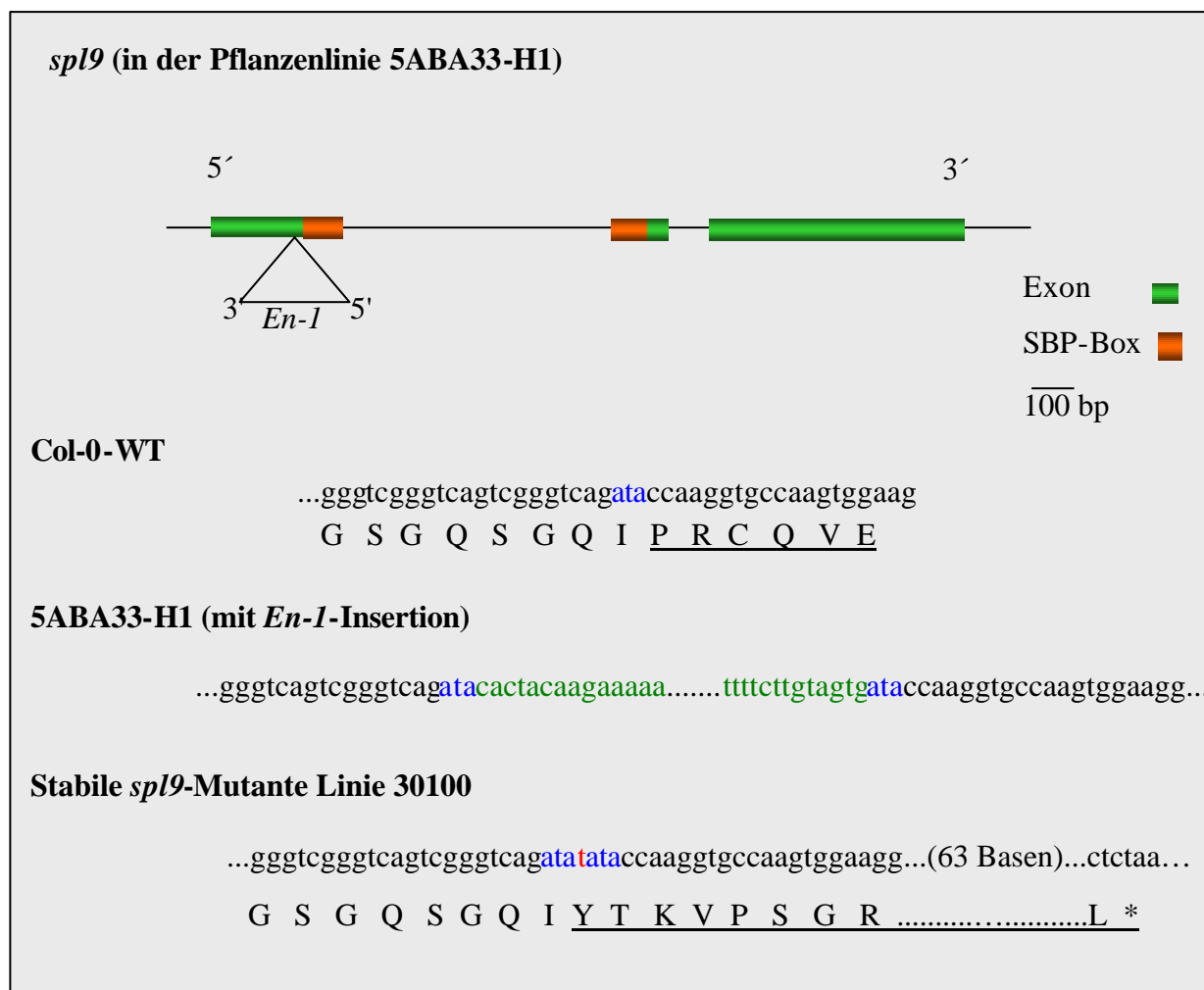
**Abbildung 3-14:** Autoradiogramme von Southernblot-Analysen genomischer DNA, die aus verschiedenen *spl9*-Mutanten isoliert und anschließend mit *EcoRV* gespalten wurde. In A ist genomische DNA aus Pflanzen, die eine *En-1*-Insertion im ersten Exon von *SPL9* enthalten extrahiert worden, wohingegen in B genomische DNA aus *A. thaliana*-Pflanzen mit einer Insertion im ersten Intron von *SPL9* verwendet wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *En-1*-spezifischen Sonde, die das 3' Ende des Transposons erkennt. Bezeichnung der Pflanzen: 1: 5ABA33-G1, 2: 5ABA33-H1, 3: 5ABA11-B2, 4: 5ABA11-F2, 5: 5ABA11-H2, 6: 5ABA11-C2, 7: 5AVB55-A1, 8: 5AVB55-A2, 9: 5AVB88-A1, 10: 5AVB88-A2, 11: 5AVB102-A1, 12: 5AVB102-A2, 13: 5AVB102-A3, 14: 5AVB107-A1, 15: WT

Die Linien, in denen das *En-1*-Transposon im ersten Intron lokalisiert ist, enthalten viele Transposons im Genom (Abb. 3-14 B). In einer der Linien mit einer Insertion eines *En-1*-Elements im ersten Exon von *SPL9* (5ABA33-H1) hingegen, ist nur noch ein weiteres Transposon im Genom vorhanden (Abb. 3-14 A). Die ca. 3 kb große Bande in der Abbildung 3-14 A korrespondiert mit der Transposoninsertion in *SPL9*. Die Pflanzen der Linie 5ABA11 waren heterozygot für die *En-1*-Insertion in *SPL9*, die verschiedenen hier untersuchten Nachkommen (5ABA11-B2, -F2, -C2 und -H2) segregierten demzufolge für die Transposoninsertionen. In der Linie 5ABA11-C2 ist kein Transposon in *SPL9* vorhanden, entweder als Folge dieser Segregation oder weil das Transposon den Lokus verlassen hat und eine Revertante entstanden ist.

### 3.4.2.1 Isolation einer stabilen *sp19*-Mutante

Bei der Insertion von *En-1* in einen Locus entsteht eine Dreibasenpaarverdopplung. Bei dem Verlassen des Locus bleibt diese dann auch oft bestehen. In einigen Fällen allerdings geschieht das Ausschneiden des Transposons durch die Transposase und die Religation der DNA-Enden ungenau und mehr oder weniger Basen können an der ursprünglichen Insertionsstelle zurückbleiben. Dies kann für die Isolation einer stabilen Mutante genutzt werden (Cardon *et al.*, 1993).

Um eine solche stabile Mutante zu isolieren, wurde eine Population von 100 Nachkommen der Pflanze 5ABA33-H1 auf ein ungenaues Ausschneiden des Transposons hin untersucht. Es konnte eine Mutante gefunden werden (Pflanze 30100), die homozygot für eine Insertion von vier Basenpaaren in *SPL9* ist. Diese zusätzlichen vier Basenpaare verursachen eine Verschiebung des Leserasters, wodurch 86 Basenpaare nach der Verdoppelung ein Stopkodon zum Ende des Leserasters führt. In der Abbildung 3-15 sind sowohl das Wildtyp-*SPL9*-Allel als auch die beiden Allele mit Mutationen im ersten Exon von *SPL9* schematisch dargestellt.



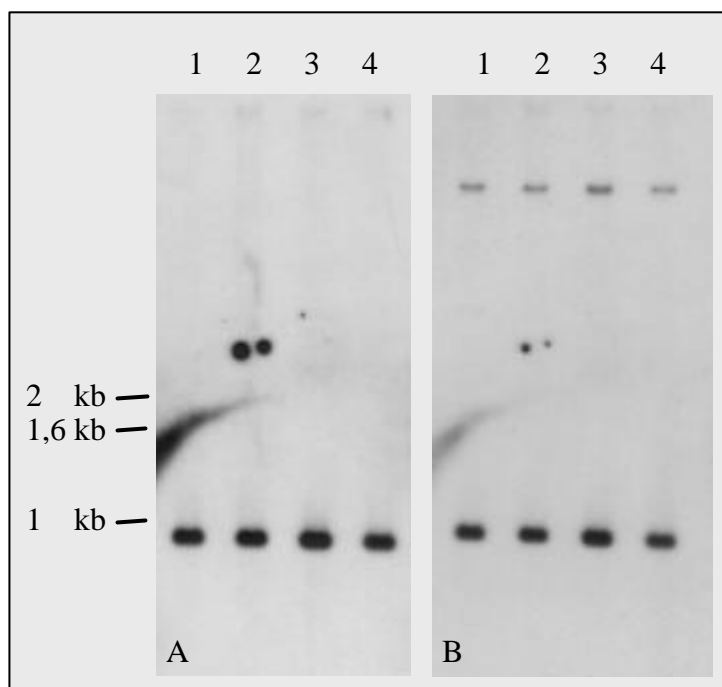
**Abbildung 3-15:** Darstellung der Sequenzunterschiede der verschiedenen *SPL9*-Allele. Durch grüne Schrift sind die Basen des *En-1*-Elements hervorgehoben und durch rote das zusätzliche Thymin in der stabilen *spl9*-Mutante. Durch blaue Schrift sind die drei Basen, die in der stabilen *spl9*-Mutante und der Linie 5ABA33-H1 verdoppelt sind, hervorgehoben. Der Stop ist als \* eingezeichnet. Die unterschiedlichen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *spl9*- und Col-0-Wildtyppflanzen sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Das *En-1*-Element im oberen Teil der Abbildung ist nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Die Insertion des *En-1*-Elements hat eine Dreibasenpaarverdoppelung verursacht (ata...ata). In der stabilen Mutante 30100 ist zusätzlich zu der Insertion der drei Basenpaare ATA, ein Thymin in die *SPL9*-Sequenz eingefügt, so daß insgesamt vier zusätzliche Basenpaare in der Sequenz vorhanden sind.



### 3.4.2.2 Klonierung der flankierenden Bereiche des zweiten *En-1*-Elements aus der Pflanzenlinie 30100

Im Genom der *spl9*-Mutante 30100 ist außer der Vierbasenpaarinsertion noch ein *En-1*-Element vorhanden. Diese Mutation kann ebenfalls für einen mutanten Phänotyp verantwortlich sein. Um zu überprüfen, ob das Transposon in einem Gen inseriert ist, wurden die flankierenden Bereiche des *En-1*-Elements mittels der TAIL-PCR-Methode (Liu *et al.*, 1995) (siehe auch 2.2.13) amplifiziert. Die anschließende Sequenzierung des Fragments ergab, daß das zweite Transposon im letzten Exon eines Gens inseriert ist, das ein unbekanntes Protein kodiert (Genbankzugriffsnummer: AC004667, Position 55456-57196). Dieses Protein enthält einen putativen P-loop – eine ATP/GTP Bindedomäne. Southernblot-Experimente mit *EcoRV* gespaltener genomischer DNA und anschließender Hybridisierung mit einer *En-1*-spezifischen Sonde, sowie einer des amplifizierten Fragments zeigten, daß tatsächlich die gleiche Bande erkannt wird (Abb. 3-16).



**Abbildung 3-16:** Autoradiogramme der Southernblot-Analyse genomischer DNA von verschiedenen Nachkommen der *spl9*-Mutante 30100 (Pflanzen 1 bis 4). Die DNA wurde mit *EcoRV* gespalten. In A erfolgte die Hybridisierung mit einer *En-1*-spezifischen Sonde, die das 3'-Ende des Transposons erkennt und in B mit einer Sonde, die mit dem klonierten unbekanntem Gen hybridisiert.

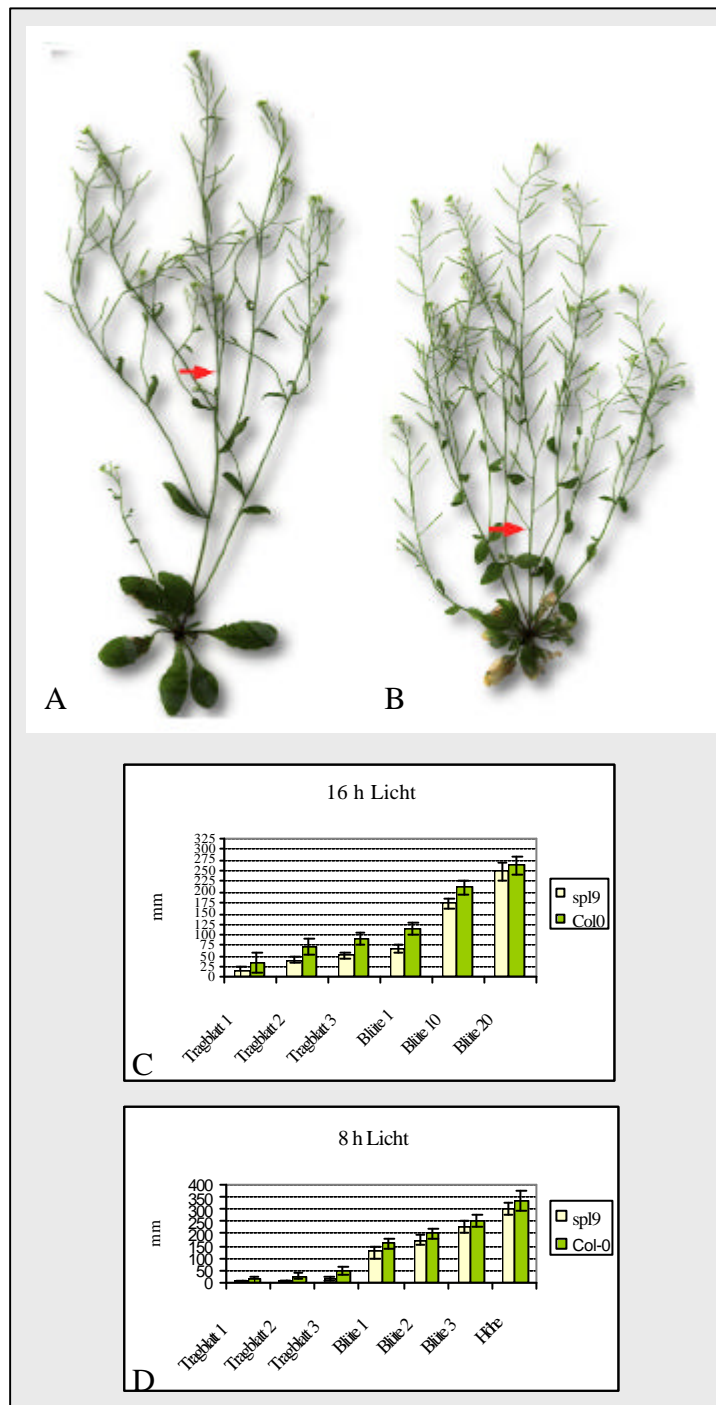
Um den *SPL9-footprint* von möglichen anderen Mutationen zu isolieren, wurde die Linie 30100 zweimal in aufeinander folgenden Generationen mit Wildtyppflanzen gekreuzt. Unter

den Kreuzungsprodukten waren Pflanzen, welche die Vierbasenpaarinsertion in *SPL9* enthielten und kein weiteres Transposon (Pflanzenlinie 30215 bis 30219) bzw. Pflanzen, die lediglich das Transposon und nicht die Vierbasenpaarinsertion in *SPL9* aufwiesen (Pflanzenlinie 30220 bis 30222).

### 3.4.3 Phänotypische Untersuchung der *spl9*-Mutante

Unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert, unterscheidet sich die stabile *spl9*-Mutante der Linie 30100 (siehe auch 3.4.2) vom Wildtyp dadurch, daß die erste und auch, wenngleich in geringerem Maße, die zehnte Schote niedriger, bezüglich des Abstandes zur Rosette, angesetzt ist (Abb. 3-17 B und C). Der Abstand der dazwischen liegenden Schoten zur Rosette ist augenscheinlich auch geringer, dieser wurde aber nicht genau bestimmt.

Unter Kurztagbedingungen hingegen ist kein signifikanter Unterschied zwischen der *spl9*-Mutante und den Wildtyp zu erkennen (Abb. 3-17 D). Die Messung der Schotenhöhe erfolgte, wenn die erste Schote sich gelb verfärbte. Auch der Abstand der ersten drei Tragblätter in Relation zur Rosette wurde sowohl in der *spl9*-Mutante als auch im Wildtyp bestimmt. Unter Lang- und Kurztagbedingungen ist das zweite und das dritte Tragblatt in *spl9*-Mutanten niedriger angesetzt als im Wildtyp. Der Blühzeitpunkt entspricht dem von Wildtyppflanzen. Wie in Abbildung 3-17 gezeigt, hat die dargestellte *spl9*-Mutante (Abb. 3-17 B) mehr Coinfloreszenzen als der Wildtyp (Abb. 3-17 A). Dieser Phänotyp konnte aber nicht durchgängig beobachtet werden.



**Abbildung 3-17:** *A. thaliana*-Wildtyppflanze (A) im Vergleich zur *spl9*-Mutante - Linie 30100 (B). Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert. Die Pfeile kennzeichnen die Position der ersten Schote. In C und D sind Balkendiagramme dargestellt, in denen die Abstände der Tragblätter und einiger Blüten relativ zur Rosette bestimmt wurden. Die Messungen erfolgten in C anhand von Pflanzen, die unter Langtagbedingungen kultiviert wurden. In D dienten Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden als Material. Grüne Balken symbolisieren den Wildtyp, gelbe die *spl9*-Mutante. Die Standardabweichungen sind als Balken angegeben.

Die Pflanzen, die nur noch die *spl9*-Mutation bzw. jene, die ein Transposon in dem unbekanntem Protein enthalten, wurden unter Langtagbedingungen in der Klimakammer kultiviert und anschließend ebenfalls zur Bestimmung der Schotenhöhe herangezogen. Alle Pflanzen wiesen unter diesen Bedingungen einen vom Wildtyp nicht zu unterscheidenden Phänotyp auf (ohne Abbildung). Untersuchungen über mögliche Auswirkungen der Kulturbedingungen auf den mutanten Phänotyp konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

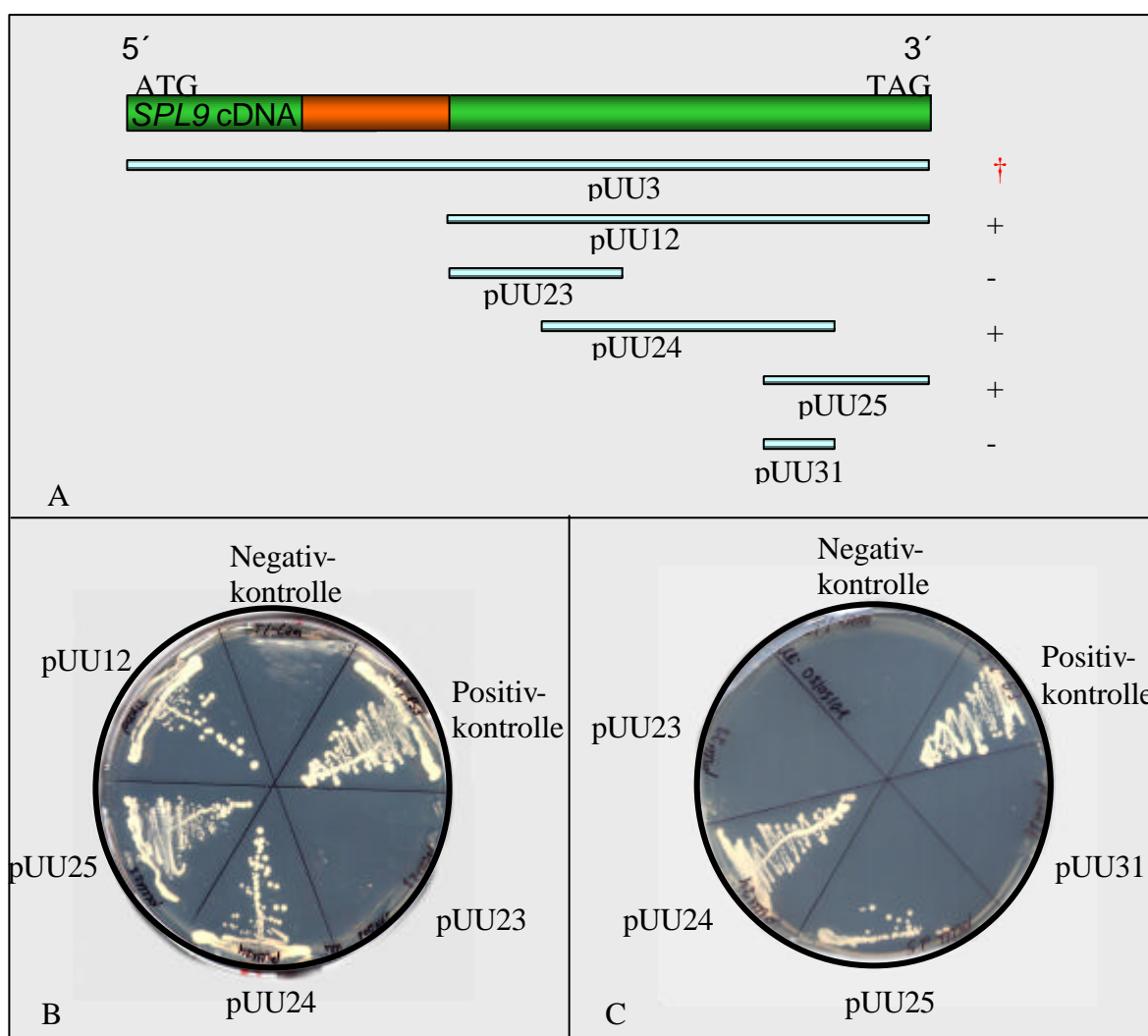
#### 3.4.4 Überexpressionsstudien von *SPL9* in *A. thaliana*

Da die *spl9*-Mutante keinen eindeutigen mutanten Phänotyp aufweist (3.4.3), wurden transgene *A. thaliana* hergestellt, welche die *SPL9*-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaikvirus exprimieren (siehe auch 2.2.28). Die Transformation und anschließende Selektion der transgenen *A. thaliana* erfolgte wie unter 2.2.22 beschrieben. Zehn der elf so hergestellten unabhängigen Linien zeigten in der T1-Generation eine unterdrückte Apikaldominanz, die sich durch einen buschigen Habitus sowie einer stark verkürzten Infloreszenzhauptachse ausdrückte (ohne Abbildung). Die Coinfloreszenzen waren deutlich länger als die Hauptinfloreszenz. In der T2-Generation konnte dieser Phänotyp nicht mehr beobachtet werden. Anschließende Northernblot-Experimente ergaben, daß das Transgen in den untersuchten T2-Linien nicht exprimiert wurde (ohne Abbildung). Von sieben der elf T1-Linien wurde die Anzahl der T-DNA-Insertionen im Genom bestimmt. Hierzu wurde die isolierte genomische DNA mit *EcoRV* gespalten und nach Southernblotting mit einer T-DNA-spezifischen Sonden hybridisiert. Die untersuchten Pflanzen enthielten zwischen einer und fünf T-DNAs pro Pflanze (ohne Abbildung).

#### 3.4.5 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente mit *SPL9*

Da die *spl9*-Mutante keinen eindeutigen mutanten Phänotyp aufweist (3.4.3) und die *SPL9*-überexprimierenden Pflanzen das Transgen nicht exprimieren (3.4.4), sollten mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems mögliche interagierende Proteine identifiziert werden (siehe auch 2.2.19). Wären diese bekannt, könnte dadurch eine Einordnung von *SPL9* in bekannte Netzwerke möglicherweise vereinfacht werden. Die Klonierungsschritte sind unter 2.2.28 beschrieben.

Nach der Transformation von pUU3 (pAS2-1::*SPL9*) in den Hefestamm Y190 und anschließender Selektion auf Mangelmedium-Platten (ohne Tryptophan - Trp) konnte keine Transformante identifiziert werden. Auch die Wiederholung des Experiments ergab kein anderes Ergebnis, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das Vollängen *SPL9*-Protein toxisch auf die Hefezellen wirkt. Um dennoch mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurde eine verkürzte Form der *SPL9*-cDNA in den Vektor pGBKT7 kloniert. Diesem Fragment fehlt der gesamte 5'-Bereich des Gens sowie die SBP-Box (pUU12). Die Transformation in den Hefestamm AH109 war erfolgreich. Daraufhin wurde untersucht, ob dieses Konstrukt möglicherweise die Transkription der Reportergene, die unter der Kontrolle des *GAL4*-Promotors exprimiert werden, von alleine, ohne interagierenden Partner, starten kann. Wie aus Abbildung 3-18 B ersichtlich, sind die Zellen in der Lage, auf Agar-Agarplatten die kein Histidin (-His), Adenin (-Ade) und Tryptophan (-Trp) enthalten zu wachsen. Dies läßt darauf schließen, daß im C-terminalen Bereich von *SPL9* möglicherweise eine Transaktivierungsdomäne vorhanden ist. Als Negativkontrolle dienten die nicht miteinander interagierenden Proteine Lamin C (Mensch) und das große *SV40* T-Antigen und als Positivkontrolle die miteinander interagierenden Proteine P53 (Maus) und das große *SV40* T-Antigen.



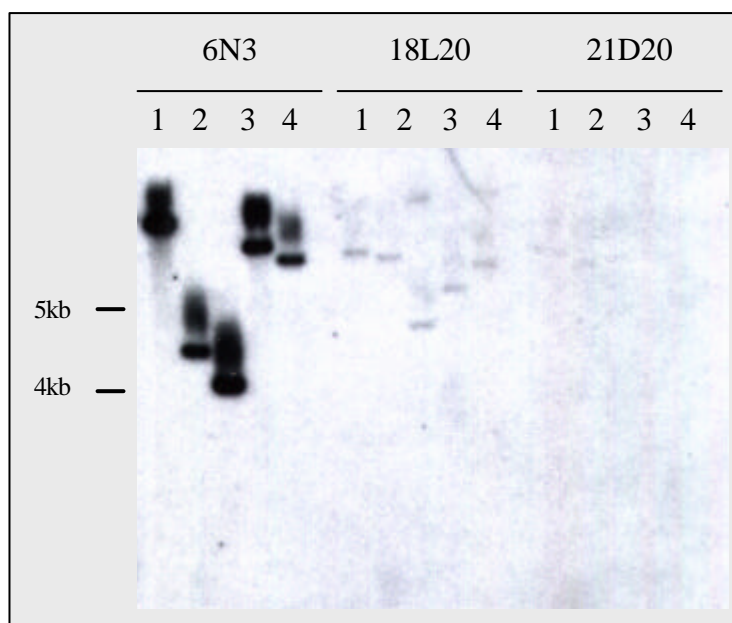
**Abbildung 3-18:** Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment mit dem SPL9-Protein. In A sind die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. In B und C das Ergebnis des Tests auf Aktivierung der Reportergene ohne interagierenden Partner dargestellt. Als Negativkontrolle dienten die nicht miteinander interagierenden Proteine Lamin C (Mensch) und das große SV40 T-Antigen. Als Positivkontrolle die miteinander interagierenden Proteine P53 (Maus) und das große SV40 T-Antigen. Die Hefezellen wurden auf Mangelmediumplatten ohne Tryptophan, Histidin und Adenin kultiviert. In A orange dargestellt ist die SBP-Box. Mit + und - sind die Konstrukte bezeichnet, die in der Lage sind die Reportergene zu aktivieren bzw. nicht zu aktivieren und † bedeutet lethal. Nähere Beschreibung im Text.

Um zu bestimmen in welchem Bereich die Aktivierungsdomäne liegt, wurden weitere Konstrukte hergestellt, die kleinere Bereiche der SPL9-cDNA enthalten (pUU23, pUU24 und pUU25). Nach Transformation in Hefe und anschließender Kultur auf Selektionsmedium (-His/-Trp/-Ade) wurde festgestellt, daß die Hefezellen, welche die Konstrukte pUU24 bzw. pUU25 enthalten, wuchsen, wohingegen mit pUU23 transformierte Hefen kein Wachstum zeigten (Abb. 3-18 B und C). Um zu überprüfen, ob der 66 Basenpaar lange Bereich, den pUU24 und pUU25 gemeinsam haben ausreicht, um die Reportergene zu aktivieren, wurde

ein weiteres Konstrukt (pUU31) hergestellt und in Hefe transformiert. Dieses enthält den überlappenden Bereich von pUU24 und pUU25. Auch diese Zellen wurden auf Selektionsplatten getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-18 C zu sehen. Das Konstrukt pUU31, in Hefe transformiert und exprimiert, ist nicht in der Lage, auf -His/-Trp/-Ade-Medium zu wachsen. SPL9 enthält den Ergebnissen zufolge eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich des Proteins. Die genaue Größe und Position der Domäne konnte aber nicht bestimmt werden.

### 3.5 Die Identifikation und Charakterisierung von *SPL15*

Auf Autoradiogrammen von Southernblots genomischer DNA, die mit *EcoRV* gespalten wurde und mit einer *SPL9*-spezifischen Gensonde (siehe auch 2.2.29) hybridisiert wurde, ist eine ca. 4 kb große Bande zu sehen, die nicht *SPL9* zugeordnet werden konnte. Um zu klären, ob diese Bande durch eine Kreuzhybridisierung der *SPL9*-Gensonde mit einem anderen, möglicherweise bis dahin unbekanntem *SPL*-Gen zurückzuführen ist und dieses zu isolieren, wurden IGF BAC-Filter (Institut für Genbiologische Forschung; Mozo *et al.*, 1998) mit der genspezifischen *SPL9*-Sonde hybridisiert. Es wurden mehrere BACs identifiziert, die mit der Sonde hybridisierten (ohne Abbildung). Die drei am stärksten hybridisierenden BAC-Klone, IGF\_B122N036Q3 (=6N3), IGF\_B122L2018Q3 (=18L20) und IGF\_B122D2021Q3 (=20D21), wurden bestellt und die BAC-DNA isoliert. Nach Spaltung der BAC-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen, Southernblotting und anschließender Hybridisierung mit der *SPL9*-Sonde sich heraus, daß lediglich der BAC mit der Bezeichnung 6N3 hybridisierte (siehe Abb. 3-19).



**Abbildung 3-19:** Autoradiogramm der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen IGF BAC-DNA nach Southernblotting und anschließender Hybridisierung mit einer *SPL9*-spezifischen Gensonde. Die Bezeichnungen der der BACs sind oberhalb der Spuren zu finden. Verwendete Restriktionsendonukleasen: 1: *EcoRI*, 2: *HindIII* 3: *EcoRV*, 4: *XbaI*, 5: *XhoI*. Der Film wurde über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Kassette mit Verstärkerfolie exponiert.

Gleichzeitig wurde der Ansatz verfolgt, dieses möglicherweise noch unbekanntes putative *SPL*-Gen durch Datenbanksuchen aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu *SPL9* zu identifizieren. Zunächst war dies erfolglos, doch dann erschien die Sequenz eines TAMU BAC-Klons (T10K17) in der Datenbank (Genbankzugriffsnummer: AL132977), auf dem ein Gen lokalisiert ist, das eine große Sequenzähnlichkeit zu *SPL9* aufweist. Oligonukleotide, die aufgrund der Sequenzinformation des TAMU BACs entworfen wurden, wurden für eine PCR eingesetzt, in welcher wiederum der identifizierte IGF BAC (6N3) als Matrize diente. Die anschließende Sequenzierung des amplifizierten Fragments ergab, daß beide BAC Klone, der TAMU und der IGF BAC 6N3, dasselbe Gen enthalten. Dieses ist ein bis dahin unbekanntes *SPL*-Gen und wurde als *SPL15* bezeichnet.

*SPL15* ist auf dem unteren Arm von Chromosom 3 lokalisiert (Abb. 3-4) und der offene Leserahmen hat eine Länge von 1065 Basenpaaren. Im Anhang C ist die genomische Sequenz von *SPL15* dargestellt. Nach dem Abschluß des Sequenzierungsprojekts des *A. thaliana*-Genoms (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) konnte bestätigt werden, daß *SPL15* dasjenige *SPL*-Gen ist, das die größte Sequenzähnlichkeit zu *SPL9* aufweist. Das wird auch durch die im Abschnitt 3.1.1 dargestellten Stammbaumanalysen verdeutlicht (siehe Abb. 3-3).

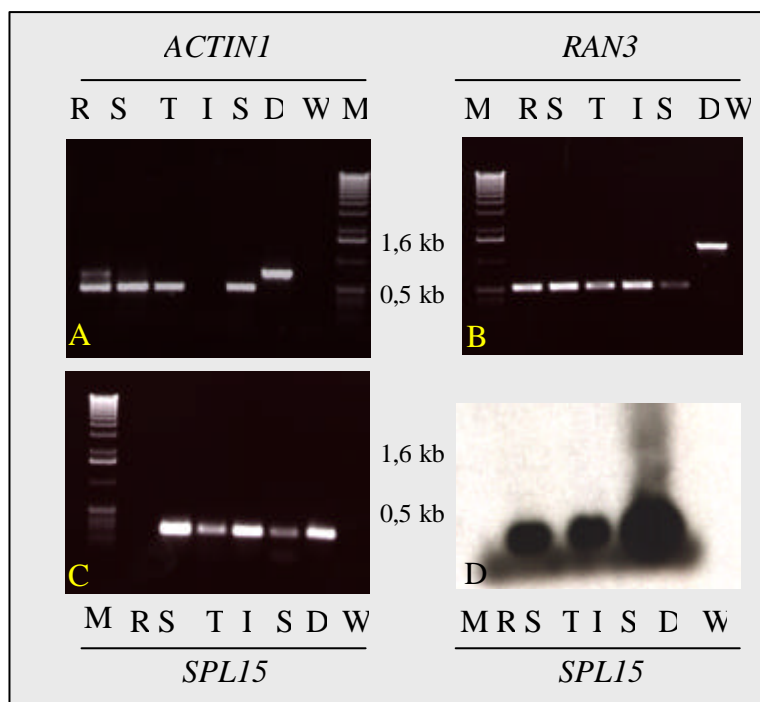


Die ZIGIA-Population (siehe 2.2.27) wurde auf eine mögliche *spl15*-Mutante hin durchsucht. Es war dort nicht möglich, eine *spl15*-Mutante zu identifizieren.

### **3.5.1 Die Isolation der *SPL15*-cDNA**

Die *SPL15*-cDNA, beginnend mit dem Startkodon bis zum Stopkodon, wurde aus einem SMART<sup>TM</sup>-cDNA-*Pool* isoliert (siehe 2.2.14; freundlicherweise von Dr. U. Hartmann (MPIZ Köln) zur Verfügung gestellt). Die Oligonukleotide GC668 und GC669 kamen hierbei zum Einsatz. Durch den Vergleich mit der genomischen mit der cDNA-Sequenz wurden zwei Introns in *SPL15* identifiziert (siehe auch Abb. 3-2). Die Exon-Intron-Grenzen stimmen mit denen von *SPL9* überein. Durch ein Vergleich der Proteinsequenzen von *SPL9* und *SPL15* konnte gezeigt werden, daß *SPL15* eine 64%ige Identität zu *SPL9* aufweist (Abb. 3-20). *SPL9* und *SPL15* können demzufolge als weiteres Genpaar (Cardon *et al.*, 1999) bezeichnet werden.





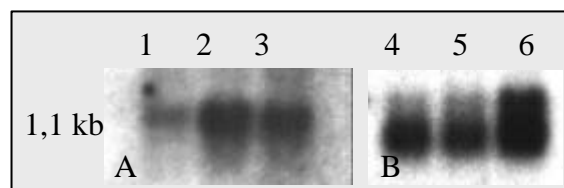
**Abbildung 3-21:** Expressionsanalyse von *SPL15* (C und D) durch RT-PCR-Experimente. Als Kontrollen dienten *ACTINI1* (A) und *RAN3* (B). In C ist das Ergebnis der RT-PCR nach 40 Zyklen mit *SPL15*-spezifischen Oligonukleotiden dokumentiert. In D ist das Autoradiogramm des Southernblots der RT-PCR-Produkte nach 25 Zyklen und anschließender Hybridisierung mit einer *SPL15*-spezifischen Gensonde dargestellt. Der Film wurde drei Stunden bei RT exponiert. Es bedeuten: M: Größenstandard; R: Rosettenblätter; Sp: Sproßachsen; T: Tragblätter; I: Infloreszenzspitzen; S: Schoten; D: genomische DNA; W: Wasser.

Das *SPL15*-Transkript ist in allen Geweben außer in Rosettenblättern vorhanden, wobei in Sproßachsen und Infloreszenzspitzen am meisten cDNA amplifiziert worden war. Die erwartete Größe des amplifizierten *SPL15*-cDNA-Fragments betrug 299 Basenpaare. Das aus genomischer DNA amplifizierte *SPL15*-Fragment hat die gleiche Größe wie jene aus cDNA amplifizierten, da die verwendeten Oligonukleotide in diesem Fall nicht stromauf- bzw. stromabwärts von einem Intron lagen (wie in dem Fall von *ACTINI1*, *RAN3* und *SPL9* – siehe 3.4.1). Das Ergebnis der Southern-Hybridisierung der RT-PCR-Produkte nach 25 Zyklen mit einer *SPL15*-spezifischen Sonde (2.2.12) ist in der Abbildung 3-21 D dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß nach 25 PCR Zyklen noch keine *SPL15*-spezifische cDNA aus Rosettenblätter-cDNA, Hochblätter-cDNA und Schoten-cDNA amplifiziert wurde. Wohingegen in den cDNA-Präparaten aus Sproßachsen-RNA und Infloreszenzspitzen-RNA bereits ein starkes Signal zu sehen ist. *SPL15* wird demzufolge in den verschiedenen Teilen von *A. thaliana* in unterschiedlicher Stärke exprimiert. Die stärkste Expression ist in Sproßachsen und Infloreszenzspitzen nachzuweisen.

### 3.5.3 Überexpressions- und *antisense* Expressionsstudien von *SPL15* in *A. thaliana*

Da keine *spl15*-Mutante isoliert werden konnte, sollte die Funktion des *SPL15*-Genprodukts durch Überexpressionsexperimente der *SPL15*-cDNA in *sense*-Orientierung (pUU14) bzw. *antisense*-Orientierung (pUU15) unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors in *A. thaliana* aufgeklärt werden. Die Konstrukte pUU14 und pUU15 enthalten am 3'- bzw. am 5'-Ende Sequenzen des TOPO-blunt-Vektors. Diese Sequenzen sind auf eine *dam*-Methylierungsstelle und damit verbundenes Unvermögen von *Xba*I zu schneiden zurückzuführen (siehe auch 2.2.28).

Die Pflanzen, die *SPL15* in *sense*-Orientierung konstitutiv exprimieren, wurden unter Langtagbedingungen kultiviert und wiesen in der T1-Generation keine phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp auf. Jene, die *SPL15* in *antisense*-Orientierung konstitutiv exprimieren, wurden ebenfalls unter Langtagbedingungen kultiviert und zeigten zunächst ebenfalls keinen mutanten Phänotyp. Durch Northernblotting und anschließender Hybridisierung mit *SPL15*-spezifischen Sonden (siehe auch 2.2.29) wurde nachgewiesen, daß die Transgene in jeweils drei untersuchten unabhängigen Transformanten der T1-Generation exprimiert wurden (Abb. 3-22). In dem Fall der pBAR35S::*SPL15-antisense*-Linien wurde eine strangspezifische DNA-Gsonde mittels PCR hergestellt. Hierfür wurde das Oligonukleotid GC666 verwendet.

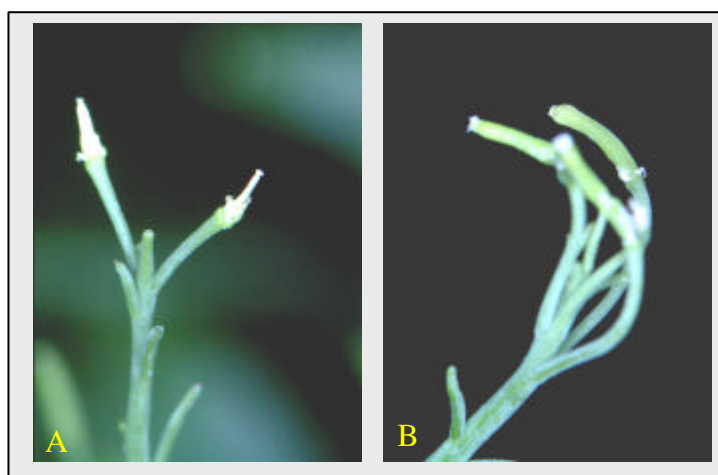


**Abbildung 3-22:** Northernblot-Analyse mit Gesamt-RNA extrahiert aus *A. thaliana*, die *SPL15* in *sense*- (A) bzw. *antisense*-Orientierung (B) konstitutiv exprimieren. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA von je drei unabhängigen Transformanten der T1-Generation (Pflanzen 1 - 6) aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte in dem Falle der *antisense*-RNAs mit einer strangspezifischen *sense*-DNA-Sonde, die durch PCR hergestellt wurde. Der Film wurde über Nacht bei -80°C exponiert.

Zu diesem Zeitpunkt wurde ein von Novartis gestellter Patentantrag (Internationale Publikationsnummer: WO 00/24914, Publikationsdatum: 04/05/2000) öffentlich zugänglich, in dem vermutet wird, daß die *SPL1*-, *SPL3*-, *SPL5*- sowie *SPL9*-Genprodukte möglicherweise im Zusammenhang mit Apomixis eine Rolle spielen. Unter Apomixis ist die

vegetative Vermehrung durch Samen zu verstehen (Nogler, 1984). Dabei entsteht ohne Befruchtung ein Embryo.

Um zu überprüfen, ob sich die transgenen, *SPL15* in *sense*- oder *antisense*-Orientierung konstitutiv exprimierenden, *A. thaliana* möglicherweise apomiktisch fortpflanzen können, wurden die Staubblätter von drei jungen Blüten der T1-Generation von je drei pBAR35S::*SPL15 sense*- und *antisense*-Pflanzen entfernt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in der Abbildung 3-23 dargestellt.



**Abbildung 3-23:** Infloreszenzspitzen von *SPL15* in *sense*- (A) bzw. *antisense*-Orientierung (B) exprimierenden *A. thaliana* nach Emaskulation. Die Expression der Transgene erfolgte unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert und die Staubblätter noch vor einer möglichen Selbstbefruchtung entfernt. Die anderen Blüten wurden ebenfalls entfernt.

Alle Karpelle der präparierten Blüten der pBAR35S::*SPL15-sense*-Linien starben einige Tage nach der Entfernung der Staubblätter ab und es entwickelten sich keine Schoten. Im Gegensatz dazu blieben alle präparierten Karpelle (und natürlich auch die nicht präparierten) der pBAR35S::*SPL15-antisense*-Blüten grün und begannen einige Tage später sich zu strecken. Nach dem Abreifen der Schoten konnten allerdings keine Samen aus diesen gewonnen werden.

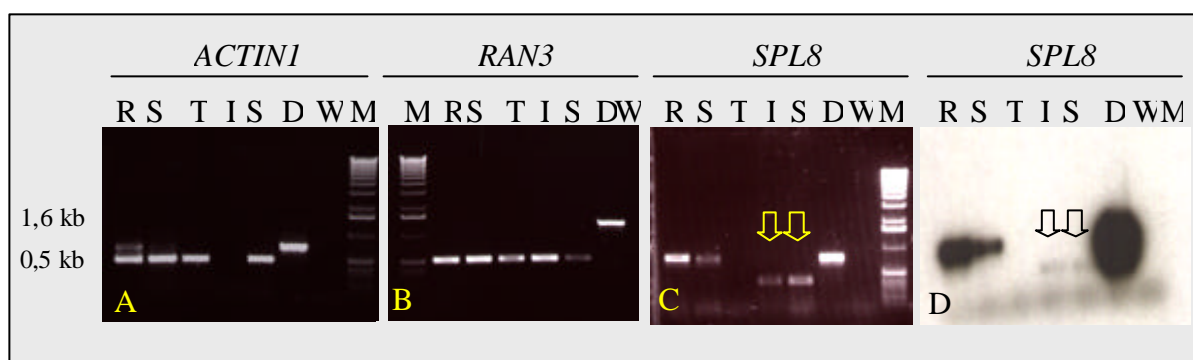
### 3.6 Die Charakterisierung des *SPL8*-Gens und der *spl8*-Mutante

*SPL8* ist auf dem oberen Abschnitt des Chromosoms 1 lokalisiert (siehe auch Abb. 3-4; Genbankzugriffsnummer: AJ011641, cDNA Genbankzugriffsnummer.: AJ011642) und hat zwei Introns (siehe auch Abb. 3-2).

Es konnten aus verschiedenen Populationen Transposon-mutagenisierter *A. thaliana*-Pflanzen drei verschiedene *SPL8*-Allele isoliert werden (siehe Kapitel 3.3.3). In den folgenden Abschnitten werden die Expression von *SPL8* sowie der Phänotyp der *spl8*-Mutante beschrieben.

### 3.6.1 Die Expression von *SPL8*

Wie von Cardon *et al.* (1999) gezeigt wurde, nimmt die Expression von *SPL8* im Laufe der Entwicklung zu. Während in einer bis drei Wochen alten Pflanzen durch Northernblot-Experimente nur wenig *SPL8*-Transkript nachgewiesen werden kann, ist in Infloreszenzen eine deutlich größere Menge detektierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von *SPL8* in verschiedenen Teilen von *A. thaliana* durch RT-PCR-Experimente genauer untersucht (siehe auch 2.2.12). Es wurden die gleichen Gesamt-RNAs wie unter 3.4.1 beschrieben verwendet. Das Ergebnis der RT-PCR-Experimente sind in den Abbildungen 3-24 C und D dargestellt.



**Abbildung 3-24:** Expressionsanalyse von *SPL8* durch RT-PCR-Experimente. Nach 40 PCR-Zyklen wurden die Fragmente auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrollen dienten *ACTIN1* (A) und *RAN3* (B). In C ist das Ergebnis der RT-PCR mit *SPL8*-Oligonukleotiden nach 40 PCR-Zyklen und in D das Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung der PCR-Produkte nach 25 Zyklen dokumentiert. Der Film wurde drei Stunden bei RT exponiert. Die Pfeile kennzeichnen die cDNAs der erwarteten Größe. Es bedeuten: M: Größenstandard; R: Rosettenblätter; Sp: Sproßachsen; T: Tragblätter; I: Infloreszenzspitzen; S: Schoten; D: genomische DNA; W: Wasser.

In der Abbildung 3-24 C ist das Ergebnis der RT-PCR nach 40 Zyklen, nachdem die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, gezeigt. In Abbildung 3-24 D hingegen ist das Ergebnis der RT-PCR nach 25 Zyklen und anschließender Southern-Hybridisierung mit einer *SPL8*-spezifischen Sonde dokumentiert.

*SPL8* wird in Rosettenblättern, Sproßachsen, Infloreszenzspitzen und Schoten exprimiert. Die Größe des amplifizierten cDNA-Abschnitts in Rosettenblättern und Sproßachsen entspricht 780 Basenpaaren, während sie in Infloreszenzspitzen und Schoten 380 Basenpaare beträgt (Pfeile). Der Längenunterschied stimmt mit der Größe des ersten Introns überein, das die SBP-Box unterbricht. Die *SPL8*-RNA wird möglicherweise Pflanzenteil-abhängig unterschiedlich gespleißt. Ob bezüglich des zweiten Introns von *SPL8* ein ähnliches Phänomen zu beobachten ist, wurde nicht untersucht. Als Kontrollen dienten hier wiederum *ACTIN1* und *RAN3* (Abb. 3-24 A bzw. B; und siehe auch Abb. 3-12).

### 3.6.2 Genotypische Untersuchung der *spl8*-Mutanten

Nachkommen der zwei *spl8*-Mutanten, die aus der SLAT-Kollektion isoliert wurden, im Folgenden als 30213 sowie 30214 bezeichnet, wurden unter Langtagbedingungen kultiviert und zur Isolation genomischer DNA verwendet. Die DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* gespalten und nach gelelektrophoretischer Trennung der entstandenen Fragmente auf eine Nylon Membran übertragen. Dann erfolgte zunächst eine Hybridisierung mit einer DNA-Gensonde, die das rechte Ende des Transposons erkennt und in einer weiteren Hybridisierungsreaktion wurde eine Sonde verwendet, die mit dem linken Ende hybridisiert. In der Linie 30214 konnten zwei *dSpm*-Elemente detektiert werden, in der Linie 30213 lediglich eins (ohne Abbildung). Die primären Transformanten der SLAT-Kollektion enthielten nach Tissier *et al.* (1999) auch eine T-DNA-Insertion. In den Pflanzenlinien 30213 und 30214 konnte keine T-DNA mehr durch Hybridisierungsexperimente nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

Die aus der ZIGIA-Population isolierten Mutanten enthalten mehrere *En-1*-Insertionen (ohne Abbildung), was ebenfalls durch Hybridisierungsexperimente nachgewiesen wurde.

In allen folgenden Experimenten wurde die *spl8*-Mutante verwendet, für die lediglich eine *dSpm*-Insertion nachgewiesen werden konnte (Pflanzenlinie 30213).

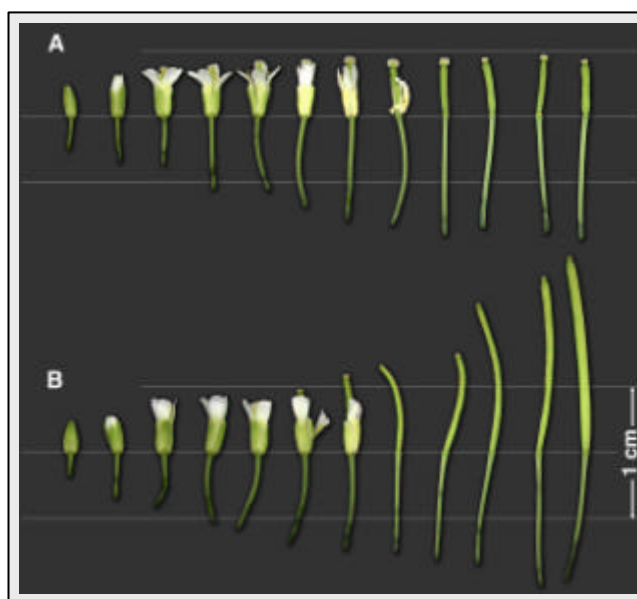
### 3.6.3 Phänotypische Untersuchungen der *spl8*-Mutante

A. *thaliana*-Wildtyppflanzen sowie *spl8*-Mutanten wurden unter Lang- und Kurztagbedingungen im Gewächshaus, im Falle der Langtagbedingungen auch zusätzlich in Klimakammern kultiviert und die Phänotypen der Pflanzen miteinander verglichen.

Homozygote *spl8*-Mutanten sind unter Langtagbedingungen in der Klimakammer steril. Wird die Lichtdauer verringert, werden in späteren Stadien der Entwicklung der Pflanzen einige Schoten gebildet, die Samen hervorbringen. Unter Kurztagbedingungen sind lediglich die ersten gebildeten Schoten steril. Kreuzungen, in denen *spl8*-Mutanten als Pollenspender bzw. *A. thaliana*-Wildtyppflanzen als Pollenspender verwendet wurden ergaben, daß eine Befruchtung der *spl8*-Mutanten möglich ist und daß die wenigen Pollen, die gebildet werden, funktional sind. Der Erfolg der Kreuzung wurde durch PCR-Analysen in der F1-Generation nachgewiesen. In dem Falle einer erfolgreichen Kreuzung konnte die *spl8*-Mutation in den für die Kreuzung verwendeten Wildtyppflanzen nachgewiesen werden. Wurden Wildtyppflanzen als Pollenspender verwendet, konnte in der F1-Generation das *SPL8*-Wildtypallel in den zuvor homozygot *SPL8*-mutanten Linien nachgewiesen werden. Auch eine Kreuzung der drei verschiedenen *spl8*-Mutanten miteinander (siehe auch Abschnitt 3.3.3) ist wahrscheinlich möglich. Da die daraus resultierenden Samen noch nicht wieder ausgelegt werden konnten, konnte der Erfolg der Kreuzung aber noch nicht bestätigt werden.

In den folgenden Abschnitten wird die phänotypische Charakterisierung der *spl8*-Mutante näher beschrieben.

In der Abbildung 3-25 sind Blüten und Schoten unterschiedlicher Entwicklungsstadien von *A. thaliana*-Pflanzen und *spl8*-Mutanten abgebildet. Alle dargestellten Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert.

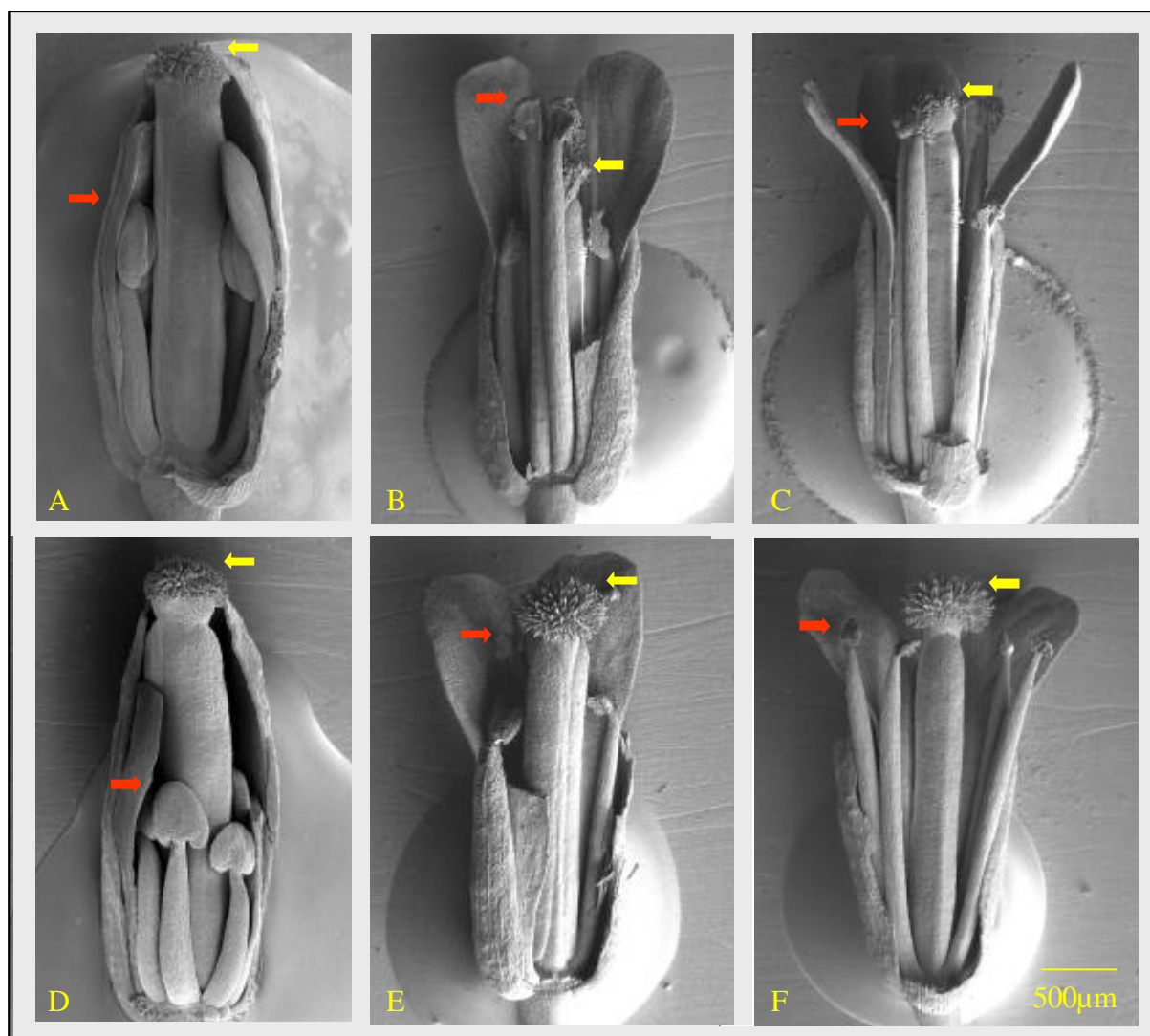


**Abbildung 3-25:** Vergleich der Schotenentwicklung von *spl8*-Mutanten (A) sowie *A. thaliana*-Wildtyppflanzen (B). Geerntet wurden alle entwickelten Schoten und älteren Blüten bis zum Stadium 12. Die Analyse erfolgte mit dem binokulären Mikroskop.



Beginnend mit der Blüte im Stadium 12 (Smyth *et al.*, 1990) wurden alle älteren Blüten und Schoten einer Wildtypinfloreszenz als auch einer *spl8*-Infloreszenz geerntet. Während die siebte Blüte des Wildtyps (Blütenstadium 15) schon deutlich gestreckte Karpelle hat, sind diese in der *spl8*-Mutante nicht gestreckt. Während Schoten im Blütenstadium 17 in Wildtyppflanzen ca. 12 mm lang sind, erreichen sie zu einem vergleichbaren Zeitpunkt in *spl8*-Pflanzen lediglich eine Länge von ca. 4 mm. Auffallend ist außerdem, daß die Papillen der Narbe im Wildtyp bereits im Stadium 16 deutlich ausgetrocknet sind, wohingegen sie in der *spl8*-Mutante weiterhin frisch bleiben. Die vegetative Entwicklung von *spl8*-Pflanzen verläuft dem Anschein nach wie die des Wildtyps. Ebenso der Blühzeitpunkt ist unverändert. Eine genauere Analyse der Blüten ergab, daß die *spl8*-Mutante eine reduzierte männliche Fertilität aufweist. Homöotische Veränderungen der *spl8*-Blüten konnten nicht beobachtet werden.

In der Abbildung 3-26 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtypblüten als auch von *spl8*-Blüten unterschiedlichen Entwicklungsstadiums dargestellt.



**Abbildung 3-26:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *A. thaliana*-Wildtypblüten (A bis C) sowie Blüten der *spl8*-Mutante (D bis F). Abbildungen A und D zeigen Blüten des Stadiums 12, Abbildungen B und E des Stadiums 14 und Abbildungen C und F des Stadiums 15 der Blütenentwicklung. Alle Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert. Durch rote Pfeile wurde die Höhe der jeweils längsten Staubblätter hervorgehoben. Durch gelbe Pfeile ist die Höhe des Gynoeceums gekennzeichnet.

Bereits im Blütenstadium 12 sind deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante auszumachen. Die Filamente der Staubblätter der *spl8*-Mutante sind deutlich kürzer und die Antheren mißgebildet. Die Theken sind deutlich kürzer als im Wildtyp. Im Stadium 14 der Blütenentwicklung sind die Staubblätter im Wildtyp deutlich länger als das Gynoeceum. In *spl8*-Mutanten hingegen sind sie deutlich kürzer als das Gynoeceum. Ein Stadium weiter, im Stadium 15, erreichen die Staubblätter der *spl8*-Mutante dann die Unterkante der Narbe. In Wildtyp sind sie zu diesem Zeitpunkt wieder kleiner als im Blütenstadium 14 und haben in etwa die gleiche Höhe wie das Gynoeceum. Am stärksten ist der Unterschied in der Länge der Staubblätter zwischen Wildtyp und *spl8*-Mutante demzufolge im Stadium 14 der

Blütenentwicklung ausgeprägt. In der Abbildung 3-26 ist außerdem zu erkennen, daß das Gynoeceum der *spl8*-Mutante relativ zur Länge der Petalen ein wenig länger ist als im Wildtyp.

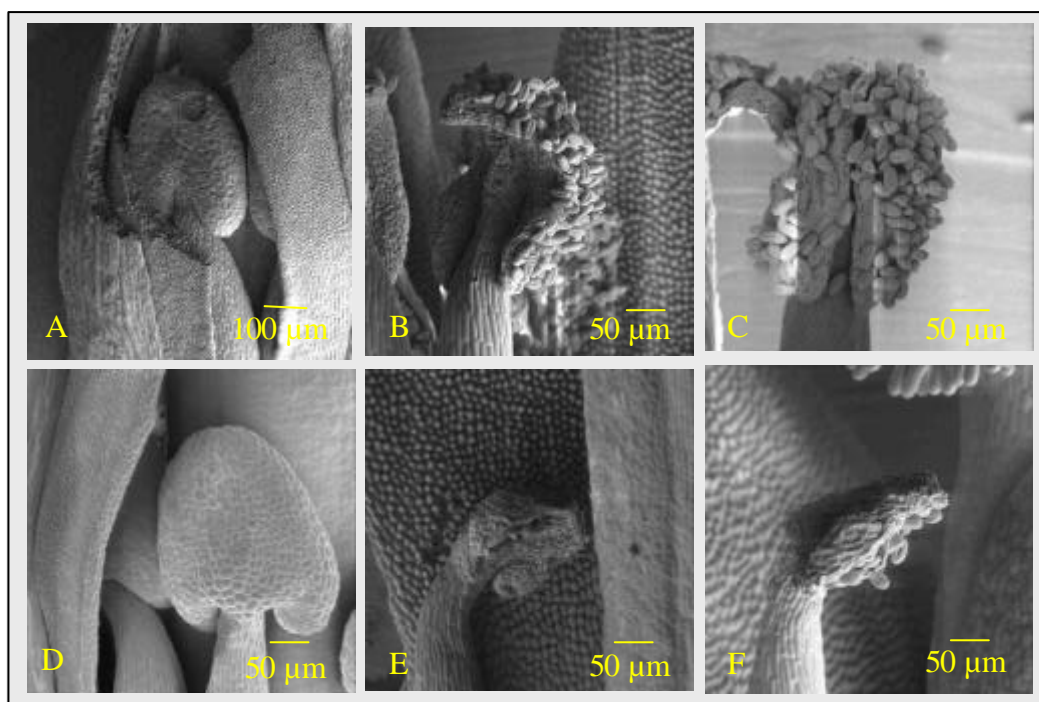
Auffallend ist außerdem, daß im Stadium 14 in Wildtypblüten die Antheren und Narben mit Pollenkörnern überdeckt sind wohingegen kaum Pollenkörner auf Antheren und Narben von *spl8*-Blüten zu finden sind (Abb. 3-27).



**Abbildung 3-27:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vom Gynoeceum und von Staubblättern des *A. thaliana*-Wildtyps (A) und der *spl8*-Mutante (B). Blüten befinden sich im Stadium 15 der Blütenentwicklung. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert.

Ein weiteres Charakteristikum der *spl8*-Mutante sind die selbst im Stadium 15 der Blütenentwicklung noch langen und frisch aussehenden Papillen der Narbe (Abb. 3-27).

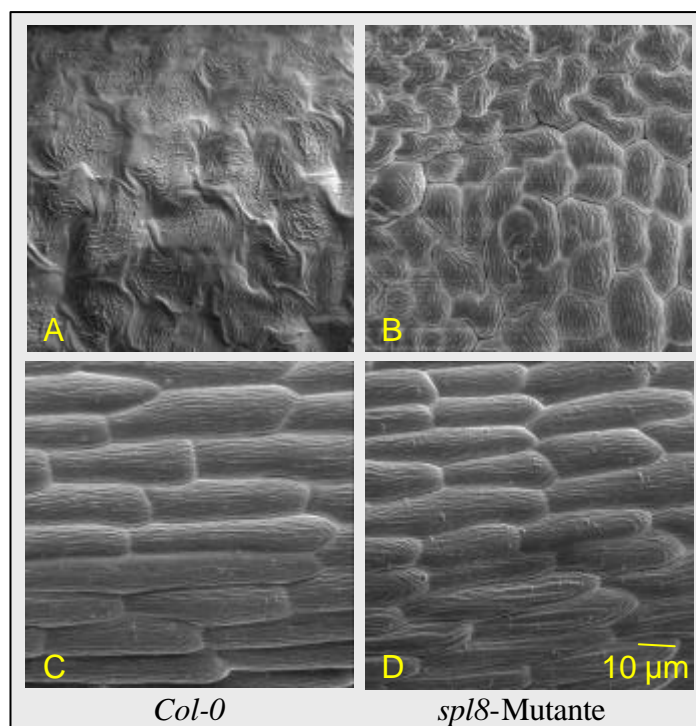
In der Abbildung 3-28 sind die vergrößerten Ausschnitte von Antheren sowohl des Wildtyps als auch der *spl8*-Mutante zu sehen.



**Abbildung 3-28:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *A. thaliana*-Antheren. In der oberen Reihe (A bis C) sind *A. thaliana*-Wildtyppflanzen dargestellt, in der unteren Reihe (D bis F) *spl8*-Mutanten. Abbildung A und D stellen Blüten des Stadiums 12, B und E des Stadiums 14 und C und F des Stadiums 15 der Blütenentwicklung dar. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert. In A entspricht der Balken 100 µm während er in B bis F 50 µm entspricht.

Offensichtlich können sich die Antheren der *spl8*-Mutante öffnen und es werden auch einige Pollenkörner gebildet. Die Form der noch geschlossenen Antheren unterscheidet sich jedoch deutlich vom Wildtyp, sie sind herzförmig und kleiner als diese. In der Abbildung 3-28 A wurde ein anderer Maßstab als in den anderen Teilabbildungen 3-28 verwendet. Die dargestellte Wildtypanthere (Abb. 3-28 A) ist fast doppelt so groß wie die *spl8*-Anthere (Abb. 3-28 D).

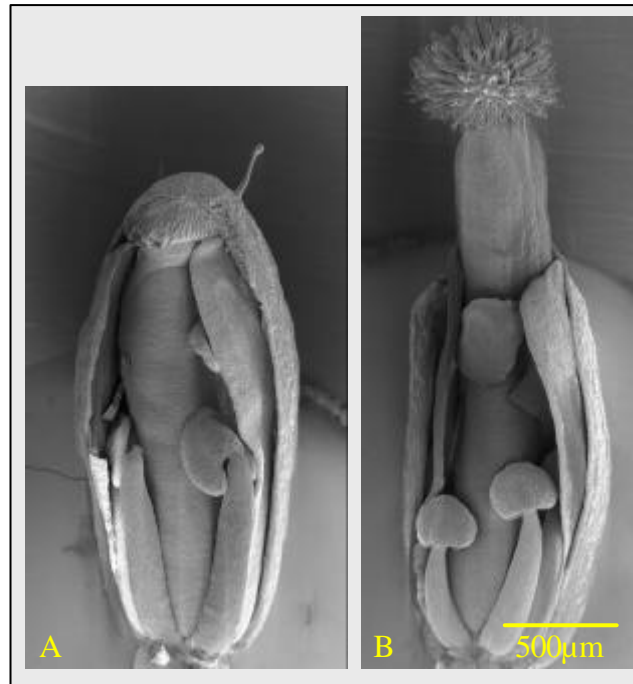
Die Oberflächen der Antheren und der Filamente im Blütenstadium 12 vom Wildtyp und der *spl8*-Mutante sind in der Abbildung 3-29 dargestellt.



**Abbildung 3-29:** Vergrößerte Ausschnitte der Oberflächen der in der Abbildung 3-28 dargestellten Staubblätter des Stadiums 12 der Blütenentwicklung. In A und B sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Antheren und in C und D von Filamenten dargestellt. A und C: *A. thaliana*-Wildtyp; B und D: *spl8*-Mutante. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert.

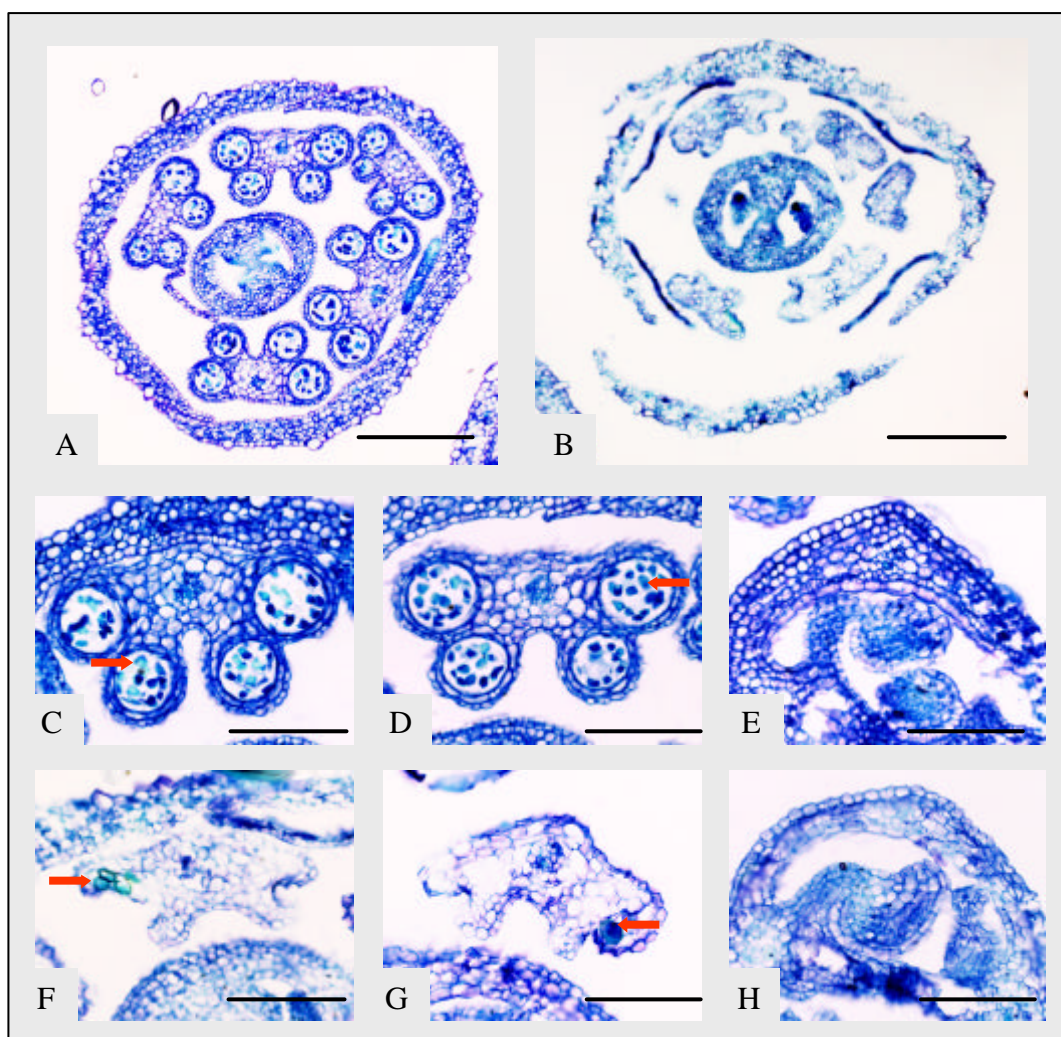
Die Zellen der Antheren des Wildtyps (Abb. 3-29 A) sind bereits stärker ausgetrocknet als die der dargestellten *spl8*-Antheren (Abb. 3-29 B). Ob die Zellen der *spl8*-Antheren immer später als der Wildtyp austrocknen, wurde nicht weiter untersucht. Es konnten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Zellen des Filaments des dargestellten Wildtyps und der *spl8*-Mutante festgestellt werden (Abb. 3-29 C und D).

Unter Kurztagbedingungen kultivierte *spl8*-Pflanzen weisen in den ersten gebildeten Blüten eine weitere Abweichung vom Wildtyp auf (Abb. 3-30): Im Blütenstadium 12, in dem im Wildtyp die Sepalen noch vollkommen die inneren Blütenorgane verdecken (Abb. 3-30 A), hat das Gynoeceum der *spl8*-Mutante bereits die Sepalen durchwachsen und ist deutlich länger als im Wildtyp. Später gebildete Blüten zeigen diesen Phänotyp nicht mehr. Die Filamente der Staubblätter sind auch unter diesen Bedingungen deutlich kürzer als im Wildtyp (Abb. 3-30 B).



**Abbildung 3-30:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *A. thaliana*-Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. In A ist eine Wildtypblüte im Stadium 12 dargestellt, während in B eine Blüte der *spl8*-Mutante in dem entsprechenden Stadium abgebildet ist.

Querschnitte durch Blüten von Wildtyppflanzen und *spl8*-Pflanzen, die unter Langtagbedingungen kultiviert wurden, sind in Abbildung 3-31 dargestellt.



**Abbildung 3-31:** Querschnitte durch *A. thaliana*-Blüten. Die Objekte wurden mit 0,05% Toluidinblau angefärbt. Abbildungen A, C, D und E zeigen *A. thaliana*-Wildtypblüten, Abbildungen B, F, G und H Blüten der *spl8*-Mutante. Abbildungen C und F zeigen Antheren des Antherenstadiums 6, während in D und G welche des Antherenstadiums 7 (Sanders *et al.*, 1999) dargestellt sind. In E und H sind junge Samenanlagen gezeigt. Durch rote Pfeile sind meiotische Zellen (C und F) bzw. Tetraden (D und G) hervorgehoben. In A und B entspricht der Balken 100  $\mu$ m, in C bis H 25  $\mu$ m.

Bereits in den Übersichtsbildern 3-31 A und B, sind deutlich die Unterschiede zwischen Wildtypblüten und *spl8*-Blüten zu erkennen. Während die Antheren im Wildtyp voll entwickelt sind und die vier Pollensäcke viele meiotische Zellen, im Antherenstadium 6 (Sanders *et al.*, 1999), siehe Abbildung 3-31 C, bzw. Tetraden, im Antherenstadium 7 (Abb. 3-31 D) enthalten, sind die Antheren in *spl8*-Blüten mißgebildet und nur eine pollensackartige Struktur ist pro Theke zu erkennen (Abb. 3-31 B). Die Pollensäcke der *spl8*-Mutante sind deutlich kleiner als die des Wildtyps und wirken eingefallen. Die im Wildtyp aus vier Zellschichten bestehende Pollensackwand scheint in *spl8*-Antheren sehr reduziert zu sein (Abb. 3-31 F und G). Es sind aber einige meiotische Zellen bzw. Tetraden in

den pollensackähnlichen Strukturen zu erkennen, die in den Abbildungen 3-31 F und G durch rote Pfeile gekennzeichnet sind.

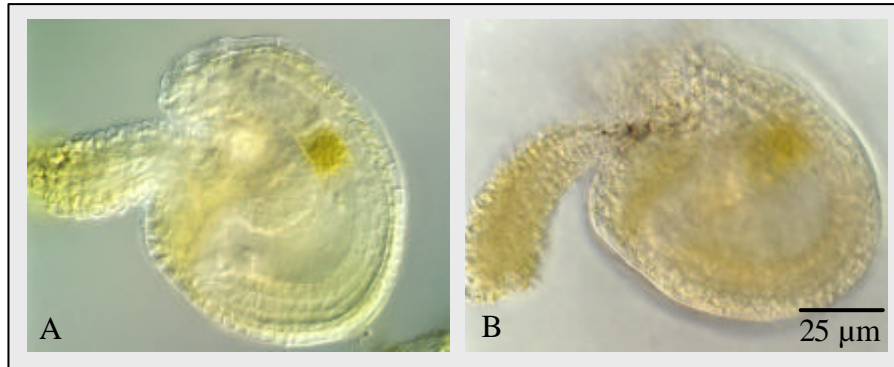
Das *spl8*-Gynoeceum (Abb. 3-31 H) ist in den Querschnitten nicht vom Gynoeceum des Wildtyps zu unterscheiden (Abb. 3-31 E). Die noch nicht befruchteten *spl8*-Samenanlagen (*Ovula*) in der Abbildung 3-31 E gleichen ebenfalls den Samenanlagen des Wildtyps des vergleichbaren Entwicklungsstadiums (Abb. 3-31 H).

#### **3.6.4 Der Vergleich der *spl8*-Mutante mit der *myb26-1A*-Mutante**

Um sicher zu gehen, daß die Entwicklung der Samenanlagen unter Langtagbedingungen von der Mutation in *SPL8* nicht direkt betroffen wird, wurde für vergleichende Studien eine Mutante herangezogen (*myb26-1*), die eine Mutation in dem *MYB26*-Gen aufweist (Genbank Genbankzugriffsnummer: AF175997). Sie enthält eine neun Basenpaar Deletion 42 Basenpaare stromabwärts des ATGs (Dr. S. Steiner-Lange (MPIZ Köln), persönliche Mitteilung). Die *myb26-1*-Mutante wurde uns freundlicher Weise für diese Experimente von Dr. S. Steiner-Lange zur Verfügung gestellt. Die Mutation in *MYB26-1A* bewirkt, daß die Antheren sich nicht mehr öffnen, Pollen werden aber gebildet. Die Entwicklung der Samenanlagen ist in dieser Mutante von der Mutation nicht betroffen (Dr. Steiner-Lange (MPIZ Köln), persönliche Mitteilung).

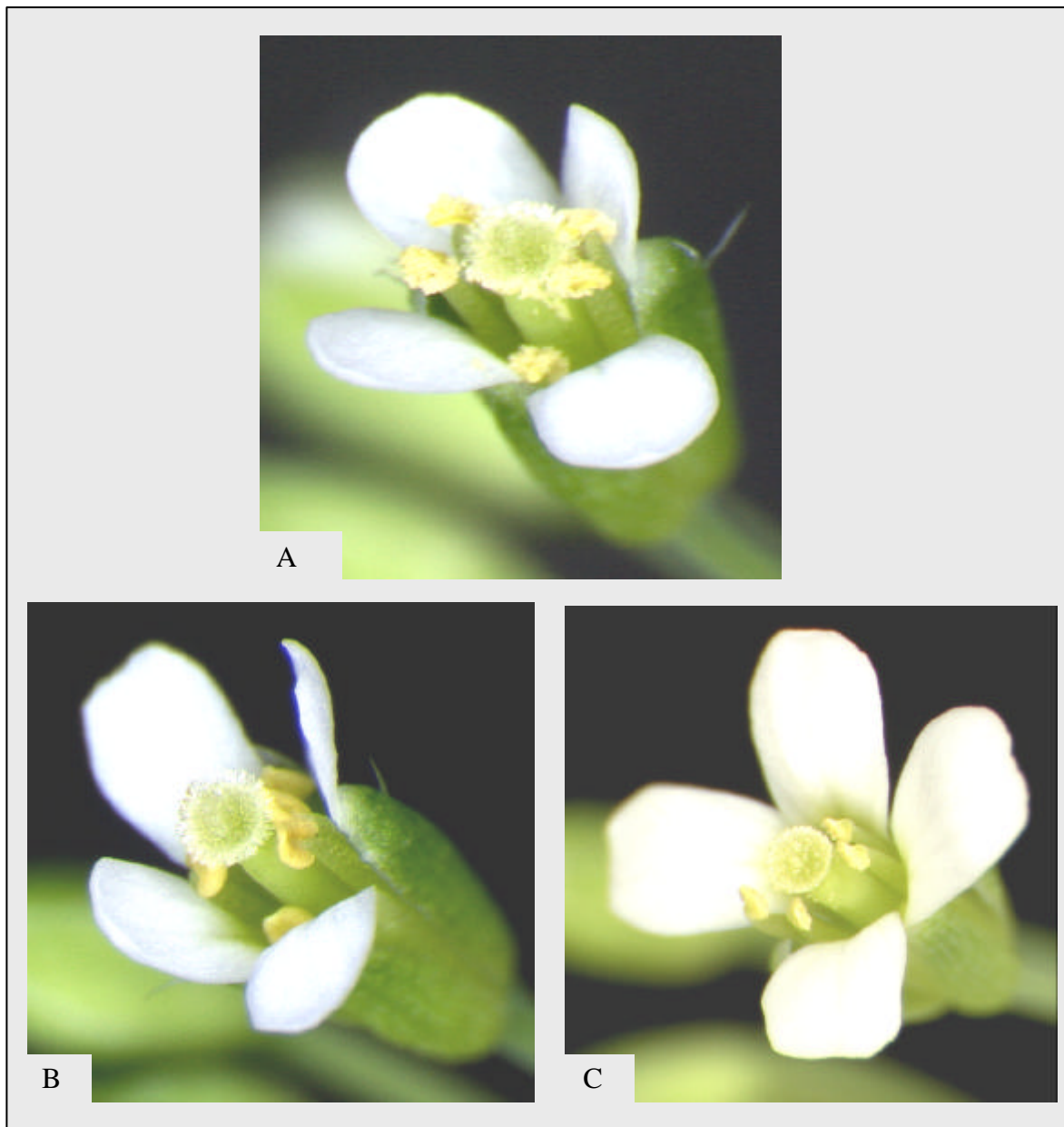
Sowohl *spl8* als auch *myb26-1* entwickeln unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kurze Schoten mit Samenanlagen, in denen keine Embryonen zu sehen sind. Wurden sterile Schoten geöffnet und die Samenanlagen herausgedrückt und anschließend ohne weitere Behandlung lichtmikroskopisch analysiert, gleichen die der *spl8*-Mutante denen der *myb26-1*-Mutante (Abb. 3-32).





**Abbildung 332:** Samenanlagen der *spl8*-Mutante (A) im Vergleich zur *myb26-1*-Mutante (B). Die Samenanlagen wurden aus sterilen Schoten herausgedrückt und ohne weitere Behandlung unter dem Lichtmikroskop mit differentiellem Phasenkontrast betrachtet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen im Gewächshaus.

In der Abbildung 3-33 sind Blüten von *A. thaliana*-Wildtyppflanzen (A), *myb26-1*-Mutanten (B) und *spl8*-Mutanten (C) dargestellt. Alle Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen.



**Abbildung 3-33:** Vergleich einer *A. thaliana*-Wildtypblüte (A) mit einer *myb26-1*-Blüte (B) und einer *spl8*-Blüte (C). Die Aufnahmen wurden unter dem binokulären Mikroskop gemacht. Die Pflanzen wurden zuvor unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert.

Während in der Wildtypblüte Pollenkörner auf den Antheren und der Narbe zu sehen sind, sind in der *myb26-1*-Mutante keine Pollenkörner und in der *spl8*-Mutante nur wenige Pollenkörner auf den Antheren und der Narbe zu erkennen. Abgesehen von dem mutanten Phänotyp der Staubblätter jedoch gleichen die Blüten beider Mutanten der des Wildtyps.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen von SBP-Domänen-Proteinen (SBP steht für SQUAMOSA PPROMOTER BINDING PROTEIN) aufgeklärt werden. Die Experimente wurden mit dem „Modellorganismus“ *A. thaliana* durchgeführt. SBP-Domänen-Proteine aus *A. thaliana* werden als SPL-Proteine (SQUAMOSA PPROMOTER BINDING PROTEIN LIKE) bezeichnet (Cardon *et al.*, 1997).

### 4.1 Allgemeine Analyse der SPL Gene

Nach dem Abschluß des Sequenzierungsprojekts des *A. thaliana*-Genoms (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) war es durch Genbanksuchen mittels BLAST möglich alle *SPL*-Gene zu identifizieren. Entgegen der Prognosen von 18 *SPL*-Genen im Genom von *A. thaliana* (Cardon *et al.*, 1999) sind lediglich 16 *SPL*-Gene vorhanden. Die Gene liegen in einfacher Kopienzahl vor. Durch die Analyse der Exon-Intron-Struktur aller *SPL*-Gene (Abb. 3-2) konnte bestätigt werden, daß *SPL*-Gene entweder ein, zwei, drei oder neun Introns haben. Die Größe der Introns ist in allen *SPL*-Genen sehr variabel. Es konnte außerdem bestätigt werden, daß auf Chromosom 4 kein *SPL*-Gen lokalisiert ist (Abb. 3-4). Die Verteilung der *SPL*-Gene im *A. thaliana* Genom erscheint entgegen der Behauptung von Cardon *et al.* (1999) als nicht zufällig (Abb. 3-4). Die Reihenfolge der *SPL*-Gene, die auf den unteren Armen der Chromosomen 1, 2 und 3 liegen, ist bezüglich der Anzahl der Introns der entsprechenden Gene immer dieselbe. Vom Centromer in Richtung Telomer ist immer folgende Anordnung zu beobachten: ein *SPL*-Gen mit einem Intron wird gefolgt von einem mit zwei Introns und dann folgt eins, das neun Introns besitzt. Nach Cardon *et al.* (1999) können *SPL*-Gene zu Paaren zusammengefaßt werden. Diese „Genpaare“ zeichnen sich durch eine hohe Sequenzhomologie auch außerhalb der SBP-Box aus und besitzen die gleiche Intronanzahl. Auch die Positionen der Introns sind konserviert. Als Paare werden *SPL4/SPL5*; *SPL1/SPL12*; *SPL10/SPL11*; *SPL9/SPL15* sowie *SPL14/SPL16* bezeichnet. *SPL4* und *SPL5* weisen auf Aminosäureebene eine Identität von 65 % auf, *SPL1* und *SPL12* hingegen haben eine Aminosäureidentität von 69 %, *SPL9* und *SPL15* sind zu 64 % identisch und *SPL14* und *SPL16* zu 71 % (Cardon *et al.*, 1999 sowie Abschnitte 3.1.1 und 3.5.1).

Die angesprochenen Paare werden durch ein jeweils drittes Gen ergänzt, das ebenfalls eine gewisse, aber geringere Sequenzähnlichkeit zu den anderen beiden aufweist, aber auch die gleiche Intronanzahl besitzt. Die Position der Introns ist hier aber im Gegensatz zu den andern

nicht immer konserviert. In dem Fall von *SPL4/SPL5* ist dies *SPL3*, bei *SPL9/SPL15* ist es *SPL6* und schließlich wird das Paar *SPL1/SPL12* durch *SPL16* bzw. *SPL14* ergänzt, die ihrerseits wiederum ein Paar bilden (Cardon *et al.*, 1999 und siehe Abschnitt 3.1.1).

*SPL10* und *SPL11* weisen auf Aminosäureebene eine Identität von 78 % zueinander auf und die Gene liegen invers zueinander orientiert (Stopkodon zu Stopkodon) lediglich 1738 Basenpaare voneinander entfernt auf dem Chromosom 1. Nach Cardon *et al.* (1999) sind die beiden Gene möglicherweise ein Produkt einer erst kurz zurückliegenden Genduplikation. Die duplizierten Genombereiche würden jeweils 900 Basenpaare stromaufwärts der Startkodons von *SPL10* bzw. *SPL11* enden. *SPL2* hingegen weist eine geringere Sequenzhomologie zu den anderen beiden auf und liegt auf Chromosom 5 (Cardon *et al.*, 1999). Es möglich, daß die Verteilung von *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* bzw. *SPL6*, *SPL9* und *SPL15* sowie *SPL1*, *SPL12* und *SPL16* im Genom von *A. thaliana* ebenfalls das Resultat von Duplikationen von Genomabschnitten sind. Eine solche Duplikation hat wahrscheinlich in dem unteren Abschnitt vom Chromosom 2 bzw. Chromosom 3 stattgefunden (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). In diesen Bereichen liegen auch die Gencluster *SPL3*, *SPL9* und *SPL1* (Chromosom 2) bzw. *SPL5*, *SPL15* und *SPL12* (Chromosom 3). Wie oben erwähnt, bilden *SPL9* und *SPL15* ein Paar und *SPL1* und *SPL12* ein weiteres und auch *SPL3* und *SPL5* bilden eine Subklade. Auf Chromosom 1 sind zusätzlich *SPL6* bzw. *SPL16* lokalisiert, also die Gene, die eine geringere Sequenzähnlichkeit zu den anderen SPL-Genen aufweisen. In der Gruppe *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* ist folgende Verteilung zu beobachten: Auf den Chromosomen 1 und 3 sind die vermutlich nahe miteinander verwandten Gene *SPL4* bzw. *SPL5* lokalisiert und auf Chromosom 2 das zu den anderen beiden unähnlichere *SPL3* (Cardon *et al.*, 1999). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die mögliche Duplikation der Bereiche in denen *SPL3*, *SPL4* und *SPL5* liegen unabhängig von den Abschnitten in denen *SPL1*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL12*, *SPL15* und *SPL16* lokalisiert sind stattgefunden hat. Ein Vergleich der BACs, auf denen die Gene liegen, zeigte, daß diejenigen auf denen *SPL9* und *SPL15* lokalisiert sind, auch außerhalb der SPL-Genen eine Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen. Die BACs, auf denen *SPL1* und *SPL12* lokalisiert sind hingegen, weisen keine offensichtliche Sequenzähnlichkeit zueinander auf, obwohl diese in der gleichen Region des Genoms liegen. Möglicherweise ist der duplizierte Bereich nicht so umfangreich, wie von der *Arabidopsis genome initiative* (2000) beschrieben. Ein Vergleich der BACs, auf denen *SPL4* und *SPL5* liegen, hingegen zeigte, daß auch außerhalb der SPL-Genen Sequenzähnlichkeiten detektiert werden können (siehe auch Cardon *et al.*, 1999). In der Veröffentlichung der *Arabidopsis genome initiative* (2000) ist in diesem Bereich aber keine Duplikation des

*A. thaliana*-Genoms dargestellt. Möglicherweise ist die Duplikation sehr lokal und der Bereich sehr klein, so daß sie in der Analyse der *Arabidopsis genome initiative* (2000) nicht berücksichtigt wurde. Eine genauere Untersuchung dieser Bereiche unter Einbeziehung bekannter Markergene würde sicher mehr Klarheit in dieser Frage schaffen.

Interessant wäre die Untersuchung der SBP-Box-Gene in nah und entfernt verwandter Spezies zu *A. thaliana*. So könnten möglicherweise, wie bereits für andere Genfamilien zum Teil untersucht (Münster *et al.*, 1997), die orthologen Gene bestimmt werden und ein Hinweis über Zeitpunkt der Genverdoppelungen gewonnen werden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen aller SPL-Proteine ist nur mit den Aminosäuresequenzen der SBP-Domänen möglich. Die Proteine sind zu unterschiedlich in ihrer Größe und Sequenz, als daß ein Vergleich der gesamten Proteinsequenzen möglich wäre (Cardon *et al.*, 1999). Ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen der SBP-Domänen (Abb. 3-1) diene als Grundlage für die Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes (Abb. 3-3). In diesem sind deutlich folgende Kladen zu unterscheiden: SPL3, SPL4 und SPL5 bilden eine Gruppe, die Gene haben ein Intron. SPL7 wird in dem phylogenetischen Stammbaum zu der SPL3/SPL4/SPL5-Gruppe zugeordnet. Unterschiede auf Sequenzebene lassen eher auf eine zufällige Zuordnung zu dieser SPL-Klade schließen. Auch die Zahl von neun Introns im *SPL7*-Gen, im Gegensatz zu *SPL3*, *SPL4* und *SPL5*, die drei Introns enthalten, lassen vermuten, daß *SPL7* nicht in diese Klade fällt. Phylogenetische Rekonstruktionen, die Sequenzen von SBP-Domänen anderer Organismen mit einbeziehen, verdeutlichen ebenfalls, daß *SPL7* sich stark von anderen SBP-Domänen-Proteinen unterscheidet (Cardon *et al.*, 1999).

Außerdem sind SPL1, SPL12, SPL14 und SPL16 von den anderen Proteinen abgegrenzt. Die Gene besitzen alle neun Introns. Schließlich ist noch eine weitere sehr heterologe Gruppe zu erkennen, die aus SPL2, SPL6, SPL8, SPL9, SPL10, SPL11, SPL13 und SPL15 besteht. Diese kann wiederum in drei Subgruppen eingeteilt werden: SPL10, SPL11 und SPL2 bilden eine Gruppe, wobei SPL2 entfernter mit den beiden anderen verwandt ist (siehe auch Cardon *et al.*, 1999). Die korrespondierenden Gene haben drei Introns. SPL9 und SPL15 bilden eine Gruppe, beide entsprechenden Gene haben zwei Introns. Die verbleibenden SPL-Proteine sind nicht so ähnlich zueinander, als daß von einer eindeutigen Gruppenbildung gesprochen werden kann oder sie anderen exakt zugeordnet werden könnten. Allerdings besitzen die entsprechenden Gene alle zwei Introns. Es wäre sicher sinnvoll, weitere detailliertere

phylogenetische Analysen, die den Rahmen dieser Arbeit aber gesprengt hätten, in Zukunft durchzuführen.

Das Alignment der 76 Aminosäuren langen SBP-Domänen Sequenzen aller SPL-Proteine ergab weiterhin die Konservierung von 24 Aminosäuren in allen SPL-Proteinen. Gut konserviert ist die Sequenz des putativen zweiteiligen Kernlokalisationsignals. Für *LIGULELESS1* (LG1), einem SBP-Domänen Protein aus *Zea mays*, wurde die Translokation in den Zellkern durch die Expression von GFP::LG1 Fusionsproteinen in Zwiebel Protoplasten nachgewiesen (Moreno *et al.*, 1997). Um zu belegen, daß SPL-Proteine ebenfalls in den Zellkern transportiert werden, wurden die cDNAs zweier nicht nahe verwandter Mitglieder der *SPL*-Genfamilie, *SPL3* und *SPL9*, mit der *GFP*-cDNA fusioniert und in *N. tabaccum*- und *A. thaliana*-Protoplasten exprimiert (Abb. 3-5). Beide Fusionsproteine werden in den Zellkern der Protoplasten transportiert, während GFP alleine, als Kontrolle eingesetzt, auch im Cytoplasma zu finden war. Dies ist neben der Fähigkeit DNA zu binden (Klein *et al.*, 1996; Cardon *et al.*, 1997) ein weiterer Hinweis darauf, daß SBP-Domänen-Proteine als Transkriptionsfaktoren agieren.

In allen SPL-Proteinen und auch in LG1 ist immer ein Serin an der Position 60, relativ zum Beginn der SBP-Domäne, vorhanden. Dies liegt in der Region des putativen zweiteiligen Kernlokalisationsignals (Cardon *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997). Nach Blom *et al.* (1999) kann dieses Serin mit einer großen Wahrscheinlichkeit phosphoryliert werden. Phosphorylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung von Proteinen in der Zelle, die an Signaltransduktions- und Entwicklungsprozessen beteiligt sind (zusammengefaßt von Nakielny und Dreyfuss, 1999).

Viele der SPL-Proteine haben ein geringeres Molekulargewicht als 60 kDa (alle außer *SPL1*, *SPL7*, *SPL12*, *SPL14* und *SPL16*), sie könnten also prinzipiell durch Diffusion in den Zellkern gelangen. Dies ist aber für nur wenige Proteine und keine RNAs (im Falle des Exports aus dem Kern) nachgewiesen worden (Mattaj und Englmeier, 1998). Würden SPL-Proteine durch reine Diffusion in den Zellkern gelangen, müßte mehr Protein im Cytoplasma nachweisbar sein. Wie aus der Abbildung 3-5 ersichtlich ist, sind *SPL3* und *SPL9* auf diese Weise nicht im Cytoplasma nachweisbar. Sie können demzufolge nur in geringen Mengen dort vorhanden sein.

Die Translokation von SBP-Domänen-Proteinen in den Zellkern kann möglicherweise durch die Phosphorylierung des konservierten Serines kontrolliert werden. Ob sie durch die Phosphorylierung am Import in den Zellkern gehindert würden wie für das ADENOMATOUS-POLYPOSIS-COLI-Protein beschrieben (Zhang *et al.*, 2000) oder ob sie

wie die SMAD-Proteine in diesem Fall importiert würden (zusammengefaßt durch: Heldin *et al.*, 1997 und Wrana *et al.*, 2000), wurde nicht geklärt

*SBP1* und *SBP2*, SBP-Box-Gene aus *Antirrhinum majus*, wurden aufgrund der Fähigkeit ihrer Genprodukte, ein Promotorelement im *SQUAMOSA* (*SQUA*) Promotor zu binden isoliert (Klein *et al.*, 1996). *SPL3* ist ebenfalls in der Lage, an ein Promotormotiv im *API*-Promotor, dem putativen *SQUA*-Ortholog aus *A. thaliana*, zu binden (Cardon *et al.*, 1997). Pflanzen, die *SPL3* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors überexprimieren blühen ebenso wie Pflanzen, die *API* überexprimieren früh. Um zu überprüfen, ob *API* tatsächlich ein Zielgen von *SPL3* ist, wurde die Expression von *API* in *SPL3*-überexprimierenden Pflanzen untersucht (Cardon *et al.*, 1997). Es stellte sich heraus, daß *API* in diesen Pflanzen wie im Wildtyp exprimiert wird. Das bedeutet, daß *SPL3* die Expression von *API* nicht reguliert (Cardon *et al.*, 1997). Das oder die möglichen Zielgene von *SPL3* sind demzufolge immer noch unbekannt. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit durch *target-detection-assays* (Thiesen *et al.*, 1990) und anschließendem Durchsuchen der Genbank mit den identifizierten Sequenzen, Zielgene von SPL-Proteinen identifiziert werden. Für diese Analysen wurden *SPL3*, *SPL8* und *SPL9* herangezogen. Durch SDS-PAGE wurde nachgewiesen, daß selbst nach Aufreinigung der Proteine mehrere Proteinbanden vorhanden waren (Abb. 3-6). Die exprimierten Proteine sind in *E. coli* vermutlich nicht stabil. Um dies zu untersuchen, wurde *SPL3* fusioniert mit DHFR exprimiert. Dies soll nach Herstellerangaben die Stabilität einiger Proteine erhöhen (siehe QIAexpressionist<sup>TM</sup> Handbuch sowie Abschnitt 3.1.3). Tatsächlich waren nach elektrophoretischer Auftrennung des Fusionsproteins DHFR::*SPL3* nur noch sehr schwach sichtbare Banden geringeren Molekulargewichts nachweisbar. Dies spricht dafür, daß zumindest *SPL3* in *E. coli* instabil ist. Die *target-detection*-Experimente wurden mit diesen Proteinen aber nicht durchgeführt, da das DHFR möglicherweise die Bindeeigenschaften der SPL-Proteine verändern könnte. Die anderen SPL-Proteine wurden ebenfalls nicht verwendet, da ihr Laufverhalten im SDS-PAGE nicht den Erwartungen entsprach und außerdem die Experimente nicht mit instabilen Proteinen durchgeführt werden sollten.

## 4.2 Isolation eines SBP-Box-Gens (*CRSBP1*) aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Da mehrere tierische, bakterielle und das Hefegenom sequenziert wurden (Adams, 2000; Blattner *et al.*, 1997; Goffeau *et al.*, 1996; Mewes *et al.*, 1997; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) und in keinem der genannten Organismen SBP-Box-ähnliche Gene identifiziert werden konnten, kann davon ausgegangen werden, daß SBP-Box-Gene ausschließlich in Pflanzen vorkommen. Während Cardon *et al.* (1999) noch davon ausgingen, daß SBP-Box-Gene ausschließlich in sogenannten höheren Pflanzen vorkommen, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Fragment eines SBP-Box-Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) isoliert werden (siehe Abschnitt 3.2). *C. reinhardtii* gehört zu der Abteilung der Chlorophyta (Grünalgen) und der Klasse der Chlorophyceae und ist ein Einzeller. Bislang war es nicht möglich, mehr als ein SBP-Box-Gen aus einer *C. reinhardtii*-Lambda-Phagen-Bibliothek zu isolieren.

Die Aufklärung der kompletten Sequenz des Gens, sowie der cDNA, würde die Bestimmung der Größe sowie der Anzahl der darin enthaltenen Introns ermöglichen. Dies wiederum könnte einen Hinweis darauf geben, welche Gruppen von *SPL*-Genen ursprünglicher sind als andere, obwohl Sequenzen von SBP-Box-Genen anderer Algen weit aussagekräftiger sein würden. Die Chlorophyceae und damit auch die Chlamydomonadaceae sind nicht die direkten Vorfahren der höheren Pflanzen, diese haben sich vermutlich aus den Charophyceae (Armleuchteralgen) oder den Klebsormidiophyceae entwickelt (Kranz *et al.*, 1995). Beide Klassen gehören allerdings auch zu der Abteilung der Chlorophyta.

Die entfernten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *A. thaliana* und *C. reinhardtii* spiegeln sich in dem Ergebnis der Analyse der Aminosäuresequenzen der SBP-Domäne wider. Von den 76 Aminosäuren der SBP-Domäne sind lediglich zwölf zwischen *A. thaliana* und *C. reinhardtii* konserviert. Das in allen *SPL*-Proteinen und auch in LG1 vorhandene zweiteilige Kernlokalisierungssignal (siehe Abschnitt 3.1 und Moreno *et al.*, 1997) ist an dieser Position in der *CRSBP1*-Sequenz nicht vorhanden. Kernlokalisierungssignale zeichnen sich oft durch basische Aminosäuren aus. Am Ende der *CRSBP1*-SBP-Box ist zwar eine Häufung von basischen Aminosäuren (RQRRKR) festzustellen, die aber wahrscheinlich nicht als Kernlokalisierungssignal fungieren (siehe Abschnitt 3.2). Da nicht die gesamte Sequenz des Proteins bekannt ist, ist es ebenso möglich, daß das Kernlokalisierungssignal an einer anderen Position des Proteins ist. Für *LIGULELESS1* wurde mittels transkriptioneller *GFP*-Fusionen nachgewiesen, daß das Protein selbst nach der Deletion des basischen zweiteiligen



Kernlokalisierungssignals in der SBP-Domäne nur im Zellkern und nicht im Cytoplasma nachweisbar ist. Dies wird als Hinweis auf die Existenz eines zweiten, nicht klar erkennbaren Kernlokalisierungssignals in LG1 gesehen (Moreno *et al.*, 1997). Dies ist möglicherweise dem ähnlich, welches in CRSBP1 funktionell ist.

Das Serin, das in den SPL-Proteinen in der Nähe des Kernlokalisierungssignals zu finden ist, ist in der CRSBP1-Sequenz nicht konserviert und durch ein Alanin ersetzt (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2). Sollte ein Kernlokalisierungssignal an einer anderen Position von CRSBP1 vorhanden sein, könnte auch in dessen Nähe eine Aminosäure vorhanden sein, die phosphoryliert werden kann. Phosphorylierungen sind eine Möglichkeit der Regulation des Transports von Kern-Proteinen in den Zellkern (zusammengefaßt von Mattaj und Englmeier). Im Abschnitt 4.6 wird darauf bezüglich der SPL-Proteine noch eingegangen werden.

In allen *SPL*-Genen und auch in allen anderen bislang bekannten SBP-Box-Genen wird die Sequenz der DNA-Binde-Box immer an der gleichen Position durch ein Intron unterbrochen (Cardon *et al.*, 1999). Die einzige bekannte Ausnahme stellt bislang *CRSBP1* dar. Dies enthält ein Intron an einer anderen Position der SBP-Box (siehe Abb. 3-7). Dadurch wird möglicherweise ebenfalls die große phylogenetische Entfernung zwischen *C. reinhardtii* und *A. thaliana* widerspiegelt. Dennoch oder gerade deswegen stellt sich die Frage nach der Funktion von SBP-Domänen-Proteinen. Gemeinsam haben beide Organismen grundlegende Stoffwechselfunktionen, Zellzyklus und Photosynthese, aber *C. reinhardtii* ist ein einzelliger Organismus, während *A. thaliana* ein Mehrzeller ist. Allerdings muß die Funktion möglicherweise orthologer Gene bzw. ihrer Produkte nicht unbedingt konserviert sein. Die *SPL*-Genprodukte könnten im Laufe der Evolution eine völlig neue Funktion übernommen haben. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Isolation von SBP-Box-Genen aus weiteren phylogenetisch interessanten Taxa wie z. B. aus basalen Angiospermen, Gymnospermen, Farnen und Moosen. Hierdurch könnten Informationen über die Evolution und möglicherweise auch die Funktion von SBP-Box-Genen bzw. ihrer Produkte gewonnen werden. Da SBP-Box-Gene in einzelligen Grünalgen existieren, stellt sich weiterhin die Frage nach deren Vorkommen in den Genomen von Braunalgen und besonders Rotalgen. Die Isolation derselben würde die Frage klären, ob SBP-Box-Gene eine „Erfindung“ von grünen Organismen sind.

### 4.3 *SPL8*, *SPL9* und *SPL15* werden in verschiedenen Teilen von *A. thaliana* unterschiedlich exprimiert

Durch RT-PCR Experimente wurde die Expression von *SPL8*, *SPL9* und *SPL15* in oberirdischen Teilen von *A. thaliana* untersucht. Als Referenz dienten *ACTINI* und *RAN3*. Alle Gene werden in den verschiedenen Teilen von *A. thaliana* in unterschiedlicher Stärke exprimiert.

Cardon *et al.* (1999) wiesen nach, daß die Expression von *SPL9* wird im Laufe der Entwicklung von *A. thaliana* zunimmt. Es wurden aber keine Organe von *A. thaliana* gesondert untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde wie im Abschnitt 3.4.1 beschrieben die Expression von *SPL9* in Rosettenblättern, Sproßachsen, Hochblättern, Infloreszenzspitzen und Schoten bestimmt. Es stellte sich heraus, daß *SPL9* in Rosettenblättern, Sproßachsen und Infloreszenzspitzen und dort im floralen Apikalmeristem und in jungen Petal- und Sepalprimordien exprimiert wird. *SPL8* hingegen wird in Rosettenblättern, Sproßachsen, Infloreszenzspitzen sowie Schoten exprimiert und *SPL15*-RNA konnte in allen Pflanzenteilen außer Rosettenblättern nachgewiesen werden. Am stärksten ist die Expression von *SPL15* in Sproßachsen und Infloreszenzspitzen (siehe Abschnitt 3.5.2).

In den für *SPL8* und *SPL9* durchgeführten RT-PCR Experimenten wurden Oligonukleotide verwendet, die stromauf- bzw. stromabwärts des Introns der SBP-Box liegen. Die amplifizierten *SPL9*- und *SPL8*-cDNA-Fragmente liegen in zwei verschiedenen Größenordnungen vor. Die großen *SPL9*-Fragmente sowie auch die großen *SPL8*-Fragmente wurden jeweils aus Rosettenblätter-cDNA und in geringerem Ausmaß auch aus Sproßachsen-cDNA amplifiziert. Die Größe dieser Fragmente entspricht denen, die aus genomischer DNA amplifiziert wurden. Möglicherweise war das erste Intron in den *SPL8*- und *SPL9*-RNAs, die aus diesen *A. thaliana*-Teilen isoliert wurden, nicht gespleißt.

Es kann eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Fragmenten der erwarteten Größe und den mutanten Phänotypen der *spl8*-Mutante sowie der *spl9*-Mutante hergestellt werden. Die Hauptinfloreszenz der *spl9*-Mutante unterscheidet sich von der Wildtyp-Hauptinfloreszenz insofern, als das die Schoten niedriger angesetzt sind (siehe auch Abb. 3-17). Ausschließlich Fragmente der erwarteten Größe wurden in den RT-PCRs in Infloreszenzen nachgewiesen, also genau in den Teilen, in denen sich die *spl9*-Mutante vom Wildtyp unterscheidet. Das gleiche gilt auch für *SPL8*. Die *spl8*-Mutante weist eine reduzierte Fertilität auf. Die Antheren sind mißgebildet und produzieren wenig Pollen. Nur in Infloreszenzspitzen (worin auch

Blüten enthalten sind) und Schoten sind ausschließlich *spl8*-cDNAs der erwarteten Größe amplifiziert worden. In Rosettenblättern und Sprossen hingegen scheint das erste Intron in den Transkripten nicht gespleißt zu sein.

Schwache Banden, die der Fragmentgröße genomischer DNA entsprechen, können auch durch RNAs entstehen, die zum Zeitpunkt der Isolation noch im Zellkern vorhanden und noch nicht gespleißt waren. Diese noch ungespleißten Transkripte können in Pflanzen bis zu 50 % der gesamten Transkriptmenge ausmachen (Nash und Walbot, 1992), das bedeutet aber auch, daß sie nicht den Hauptteil der Transkripte ausmachen sollten.

Eine Verunreinigung der RNA durch genomische DNA kann weitgehend ausgeschlossen werden. Wurde in einer zuvor durchgeführten Kontroll-PCR, in der RNA als Matrize diente genomische DNA nachgewiesen, wurde diese durch einen DNase-Verdau eliminiert.

Diese Ergebnisse könnten auf einen regulatorischen Mechanismus hinweisen. Möglicherweise werden die *SPL9*-RNAs sowie die *SPL8*-RNAs abhängig vom Transkriptionsort differentiell gespleißt. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (einige virale RNAs) werden nur vollständig gespleißte RNAs aus dem Zellkern transportiert, um anschließend im Cytoplasma translatiert zu werden (zusammenfassend dargestellt von Nakielny und Dreyfuss, 1999). In den Pflanzenteilen, in denen ausschließlich die großen *SPL*-Transkripte vorhanden sind, würde demzufolge kein *SPL*-Protein synthetisiert werden. Durch Western-Blot-Analysen könnte das in Zukunft geklärt werden.

Das SBP-Box-Intron unterbricht in allen *SPL*-Genen an der gleichen Stelle die SBP-Box. Die Sequenzen der SBP-Box-Introns der verschiedenen *SPL*-Gene sind allerdings selbst zwischen ansonsten sehr ähnlichen Genen nicht konserviert (Cardon *et al.*, 1999). Möglicherweise findet trotzdem auf Transkriptebene eine Regulation der Expression von *SPL*-Genen statt und das Intron in der SBP-Box spielt eine wichtige Rolle dabei. *SPL8* und *SPL9* haben zwei Introns. Es wurde bislang nicht untersucht, ob das jeweilige zweite Intron möglicherweise auch in den verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedlich gespleißt wird.

Ob für *SPL15* ebenfalls ein ähnliches Phänomen beobachtet werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide lagen nicht stromauf- bzw. stromabwärts eines Introns.

#### 4.4 Die Suche nach *spl*-Mutanten

Die Erfolgsquote in der ZIGIA-Population Pflanzen zu identifizieren, die eine Mutation im Exonbereich aufweisen, liegt bei 40 % (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de>; ZIGIA-Homepage).

Obwohl für insgesamt 13 Gene Mutanten gesucht wurden, konnten nur in dem Fall von *SPL8* und *SPL9*-Pflanzen mit Mutationen in einem Exon identifiziert werden. Dies entspricht einer Erfolgsquote von ca. 15 %. *En-1*-Transposons in der Nähe von Genen werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 37 % identifiziert. Für die 13 untersuchten *SPL*-Genen wurden vier Pflanzenlinien isoliert, die Transposons in der Nähe lokalisiert haben (31 %) und diese auch in der nächsten Generation an dieser Position weiterhin enthielten (siehe auch Abschnitt 3.3). Die Durchsuchung der ZIGIA-Population nach *spl*-Mutanten war demzufolge unterdurchschnittlich erfolgreich. Der Grund hierfür mag in der Größe der Gene liegen. Zu dem Zeitpunkt der Durchführung des Experiments waren lediglich drei große *SPL*-Gene bekannt (*SPL1*, *SPL7* und *SPL12*), wobei *SPL7* mit einem 4,1 kb großen offenen Leserahmen am längsten ist. Die offenen Leserahmen aller anderen untersuchten *SPL*-Gene haben eine Größe von unter 1,9 kb. Die Wahrscheinlichkeit einer Transposoninsertion steigt natürlich mit der Größe der Gene. Demzufolge ist die Wahrscheinlichkeit, eine *spl3*-Mutante auf diese Weise zu finden relativ gering, da das *SPL3*-Gen nur eine Größe von 470 Basenpaaren aufweist.

Erschwert wird die Identifikation von Mutanten auch durch die Tatsache, daß *En-1* ein autonomes Element ist und diese Funktion auch in *A. thaliana* nicht verloren hat (Cardon *et al.*, 1993). Dadurch bedingt werden viele genetische Mosaik isoliert. Teile der entsprechenden Pflanzen können ein Wildtyp-*SPL*-Allel enthalten und andere ein oder mehrere mutante *SPL*-Allele. Ist der Sektor entsprechend groß und überspannt mehrere Blätter, kann dies zu der Identifikation einer genetisch uneinheitlichen Pflanze führen (einer sogenannten „Falschpositiven“). Sofern die reproduktiven Organe nicht betroffen sind, wird sich die Mutation nicht vererben. In der nächsten Generation werden folglich nur Pflanzen mit Wildtyp-Allelen identifiziert werden. Sowohl Versuche im Rahmen dieser Arbeit als auch frühere Versuche eine *spl3*-Mutante zu isolieren waren erfolglos (Dr. P. Huijser (MPIZ Köln), persönliche Mitteilung). Es konnten lediglich Pflanzen identifiziert werden, in denen *SPL3* in großen Bereichen, aber nicht der ganzen Pflanze, mutiert war. Möglicherweise sind Mutationen in *SPL3*, welche die gesamte Pflanze betreffen, sogar in heterozygoter Konstellation letal. Nur Pflanzen, die überwiegend das *SPL3*-Wildtypallel haben, überleben.

Die Transposon-Insertionen in der Nähe von *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* und *SPL12* konnten in den jeweiligen nächsten Generationen bestätigt werden. Allerdings wies keine dieser Pflanzen unter Langtagbedingungen einen mutanten Phänotyp auf (siehe auch Abschnitt 3.3.1). Da die Transposons alle außerhalb der offenen Leserahmen der entsprechenden Gene inseriert sind,

ist deren Expression möglicherweise gar nicht betroffen. Dies wurde experimentell aber nicht nachgewiesen. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, daß lediglich eine Wachstumsbedingung untersucht wurde. Möglicherweise prägt sich ein mutanter Phänotyp erst unter speziellen Wachstumsbedingungen oder z. B. den Befall durch spezielle Pathogene aus. Da die *SPL*-Gene aber eine neue Genfamilie darstellen und wenig über die Funktion ihrer Genprodukte bekannt ist, war es schwierig zu entscheiden, welche Bedingungen getestet werden sollten.

#### **4.5 *SPL9* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in bestehende Netzwerke eingeordnet werden**

Die *spl9*-Mutante weist keinen eindeutigen mutanten Phänotyp auf. Unter Langtagbedingungen im Gewächshaus kultiviert unterscheidet sich die Pflanzenlinie 30100 insofern vom Wildtyp, als die Position der ersten Schote sowie des ersten und zweiten Tragblattes, relativ zur Rosette, niedriger angesetzt ist. Unter Kurztagbedingungen sind lediglich die Position der Tragblätter verändert, aber nicht die Position der ersten Schote (siehe auch Abschnitt 3.4.3).

Die Pflanzenlinie 30100 enthält außer der Mutation in *SPL9* noch eine in einem unbekanntem Gen. Sein Genprodukt weist Homologien zu ATP/GTP-bindenden Proteinen auf. Nach der Kreuzung dieser Pflanzenlinie mit *A. thaliana* Wildtyppflanzen konnten die Mutationen getrennt werden. Keine der Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generation zeigte unter Klimakammerbedingungen (Langtag) einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (siehe auch Abschnitt 3.4.3).

Der mutante Phänotyp prägt sich möglicherweise in Abhängigkeit von den bestehenden Umweltbedingungen aus. In der Klimakammer sind immer die gleichen Lichtbedingungen. Im Gewächshaus hingegen sind diese von den Witterungsbedingungen abhängig. An einem regnerischen Tag sind die Lichtdauer und -intensität geringer. Die *spl9*-Mutante zeigt möglicherweise abhängig von den Lichtbedingungen einen unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotyp.

Zu bedenken ist, daß besonders bei der Untersuchung von Genfamilien die Gefahr der Redundanz der Genprodukte besteht (zusammengefaßt von Pickett und Meeks-Wagner, 1995), wobei der Begriff Redundanz prinzipiell nichts über die Verwandtschaftsbeziehungen der Gene zueinander aussagt, sondern nur über die Funktion ihrer Genprodukte.

Wie oben beschrieben, sind Paare von *SPL*-Genen zu erkennen, die eine ähnliche Exon-Intron-Struktur und ein in Northernblot-Experimenten ähnliches Expressionsmuster aufweisen (Cardon *et al.*, 1999). Auf Aminosäureebene weisen die entsprechenden Proteine Identitäten von über 60 % zueinander auf. Wie bei Pickett und Meeks-Wagner beschrieben, könnte eine Aminosäureidentität von 50 % schon ausreichend sein, um Redundanz zu bewirken. Es ist also denkbar, daß lediglich Mehrfachmutanten einen mutanten Phänotyp aufweisen. *SPL15* und *SPL9* besitzen ein überlappendes Expressionsmuster (siehe oben) und die *SPL9*- und *SPL15*-Genprodukte sind auf Aminosäureebene zu 64 % identisch. Möglicherweise kann das *SPL15*-Genprodukt einen Teil der Funktionen des *SPL9*-Genprodukts übernehmen und umgekehrt. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß die *spl9*-Mutante keinen stark vom Wildtyp abweichenden Phänotyp ausprägt, sondern erst die Doppelmutante *spl15/spl9* einen deutlichen mutanten Phänotyp zeigt (siehe Abschnitt 3.4.3).

Das Phänomen der Redundanz wurde von Pelaz *et al.* (2000) für die *SEPALLATA*-Genprodukte (*SEP1*, *SEP2* und *SEP3*) beschrieben. Nur wenn alle drei *SEP*-Gene mutiert sind, entstehen Blüten, die sepalenartige Organe anstelle von Petalen und Staubblättern aufweisen. Statt Karpellen bildet sich eine neue, ebenfalls mutante Blüte in der Blüte.

Ein synergistischer Effekt hingegen wurde für die MADS-Box-Gene *CAULIFLOWER* (*CAL*) und *APETALA1* (*AP1*) aus *A. thaliana* beschrieben (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995). Während *cal*-Mutanten keinen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp aufweisen, sind in der Doppelmutante *cal/ap1* alle floralen Meristeme in Infloreszenzmeristeme umgewandelt. Die Einfachmutante *ap1* zeigt einen mutanten Phänotyp, der jedoch von der *cal/ap1* Doppelmutante abweicht. *ap1* bildet in den Achseln der blattähnlichen Organe des ersten Blütenwirtels erneut - mutante - Blüten. Dies kann als partielle Umwandlung der Identität der floralen Meristeme in Infloreszenzmeristeme gedeutet werden. Das *AP1*-Genprodukt hat demzufolge eine Funktion, die vom *CAL*-Genprodukt nicht komplementiert werden kann. Die *CAL*-Funktion kann im Gegensatz dazu aber völlig von *AP1* übernommen werden. Ein solcher Mechanismus wäre ebenfalls für *SPL9* und *SPL15* denkbar, da Pflanzen, die *SPL15* in *antisense*-Orientierung überexprimieren, einen eindeutig mutanten Phänotyp aufweisen, die *spl9*-Mutante hingegen nicht (siehe auch 3.4.3 sowie 3.5.3).

Um auf anderem Wege mehr über die Funktion von *SPL9* zu erfahren, wurden transgene *A. thaliana*-Pflanzen hergestellt, die *SPL9* unter dem konstitutiv aktiven Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotor exprimieren (siehe Abschnitt 3.4.4). In der T1-Generation wiesen

zehn der elf unabhängigen Linien eine stark unterdrückte Apikaldominanz auf. In der folgenden Generation konnte dieser Phänotyp nicht mehr beobachtet werden. Northernblot-Analysen ergaben, daß das Transgen in den untersuchten Pflanzenlinien nicht mehr aktiv war. Weitere Experimente wurden aus diesem Grund mit diesen Pflanzenlinien nicht durchgeführt. Statt dessen sollten mögliche mit SPL9 interagierende Proteine durch Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.4.5). Diese sollten helfen, SPL9 in bestehende Netzwerke einzuordnen. Die Untersuchungen wurden dadurch erschwert, daß das SPL9-Genprodukt offensichtlich toxisch auf die Hefen wirkt. Die Expression nur des 3'-Bereiches der cDNA, ohne die SBP-Box, ist möglich. Dennoch stellte sich heraus, daß SPL9 in diesem Bereich eine Transaktivierungsdomäne besitzt, die in Hefe aktiv ist (siehe auch Abschnitt 3.4.5). Dieses Ergebnis stützt neben der DNA-Bindfähigkeit (Cardon *et al.*, 1997) und der Translokation in den Zellkern (siehe Abschnitt 3.1.4) die Vermutung, daß SPL-Gene Transkriptionsfaktoren kodieren. Erschwert wird dadurch aber die Identifikation von Proteinen, die mit SPL9 interagieren. Die putative Transaktivierungsdomäne ist im C-terminalen Bereich von SPL9 lokalisiert (siehe Abschnitt 3.4.5). Eine genaue Eingrenzung der Transaktivierungsdomäne war nicht möglich. Es konnte zwar festgestellt werden, daß diese möglicherweise in einem 22 Aminosäuren großen Bereich lokalisiert sein könnte, aber bestätigt werden konnte dies nicht, denn dieser Bereich alleine ist nicht in der Lage, in Hefe transformiert, die Expression der Reportergene zu aktivieren. Wahrscheinlich kann dieses lediglich 22 Aminosäuren lange Peptid nicht die richtige Konformation einzunehmen. Als weitere Möglichkeit kann diskutiert werden, daß zusätzlich Sequenzen in den weiter N-terminal bzw. weiter C-terminal gelegenen Bereiche notwendig sind, um eine vollständige Transaktivierungsdomäne zu bilden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß weder die Analyse der *spl9*-Mutante noch die der transgenen *A. thaliana*-Pflanzen einen Hinweis auf die Funktion von SPL9 lieferten. Eine Einordnung von SPL9 in bestehende Netzwerke war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Durch Hefe-Zwei-Hybridexperimente und die Experimente zur Bestimmung der zellulären Lokalisation des SPL9-Proteins, konnte aber die Vermutung gestärkt werden, daß das SPL9-Genprodukt als Transkriptionsfaktor wirkt.

## 4.6 Die Beteiligung von SPL-Proteinen an Apomixis

Die vegetative Fortpflanzung über Samen wird als Apomixis bezeichnet (Nogler, 1984). Im Gegensatz zur sexueller Fortpflanzung gehen apomiktisch entstandene Organismen nicht auf die Verschmelzung männlicher und weiblicher Gameten zurück. Vielmehr sind die Nachkommen mit dem Elternorganismus genetisch identisch. Im Gegensatz zur sexuellen Vermehrung findet ein Generationswechsel, aber kein Kernphasenwechsel statt.

Im Allgemeinen werden drei Formen von Apomixis unterschieden:

Bei der Diplosporie entwickelt sich der diploide Embryosack aus der Makrosporenmutterzelle. Aus der diploiden Eizelle entwickelt sich ohne Befruchtung der Embryo.

Bei der Aposporie entwickelt sich der diploide Embryosack z. B. aus einer Zelle des Integuments oder des Nucellus. Der Embryo entsteht auch in diesem Fall ohne Befruchtung aus der diploiden Eizelle.

Adventivembryonen entstehen direkt durch mitotischen Teilungen einer Zelle des sporophytischen Gewebes in der Samenanlage.

Diplosporie und Aposporie werden auch unter dem Begriff gametophytische Apomixis zusammengefaßt, Adventivembryogenese wird auch als nicht-gametophytische Apomixis bezeichnet.

Beispielsweise *Tripsacum dactyloides* (eine Maisverwandte), *Taraxacum officinalis* (Löwenzahn) und viele tropische Gräser pflanzen sich auch apomiktisch fort. Apomiktische Spezies haben meist ein polyploides Genom und geschlechtliche Fortpflanzung und Apomixis können nebeneinander vorkommen (zusammenfassend behandelt von Savidan, 2000). Die Pollenentwicklung wird durch Apomixis nicht betroffen.

Warum Pflanzen sich apomiktisch fortpflanzen und über die daran beteiligten Gene ist nur wenig bekannt. *SPL1*, *SPL3*, *SPL5* und *SPL9* interagieren laut dem Patent mit der internationalen Nummer WO00/24914 mit der SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK). Die SERK wurde in den Veröffentlichungen von Schmidt *et al.* (1997) und Somleva *et al.* (2000) als ein Marker für somatische Embryogenese beschrieben. Aus Zellen, in denen die Expression des *SERK*-Gens nach Auxinzugabe nachgewiesen werden konnte, entwickeln sich in einer *Daucus carota*-Zellkultur (Karotte)



bzw. an Blattexplantaten von *Dactylis glomerata* L. (Gemeines Knäuelgras) somatische Embryonen. Laut der Patentschrift soll die Wahrscheinlichkeit vegetativer Fortpflanzung von Pflanzen unter anderem durch die Überexpression des *SERK*-Gens bzw. durch die von Genen, die Komponenten der sich anschließenden Signaltransduktionskette kodieren, gesteigert werden. Die *SPL1*-, *SPL3*-, *SPL5*- und *SPL9*-Proteine interagieren mit der *SERK* und sie werden in dieser Patentschrift als mögliche Komponenten der sich anschließenden Signaltransduktionskette beschrieben. Die Verfasser gehen davon aus, daß die oben erwähnten *SPL*-Proteine möglicherweise solange cytoplasmatisch vorliegen, bis sie von der *SERK* phosphoryliert werden. Möglicherweise erst dann werden sie in den Zellkern transportiert. Im Zellkern angekommen können sie dann an ihre Zielsequenzen im Genom binden und die Expression ihrer Zielgene regulieren.

Ein solcher Mechanismus wurde für *TGF $\beta$*  (TRANSFORMING GROWTH FACTOR  $\beta$ ) und *SMAD* Proteine von Heldin *et al.* (1997) und Wrana *et al.* (2000) für tierische Systeme beschrieben. *TGF $\beta$*  gehört zu der Familie der Serin/Threonin-Transmembran-Rezeptorkinasen. Es können zwei Rezeptorteile unterschieden werden, I und II. Nach Bindung eines Liganden wird die Untereinheit I von der Untereinheit II phosphoryliert. In dieser Form ist die Rezeptorkinase in der Lage, R-*SMADs* zu phosphorylieren. Diese stellen Mitglieder der sich anschließenden Signaltransduktionskette dar. Sie bilden nach der Phosphorylierung heteromere Komplexe mit sogenannten Co-*SMADs* aus. In dieser Form können sie in den Zellkern transportiert werden und dort Genexpression regulieren. Von den Autoren des Patents wird ein ähnlicher Mechanismus für die *SERK* und *SPL1*, *SPL3*, *SPL5* bzw. *SPL9* als Möglichkeit beschrieben. Die *SPL*-Proteine übernehmen in diesem Modell die Rolle der *SMADs*.

Wie im Abschnitt 3.1.1 dargestellt, besitzen alle *SPL*-Proteine in ihrer Aminosäuresequenz ein Serin, das möglicherweise phosphoryliert werden kann. Des weiteren werden sie in den Zellkern von *N. tabaccum*- und *A. thaliana*-Protoplasten transportiert (siehe Abschnitt 3.1.2). Eine Interaktion mit der *SERK* vorausgesetzt, wäre ein Mechanismus wie für *TGF $\beta$*  und *SMADs* beschrieben denkbar. Ob die *SERK* tatsächlich in der Lage ist, *SPL*-Proteine zu binden und zu phosphorylieren, könnte durch Immunopräzipitationsexperimente geklärt werden.

Überexpression von *SPL1*, *SPL3*, *SPL5* bzw. *SPL9* soll die Wahrscheinlichkeit für apomiktische Fortpflanzung erhöhen. *A. thaliana* ist ein fakultativer Selbstbestäuber. Apomiktisch entstandene Samen sind per Augenschein nicht von sexuell entstandenen zu

unterscheiden. Sowohl Pflanzenlinien, die *SPL3* (Cardon *et al.*, 1997) als auch *SPL5* (Nettesheim, Inaugural-Dissertation, 1998) unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors überexprimieren, sind vorhanden. Des weiteren steht die *spl9*-Mutante zur Verfügung. Alle diese Transgene könnten in einen männlich sterilen genetischen Hintergrund gekreuzt werden, um zu untersuchen, ob tatsächlich apomiktisch Samen entstehen.

Wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß alle untersuchten Pflanzen, die ein *SPL15 antisense*-Konstrukt unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotors exprimieren, nach Emaskulation Schoten bilden. Aus diesen Schoten konnten keine Samen gewonnen werden, das heißt parthenocarpische Fruchtentwicklung konnte beobachtet werden, Apomixis nicht. Parallel wurde das gleiche Experiment auch mit Pflanzen durchgeführt, die *SPL15* in *sense*-Orientierung überexprimieren (siehe 3.5.3). Im Gegensatz zu den Pflanzen, die *SPL15* in *antisense*-Orientierung überexprimieren bildete keine der *SPL15* in *sense*-Orientierung überexprimierenden Pflanzen nach Emaskulation Schoten aus, sondern die Karpelle verfärbten sich nach wenigen Tagen braun und trockneten aus. Es wurden nur je drei Blüten an je drei Pflanzen präpariert und außerdem die T1-Generation transgener Pflanzen verwendet. Eine Wiederholung des Experiments mit einer größeren Anzahl Pflanzen aus außerdem der T2-Generation wäre sicher notwendig, um eine solidere Datengrundlage zu erhalten. Außerdem wäre die Kreuzung mit einer männlich sterilen Mutante auch hier sinnvoll. Auf diese Weise könnten viele Pflanzen mit einer geringeren Kontaminationsgefahr auf einfache Weise getestet werden.

*SPL15* wurde in dem Patent zwar nicht erwähnt, ist aber das zu *SPL9* ähnlichste Gen (siehe Abschnitt 3.1.1 und 3.5.1). Entgegen der Erwartungen wurde parthenocarpische Fruchtbildung in den Pflanzen beobachtet, die *SPL15* in *antisense*- und nicht in *sense*-Orientierung überexprimieren. In dem Patent hingegen wurde davon ausgegangen, daß zumindest *SPL1*, *SPL3*, *SPL5* und *SPL9* überexprimiert werden müßten, um die Wahrscheinlichkeit für apomiktische Vermehrung zu erhöhen. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß zumindest einige SPL-Proteine als negative Regulatoren agieren, also putative Repressoren von Genexpression sind. *SPL9* allerdings wirkt zumindest im Hefesystem als Aktivator. Eine weitere Möglichkeit ist, daß SPL-Proteine die Expression von Genen aktivieren, deren Produkte Apomixis verhindern.

Interessant wäre es deswegen zu klären, ob auch die *spl9*-Mutante parthenocarpische Fruchtentwicklung zeigt oder sogar apomiktisch Samen bildet. Dies wäre dann ein Hinweis

darauf, daß die Prognosen in dem Patent mit der internationalen Nummer WO00/24914 bezüglich der *SPL*-Gene nicht richtig sind.

Die Expression aller in dem Patent erwähnten *SPL*-Gene außer *SPL1* nimmt im Laufe der Entwicklung von *A. thaliana* zu. Besonders das Expressionsmuster von *SPL1* läßt nicht eindeutig auf eine Beteiligung des Genprodukts an reproduktiven Vorgängen schließen. Nach Cardon *et al.* (1999) wird *SPL1* konstitutiv exprimiert. Detailliertere Studien der Expression von *SPL1* und natürlich auch der anderen *SPL*-Gene durch *in situ*-Hybridisierungs-Experimente wären sicher angebracht.

#### **4.7 Die *spl8*-Mutante weist eine reduzierte männliche Fertilität auf**

Es können grob zwei Arten männlicher Sterilität bei Pflanzen unterschieden werden: Cytoplasmatische und Kerngen-kontrollierte.

Die cytoplasmatische Pollensterilität, wird nicht über Kerngene, sondern über mitochondriale Gene maternal vererbt. Oft sind Rekombinationsereignisse im Mitochondriengenom die Ursache für die männliche Sterilität.

Es können drei Arten Kerngen-kontrollierter männlicher Sterilität unterschieden werden:

Bei der strukturellen männlichen Sterilität wird die Entwicklung des Androeceums gestört.

Die sporogene männliche Sterilität ist durch die Störung der Mikrosporogenese verursacht und bei der funktionellen männlichen Sterilität können die Antheren den Pollen nicht entlassen.

Die meisten beschriebenen männlich sterilen Mutanten gehören zu der Klasse der sprogenen männlich Sterilen. Ein Beispiel hierfür sind die *pollenless1*-, *pollenless2*- sowie *pollenless3*-Mutanten aus *A. thaliana*. Die Zellen, die aus der Mikosporenmutterzelle entstehen degenerieren in den *pollenless1*-, *pollenless2*- bzw. *pollenless3*-Mutanten. Tetraden und Mikrosporen sind demzufolge nicht vorhanden (Ross *et al.*, 1997; Glover *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1999).

Bekannt sind auch die *dehiscence*-Mutanten wie *delayed-dehiscence1* (Sanders *et al.*, 1999 und die Verweise darin), sie öffnen die Antheren sehr spät oder gar nicht.

Wie im Abschnitt 3.6 beschrieben zeichnet sich die *spl8*-Mutante durch eine reduzierte männliche Fertilität aus. Homöotische Veränderungen konnten in *spl8*-Blüten nicht beobachtet werden. Die *spl8*-Mutante kann mit Wildtyppollen und der Wildtyp mit

*spl8*-Pollen befruchtet werden, die weibliche Seite ist von der *spl8*-Mutation offensichtlich nicht betroffen.

Da die *spl8*-Pollen fertil sind und die Antheren sich öffnen, können sporogene und funktionelle Sterilität als Ursache für den mutanten Phänotyp ausgeschlossen werden. Vielmehr läßt sich die *spl8*-Mutante in die Klasse der strukturell männlich sterilen Mutanten einordnen. Da in den Antheren nur ein Pollensack pro Theke eindeutig zu erkennen ist, sind die Theken kürzer und herzförmiger (siehe auch Abb. 3-28). Die vorhandenen Pollensäcke sind nicht rund wie im Wildtyp, sondern wirken eingefallen und nur wenige meiotische Zellen oder Tetraden sind in ihnen vorhanden (siehe Abb. 3-31). Die Pollensackwände sind stark reduziert. Im Wildtyp bestehen sie aus vier Zellschichten (Epidermis, Faserschicht, Zwischenschicht und Tapetum), in der *spl8*-Mutante hingegen sind diese Zellschichten nicht zu erkennen. Möglicherweise werden aus diesem Grund so wenige Pollen gebildet. Tapetumzellen sind cytoplasmareich und sekretorisch wirksam, sie dienen der Ernährung der sich entwickelnden Pollen. Da das Tapetum in der *spl8*-Mutante nicht normal entwickelt ist, ist die Versorgung der Gametophyten möglicherweise nicht mehr gewährleistet und nur wenige vollständig ausgebildete Pollenkörner können sich entwickeln.

Außerdem sind die Filamente der Staubblätter der *spl8*-Mutante kürzer als im Wildtyp (Abb. 3-26). Ob die Ursache hierfür in einer geringeren Zellgröße oder darin zu finden ist, daß weniger Zellen gebildet werden, war durch die durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Analysen nicht eindeutig zu bestimmen (Abb. 3-29). Um eine Aussage darüber treffen zu können, müßten mehr *spl8*-Blüten im Vergleich zu Wildtypblüten untersucht und die Ergebnisse anschließend statistisch ausgewertet werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich. Das gleiche gilt für Untersuchungen zum Austrocknungsgrad der Zellen der Antheren kurz vor Öffnung derselben.

Unter Kurztagbedingungen kultivierte *spl8*-Mutanten zeigen einen zusätzlichen Phänotyp: In den ersten gebildeten Blüten ist das Gynoeceum überdurchschnittlich lang und durchwächst die eigentlich noch geschlossenen Sepalen und Petalen, die dadurch auseinander gedrückt werden (Abb. 3-30). In späteren Blüten konnte das in dieser Form nicht mehr beobachtet werden. Aber auch unter Langtagbedingungen ist das Gynoeceum von *spl8*-Mutanten länger als im Wildtyp. Aufgrund von Beobachtungen ist bekannt, daß die ersten Blüten von *A. thaliana* und Blüten von unter Kurztag angezogenen Wildtyppflanzen oft Mißbildungen aufweisen und extreme Phänotypen ausbilden. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, daß

der extreme Phänotyp der ersten *spl8*-Blüten unter Kurztagbedingungen auf die Kulturbedingungen zurückzuführen ist.

Die Keimung der Pollenkörner auf der Narbe beginnt nach Wasseraufnahme aus den Zellen der Papillen. Da in der *spl8*-Mutante durch die geringere Länge der Filamente, das relativ längere Gynoeceum und die geringfügige Menge Pollen, die gebildet werden weniger Pollen auf die Narbe gelangen als im Wildtyp, trocknen die Papillen wahrscheinlich nicht so schnell aus.

In Abhängigkeit von den Lichtbedingungen prägt sich der *spl8*-Phänotyp in unterschiedlicher Stärke aus. Unter Langtagbedingungen in der Klimakammer können keine Samen von *spl8*-Pflanzen gewonnen werden, während unter Kurztagbedingungen nur die ersten Blüten einen extremen Phänotyp ausprägen und die *SPL8*-mutanten Pflanzen später Schoten mit Samen bildeten. Von Zhang *et al.* (1994) wurde eine männlich sterile Reis-Mutante beschrieben (*psgms* - *photoperiod-sensitive genic male sterile*), deren Pollen unter Langtagbedingungen völlig steril sind. Unter Kurztagbedingungen hingegen sind die Pollen zum Teil fertil. Da die Pollenkörner in dem PSGMS-Reis partiell steril sind (das spricht für sporogene männliche Sterilität) und in der Veröffentlichung kein anderer Phänotyp beschrieben wurde, ist es unwahrscheinlich, wenngleich nicht unmöglich, daß der PSGMS-Reis-Phänotyp durch eine Mutation in dem *SPL8*-Ortholog aus Reis hervorgerufen wird. Völlig ausgeschlossen werden kann das aber bis zu der Klonierung der möglicherweise für den PSGMS-Reis-Phänotyp verantwortlichen Gene (*PMS1* und *PMS2*) nicht.

Eine weitere in der Literatur beschriebene Mutante mit reduzierter männlicher Fertilität ist die *farinelli*-Mutante aus *A. majus*, *FARINELLI* (*FAR*) kodiert ein MADS-Domänen-Protein und wird als weiteres C-Funktionsgen neben *PLENA* (Bradly *et al.*, 1990) beschrieben (Davis *et al.*, 1999). Die *far*-Mutanten prägen den mutanten Phänotyp vor allen Dingen aus, wenn sie unter warmen Wachstumsbedingungen (18 – 25 °C) kultiviert werden. Unter kälteren Bedingungen (15 °C) werden einige Pollen produziert. Die Entwicklung der Pollen erscheint bis zu frühen Stadien der Mikrosporenentwicklung normal. Dann aber werden in extremen Fällen die Mikrosporen und Tapetumzellen komplett degradiert. In den Pollensäcken sind dann gar keine oder lediglich einige Mikrosporen-ähnliche Zellen zu erkennen. SBP-Box-Gene wurden isoliert, da ihre Genprodukte in der Lage sind, ein Motiv im Promotor von *SQUAMOSA*, ebenfalls einem MADS-Box-Gen (Huijser *et al.*, 1992), zu erkennen und zu binden (Klein *et al.*, 1996). Interessant wäre die Untersuchung des *FAR*-Promotors auf ein SBP-Bindemotiv hin. Möglicherweise ist das *SPL8*-Ortholog in

*A. majus* an der Regulation von *FAR* beteiligt. In *A. thaliana* übernimmt *AGAMOUS* (*AG*) die C-Funktion (Yanofsky *et al.*, 1990). Homozygote *agamous*-Mutanten bilden keine Staubblätter und Karpelle aus, sondern an deren Stelle entstehen Petalen und Sepalen im dritten und vierten Blütenwirtel. Außerdem sind im Inneren der Blüte weitere zusätzliche Wirtel, die Petalen und Sepalen enthalten. Die *spl8*-Mutante weist keine homöotischen Veränderungen in der Blüte auf. *SPL8* kann demzufolge nicht alleine für die Regulation der Expression von *AG* verantwortlich sein. Aber auch hier könnte Redundanz wiederum insofern eine Rolle spielen, als daß nur eine Doppelmutante (*spl8/unbekannt*) einen *ag*-Phänotyp ausprägen würde.

#### 4.8 *LIGULELESS1* ist mit *SPL8* verwandt

*LIGULELESS1* (*LG1*) kodiert ein SBP-Domänen-Protein in *Zea mays* (Moreno *et al.*, 1997). Von allen *SPL*-Genen besitzt *SPL8* die größte Ähnlichkeit zu *LG1* (Cardon *et al.*, 1999). Die Aminosäuresequenzähnlichkeit ist nur in dem Bereich der SBP-Domäne auszumachen. Außerhalb der SBP-Domäne weisen *SPL8* und *LG1* nur geringe Sequenzähnlichkeiten zueinander auf (Cardon *et al.*, 1999).

Der *lg1*-Mutante fehlen die Ligulen und Aurikel des Blattes. Die zu Ligulen homologen Organe in dikotylen Pflanzen sind möglicherweise die Stipeln (Nebenblätter) (Mooney und Freeling, 1997). Stipeln werden in Rothmaler „Exkursionsflora“ als zipfel- oder blattartige Ausgliederungen des Blattgrundes beschrieben. Bei Zweikeimblättrigen sind sie paarig rechts und links der Basis des Blattstieles frei (z. B. Wicke) oder am Blattstiel angewachsen (z. B. Rose) zu finden. In *A. thaliana* sind die Stipeln extrem klein und sind im voll entwickelten Blatt bereits wieder reduziert (Mooney und Freeling, 1997). Ob in der *spl8*-Mutante die Entwicklung der Stipeln betroffen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Fraglich ist auch, ob *LG1* wirklich das *SPL8*-Ortholog aus *Zea mays* ist und zusätzlich sein Genprodukt die gleiche Funktion wie das von *SPL8* haben muß. Laut Definition sagt Orthologie nichts über die Erhaltung der Funktion eines Proteins im Laufe der Evolution aus, wenngleich solche Fälle aber häufig beobachtet werden (zusammenfassend behandelt von Theissen *et al.*, 2000). Da wenig über die SBP-Box-Gemfamilie in *Zea mays* bekannt ist, ist nicht auszuschließen, daß ein weiteres, zu *LG1* paraloges Gen, dessen Genprodukt eine ähnliche Funktion wie das von *SPL8* hat, das wirkliche *SPL8*-Ortholog ist. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß sich die Ähnlichkeit der beiden Proteine zueinander lediglich auf den Bereich der SBP-Domäne beschränkt (Cardon *et al.*, 1999). Da

die Sequenz des *Zea mays*-Genoms nicht vollständig bekannt ist, kann darüber aber nur spekuliert werden.

## 4.9 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier neue vollständige *SPL*-Gene (*SPL13*, *SPL14*, *SPL15* und *SPL16*) und zwei *spl*-Mutanten (*spl8* und *spl9*) identifiziert werden. Außerdem wurde durch die Identifikation von *CRSBP1* nachgewiesen, daß SBP-Box-Gene nicht nur in höheren Pflanzen vorkommen, sondern auch in *Chlamydomonas reinhardtii*, einer einzelligen Grünalge. Durch die Isolation und Analyse des gesamten *CRSBP1*-Gens, der cDNA und des Genprodukts könnten wertvolle Informationen über die Evolution von SBP-Box-Genen gewonnen werden. Ebenso durch die Isolation von SBP-Box-Genen aus anderen informativen Spezies.

Des weiteren war es möglich, die Translokation von *SPL*-Proteinen in den Zellkern anhand von zwei beispielhaft ausgewählten *SPL*-Proteinen (*SPL3* sowie *SPL9*) nachzuweisen. Wie im Abschnitt 3.4.5 gezeigt, besitzt *SPL9* eine Transaktivierungsdomäne. Diese beiden Ergebnisse stützen die Annahme, daß zumindest *SPL9* als Transkriptionsfaktor agiert.

Die Determination der Konsensussequenz des DNA-Bindemotivs von *SPL*-Proteinen würde die Identifikation putativer Zielgene möglicherweise erleichtern. Da die Expression von *SPL*-Genen in *E. coli* sich als schwierig gestaltete, könnten die Proteine in Zukunft durch *in vitro*-Translation hergestellt werden und die *target-detection*-Experimente dann durchgeführt werden.

Möglicherweise sind einige *SPL*-Gene an dem Vorgang der Apomixis beteiligt. Kreuzungen der männlich sterilen *myb26-1*-Mutante mit Pflanzen, die *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* bzw. *SPL15* in sowohl *antisense*- als auch in *sense*- Orientierung exprimieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit schon initiiert und wären eine Möglichkeit dies zu bestätigen.

Ob die Regulation der Expression von *SPL*-Genen unter anderem durch differentielles Spleißen geschieht, sollte in Zukunft ebenfalls untersucht werden. Die Bestätigung, daß nur das SBP-Box-Intron dieses Phänomen zeigt, wäre ein Hinweis darauf.

Im Zusammenhang der Regulation wäre auch zu klären, ob das Serin, am Ende der SBP-Domäne aller SPL-Proteine, phosphoryliert wird und ob dieses die Translokation der Proteine in den Zellkern beeinflusst. Da eine *spl8*-Mutante identifiziert werden konnte, wären Komplementationsstudien dieser mit einerseits einem Konstrukt mit mutierter Phosphorylierungsstelle und andererseits mit der Wildtypsequenz, beide fusioniert mit GFP, sowie die Überexpression von *SPL8* ohne GFP, vielleicht eine Möglichkeit, diese Frage zu klären. Auf diese Weise könnte gleichzeitig die Translokation und die Komplementation getestet werden.

Auch die phänotypische Charakterisierung von *spl8* und *spl9* mit dem Ziel das *SPL8*-Gen und *SPL9*-Gen in einen Zusammenhang mit bereits bekannten Netzwerken zu bringen, sollte in Zukunft weitergeführt werden. Hierzu soll einerseits geklärt werden, ob *SPL9* an Apomixis beteiligt ist. Andererseits sollen genauere mikroskopische Untersuchungen der *spl8*-Mutante helfen, die Funktion von *SPL8* besser zu verstehen.



## 5. Zusammenfassung

*SPL*-Gene sind Mitglieder der SBP-Box-Genfamilie, die bis vor kurzem ausschließlich aus sogenannten höheren Pflanzen isoliert werden konnten. Ihre Genprodukte sind putative Transkriptionsfaktoren. Die *SPL*-Gene kodieren eine gut konservierte DNA-Bindedomäne, die als SBP-Domäne bezeichnet wird. Abgesehen von der guten Konservierung der Sequenz der SBP-Box, weisen die verschiedenen Mitglieder dieser Genfamilie nur wenig Gemeinsamkeiten zueinander auf. So ist die Größe der Gene und Transkripte sehr variabel und die Expressionsmuster divers (Klein *et al.*, 1996, Cardon *et al.*, 1997 und 1999). Über die Funktion von SBP-Box-Genen in der Pflanzenentwicklung ist nur wenig bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier neue vollständige *SPL*-Gene identifiziert werden. Insgesamt existieren im *A. thaliana*-Genom 16 *SPL*-Gene, die in einfacher Kopienzahl vorliegen. Außerdem wurde, ein SBP-Box-Gen (*CRSBP1*) in *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert. SBP-Box-Gene sind demzufolge auch in sogenannten niederen Pflanzen vorhanden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, daß *SPL3* sowie *SPL9* in den Zellkern transportiert werden.

*SPL9* besitzt eine Transaktivierungsdomäne, die in Hefe aktiv ist, ein weiterer Hinweis darauf, daß *SPL9* ein Transkriptionsfaktor ist.

Durch RT-PCR-Experimente wurde herausgefunden, daß *SPL8* und *SPL9* möglicherweise differentiell gespleißt werden.

Um Hinweise auf die Funktion der *SPL*-Gene zu bekommen, sollten Funktionsverlustmutanten identifiziert werden. Hierzu wurden verschiedene Populationen Transposon-mutagenisierter Pflanzen durchsucht. In diesen wurden Mutanten für *SPL8* und *SPL9* identifiziert. Außerdem wurden Pflanzenlinien identifiziert, die Transposoninsertionen nahe der offenen Leserahmen von *SPL4*, *SPL5*, *SPL6* und *SPL12* enthalten. Die *spl8*-Mutante und die *spl9*-Mutante wurden genauer charakterisiert. *SPL9* jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit in kein bekanntes Netzwerk eingeordnet werden. Die *spl8*-Funktionsverlustmutante hingegen wurde in die Klasse der strukturell männlich sterilen Mutanten eingeordnet.

## 6. English abstract

The *SPL*-genes are members of the SBP-box gene family, which are until now exclusively found in higher plants. Their gene products function as putative transcription factors. They all share a highly conserved DNA-binding domain, the SBP-domain. Besides the sequence similarity of the SBP-box, the members of this gene family have little in common. They differ in the length the genes and transcripts and in their diverse expression patterns (Klein *et al.*, 1996, Cardon *et al.*, 1997 and 1999). Their function in plant development remains largely unknown.

In this work it was possible to identify four new, full length *SPL*-genes. In summary 16 *SPL*-genes are present in the *A. thaliana* genome. They are all single copy genes. Furthermore an SBP-box gene from *Chlamydomonas reinhardtii* was identified. Therefore, SBP-box genes are also found in so called lower plants. It could be demonstrated that the *SPL3* and *SPL9* are translocated to the nucleus.

*SPL9* has a transactivation domain. Both results are hints that *SPL9* function as a transcription factor.

RT-PCR experiments indicate that the *SPL8*- and *SPL9*-transcripts may undergo differential splicing.

To learn more about their function, mutants for *SPL*-genes should be identified. For these purpose different populations of transposon mutagenised *A. thaliana* plants were utilised. In this way two mutants were identified, one for the *SPL8*-gene and another one for the *SPL9*-gene. Additionally plant lines carrying transposons close to the open reading frames of *SPL1*, *SPL4*, *SPL5* and *SPL12* were found in these populations. The *spl8*- and the *spl9*-mutant were characterised further. *SPL9* could not be classified in any existing network. The *spl8*-mutant on the other hand seems to be structurally male sterile.

## 7. Literaturverzeichnis

**Adams, M. D.:** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185 – 2195 (2000).

**Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B. and Wismann, E.:** Successful PCR-based reverse genetic screen using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* 97, 729 – 734 (1998).

**Blom, N., Gemmeltoft, S. and Brunak S.:** Sequence and structure-based predictions of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Mol. Biol.* 294, 1351 – 1362 (1999).

**Blattner, F. R. Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Bruland, V., Riley, M., Collado Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, H., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. and Shao, Y.:** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453 – 1462 (1997).

**Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. and Smyth, D. R.:** Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 112, 721 – 743 (1993).

**Bradly, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N. and Coen, E.:** Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell* 72, 85 – 95 (1993).

**Cardon, G. H., Frey, M., Saedler, H. and Gierl, A.:** Mobility of the maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 3, 773 – 784 (1993).

**Cardon, G. H., Höhmann, S., Nettlesheim, K., Saedler, H. and Huijser, P.:** Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal* 12, 367 – 377 (1997).

**Cardon, G. H., Höhmann, S., Klein, J., Nettlesheim, K., Saedler, H. and Huijser, P.:** Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237, 91 – 104 (1999).

**Clough S. J. and Bent A. F.:** Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735 – 743 (1998).

**Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M.:** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31 – 37 (1991).

**Davis, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H. and Schwarz-Sommer, Z.:** *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO Journal* 14, 4023 – 4034 (1999).

**Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.:** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349 (1991).

- Gehring, W. J.:** The homeobox in perspective. *Science* 17, 277 – 280 (1992).
- Gehring, W. J.:** Wie Gene die Entwicklung steuern – Die Geschichte der Homeobox. Birkhäuser Verlag (2001).
- Glover, J. A., Grelon, M., Craig, S., Chaudhury, A. and Dennis, E.:** Cloning and characterization of *MS5* from *Arabidopsis*: a gene critical for male meiosis. *Plant Journal* 15, 345 – 356 (1998).
- Goffeau, A., Barrel, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S. G.:** Life with 6000 genes. *Science* 274, 563 – 567 (1996).
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F. R.:** Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO Journal* 15, 5584 – 5594 (1996).
- Goto, K and Meyerowitz, E. M.:** Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes and Development* 8, 1548 – 1560 (1994).
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. and Huijser, P.:** Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 21, 351 – 360 (2000).
- Haughn, G. W. and Sommerville, C. R.:** Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev. Genet.* 9, 73 – 89 (1988).
- Heldin, G.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.:** TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465 – 471 (1997).
- Hieda, M., Tachibana T., Yokoya, F., Kose, S., Inanoto, N. and Yoneda, Y.:** A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of RAN inhibits both the recycling of RAN and nuclear protein import in living cells. *Journal Cell Biol.* 144, 645 – 655 (1999).
- Hood, J. K. and Silver, P. A.:** In or out? Regulating nuclear transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 241 – 247 (1999).
- Huijser P., Klein J., Lönnig W. E., Meijer H., Saedler H. and Sommer H.:** Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal* 11, 1239 – 1249 (1992).
- Jarmolowski A., Boelens, W. C., Izaurralde, E. Mattaj, I.W.:** Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* 124, 627 – 635 (1994).
- Jack, T., Brockmann, L. L. und Meyerowitz, E. M.:** The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS-box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68, 683 – 697 (1992).

**Jofuku, K. D., den Boer, B. G. W., Van Nontagu, M. and Okamoto, J. K.:** control of the *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell* 6, 1211 – 1225 (1994).

**Kempin, S. A., Savidge, B. and Yanofsky, M. F.:** Molecular basis of the *cauliflower* phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267, 522 – 525 (1995).

**Klein, J., Saeder, H. and Huijser, P.:** A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol. Gen. Genet* 250, 7 – 16 (1996).

**Koetsier P. A., Schorr J. and Doerfler W.:** A Rapid Optimized Protocol for Downward Alkaline Southern Blotting of DNA. *Bio Feedback* 15, 260 – 262 (1993).

**Kranz, D. H., Mikš, D., Siegler, M-L., Capesius, I., Sensen, W. C. and Huss, V. A. R.:** The origin of land plants: Phylogenetic relationship among Charophytes, Bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 41, 74 – 84 (1995).

**Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. and Gorlich, D.:** Export of a importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061 – 1071 (1997).

**Laemmli, U. K.:** Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970).

**Levy, Y. Y. and Dean, C.:** The transition to flowering. *The Plant Cell* 11, 1973 – 1989 (1998).

**Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T., Whittier F.:** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8, 457 – 463 (1995).

**Logel, J., Dill, D. and Leonard, S.:** Synthesis of cRNA probes from PCR-generated DNA. *Biotechniques* 13, 604 – 610 (1992).

**Ma, H.:** To be, or not to be, a flower-control of floral meristem identity. *Trends Genet.* 14, 26 – 32 (1998).

**Mahajan, R., Gerace, L. and Melchior, F.:** Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *Journal of Cell Biol.* 140, 259 – 270 (1998).

**Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M. F.:** Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360, 273 – 277 (1992).

**Mandel, M. A. and Yanofsky, M. F.:** A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377, 522 – 524 (1995).

- Mattaj, I. W. and Englmeier, L.:** Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 265 – 306 (1998).
- McGinnis, W. and Kuziora, M.:** The molecular architects of body design. *Scientific American* 270, 36 – 42 (1992).
- Melchior, F. and Gerace, L.:** Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol.* 8, 175 – 179 (1998).
- Mewes, H. W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S. G., Pfeiffer, F. and Zollner, A.:** Overview of the yeast genome. *Nature* (6632 Suppl.) 387, 7 – 65 (1997).
- Michaels, S. and Amasino, R. M.:** *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS-domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11, 949 – 956 (1999)
- Mooney, M. and Freeling, M.:** Using regulatory genes to investigate the evolution of leaf form. *Maydica* 42, 173 – 184 (1997).
- Moore, M. S.:** Ran and nuclear transport. *Journal Biol. Chem.* 273, 22857 – 22860 (1998).
- Moreno, M. A., Harper, L. C., Krueger, R. W., Dellaporta, S. L. and Freeling, M.:** *LIGULELESS1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize organogenesis. *Genes and Development* 11, 616 – 628 (1997).
- Mozo, T., Fischer, S., Shiyuza, H. and Altmann, T.:** Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 258, 562 – 570 (1998).
- Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J. T., Martin, W., Saedler, H. and Theißen, G.:** Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *PNAS* 94, 2415 – 2420 (1997).
- Nakielnny, S. and Dreyfuss, G.:** Transport of Proteins and RNAs in and out of the Nucleus. *Cell* 99, 677 – 690 (1999).
- Nash, J. and Walbot V.:** *Bronze-2* gene expression and intron splicing patterns in –cells and tissues of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 100, 464 – 471 (1992).
- Nettesheim, K.:** Cytologische und molekularbiologische Untersuchungen der floralen Transition in *Arabidopsis thaliana*. Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln (1998).
- Nogler, G. A.:** Gametophytic apomixis. *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, 475 – 518 (1984).
- NOVARTIS, Schmidt, E. D., DE VRIES, S, HECHT, V.:** Apomixis conferred by expression of SERK interacting proteins. International publication number: WO 00/24914; International application number: PTC/EB99/07972 (Patentantrag).

**Ohtsubo, M., Okazaki, H. and Nishimoto, T.:** The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *Journal Cell Biol.* 109, 1389 – 1397 (1989).

**Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wismann, E. and Yanofsky, M. F.:** B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405, 200 – 203 (2000).

**Perry, S. E., Nichols, K. W. and Fernandez, D. E.:** The MADS-domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *The Plant Cell* 8, 1977 – 1989 (1996).

**Pickett, F. B. and Meeks-Wagner, D. R.:** Seeing Double: Appreciating genetic redundancy. *The Plant Cell* 7, 1347 – 1356 (1995).

**Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J.:** Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111, 229 – 233 (1990).

**Rexach, M. and Blobel, G.:** Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors and nucleoporins. *Cell* 83, 683 – 692 (1995).

**Riechmann, J. L. and Meyerowitz E. M.:** MADS-domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378, 1079 – 1101 (1997).

**Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O. J., Ratcliffe, R. R., Samaha, R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandhari, D., Sherman, B. K., Yu, L.-G.:** *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Nature* 290, 2105 – 2110 (2000).

**Ross, K. J., Franz, P., Armstrong, S. J., Vizir, I., Mulligan, B., Franklin, F. C. H. and Jones, G. H.:** Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. *Chromosome Res.* 5, 551 – 559 (1997).

**Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T.:** *Molecular Cloning*, 2<sup>nd</sup> Edition, Volume 1 bis 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

**Sanders, P. M., Bui, A. Q., Weterings, K., McIntire, K. N., Hsu, Y-C., Lee, P. Y., Truong, M. T., Beals, T. P. and Goldberg, R. B.:** Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction* 11, 297 – 322 (1999)

**Savidan, Y.:** Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Reviews* 18, 13 – 86 (2000).

**Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. J. and de Vries, S. C.:** A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124, 2049 – 2062 (1997).

**Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saeder, H. and Sommer, H.:** Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250, 931 – 936 (1990).

- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, P., Tetens, F., Lönnig, W.-E., Saedler, H. and Sommer H.:** Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *DEFICIENS*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO Journal* 11, 251 – 263 (1992).
- Scortecchi, K. C., Michaels, S. D. and Amasino, R. M.:** Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *The Plant Journal* 26, 229 – 236 (2001).
- Sheldon, C. C., Burn, J. El, Perez, P. P., Metzger, J., Edwards, J. A., Peacock, W. J. and Dennis, E. S.:** The *FLF* MADS-box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation: *The Plant Cell* 11, 445 – 458 (1999).
- Simpson, G. G. and Filipowicz, W.:** Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* 32, 1 – 41 (1996).
- Sommer, H., Beltràn, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.-E., Saeder, H. and Schwarz-Sommer, Z.:** *DEFICIENS*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO Journal* 9, 605 – 613 (1990).
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.:** Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2, 755 – 767 (1990).
- Somleva, M. N., Schmidt, E. D. L. and de Vries, S. C.:** Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19, 718 – 726 (2000).
- The Arabidopsis Genome Initiative:** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796 – 815 (2000).
- The C. elegans Sequencing Consortium:** Sequence and analysis of the genome of *C. elegans*. *Science* 282, 2012 – 2018 (1998).
- Theißen, G. and Saedler H.:** MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenic' law revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 628 – 639 (1995).
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K.-U. and Saeder, H.:** A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42, 115 – 149 (2000).
- Thiesen, H.-J., Bach, C.:** Target Detectin Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acid Research* 18, 3203 – 3209 (1990).
- Tissier, A. F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M. A., Murphy, G. and Jones, J. D. G.:** Multiple Independent Defective Suppressor-mutator transposon Insertions in *Arabidopsis*: A Tool for Functional Genomics. *The Plant Cell* 11, 1841 – 1852 (1999).



- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.-E., Saedler, H., Sommer, H. and Schwarz-Sommer, Z.:** *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral morphogenesis. *EMBO Journal* 11, 4693 – 4704 (1992).
- Von Arnim, A. G., Deng, X.-W., Stacey, M. G.:** Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *GENE* 221, 35 – 43 (1998).
- Weigel, D. and Meyerowitz, E. M.:** The ABC of floral homeotic genes. *Cell* 78, 203 – 209 (1994).
- Weigel, D., Nilsson, O.:** A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377, 495 – 500 (1995).
- Wisman, E., Cardon, H. G., Fransz, P. and Saedler, H.:** The behaviour of the autonomous transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Molecular Biology* 37, 989 – 999 (1998).
- Wrana, J. L. and Attisano, L.:** The Smad pathway. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11, 5 – 13 (2000).
- Zhang, F., White, R. L. and Neufeld, K. L.:** Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *PNAS* 97, 12557 – 12582 (2000).
- Zhang, Q., Shen, B. Z., Dai, X. K., Mei, M. H., Saghai Maroof, M. A. and Li, Z. B.:** Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *PNAS* 91, 8675 – 8679 (1994).

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
<i>al.</i>	alli
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> oder <i>copy</i> ) DNA
Col-0	Columbia-0
cpm	Ausschläge pro Minute
dCTP	Desoxycytidintiphosphat
dam <sup>-</sup>	Dam-Methylierungsnegativ
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxynukleinsäure ( <i>-acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isoproylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
min	Minute
mRNA	Boten- ( <i>messenger</i> -) Ribonukleinsäure
MPIZ	Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
<i>N. tabaccum</i>	<i>Nicotiana tabaccum</i> (Tabak)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure (- <i>acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	(rotations) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR (Reverse Transkriptase PCR)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium-</i> )
T	Thymin
TGF	<i>transformation growth factor</i> – transformierender Wachstumsfaktor
U	<i>Unit</i> (funktionelle Einheit)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

## 9. Nomenklatur

Gen:	Großbuchstaben, kursiv, z. B. <i>SPL8</i>
Protein:	Großbuchstaben, z. B. SPL8
Mutanten:	Kleinbuchstaben, kursiv, z. B. <i>spl8</i>

Anderssprachliche, im Deutschen nicht gebräuchliche Begriffe wurden kursiv geschrieben, z. B. *Arabidopsis thaliana*.



1141 ACCACAGAAGGCACAAAGTGTGCGAATTCCTCAAAAAGCATCGACGGTTGTAGCCGCCG  
H R R H K V C E F H S K A S T V V A A G

1201 GACTAAGCCAAAGGTTTTGCCAGCAATGCAGAGGTTTGTGCCCCCTAAAGTTGCCACCT  
L S Q R F C Q Q C S R

1261 TTGACCTTTTTTAAATAAATAAAAAAATACTATAGCTGTGGGGTTTCGGCTATCTTCTCT

1321 TCTCTTCGTCCGTACATCCTTAATCTTGTTCTATCTTAGTTTTTAGATCTTCTTTGGATC

1381 TCCTTTTTTTTTTATTAGTTAGTTAGCTTCCCTTTTTGTTTATTAATTAATTTACAATCAC

1441 TGCTAAAGGATCGACACAATCATTGAGAGGGTTCGTAAGTGTGGTGGGGGATCCCGA

1501 TATGGCTTTCTCTCGTCCTTTCCAACCAAATCATTTTAGCCCTAACTAACCAACCAAAC

1561 CTTATCACTAATTCTCCATCTCATCATCATCTGATTTATACATATATATATCGAAAT

1621 AATCAATACAGGTTCCATTGCTGTGCGAATTCGACAACGGGAAACGGAGCTGCCGTAAG  
F H L L S E F D N G K R S C R K

1681 CGACTTGCTGACCATAACCGCCGCCGCCGTTAAATGTCACCAATCAGCCTCCGCCACCCAA  
R L A D H N R R R R K C H Q S A S A T Q

1741 GACACCGGCACCGCAAGACTACTCCAAGTACGTAAGTCTTCTTATCATATATATAT  
D T G T G K T T P S

1801 ATATATATATATCCTCTTTCAAATTAAGATAATCTCTAGATATATGTGTGCATTTAATTA

1861 ATAAATGGGAATATGTGATGATGATGATGACCAGAGTCACCGAACGATTCGGGTGTTAAA  
E S P N D S G V K

1921 GCGTCATCGTCACCGTCGTCCAACGCGCCGCCTACGATATCACTGGAGTGCTTCCGGCAA  
A S S S P S S N A P P T I S L E C F R Q

1981 AGGCAGTTCCAAACGACAGCGTCTTCATCCACGTCAGCGTCTTCGTCTTCAAATTC AATG  
R Q F Q T T A S S S T S A S S S S N S M

2041 TTTTTCTCCAGCGGATAGTTATAAGCTTTACTCATATGATATATTATGCTTAAAATGAGA  
F F S S G \* L

2101 AATCAAAGGACTCTTCAATATCACTAGTTAATGCTAGCTGTCTATCATCTGAATTAGTCG

2161 GTAATGTGTAACGTTTTATTTTATGCTCTCTCGTTTTGTCGTTTTTTCATATTGTTTTT

2221 GACTTAGTAGAGGTTTTATTTAATTAACCAACAACATATCAGATTTCTGATTCTATTATCA

2281 ATATCTCCTTACAAAAATAACAATTTTCAAAGATGTCTTCAAAGAAAAAAGAAAGAA

2341 ATTGAAAGTGTGATTGATATATTATTGCTGGTAAAAGCAAAGACCGGGGAGAGTACTCGT

2401 GCATGGTGGTTCGTTTCATCGTTTATTCATTTTCGGGGAAGTGAATTATTGACTCTCTCTCT

2461 CTCTCTCTGTCTGCTGTCTGATGCTGAGCTGCTGGAATTTTCTATAAAACTACAAGAAA

2521 CCAATATTTTAGAAAGTGACCGATCAATGTACGTCCACGTGGTTTTTACCGTCTTTTAAAA

## Anhang B: Die genomische Sequenz von *SPL9*

Die SPB-Domäne ist gelb unterlegt, die *En-1*-Insertionsstellen sind blau hervorgehoben.

```

1   atatgttctaaagttaataatggggttagacatttagtagaaaatatatatttttgggtt
61  ttgggttgggttgggttcggataatcaaaattttcagtattcgactaaaatacatttttgag
121 ttatatttctttacttaattttcataattgtaagtatttaaccttgtgtacgattaaaaa
181 aaaaaaagtattttaaccttgtgtatcattcataatgtaggttttctttccattttgaaa
241 aaaagttttgatattgggttcgcattcatcagttgaaaaccaagtcaaatttatggtagat
301 tggcaatggacaaacacaaaatatcatctccatttattgccaacctcataatgccaaatg
361 gtggaccaaaggaaaaacatgcatttatttattctcttgacataagagaaaatgcattt
421 aacttgtcaaataattgcaaggaaaaactctataaaaagatagaaatgtgaacagtataa
481 agtaaataaagaaatagtgtacatgaaagacctctccaatgttcacttgcctcagtttc
541 tccaagattagaaactgctacgtctctctctatagctccctcgttttgctatgtggaat
601 taacaacagacaacagtttttggttgtccgtaccgttttacttactctctcactgtcttt
661 gtctattaccactctcgtctcttttcttttttctctctgttctgtttctctctctaaacc
721 aaaacagtcaaaatcaggggaagccgaaattttctttgctttctctcctttggtoctttc
781 tttaaaccgagacagtttaggtttgtgtgagagagagaatgatgagtaaaaccctttctg
841 tctgagtaagaggaaaccaacatggagatgggttccaactcgggtcgggtcatggtcg
      M E M G S N S G P G H G P
901 ggtcaggcagagtcgggtgggttccctccactgagtcacctctttcagtgaggggctcatg
      G Q A E S G G S S T E S S S F S G G L M
961 tttggccagaagatctacttcgaggacgggtgggtgggatccgggtcttcttccctcaggt
      F G Q K I Y F E D G G G G S G S S S S G
1021 ggtcgttcaaacagacgtgtccgtggaggcgggtcgggtcagtcgggtcagataccaagg
      G R S N R R V R G G G S G Q S G Q I P R
1081 tgccaagtggaaggttgggtgggatcctaaccaatgcaaaagggttattactcgagacac
      C Q V E G C G M D L T N A K G Y Y S R H
1141 cgagtttgggtgagtgactctaaaacacctaagtcactgtgggtgggatcgaaacagagg
      R V C G V H S K T P K V T V A G I E Q R
1201 ttttgtcaacagtgacagcaggttcttttattcttcttcccagttctacccttagttcta
      F C Q Q C S R
1261 ttctttattaacatgttttgccattgcccggagatattcgagtcggccaaggctctgctt

```

1321 gttccactggttgatcaaatctaaaggcttagctttttgtgattgtcagtgatcatat  
1381 gcttttttggctttaacgtctttttatctttttcatttttttaaaaaactttacagcttagttt  
1441 tgtaacctgggtcttggtggttggtgactcgttgggctcatttttgggaatatgtttacgt  
1501 ctactttagatgcttctctttttatctttttgattttgtctttctaaatatctaac  
1561 caaagagatatgaaatgaatggacaagaagaaagccggttgccctcatttttgcttcttta  
1621 ggtcatatcattattgagggggacaaaactagtgtaccatagcatcattgacgtgatcat  
1681 tgaggaactctgttacattatattacaagtgtgtgggttttagattttaattcaaaactga  
1741 tgacaaaagcttataatgactgatagaatgtatacaaacggttagttaacgtggagaggtc  
1801 ttgtctttggaatgttctgttatgttgctttttctttgaagttaactcaatctgaatcaat  
1861 cacataggtttcatcagcttccggaatttgacctagagaaaaggagttgcccagggagac  
F H Q L P E F D L E K R S C R R R L  
1921 tcgctggtcataatgagcgcgaaggaagccacagcctgcgtctctctctgtgtagctt  
A G H N E R R R K P Q P A S L S V L A S  
1981 ctcgttacgggaggatcgcaccttgcgtttacgggttagatccttaagctcgacacataag  
R Y G R I A P S L Y G  
2041 accgattcatgtacttttcatccttaaaagatagatgtatatgctacagaaaatgggtgat  
E N G D  
2101 gctggaatgaatggaagctttcttgggaaccaagagataggatggccaagttcaagaaca  
A G M N G S F L G N Q E I G W P S S R T  
2161 ttggatacaagagtgatgagggcgccagtgctcgtcaccgctcatggcagatcaatccaatg  
L D T R V M R R P V S S P S W Q I N P M  
2221 aatgtatttagtcaagggttcagttggtggaggagggacaagcttctcatctccagagatt  
N V F S Q G S V G G G G T S F S S P E I  
2281 atggacactaaactagagagctacaaggaattggcgactcaaactgtgctctctctctt  
M D T K L E S Y K G I G D S N C A L S L  
2341 ctgtcaaatccacatcaaccacatgacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac  
L S N P H Q P H D N N N N N N N N N N N  
2401 aacaacaatacatggcgagcttcttcagggttttggcccgatgacggttacaatgggtcaa  
N N N T W R A S S G F G P M T V T M A Q  
2461 ccaccacctgcacctagccagcatcagtatctgaaccgccttgggtattcaaggacaat  
P P P A P S Q H Q Y L N P P W V F K D N

2521 gataatgatatgtctcctgTTTTgaatttaggtcgatacaccgagccagataattgtcag  
D N D M S P V L N L G R Y T E P D N C Q  
2581 ataagtagtggcacggcaatgggtgagttcgagttatctgatcaccatcatcaaagtagg  
I S S G T A M G E F E L S D H H H Q S R  
2641 agacagtacatggaagatgagaacacaagggcttatgactcttcttctcaccataccaac  
R Q Y M E D E N T R A Y D S S S H H T N  
2701 tggctctctgacttgtctttgcatcagagaatcttcttacaatgaacgattctgcaata  
W S L \*  
2761 tcttatctTTTTgcttctttgTTTattctgTTatctgctatcaataaaccagacaattgt  
2821 tgccagataatggctTTTTgattttgatttgTTTttatctccatgaaaatccaagttat  
2881 gagatcagattgatttcttttagcacatcaaggttccatataatgaatctataatcatcct  
2941 agtatattagtcaaagcaggagctaacattacctTTTtaacttaaggcttaagccatagca  
3001 ttatcatcagctttgctcaaactcaacatctTaaacacttaattagactcagagatctat  
3061 cgaccaacgaagtgaactgctTTTTccccaaaaccctaaccacccactttcaaagattcg  
tcctttatggatttagctcccctgTTTccaaatgaaacctcaaaaaacttgaacatata



## Anhang C: Die genomische Sequenz von *SPL15*

Die SPB-Domäne ist gelb unterlegt.

```

1  ATAATTAGAATAAATTAGCTGTAGATTTTTACATGGGAGTTATGTTCCCTGATCTGGTCT
61  GGTCTCGTTTTAAGGATATCATTTTGTACGTTAAAGAAGAAAAATATCCTTATCCTCCCTT
121  TTGTGTTTATTTGTTTTCAGATGTTACAAAAACCACCAAAACGCACCAACATCCCCAAAACGC
181  AAACGCTAAAAACACGTAGCTGTCTGGACTAGTGTCAATCACTCTTGAGTGTCTCTTCT
241  TTTGTCAGCTTCTCTTTCTTTCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTGATTCTTTAAAAGAT
301  AGCAACATCTAAAATCTGCAAAACCACATTTTCTTTCTCTATTCTCCTCCGTCCTTACT
361  ATTTCCAGAGTTCAGTACTTAGAAAAGAAAGAGAGTGATGAGCAGAAGCATCTCTTTCTCT
421  GTCTGAGTAAGAGGAAGCCAAAACCATAATGGAGTTGTTAATGTGTTCCGGGTCAGGCCGA
      M E L L M C S G Q A E
481  GTCAGGTGGTTCTTCTTCCACCGAGTCTTCTTCACTCAGTGGTGGACTCAGGTTTGGTCA
      S G G S S S T E S S S L S G G L R F G Q
541  GAAGATCTACTTCGAGGATGGATCCGGATCCAGAAGCAAGAACCGGGTCAATACCGTTCC
      K I Y F E D G S G S R S K N R V N T V R
601  TAAGTCGTCTACCACGGCGAGGTGCCAAGTGAAGGTTGTAGAATGGATCTAAGCAATGT
      K S S T T A R C Q V E G C R M D L S N V
661  TAAAGCTTATTACTCGAGACACAAAGTTTGTTCATTCACTCTAAATCATCTAAAGTCAT
      K A Y Y S R H K V C C I H S K S S K V I
721  TGTCTCTGGTCTTCATCAAAGTTTTGTCAACAATGTAGCAGGTTTCCCCCTTTTTTCTT
      V S G L H Q R F C Q Q C S R
781  CTTCTTTTATTTACTCATTTTGGCATTTCGGTGATCGGAATAGTTCTAAGGGAACCAT
841  AGCTTTACGCTTTTTTTCAGGTTTTATGTTCCTTTTGAGCTTTTTGAGTTTTGGCTCTTAA
901  CGTCATTGAAGAGTCTTATCAAACTTAACTTTACAGCTAGTTATTATGTGGTCTTGTCT
961  TCTTGTCTTATGCATTATTTAGGTTGCTTTTTCTTTGAAGCTTTCTTTTCTTTATATCAAA

```

1021 TCAGGTTTTACCAGCTTTTCTGAGTTTGACTTGGAGAAAAGAAGTTGTGCGCAGAAGACTCG  
F H Q L S E F D L E K R S C R R R L A

1081 CTTGTCTATAACGAACGACGAAGAAAACCACAACCCACAACGGCTCTTTTCACTTCTCATT  
C H N E R R R K P Q P T T A L F T S H Y

1141 ACTCTCGAATCGCTCCATCTCTTTACGGTTAGATCCCAATATACACAGCCCTTTTTCAGCT  
S R I A P S L Y G

1201 CAATGAGTCTCAAAAACAAGTTATTGAATTTCTGTGTGTGTCAGGAAACCCCAATGCTGCA  
N P N A A

1261 ATGATTAAAAGCGTTTTTGGGAGATCCTACTGCGTGGTCAACCGCAAGATCAGTGATGCAG  
M I K S V L G D P T A W S T A R S V M Q

1321 CGGCCTGGACCGTGGCAGATTAATCCAGTTAGGGAAACCCATCCACACATGAATGTTTTA  
R P G P W Q I N P V R E T H P H M N V L

1381 TCACATGGAAGCTCAAGCTTTACTACATGTCCAGAGATGATAAACAACAATAGCACAGAT  
S H G S S S F T T C P E M I N N N S T D

1441 TCAAGCTGTGCTCTCTCTCTTTCTGTCAAACCTCATAACCAATTCATCAGCAGCAACTTCAG  
S S C A L S L L S N S Y P I H Q Q Q L Q

1501 ACACCAACAAATACATGGCGACCATCTTCTGGTTTTCGACTCGATGATCTCATTCTCCGAT  
T P T N T W R P S S G F D S M I S F S D

1561 AAGGTTACAATGGCTCAGCCACCGCCCATTTCAACCCATCAGCCGCCCATCTCAACACAT  
K V T M A Q P P P I S T H Q P P I S T H

1621 CAGCAGTACCTCAGCCAAACTTGGGAAGTCATCGCGGGCGAAAAGAGCAATTCACATTAT  
Q Q Y L S Q T W E V I A G E K S N S H Y

1681 ATGTCTCCTGTGAGTCAAATCTCGGAGCCAGCAGATTTCCAGATAAGCAATGGCACCACA  
M S P V S Q I S E P A D F Q I S N G T T

1741 ATGGGTGGATTTGAGCTGTATCTTCATCAGCAGGTTCTGAAGCAATACATGGAACCCGAG  
M G G F E L Y L H Q Q V L K Q Y M E P E

1801 AACACAAGAGCTTATGACTCCTCTCCTCAACATTTCAATTGGTCTCTTTGAGTCTAATCT  
N T R A Y D S S P Q H F N W S L \*

1861 CTTTCACCTTTTAAGATCTTCATCAGTTTGTTACTAAAATCTTATCAACTATCTCTTGTG

1921 TGCTACTTTAAAACCAGGCAATGATGCCCCGATAATGCCTTTCCGTTTGGATGTTTTTTTC

1981 ATGGCTTTTTTATCTTTTTAAGAACTTTGGTTTTTATTGATGATCTCTACGATAGTTTACGA

---

2041 TTTGCATCCAACAGAACTCAGGTTACATACTTGGAGATCAAATTGAAACATCAACATTA  
2081 TCATCAATATATTGTCTTATCAAATCAGAGTTCCACATGCTTTTATCATCCTACTATCTA  
2141 TTTAAAAGCATGAGAATTAGCAAGTCCTTAAGATTCTAAGTGTGTACCTCAACTGCAAAC  
2201 ACAGTCTTCCTTCTGTATCTTGCTTCCTCTTCAGCCACATCAGGAAATTTTCAACCTGAA  
2261 GCTTCTGCAGACATGGATTGTGTTTGTGTGCTTCCATACTAGTGTGGCTTATCTAGTGAT  
2301 CATCCTCATTACGCCAGGACAGTTGGATAGAAGAGCTT

## Anhang D: *En-1*-Insertionen in *SPL*-Genen

*En-1*-Sequenzen sind blau dargestellt.

### *En-1* (5'Ende) im *SPL3*-Lokus

```

1   CTCCTTTGAC GTTTTCTTGT AGTGGTTGCT TCTAGTCTCA GAGTGTCTTC
51  GAGATATGTG TAGTCTTTAG TGTACCCTGA GACCTGAGTA CAAGATCGAA
101 AAGAAAATAT CTCGAATAAC AGAGTTGTGT TTGCTGTTTT TACCATTTAA
151 TTATGCTAAT ATCTTTGTTT TACATAATAC CAATTGAAAA ATGAATACAT
201 AATTCAAGTT TGGACCATTG TTGTATATCC ACTTTTGGCT TCGTGGCCCC
251 GATAGCTAAT TTGATTGACC TTATCATCTA CACCAAACAA GAAATTAAT

```

### *En-1* (3'Ende) im *SPL4*-Lokus

```

1   ATGTTTCAAA GATATGGCTA ATGATATGTG TAATACTTCT ACCTAGTCGA
51  TGTGTGAATG CTAAGTGGTA AACGTTTTGA ATACAGATAC GAGTAAGGAG
101 TGTGACTTAT CAAAAGCAC AGGGAAACTA CTAACCAAAA GCCACGGTCA
151 CTCTGAAGTT TCAGAGCCAC GAAGGAGATA TATCATCCTA GCTTTTCTTT
201 GCCAACATAG TAGTAGAATA GAATATTTGA ATAAACACCT ACCATTATTA
251 GTAAATCGTT GAGAGTAGAT TATAGTGGAA GCAAACCTTT CAGGGTCCAT
301 CACTTGCTAT GATGAGAGAC TCCTTAGACG TCATCAATAA TTATCTTATT
351 CCCTTGGCAT GCATGACCAG TTTGCAACAT TACCTGATTT TGAATCAGAA
401 ATACATATGA CTATACACTA CAAGAAAAAA GGCAAGGAGT GTCGGCCAAA
451 ACCCCACACT CTTACTGAAA TAAGCCGACA CTCTAAGTAT AAGAGTGTCC

```

### *En-1* (3'Ende) im *SPL5*-Lokus

```

1   AGAGTGTCCG TCAACCGACA CTCTTATACT TAGAGTGTCC GCTTATTTCA
51  GTAAGAGTGT GGGGTTTTGG CCGACACTCC TTGCCTTTTT TCTTGTAGTG
101 AGACGATATT CATGCTGCCA ACATCATATA CCACAGACAA GGCAATTTTA
151 AAACCAGATA CAAATCAGTA TGTAATAATA AAGACAACGA TGTGTTTAAA
201 CAGAACATAA CCATTTTACC TCTCATCCTA AGCTAACCTT AAATGCCTAT
251 ACTCTAGATG GGTCCAACAA TAGATGACCA CTAGGGTTGC AGGAAGAGGA
301 ATCCAATAGT CTACATCGAC AAAGGATGTC ACCATTTATT AGGACCTTTG
351 TCTGTTTCTA GAGATATATT ATAAAGTTAG ATGAGAAGAC CATGGGTAAA
401 TTATGATATT CCAGCTCTTC TTCCCTGTAC TATATGTCTA CAGTTGCACT
451 GATCAATAAG GTTCACCTTA ATTACCTAGA AGGACATCAA TGTAAAAAAC
501 AAAAGGGTCC CCAATTTGAA TAAGAAATTC AAATTAATAA TCAAAACAGT
551 AAACCCGAA GTACAATATA CAGCTTCCAA TCTTGTATCA ACTATTAATT
601 GCTTCAGAAG AAACCAAAAC CACGAAAGGC CTATGAAATA GTTCAAGAAA

```

### *En-1* (3'Ende) im *SPL6*-Lokus

```

1   TCGGTCAACC GACTCTTTA TACTTAGAGT GTCGGCTTAT TTCAGTAAGA
51  GTGTGGGGTT TTGGCCGACA CTCCTTGCTT TTTTCTTGT AGTGAAACA
101 TGGAACAAGT AGGTTTCTCT TTGAAACTCA CGAGTCTACT TGACGGTGG
151 TCGTCTTCAT CTATTACTCT GTATAAGAGA CTACCAGGAA ATGACTCTGG
201 CAATACCAAT GATGAATTCT CCAGAACTT GTTGCTTACT ACATAA

```

*En-1* (3`Ende) im *SPL12*-Lokus

1	GAGTGTCGGT	CAACCGACAC	TCTTATACTT	AGAGTGTCGG	CTTATTTTCAG
51	TAAGAGTGTG	GGGTTTTTGGC	CGACACTCCT	TGCCTTTTTTT	CTTGTAGTGG
101	TCGATCTCGA	ACGATTTACC	ATCGGAGCTC	TTCAACATGA	TCTTCGTCGA
151	CATTGTTATG	GAGCGATTTT	TCTCTGGAAA	GCAAGGTTGA	TGAAACAAGA
201	TTGAAGAAGA	ATTTAGAGAG	CGATTTGAAG	AAAAATGATG	TAACGAACTT
251	ATGAATCTAT	GCGTCTGTGT	ATTTATAAGC	TCCAACGTGC	AGAGTCGGTG
301	GGATCAACAT	TTTCAGTGGA	GTAAACCAAG	CTGAACCGGG	TCGAATTTTA
351	CAATTGGCCC	AGTTTCGTAG	ATTCGGCCCA	AAACTTGATC	GAGATGGATT
401	AAATGTCAAA	AGAAAAAAG	GATTTGGTTG	GTGTTTTATG	TGATTTGTTG
451	TTATTCTCAC	TCACTTCAAG	ATTTGCCATC	AAAGACAAAG	TACAAAATGT
501	TACAAACACA	CAAAAACGTA	GTTATACAAA	TTCGGGGGTT	TAACATCAGA
551	TAAAGCTACA	TTACATATAA	TCTTGTAAG	CTGAATGATA	CATATTCTAG

**Anhang E: Verwendete Oligonukleotide**

<i>SPL1/SPL12</i> -Oligonukleotide	
GC626	5`-ATTAGAGTTCACTGGAAGTCTGC-3`
GC627	5`-ATCTTCTGAACCGTCTTTACCAGCTGC-3`
GC628	5`-CGAAATCGGTTGGCTTCTACACAGAAG-3`
GC629	5`-AGGTGTTAAGCCGCCTGGACCAGC-3`
<i>SPL2</i> -Oligonukleotide	
GC127	5`-ACTCCTCACTGTCAAGTTGAAGG-3`
GC333	5`-TGATGGTACGTGCTTCGAACTTGGC-3`
GC334	5`-TTGGGACTTCCAGTGAAGTCTGGCTTC-3`
GC635	5`-CATAACAGAAATGACAAAAGCATCTCC-3`
GC636	5`-TCTCCATCAATGAGATTGTTGTGAACC-3`
<i>SPL3</i> -Oligonukleotide	
GC188	5`-CTTTAGTCAGATCTGCTTTTCCGCC-3`
GC217	5`-GATCTCTGGTCTTCACCAACG-3`
GC241	5`-CAGAAGAGAGTAAGCAAAGCCTGTTTC-3`
GC268	5`-TGAGTATGAGAAGAAGCAAAGCGGAAG-3`
GC324	5`-GAATTTTGCAGATCAGTATGAG-3`
GC325	5`-AACCATGCGTAGGTTTAGCAGATAGC-3`
GC600	5`-CATGGATCTAGCTGATGACATAACACG-3`
GC601	5`-AAGCCAAAAGTGGATATACAAGAATGG-3`
GC647	5`-AGATGACCATGGGAAGAAGCAAAGCGGAAG-3`
GC649	5`-TTCAGAATTCTTAGTCAGTTGTGCTTTTCC-3`
GC659	5`-TTCACCGTCCCATGGAAGTTGTGCTTTTCC-3`
GC697	5`-CCTGACAACTCCACTACTACTTGTAGC-3`
<i>SPL4</i> -Oligonukleotide	
GC189	5`-AGACTGATACGGATGAAGAAGAG-3`
GC336	5`-ATGGAGACTGATACGGATGAAGAAGAG-3`
GC338	5`-CTTCTTGATTCTGCATCACC-3`
GC558	5`-GTGGAAGAAGATATGGAGACTGATAC-3`
GC559	5`-CATAGGAAGTGTCATCTCTACCCTTG-3`
GC630	5`-GGAGTCTCTCATCATAGCAAGTGATGG-3`
<i>SPL5</i> -Oligonukleotide	
GC113	5`-CACGAATACAACCTTAAAGCTTTACCAGAAAATGGAGG-3`
GC339	5`-CATCCTTCAACATTGCTTCCTAACCAG-3`
GC340	5`-GAGAGCGGGAGGGTTTATCTGATCTGTG-3`
GC583	5`-GAGTCTGCAGAGGTCTCTTCTCCTATC-3`
GC631	5`-TAGTCTACATCGACAAAGGATGTCACC-3`
p5f05	5`-GTTCCACGTGTCGTTTGCATTG-3`
p5r01	5`-TGGTGACATCCTTTGTGCGATGTAGAC-3`

<i>SPL6</i> -Oligonukleotide	
GC342	5`-GGTAAGCGCCATAAAGCTTCTTCGCACC-3`
GC345	5`-CAATCTCAAGAAACTCGAACCGG-3`
GC346	5`-TAATCAAGCCATGCAGGCTTGTCTTGTCC-3`
GC562	5`-TAATCAAGCCATGCAGGCTTGTCTTG-3`
GC560	5`-GTGCTCTCAGAATCCCTTGTGTCAAG-3`
GC561	5`-GTGTAGTAAGGATCTGAGCTCTTCG-3`
GC590	5`-CTACACCGGACGTAGTAGAGATGTTCG-3`
GC591	5`-GAGCTAATTTGTAAACCGAATCTACAC-3`
GC609	5`-CTCTACTACGTCCGGTGTAGCATCTGC-3`
<i>SPL7</i> -Oligonukleotide	
GC315	5`-GCCTCTGATTCCGACGCAAACCTCCG-3`
GC347	5`-CCGCAGACGAACGCCTTCTCGTCGATC-3`
GC348	5`-CCTTCATCAAAGTCCGGGAGCAAATG-3`
GC587	5`-CAGCTGTCGGAGAAAGCTAGAGCGTC-3`
GC588	5`-GAATACTTGATGACGTAGTCTCCGTGG-3`
GC589	5`-TGTTCAAATAGACAGTCATCGAGCCTC-3`
<i>SPL8</i> Oligonukleotide	
GC344	5`-TGCTGGCAAACCTTTGGCTTAGTCC-3`
GC349	5`-GACTCTGACCCGACCCGGTCATCCTTC-3`
GC633	5`-TTGTTCTCCTACGACCAGACAGGACC-3`
GC634	5`-TTGTCGAATTCCGACAGCAAATGGAAC-3`
GC637	5`-AAGACAGAAGTGGATTTACGTCCAAC-3`
GC707	5`-CACCATGGTGGACTACGAATGGGATGGTC-3`
GC708	5`-TAAAGATCTGCTGGAGAAAACATTG-3`
<i>SPL9</i> Oligonukleotide	
GC483	5`-CGTTACGGGAGGATCGCACCTTCG-3`
GC484	5`-AGAACATTGGATACAAGAGTGATGAGG-3`
GC485	5`-CATCCTCTTTCAGTGGAGGGCTCATG-3`
GC642	5`-AGTAAGAGGAAACCACCATGGAGATGG-3`
GC643	5`-AAAGACAAGAGATCTAGACCAGTTGGTATGG-3`
GC648	5`-AAGCCACCCATGGCGTCTCTCTGTGTTAG-3`
GC652	5`-CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTTGGTATCTGACCC GAC-3`
GC654	5`-CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGAGATGGGTTCCA ACT-3`
GC632	5`-CATTCAATTGGATTGATCTGCCATGACG-3`
GC638	5`-ACTGGCCGCCTCATCACTCTTGTATCC-3`
GC643	5`-AAAGACAAGAGATCTAGACCAGTTGGTATGG-3`
GC646	5`-CAAAGAATTCTCAGAGAGACCAGTTGGTATGGTG-3`
GC651	5`-CAAATCTAGATCAGAGAGACCAGTTGGTATGGTG-3`
GC670	5`-AACCTTCCACTTGGCACCTTGGTATA-3`
GC705	5`-GGTCGGGTCAGTCGGGTCAGATACC-3`
<i>SPL10</i> - und <i>SPL11</i> -Oligonukleotide	
GC622	5`-GTCGACCTCTATCAACTCATCATCTCC-3`
GC623	5`-CAGAGAGGTAATGGCTCTGAGGACCAA-3`
GC624	5`-CGATGCAATCTTGCATCACAAGTTCC-3`
GC625	5`-TCTGTGTAGGCTTTGTCTCATAAGTGG-3`

<i>SPL12</i> -Oligonukleotide	
GC592	5`-AGGTGGACTAGACTGACGCGAGTCTTG-3`
GC604	5`-GATACTATAGGCAATGGGACTTCTATG-3`
<i>SPL15</i> Oligonukleotide	
GC662	5`-AACCACCATGGAGTTGTTAATGTGTTCG-3`
GC663	5`-AGATTAAGATCTAAGAGACCAATTGAAATGTTGAGG-3`
GC664	5`-TTGGGAGATCCTACTGCGTGGTCAACC-3`
GC665	5`-AGCCATTGTAACCTTATCGGAGAATGAG-3`
GC666	5`-AAGATCAGTGATGCAGCGCCTGGACC-3`
GC667	5`-AGAAGATGGTCGCCATGTATTTGTTGG-3`
GC668	5`-AGCCAAATCTAGAATGGAGTTGTTAATGTGTTCG-3`
GC669	5`-AAAGAGATCTAGATCAAAGAGACCAATTGAAATG-3`
GC711	5`-TGAAAGAGCCGTTGTGGGTTGTGG-3`
GC712	5`-AGAAGCAAGAACCGGGTCAATACC-3`
GC713	5`-AAAAGAAGTTGTCGCAGAAGACTCG-3`
<i>C. reinhardtii</i> -Oligonukleotide	
GC678	5`-TGTGCCAAGTTGACCAAGTGCAACCAGG-3`
GC679	5`-AAACGCTTCCGCTGCCGGCTGTCCACG-3`
<i>ACTIN1</i> -Oligonukleotide	
GC682	5`-TGCGACAATGGAACCTGGAATG-3`
GC683	5`-GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC-3`
<i>RAN3</i> -Oligonukleotide	
GC709	5`-ACCAGCAAACCGTGGATTACCCTAGC-3`
GC710	5`-ATTCCACAAAGTGAAGATTAGCGTCC-3`
<i>En-1</i> -Oligonukleotide	
En205	5`-AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA-3`
En8130	5`-GAGCGTCGGTCCCCACACTTCTATAC-3`
GC516	5`-CTTTAATTAAGTACACTCCTTTGACG-3`
GC517	5`-GAAGCTAATTCTCACAGCCGGGGG-3`
GC519	5`-GTTTCAGGCTCACATCATGCTAGTCC-3`
GC521	5`-AAGAGCGTCCATTTTAGAGTGACGGCT-3`
GC522	5`-TAGCCGTCCTCTAAAAATGGACGCTC-3`
GC524	5`-AGAGTACAATTCATGGACCTGAGGT-3`
<i>dSpm</i> -Oligonukleotide	
GC688	5`-CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG-3`
GC689	5`-GTTTTGGCCGACACTCCTTACC-3`
CG690	5`-GGTGCAGCAAAACCCACACTTTTACTTC-3`
GC691	5`-CGGGATCCGACACTCTTTAATTAAGTACACTC-3`
T-DNA-Oligonukleotide	
GC564	5`-CCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATG-3`
GC565	5`-GATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAG-3`
T7-Oligonukleotid pGBKT7	
T7 Y2H	5`-GTAATACGACTCACTATAGGGCGA-3`
pQE60-Oligonukleotide	
GC644	5`-GGCGTATCACGAGGCCCTTTGG-3`
GC645	5`-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3`



pBAR-Oligonukleotide	
GC248	5`-GACGCACAATCCCCTATCCTTCG-3`
GC359	5`-CTATAAGAACCCTAATTCCTTATCTG-3`
TAIL-PCR-Oligonukleotide	
SH35	5`-WGGWANCWGAWANGCA-3`
SH36	5`-WCGWWGAWCANGNCGA-3`
SH37	5`-WGCNAGTNAGWANAAG-3`
SH38	5`-AWGCANGNCWGANATA-3`
SH39	5`-SSTGGSTANATWATWCT-3`
SH40	5`-CGSATSTCSAANAAT-3`
SH41	5`-TGCCGAGCTTG-3`
SH42	5`-NGTCGASWGANAWGAA-3`
Oligonukleotide für Standardplasmide	
T7ext	5`-AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG-3`
T3ext	5`-CTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC-3`
SMART-Oligonukleotide	
GC360	5`-GCAGTGGTACAACGCAGAGTACTTT-3`
GC361	5`-CAGCTAGTCAAGGATCCGAATTCGAGCGGG-3`
GC362	5`-AGCTAGTCAAGGATCCGAATTCGAG-3`
OligodT	5`-AAGCAGTGGTAACAACGCAGACTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3`

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Saedler (Abteilung Molekulare Pflanzengenetik, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung) betreut worden.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

.....

Datum

.....

Unterschrift

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Saedler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an diesem Institut und besonders für sein nie nachlassendes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. M. Hülskamp danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dr. P. Huijser möchte ich ganz besonders für die stete Diskussionsbereitschaft und gute Betreuung danken.

Dr. U. Hartmann und S. Höhmann danke ich für die vielen kleinen Tips und Tricks am Rande, die mir das Laborleben doch maßgeblich erleichterten und mir die Eingewöhnung in das zu Beginn für mich neue Feld der *Arabidopsis*-Forschung vereinfachten.

Dr. G. H. Cardon möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft während der ersten Phase dieser Arbeit und seine Einführung in die Welt der *SPL*-Gene danken.

Dr. L. U. Wingen danke ganz herzlich für die Unterstützung vor allen Dingen in der letzten Zeit dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik möchte ich meinen Dank für die schöne Arbeitsatmosphäre aussprechen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern außerhalb der Abteilung bedanken, die mir bei Teilprojekten zur Seite standen.

Dr. D. Leister und Dipl. Biol. P. Pesaresi danke ich für die Überlassung der *sp18*-Mutanten aus der ZIGIA-Population und Dr. S. Steiner-Lange für die Bereitstellung der *myb26-1A*-Mutante für einige Experimente.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und dafür, daß sie stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten, wenngleich sie bestimmt nur einen Bruchteil davon verstanden. Danke für Eure Geduld mit mir!

## Lebenslauf

Name: Ulrike Swantje Arna Heike Unte

Geburtsdatum: 29.07.1970

Geburtsort: Uslar

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

- |               |   |
|---------------|---|
| 1976 bis 1979 | Besuch der Grundschule Hammersbach  |
| 1979 bis 1980 | Besuch der Grundschule Hainchen   |
| 1980 bis 1989 | Besuch des Wolfgang-Ernst-Gymnasiums, Büdingen  |
| 1989          | Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife  |
| 1989 bis 1990 | Auslandsaufenthalt in Paris/Frankreich  |
| 1990 bis 1997 | Studium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen  |
| 1996          | Mündliche Diplomprüfung in den Hauptfächern Genetik und Zoologie und den Nebenfächern Pflanzenphysiologie und Entwicklungsbiologie                                  |
| 1996 bis 1997 | Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Pflanzenphysiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. K. Zetsche                 |
| 1997          | Abschluß des Studiums mit der Note "sehr gut"   |
| 1997 bis 1998 | Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im Labor von Prof. Dr. C. F. Beck am Institut für Biologie III der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg               |
| 1998          | Beginn der Dr. Arbeit in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Saedler |
| 2001          | Erlangung des Reinhold von Sengbuschpreises   |