

**Analyse pflanzlicher Transkriptionsfaktoren durch
Überexpression dominant-negativer Proteinchimären**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Heike Markel

aus Gummersbach

Köln, 2002

Berichtersteller: Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2002

WENN DU ETWAS TUN KANNST,
UM EIN PROBLEM ZU LÖSEN,
HAST DU KEINEN GRUND
UNGLÜCKLICH ZU SEIN.
KANNST DU NICHTS TUN,
HILFT ES AUCH NICHT WEITER
UNGLÜCKLICH ZU SEIN.

Ein tibetanischer Meister

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Pflanzenentwicklung: Funktion der Meristeme.....	1
1.2 Pflanzliche Transkriptionsfaktoren	3
1.3 <i>KNOTTED1-like</i> Homöobox (<i>KNOX</i>) Gene.....	4
1.3.1 <i>SHOOT MERISTEMLESS (STM)</i>	5
1.3.2 <i>KNOTTED1-like Arabidopsis thaliana 1 (KNAT1)</i>	6
1.3.3 <i>KNOTTED1-like Arabidopsis thaliana 2 (KNAT2)</i>	7
1.4 Analyse von Transkriptionsfaktoren	8
1.5 Dominant-negative Genfunktionen.....	9
1.6 Ziel der Arbeit.....	10
2 MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 Methoden	11
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Radioisotope.....	11
2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien	11
2.1.3 Nukleinsäuren	12
2.1.3.1 <i>Oligonukleotide (5'→3')</i>	12
2.1.3.2 <i>Plasmide</i>	13
2.1.3.3 <i>Konstrukte</i>	13
2.1.3.4 <i>DNA-Sonden</i>	13
2.1.4 Bakterienstämme	14
2.1.5 Pflanzenmaterial.....	14
2.1.6 Anzuchtbedingungen.....	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 Molekulare Standardmethoden	15
2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (<i>E.coli</i>)	15
2.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompeter Agrobakterien (GV 3101).....	15
2.2.4 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA.....	16
2.2.6 Präparation von BAC-DNA.....	16
2.2.7 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.2.8 Restriktionsverdau genomischer DNA.....	17
2.2.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2.10 Agarosegelelektrophorese	18
2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agaosegelen	18
2.2.12 DNA-Sequenzierung	18
2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	18

2.2.14 Southern-Blot	19
2.2.14.1 Transfer von DNA auf Membranfilter.....	19
2.2.14.2 Hybridisierung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden an filtergebundene DNA.....	19
2.2.15 Northern-Blot.....	19
2.2.15.1 Transfer von RNA auf Membranfilter.....	19
2.2.15.2 Hybridisierung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden an filtergebundene RNA.....	19
2.2.16 Reverse Transkriptase Reaktion	20
2.2.17 PCR-Amplifikation	20
2.2.18 Nicht-radioaktive RNA <i>In-situ</i> -Hybridisierung	20
2.2.18.1 Gewebefixierung und Einbettung	21
2.2.18.2 Herstellung der Gewebeblöcke	21
2.2.18.3 Herstellung der Mikrotomschnitte.....	22
2.2.18.4 Präparation der antisense RNA Sonde	22
2.2.18.5 Hybridisierungsreaktion.....	23
2.2.18.6 Waschen der Schnitte	25
2.2.18.7 Detektion	25
2.2.18.8 Abstoppen der Reaktion und Schlussbehandlung der Gewebeschnitte	25
2.2.18.9 Puffer und Stammlösungen.....	26
2.2.19 Mikroskopie und Fotografie	26
2.2.20 Computeranalysen	26
3 ERGEBNISSE	27
3.1 Untersuchungen zum Mechanismus von <i>CHRIS</i>	27
3.1.1 Das 35S:: <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>STM</i> Konstrukt.....	27
3.1.2 Beschreibung und Klassifizierung der Phänotypen der transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	28
3.1.3 Die EN ²⁹⁸ -Domäne fusioniert mit verschiedenen <i>STM</i> -Deletionskonstrukten	30
3.1.3.1 Frequenzen der Phänotypen.....	32
3.1.3.2 Zusätzlicher Phänotyp der transgenen 35S:: <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>STMΔN1 Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen.....	34
3.1.3.3 Keine Korrelation zwischen Expressionsstärke und Phänotyp	36
3.1.4 Überexpression einiger <i>STM</i> -Deletionskonstrukte, der <i>KNOX</i> _(STM) und der <i>KNOX/ELK</i> _(STM) Domäne ohne die EN ²⁹⁸ -Domäne	37
3.1.4.1 Transgene 35S:: <i>KNOX</i> _(STM) und 35S:: <i>KNOX/ELK</i> _{(STM) Arabidopsis thaliana Pflanzen zeigten einen bisher nicht mit <i>STM</i> assoziierten Phänotyp.....}	40
3.1.5 Einfügen von Leserasterverschiebungen in einige der Konstrukte.....	42
3.1.6 Zusammenfassung der Daten	44
3.2 Analyse der Transkriptionsfaktoren <i>KNAT1</i> und <i>KNAT2</i> mit der Hilfe von <i>CHRIS</i>	45
3.2.1 Die Konstrukte: 35S:: <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>KNAT1</i> und 35S:: <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>KNAT2</i>	46
3.2.2 Phänotyp der transgenen <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>KNAT2</i> Pflanzen.....	46
3.2.3 Phänotyp der transgenen <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>KNAT1</i> Pflanzen.....	47

3.2.4 Identifizierung der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>brevipedicellus</i> (<i>bp</i>)	
als Funktionsverlustmutante von <i>KNAT1</i>	48
3.2.4.1 Der Phänotyp der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>brevipedicellus</i> (<i>bp</i>).....	49
3.2.4.2 Vergleich zwischen <i>en</i> ²⁹⁸ - <i>KNAT1</i> und <i>bp-1</i> Pflanzen.....	50
3.2.4.3 Ein weiteres <i>brevipedicellus</i> Allel: <i>bp-R</i>	52
3.2.4.3.1 Phänotyp der <i>bp-R</i> Mutante.....	52
3.2.4.3.2 Vergleich zwischen <i>bp-R</i> , <i>bp-1</i> und <i>Ler</i> Pflanzen	54
3.2.4.3.3 Kreuzung der <i>bp-R</i> mit <i>bp-1</i> Pflanzen.....	55
3.2.4.4 Das <i>KNAT1</i> Transkript in <i>bp-1</i> und <i>bp-R</i> Mutanten.....	55
3.2.4.5 Southern-Analysen mit genomischer DNA von <i>bp-1</i> und <i>bp-R</i> Mutanten	57
3.2.4.6 Komplementation des <i>brevipedicellus</i> Phänotyps durch	
Expression eines 35S:: <i>KNAT1</i> Konstruktes in <i>bp-1</i> Mutanten	59
3.2.5 Die Expression der beiden Domänen <i>KNOX</i> _(<i>KNAT1</i>) und	
<i>KNOX/ELK</i> _(<i>KNAT1</i>) als <i>EN</i> ²⁹⁸ -Fusionen.....	60
4 DISKUSSION	62
4.1 Dominant-negative <i>EN</i> ²⁹⁸ -Fusionen erzeugen in	
Pflanzen eine Kopie des Funktionsverlust-Phänotyps	62
4.2 Möglicher Mechanismus von <i>CHRIS</i>	64
4.2.1 Cosuppressor-abhängige und -unabhängige Repression durch <i>EN</i> ²⁹⁸	68
4.3 <i>CHRIS</i> im Vergleich mit anderen Methoden.....	69
4.4 Ausblick	72
5 ZUSAMMENFASSUNG	73
6 ABSTRACT.....	74
7 LITERATURVERZEICHNIS	75
8 ANHANG.....	82

1 EINLEITUNG

1.1 Pflanzenentwicklung: Funktion der Meristeme

Im Unterschied zu Tieren können Pflanzen ihren Standort nicht beliebig wechseln, um sich günstigere Lebensbedingungen zu suchen, wenn sich das Angebot an Licht und Wasser sowie lebensnotwendigen Nährstoffen verschlechtert. Um zu überleben, sind sie darauf angewiesen sich den Veränderungen ihrer Umwelt anzupassen. Genetisch identische Pflanzen, die unter unterschiedlichen Umweltbedingungen wachsen, weisen eine große Variabilität in Größe und Form auf (Steeves & Sussex, 1989).

Während in höheren tierischen Systemen die Morphogenese im Wesentlichen während der Embryonalentwicklung stattfindet, wird im Verlauf der pflanzlichen Embryogenese nur der grundlegende Körperaufbau entlang der Wurzel-Spross-Achse angelegt. Pflanzen bilden während des gesamten Lebenszyklus durch die Differenzierung von Zellen der so genannten apikalen Meristeme kontinuierlich neue Gewebe und Organe aus (Walbot, 1985). Die Aktivität der Wurzel- und Sprossapikalmeristeme gewährleistet den Pflanzen die Flexibilität, die laufenden Veränderungen der Umwelt in ihre Entwicklungsentscheidungen zu integrieren und auf diese Weise die Effizienz der Photosynthese zu maximieren. Das heißt, über laufend neu gebildete Pflanzenorgane wird eine optimalere Nutzung der vorhandenen Ressourcen möglich (Taylor, 1997), der Körperaufbau kann sich den gegebenen Umweltbedingungen anpassen.

Der Lebenszyklus der Blütenpflanzen unterteilt sich in Embryogenese, vegetative und generative Entwicklung. Die primären Meristeme des Sprosses und der Wurzel werden früh in der Embryogenese an den entgegengesetzten Enden der apikal-basalen Achse gebildet (Weigel & Jürgens, 2002). Der reife Embryo zeigt zum einen ein apikal-basales Muster mit den Elementen Sprossmeristem, Kotyledonen, Hypokotyl, embryonale Wurzel, Wurzelmeristem und zum anderen ein radiales Muster mit den Elementen Epidermis, Grundgewebe mit den Derivaten Cortex und Endodermis sowie dem Leitgewebe.

Mit der Keimung des Samens entsteht aus dem Embryo der Keimling, der sich während der vegetativen Wachstumsphase zur fortpflanzungsfähigen Pflanze entwickelt. Diese Entwicklung beruht auf der Aktivität der primären Meristeme, auf die sich frühzeitig die Zellteilungsaktivität beschränkt. Das Sprossapikalmeristem ist verantwortlich für die Bildung sich wiederholender Struktur- und Funktionseinheiten im Spross, so genannter Phytomere, bestehend aus Internodium, Nodium, Blatt und Achselknospe (Sussex, 1989). Eine Voraussetzung hierfür ist die Fähigkeit der Pflanzen während des gesamten Entwicklungszyklus eine Gruppe undifferenzierter Zellen im Zentrum der Meristeme (zentrale Zone) zu erhalten. Diese so genannten Stammzellen teilen sich langsam und gliedern zwei Arten von Tochterzellen ab. Zellen, die im Zentrum bleiben, bleiben Stammzellen und erneuern auf diese Weise den Vorrat an undifferenzierten Zellen. Tochterzellen, die an den Rand des Meristems abgegeben

werden (periphere Zone), durchlaufen Differenzierungsprozesse zu spross-spezifischen Zellen, zur Bildung lateraler Organe oder zur Initiation sekundärer Meristeme. Die Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelldifferenzierung aufrecht zu erhalten, ist eines der charakteristischen Merkmale des Sprossapikalmeristems (Weigel & Jürgens, 2002).

Der Übergang in die generative Wachstumsphase ist gekennzeichnet durch die Bildung des Infloreszenzmeristems, das direkt aus dem vegetativen Sprossmeristem hervorgeht (Poethig, 1990). Diese Umwandlung (Evokation) geschieht häufig erst nach Induktion durch Außenfaktoren, wie Temperatur- und Lichteinwirkung (Blühinduktion). Das Infloreszenzmeristem bildet dann die Blütenmeristeme aus, die sich zu Blüten mit den charakteristischen Blütenorganen Sepalen, Petalen, Stamina und Karpelle entwickeln, wobei die letzten beiden die reproduktiven Organe repräsentieren. Die Gametenbildung bei Pflanzen erfolgt also erst in einer relativ späten Entwicklungsphase durch die Umdifferenzierung einer Population von Zellen, die vorher bereits am Aufbau des vegetativen Pflanzenkörpers beteiligt waren. Dies ist Ausdruck der Entwicklungsplastizität pflanzlicher Zellen, die im Prinzip während des gesamten Lebenszyklus totipotent bleiben, das heißt das Potential für sämtliche Entwicklungsstrategien von Pflanzenzellen abrufbar enthalten (Walbot, 1985; Weigel & Jürgens, 2002). Mit der Ausbildung der Blüte endet bei einjährigen Pflanzen die Aktivität der Meristeme.

Die beschriebene Entwicklung höherer Pflanzen zeigt die seit langem bekannte große Bedeutung der Meristeme in diesen Prozessen. Aber erst in letzter Zeit gibt es Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Bildung und Aufrechterhaltung der Meristeme zugrunde liegen. Die meisten Erkenntnisse über die Regulationsprozesse in Meristemen haben sich aus Untersuchungen der dikotylen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ergeben, die sich aufgrund ihres kleinen Genoms, ihrer geringen Größe und ihres kurzen Lebenszyklus besonders gut zur genetischen Analyse der Pflanzenentwicklung eignet. Ein weiterer Vorteil ist, dass *Arabidopsis thaliana* die erste Pflanze ist, deren Genom vollständig sequenziert ist (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000).

Arabidopsis ist eine Rosettenpflanze, das heißt das Sprossapikalmeristem gliedert in kurzen Abständen Blätter ab, ohne dass die Internodien nennenswert wachsen. Nach der Blühinduktion wächst die Infloreszenz, an deren Basis die 9 bis 11 Blätter (unter Langtagbedingungen) als Rosette angeordnet sind. In den Achseln der Rosettenblätter gibt es sekundäre Sprossmeristeme, die aufgrund der apikalen Dominanz erst spät oder gar nicht auswachsen. Das endständige Infloreszenzmeristem bleibt bei *Arabidopsis* undifferenziert und gliedert laufend Blütenmeristeme sowie Anlagen für Seitensprosse ab. Die Blütenorgane sind charakteristisch in vier konzentrischen Wirteln angeordnet, die Blüte bestäubt sich selbst. Sechs Wochen nach der Aussaat ist bereits die Samenreife erreicht.

Die Suche nach *Arabidopsis thaliana* Mutanten, bei denen die beschriebene Meristem-entwicklung bzw. die Musterbildung verändert ist und die Isolierung der für den beobachteten Phänotyp verantwortlichen Gene, hat zur Identifizierung einer Reihe molekularer Marker geführt. Diese können erste Aufschlüsse über die molekularen Regulationsprozesse in Meristemen und bei der Bildung von Organen geben. Eine große Anzahl der identifizierten Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, dazu zählen unter anderem *SHOOT MERISTEMLESS* (Long et al., 1996) und *ASYMMETRIC LEAVES1* (Byrne et al., 2000), die eine Rolle bei der Organisation des Sprossapikalmeristems spielen, sowie *APETALA3* (Jack et al., 1992) und *PISTILLATA* (Goto & Meyerowitz, 1994), die an der Entwicklung der Blütenorgane beteiligt sind.

1.2 Pflanzliche Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren im allgemeinen sind trans-wirkende Proteine, die an cis-regulatorische Elemente binden und/oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und auf diese Weise die Aktivität ihrer Zielgene regulieren (Mitchell & Tijan, 1989). Die Funktion der Transkriptionsfaktoren spiegelt sich in ihrer Struktur wieder.

Ein typischer pflanzlicher Transkriptionsfaktor enthält, mit wenigen Ausnahmen, eine DNA-bindende Domäne, eine Protein-Protein Interaktionsdomäne, eine transkriptionsregulierende Domäne und ein Kernlokalisierungssignal. Aufgrund von Strukturmerkmalen der konservierten Domänen, die für die Bindung der DNA und für die Protein-Protein Interaktion verantwortlich sind, ergibt sich die Einteilung der pflanzlichen Transkriptionsfaktoren in unterschiedliche Familien (Liu et al., 1999). Dazu zählen unter anderem die Familie der Zinkfinger-Proteine (Takatsuji, 1998), die MYB verwandten Proteine (Martin & Paz-Ares, 1997), die MADS Transkriptionsfaktoren (Riechmann & Meyerowitz, 1997) und die Homöodomänen Proteine (Kerstetter et al., 1994).

Diese Struktur motive sind auch in tierischen Transkriptionsfaktoren konserviert. Die Homöobox beispielsweise, die die 60 Aminosäuren umfassende DNA-bindende Homöodomäne kodiert, wurde zuerst in *Drosophila* entdeckt (Scott & Weiner, 1984; McGinnis et al., 1984). Sie ist in vielenentwicklungsspezifischen Genen enthalten, die eine Schlüsselrolle unter den Kontrollgenen spielen, die das anterior-posterior Muster von *Drosophila* definieren. Dazu zählen die Gene der *ANTENNAPEDIA*- und *BITHORAX*-Komplexe, sowie *BICOID*, *FUSHI TARAZU* und *ENGRAILED* (Gehring, 1987; Scott & Carroll, 1987).

Die Entwicklungsstrategien höherer Pflanzen und Tiere weisen, wie bereits beschrieben, große Unterschiede auf. Die Isolierung von pflanzlichen Homöobox Genen, die eine Rolle bei der Organisation der Meristeme spielen, hat allerdings die Vermutung nahe gelegt, dass wichtige Regulationsmechanismen, die die Entwicklung kontrollieren unter allen höheren Eukaryoten konserviert sein könnten (Hake, 1992).

1.3 *KNOTTED1*-like Homöobox (*KNOX*) Gene

Das erste in Pflanzen identifizierte Homöobox Gen, *KNOTTED1* (*KN1*), wurde aus einer morphologischen Transposon markierten *Zea mays* Mutante isoliert (Hake et al., 1989; Vollbrecht et al., 1991). Die dominanten *kn1* Mutanten bilden durch fortgesetzte Teilungen einzelner Gruppen von Zellen entlang der lateralen Leitgefäße der Blattspreite kleine Auswüchse, so genannte Knoten, aus, bedingt durch die ektopische Expression von *KN1* in den Blättern (Smith et al., 1992).

In Wildtyp-Pflanzen wird *KN1* im Sprossapikalmeristem, in sekundären Meristemen, in Infloreszenzmeristemen und in Blütenmeristemen expremiert, nicht aber in Blättern oder Blütenorganen. Die *KN1* Expression geht zurück, sobald ein neues Organprimordium initiiert wird (Jackson et al., 1994). In *kn1* Funktionsverlust (*loss-of-function*) Mutanten zeigen männliche und weibliche Blüten eine geringere Verzweigung, darüber hinaus werden in weiblichen Blüten zusätzliche Karpelle und vereinzelt in den Achseln der vegetativen Blätter zusätzliche Blätter ausgebildet. Das heißt, dass im Wildtyp meristematisch bleibende Zellen einen Differenzierungsprozess durchlaufen, wenn das *KN1* Protein ausfällt (Kerstetter et al., 1997). In einigen Inzuchtlinien führt der Verlust der *KN1* Funktion zu signifikant kleineren Meristemen, was zur Folge hat, dass nach der Bildung der Koleoptile höchstens zwei Blätter initiiert werden und die Maispflanzen im Keimlingsstadium verbleiben (Vollbrecht et al., 2000).

Das Expressionsmuster und die Phänotypen der Funktionsverlust und -gewinn Mutanten weisen darauf hin, dass *KNOTTED1* eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung eines meristematischen bzw. undifferenzierten Zellstatus hat.

Inzwischen sind eine ganze Reihe weiterer sequenzähnlicher Gene aus verschiedenen Pflanzenarten unter anderem aus Mais (*KNOX*-Gene, Kerstetter et al., 1994), *Arabidopsis* (*STM*, Long et al., 1996; *KNAT*-Gene, Lincoln et al., 1994) und Reis (*OSH1*, Matsuoka et al., 1993) isoliert worden, die zusammen die Familie der *KNOTTED1*-like Homeobox (*KNOX*) Gene bilden. Die *KNOX*-Genfamilie gehört zur übergeordneten *Three Amino acid Loop Extention* (*TALE*) Familie (Bürglin, 1997), die ihren Namen durch drei zusätzliche Aminosäuren im *loop* zwischen Helix 1 und Helix 2 im Vergleich mit einer typischen Homöodomäne erhalten hat und der Gene aus Pflanzen, Tieren und Pilzen zuzuordnen sind.

Über die Homologie der Homöodomäne hinaus weisen die Mitglieder der *KNOX*-Genfamilie zusätzliche Sequenzähnlichkeiten auf. N-terminal an die Homöodomäne grenzt die ELK Domäne an (Kerstetter et al., 1994), die als Kernlokalisierungssignal fungieren kann (Meisel & Lam, 1996), gefolgt von einem kleineren weniger konservierten Element, der GSE Box. Weiter stromaufwärts liegt die etwa 100 Aminosäuren umfassende *KNOX*-Domäne, eine putative Protein-Protein Interaktionsdomäne, die in einer tierischen *TALE* Klasse als MEIS Domäne vorkommt, also auch zwischen Pflanzen und Tieren hoch konserviert ist (Bürglin, 1997; Sakamoto et al., 1999).

Aufgrund von Sequenzhomologien lassen sich die Mitglieder der KNOX-Genfamilie in zwei Klassen unterteilen. Während die Klasse 2 Gene sehr unterschiedliche Expressionsmuster zeigen, ist für die Klasse 1 Gene, dazu gehört *KNOTTED1* aus Mais, sowie *SHOOT MERISTEMLESS* und *KNAT1* aus *Arabidopsis*, eine meristem-spezifische Genexpression charakteristisch (Reiser, 2000).

1.3.1 SHOOT MERISTEMLESS (STM)

Das *Arabidopsis SHOOT MERISTEMLESS* Gen kodiert einen 382 Aminosäuren langen Transkriptionsfaktor der Klasse 1 KNOX-Gene (Long et al., 1996), der neben der Homöodomäne die charakteristischen Strukturmerkmale KNOX- und ELK-Domäne aufweist.

In Wildtyp *Arabidopsis* Embryonen ist die *STM* mRNA bereits im mittleren Globular-Stadium in einer einzelnen Zelle detektierbar, noch bevor das Sprossapikalmeristem initiiert ist. Im frühen Herzstadium ist die *STM* Expression dann als schmaler Streifen zwischen den zu diesem Zeitpunkt angelegten Primordien der Kotyledonen zu finden. Im reifen Embryo schließlich beschränkt sich die *STM* mRNA auf den zentralen Bereich des embryonalen Sprossapikalmeristems (Long & Barton, 1998). Nach der Keimung bleibt die *STM* Expression die vegetative und generative Entwicklung hindurch in allen Meristemen (vegetative, Achsel-, Infloreszenz- und Blütenmeristeme) erhalten. Keine Expression ist in differenzierten Organen zu finden. Sobald Organprimordien initiiert werden, wird die *STM* Expression herunterreguliert (Long et al., 1996).

Arabidopsis Keimlingen, die homozygot für rezessive Mutationen im *STM* Gen sind, fehlt ein sichtbares Sprossapikalmeristem und die beiden Kotyledonen sind im Bereich der Petiolen miteinander fusioniert (Barton & Poethig, 1993). Später entstehen offenbar Blätter aus den Achseln der Kotyledonen. Schwächere *stm* Allele entwickeln scheinbar ein Sprossapikalmeristem, das jedoch nach der Ausbildung einiger weniger Blätter keine weiteren Organe mehr abgliedert, sozusagen „aufgebraucht“ ist und die Entwicklung stoppt. Gelegentlich entstehen Infloreszenzen aus sekundären Meristemen in den Achseln der Blätter, die einige Hochblätter und eine variable Anzahl Blüten tragen. Diese Infloreszenzmeristeme enden in Blütenstrukturen, die zum Teil miteinander fusioniert sind. Den gebildeten Blüten fehlen teilweise Organe oder diese sind in geringerer Anzahl vertreten (Clark et al., 1996). In einigen Fällen sind so genannte „Luftrosetten“ zu beobachten, ähnlich wie in *wuschel* Mutanten (Laux et al., 1996). Die Infloreszenz wächst, stoppt die Entwicklung, eine größere Anzahl Blätter wird rosetten-ähnlich abgegliedert und anschließend wächst erneut die Infloreszenz.

Die ektopische Expression von *STM* unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in *Arabidopsis* führt zu schwer verkümmerten Pflanzen (Größe etwa 1 mm) mit einem vollkommen unorganisierten Sprossapikalmeristem, das von zwei sehr kleinen Kotyledonen umgeben ist. Das Sprossmeristem trägt viele kleine Strukturen, die

Blattprimordien ähneln aber nicht auswachsen. Diese Pflanzen sind also nicht in der Lage differenzierte Strukturen auszubilden (Williams, 1998).

Das *STM* Expressionsmuster, das dem von *KN1* sehr ähnlich ist, und die Phänotypen der Funktionsverlust und -gewinn Mutanten zeigen, dass *STM* ebenso wie *KN1* eine wichtige Funktion bei der Bildung der Meristeme hat, aber vor allem notwendig ist, die meristematischen Eigenschaften zu erhalten.

Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen und der Expressionsmuster zwischen *KN1* und *STM* ließ vermuten, dass es sich bei *STM* um das *KN1* Ortholog aus *Arabidopsis* handelt. Phylogenetische Analysen haben aber gezeigt, dass *STM* und *KN1* in zwei unterschiedlichen Zweigen zu finden sind (Reiser, 2000). Die größte Homologie weist *STM* zu SBH1 einem KNOX-Protein aus Sojabohne auf (67% Identität, Ma et al., 1994). Die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen *KN1* und *STM* liegt bei 47%, genau wie zwischen *STM* und *KNAT1* (*KNOTTED1-like Arabidopsis thaliana*), einem weiteren KNOX-Protein aus *Arabidopsis*.

1.3.2 *KNOTTED-like Arabidopsis thaliana 1 (KNAT1)*

Durch Hybridisierung mit der Homöobox von *KNOTTED1* als heterologer Sonde konnten in unterschiedlichen *Arabidopsis* cDNA Banken eine Reihe von Klonen, die *KNAT* Gene (für *KNOTTED1-like* from *Arabidopsis thaliana*), identifiziert werden (Lincoln et al., 1994; Serikawa et al., 1996). Zwei dieser Gene, *KNAT1* und *KNAT2*, sind den Klasse 1 KNOX-Genen zuzuordnen (Lincoln et al., 1994).

KNAT1 kodiert ein 398 Aminosäure langes Homöodomänen Protein, das wie *KN1* und *STM* zusätzlich zur Homöodomäne die konservierten Domänen ELK und KNOX enthält.

Northern-, in situ Hybridisierungsexperimente und die Analyse des β -Glucuronidase (GUS) Expressionsmusters in transgenen *KNAT1::GUS* Pflanzen haben gezeigt, dass *KNAT1* im Wildtyp Keimling und in der Infloreszenz aber nicht in den Blättern expremiert wird. Die *KNAT1* mRNA ist während der vegetativen Entwicklung in erster Linie in der peripheren Zone des Sprossapikalmeristems zu finden, an der Basis der Blattprimordien und angrenzend an das sich entwickelnde vaskuläre Gewebe sowie im Hypokotyl. Keine Expression ist in jungen Blattprimordien, älteren Blättern und Stipeln (Nebenblätter, Strukturen an der Basis der Blätter) detektierbar. Nach dem Übergang in die generative Phase beschränkt sich die *KNAT1* Expression auf die inneren Zelllagen des Kortex entlang der primären Sprossachse, der Seitensprosse und der Pedicels (Blütenstiele) sowie im vierten Blütenwirtel auf den Griffel der Karpelle. In Infloreszenz- und Blütenmeristemen konnte keine Expression nachgewiesen werden (Lincoln et al., 1994; Ori et al., 2000).

Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die *KNAT1* unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimieren, zeigen Veränderungen in der Blattentwicklung. Die Blätter, sowohl Rosetten- als auch Hochblätter, sind im Unterschied zu wildtypischen Blättern etwas schmaler, stark gelappt und leicht gewellt, wobei die Stärke des Phänotyps sehr variiert. Im Wildtyp sind die Blätter beginnend mit dem dritten Rosettenblatt lediglich leicht gezackt und an der Basis entwickeln sich ein Paar Stipeln. Die starken Ausbuchtungen (*lobes*) der Blätter in 35S::*KNAT1* Pflanzen entstehen an Positionen, an denen sich im Wildtyp die kleinen Zacken befinden. Die Zacken werden zu Primordien, die zu *lobes* auswachsen, an deren Basis sich ektopische Stipeln bilden. Die einzelnen *lobes* ähneln also wildtypischen Blättern. Einige Transformanten entwickeln ektopische Meristeme im Bereich zwischen zwei Ausbuchtungen. Bei den am stärksten betroffenen 35S::*KNAT1* Pflanzen ist auch die Blütenentwicklung gestört (Lincoln et al., 1994; Chuck et al., 1996).

Die Sequenzähnlichkeit mit KN1 und STM, das Expressionsmuster von *KNAT1* sowie der Phänotyp der Funktionsgewinn Mutante haben zu der Vermutung geführt, dass *KNAT1* ebenfalls für die Bildung oder Aufrechterhaltung von Meristemen notwendig sein könnte. Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Arbeit war keine Funktionsverlust Mutante von *KNAT1* bekannt, die näheren Aufschluss über die Bedeutung des Gens in der Entwicklung hätte geben können.

1.3.3 *KNOTTED-like Arabidopsis thaliana 2 (KNAT2)*

KNAT2, das zweite identifizierte Klasse1 *KNOX*-Gen in *Arabidopsis*, kodiert ein 310 Aminosäure langes Protein, das im Bereich der Homöodomäne zu 80% identisch mit *KNAT1* und *KN1* ist. Wird die Aminosäuresequenz über die gesamte Länge betrachtet, liegt die Übereinstimmung mit *KNAT1* bzw. *KN1* lediglich bei etwa 45% bzw. 40% (Lincoln et al., 1994).

KNAT2 wird im inneren Bereich des vegetativen Sprossapikalmeristems exprimiert; keine Expression ist in den sich entwickelnden Blattprimordien detektierbar. *KNAT2* ist im Infloreszenzmeristem nicht aktiv, wird später in Blütenmeristemen wieder reaktiviert und beschränkt sich schließlich auf den Blütenboden und das Gewebe zwischen den fusionierten Karpellen. Darüber hinaus ist das *KNAT2* Transkript in den Achselknospen der Infloreszenz zu finden (Dockx et al., 1995; Laufs et al., 1998; Pautot et al., 2001).

Die Überexpression von *KNAT2* in *Arabidopsis* führt ähnlich wie in 35S::*KNAT1* Pflanzen zu gewellten und gelappten Blättern mit ektopischen Stipeln, d.h. die Differenzierung der Blattzellen ist verändert. Zusätzlich ist in den Blüten von mit Dexamethason induzierten 35S::*KNAT2-GR* Landsberg *erecta* Pflanzen (GR für Hormon-Bindungsdomäne des Glucocorticoid-Rezeptors) eine homöotische Transformation der Ovulen in carpellartige Strukturen zu beobachten (Pautot et al., 2001).

Das Expressionsmuster von *KNAT2* und der Phänotyp der Überexpressions-Pflanzen lassen die Vermutung einer überlappenden Funktion im apikalen Sprossmeristem zwischen *KNAT2* und *KNAT1* sowie *STM* zu. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Überexpression von *KNAT2* zumindest teilweise in der Lage ist *stm* Mutanten zu retten (Byrne et al., 2000; Pautot et al., 2001). Darüber hinaus ist eine Aktivität von *KNAT2* in der Entwicklung der Karpelle vorstellbar. Eine Funktionsverlust Mutante von *KNAT2* wurde bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert.

1.4 Analyse von Transkriptionsfaktoren

In Eukaryoten ist die Kontrolle der Transkription eine der wichtigsten Ebenen der Genregulation. Auf der Transkriptionsebene werden die unterschiedlichen intra- und interzellulären Signale verarbeitet, so dass sich für jedes Gen ein spezifisches zeitliches und räumliches Expressionsmuster ergibt. An diesem Regulationsnetzwerk sind wie bereits beschrieben eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt, deren Gene in Pflanzen häufig einer größeren Genfamilie angehören (Benfey & Weigel, 2001). Der Familie der *myb*-verwandten Gene werden zum Beispiel in *Arabidopsis* 136 Gene zugeordnet (Riechmann et al., 2000). MADS Box und Homöobox Gene sind in allen bisher untersuchten Pflanzenarten ebenfalls in großen Genfamilien vertreten (Riechmann & Meyerowitz, 1997; Kerstetter et al., 1994).

Nachdem das *Arabidopsis* Genom vollständig sequenziert ist (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), sind hier die Sequenzen aller putativen Transkriptionsfaktoren bekannt, aber für die meisten dieser Gene, wie z. B. *KNAT1* und *KNAT2*, ist weiterhin unklar, welche Rolle sie im Regulationsnetzwerk spielen, vor allem weil Funktionsverlust Mutanten vieler Gene bisher noch nicht identifiziert wurden.

Die Bestimmung des Expressionsmusters durch *Northern*-Analysen und *in situ* Hybridisierungen sowie die ektopische Expression des Gens in Sinn (*sense*) Orientierung unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors geben Hinweise, ersetzen aber nicht die Informationen, die Mutanten über die biologische Funktion der Gene liefern können. Redundanz erschwert jedoch die Identifizierung von Funktionsverlust Phänotypen. Wenn mit Hilfe der PCR in Transposon oder T-DNA Populationen eine Insertion in dem untersuchten Gen identifiziert werden kann, sind häufig erst Doppel- oder Dreifachmutanten verwandter Gene aussagekräftig. Dies ist recht zeitaufwendig.

Ein Versuch, das Fehlen einer Funktionsverlust Mutante auszugleichen und auch das Problem der Redundanz zu umgehen, ist die ektopische Expression des zu untersuchenden Gens in Gegensinn (*antisense*) Orientierung (Schuch, 1991). Man erhofft sich die Reaktion der eingebrachten *antisense* RNA mit der *sense* RNA des zu untersuchenden Gens sowie mit der RNA sequenzähnlicher Gene, um dadurch eine Kopie eines Funktionsverlust Phänotyps zu erzeugen und auf diese Weise etwas über die biologische Funktion des Gens zu erfahren. Darüber hinaus ist bei der ektopischen Expression von *sense* RNA neben dem Überexpressions-Phänotyp teilweise ebenfalls

eine Kopie des Funktionsverlust Phänotyps zu beobachten, ein häufig als Cosuppression bezeichnetes Phänomen. (Napoli et al., 1990). Auch hier kann die RNA des eingebrachten Transgens mit der RNA des homologen endogenen Gens interagieren, was zur Bildung von anormaler RNA und/oder cRNA führt. Die auf diese Weise gebildeten doppelsträngigen RNA Moleküle (dsRNA) initiieren dann den Abbau der transgenen und der homologen endogenen RNA. In Pflanzen wird diese Antwort auf dsRNA als *post-transcriptional gene silencing (PTGS)* bezeichnet und vermittelt natürlicherweise Resistenz gegen endogene parasitische und exogene pathogene Nukleinsäuren (Vaucheret et al., 1998). Über *antisense* RNA oder Cosuppression eine Kopie des Funktionsverlust Phänotyps zu erzeugen ist jedoch nicht immer erfolgreich, da vor allem häufig nur ein geringer Prozentsatz der transgenen Pflanzen diesen Phänotyp zeigen bzw. der Phänotyp sehr schwach ist.

Seit kurzem wird auch in Pflanzen eine in *Caenorhabditis elegans* bereits erfolgreich angewendete Methode zum gezielten „Ausschalten“ eines zu untersuchenden Gens eingesetzt, genannt RNAi für RNA *interference* (Fire et al., 1998; Ueda, 2001; Hannon, 2002). Hierbei werden direkt dsRNA-exprimierende Konstrukte der zu untersuchenden Gene in die Pflanzen eingebracht. Der bisherige Einsatz von RNAi in *Arabidopsis thaliana* scheint Erfolg versprechend zu sein und die Methode wird weiter verfeinert (Chuang & Meyerowitz, 2000; Wesley et al. 2001).

1.5 Dominant-negative Genfunktionen

Eine weitere Alternative die biologische Funktion von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, ist die Umwandlung der Transkriptionsfaktoren in dominant-negative Genfunktionen, um dann durch die Überexpression dieser Proteinchimären eine Kopie des Funktionsverlust Phänotyps zu erzeugen (Herskowitz, 1987). Dies ist insbesondere dann hilfreich, wenn Funktionsverlust Mutanten fehlen oder Einfachmutanten aufgrund von Redundanz nicht aussagekräftig sind. Die Herstellung dominant-negativer Proteinchimären durch Fusion mit der Repressordomäne des *Drosophila* Engrailed Proteins wurde in *Drosophila*, *Xenopus* und Maus erfolgreich eingesetzt (John et al., 1995; Conlon et al., 1996; Lyon & Watson, 1996).

Das *Drosophila* Segmentpolaritätsgen *engrailed* kodiert einen aktiven Repressor, dessen N-terminaler Bereich (En²⁹⁸, 298 Aminosäuren) die Repressordomäne umfasst, die von der DNA-bindenden Domäne des Proteins abgekoppelt werden und auf heterologe DNA-Bindungsdomänen übertragen werden kann (Poole et al., 1985; Jaynes et al., 1991; Han & Manley, 1993). Dass diese Strategie *in vivo* erfolgreich ist, hat die ubiquitäre Expression eines chimären Proteins in *Drosophila* gezeigt, bei dem die DNA-bindende Homöodomäne von Engrailed (En) durch die des transkriptionsaktivierenden Proteins Fushi tarazu (Ftz) ersetzt wurde. Nach der Induktion bindet das chimäre Protein aufgrund der eingesetzten DNA-bindenden Domäne spezifisch an Promotorregionen der normalerweise von Ftz aktivierten Gene, die dann aber aufgrund

der Engrailed Repressordomäne reprimiert werden, was in einer Phänokopie der *ftz* Funktionsverlust Mutante resultiert (John et al., 1995). Der Einsatz von En²⁹⁸-Fusionsproteinen bei der Analyse des *Xbra* Gens in *Xenopus* und Zebrafisch (Conlon et al., 1996) sowie bei der Analyse von c-Myb in Maus (Lyon & Watson, 1996) war ebenfalls erfolgreich und hat wichtige Informationen zur Funktion dieser Gene geliefert.

In Pflanzen steht noch keine wirklich funktionsfähige Repressordomäne zur Verfügung. Erst in diesem Jahr wurde eine Repressordomäne in SUPERMAN identifiziert, einem Transkriptionsregulator, der als aktiver Repressor in der Blütenentwicklung von *Arabidopsis* agiert (Hiratsu et al., 2002). Andererseits gibt es Homologien zwischen pflanzlichen und tierischen Transkriptionsfaktoren sowie Bestandteilen des Transkriptions-Initiationskomplexes. Daraus hat sich die Frage ergeben, ob es möglich ist, auch in Pflanzen bei der Analyse von Transkriptionsfaktoren die Engrailed Repressordomäne zur Herstellung dominant-negativer Proteinchimären einzusetzen.

Um die Einsatzfähigkeit des Systems, genannt Chimeric Repressor Interference System (*CHRIS*), in Pflanzen zu testen, wurde in unserer Arbeitsgruppe der gut charakterisierte Transkriptionsfaktor *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*, siehe oben) gewählt und als chimäres Konstrukt *en*²⁹⁸-*STM* unter der Kontrolle des starken CaMV 35S Promotors in *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Die Auswertung der erhaltenen Primärtransformanten hat gezeigt, dass die Engrailed Repressordomäne auch in Pflanzen funktionell zu sein scheint. Über 70 % der transgenen Pflanzen haben eine Kopie des *stm* Funktionsverlust Phänotyps gezeigt.

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen meiner Dissertation sollte zunächst der Mechanismus von *CHRIS* näher untersucht werden, um die Einsatzfähigkeit des Systems in Pflanzen besser belegen zu können. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe C- und N-terminaler Deletionen von *STM* sowie einzelne Domänen mit und ohne die En²⁹⁸ Repressordomäne in *Arabidopsis* Pflanzen überexprimiert. Darüber hinaus wurden in einige dieser Konstrukte Leserasterverschiebungen eingefügt und ebenfalls in *Arabidopsis* überexprimiert. Die erhaltenen Primärtransformanten wurden analysiert.

Das System wurde entwickelt, um die biologische Funktion von Transkriptionsfaktoren besser untersuchen zu können, für die im Rahmen klassischer Untersuchungen bisher kein Funktionsverlust Phänotyp identifiziert werden konnte. Um die Leistung des Systems in dieser Hinsicht zu testen, wurden im zweiten Abschnitt meiner Arbeit zwei weitere Mitglieder der *KNOX*-Genfamilie, *KNAT1* und *KNAT2* (siehe oben), mit Hilfe des Einsatzes dominant-negativer En²⁹⁸-Proteinchimären analysiert. Für beide Gene waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchungen keine Funktionsverlust Mutanten bekannt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Radioisotope

Chemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysis (p.A.) verwendet und wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Life Technologies (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhof).

Enzyme sowie die entsprechenden Puffer stammen von den Firmen Gencraft (Münster), Invitrogen GmbH (Karlsruhe) ehemals Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega GmbH (Mannheim), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg).

Verbrauchsmaterial wurde von Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Rommelsdorf) bezogen, Röntgenfilme von Kodak (Rochester, USA), Farbumkehrfilme (Ektachrom 100, Ektachrom 64T) von Annaker (Köln) und Filtermaterial von den Firmen Schleicher & Schüll (Dassel), Macherey & Nagel (Düren) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

Radioisotope ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ mit der spezifischen Aktivität 6000 Ci/mmol und 400 Ci/mmol) wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bestellt.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle verwendeten Standardlösungen und -puffer sowie die Medien zur Kultivierung von *E. coli* wurden nach den Angaben von Ausubel et al. (1996) hergestellt.

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem H_2O (dd H_2O , Milli-Q, Wasserreinigungssystem, Millipore Eschborn) angesetzt. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten sowie Medien wurden autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 μm Filter, Roth), Medien anschließend falls erforderlich mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

Die Angaben der folgenden Medien beziehen sich auf 1l Endvolumen:

YEB-Medium/Agar (für Agrobakterien): 5 g *Beef extract*, 5 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 5 g Saccharose, 2 ml 1 M MgSO_4 ; zur Herstellung fester Medien 15 g Agar zusetzen.

Infiltrationsmedium: 5 % Saccharose, 200 μl Silwet L -77[®] Copolymer (Witco, Steina an der Strasse)

2.1.3 Nukleinsäuren

2.1.3.1 Oligonukleotide (5' → 3')

Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) und Sigma (Deisenhof) bezogen. Grau unterlegt sind eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die die Klonierung in die verwendeten Vektoren ermöglicht haben. F steht für *forward Primer*, R steht für *reverse Primer*.

a) Für die Amplifikation der *STM*-Fragmente:

stmN_1	GGAACCATGGACCCTTGCTCCTCTTTCTC	(F: bp 331-347)
stmN_2	ACAGCCATGGTTGGTGAAGATCCAGGGCTTG	(F: bp 520-538)
stmN_3	TCTTCCATGGCTCTATCCTCACCTTCCTC	(F: bp 661-677)
stmN_4	TCTGCCATGGGTGATCCACAAGCTGAGG	(F: bp 763-778)
stmN_5	TCGACCATGGATAAAGGAAAGCTCCCTAAAG	(F: bp 862-880)
stmN_6	TGGACCATGGCGGAGGATATGCAGTTTG	(F: bp 1039-1054)
stmN_B	GACTAGGATCCGAAGCATGGTGGAGGAG	(R: bp 1138-1153)
STM_F	CTAGCCATGGAGAGCGGTTCC	(F: bp 1-15)
stm111	AGAGGGGATCCGGTTGATTCTCTCTG	(R: bp 316-330)
STM_fs	TCTACCATGGGAGAGCGGTTCCAAC	(F: bp 1-15)
KNOFR	GGACGCCATGGCCCTTGCTCCTCTTTCTCTTCT	(F: bp: 331-351)
KNO ₁₇₅ lo	AGGTGGGATCCGAGAGAGAGATTTGAATTGACA	(R: bp: 640-660)
ELKlo	AGCAGGATCCGACGCGCTTCTTTAGGGAGCTT	(R: bp: 868-888)

b) Für die Amplifikation der *KNAT1*-Fragmente:

knat1U	GTCGCCATGGGAAGAATATCAGCATGACAAC	(F: bp: 1-24)
knat1L	TTCGAGGATCCATGGACCGAGACGATAAG	(R: bp: 1177-1193)
K1oxF	GCTACCATGGACAACAATGACAACGTAAG	(F: bp: 370-386)
K1oxR	GGACGGATCCACAACATGCTAAGCTGAG	(R: bp: 683-699)
K1ELKR	GGAAAGTTGGATCCTCTTTTCTTCTTGGATAG	(R: bp: 895-912)

c) Für die Amplifikation der *KNAT2* cDNA:

knat2U	ACATCCATGGATAGAATGTGTGGTTTCCGC	(F: bp 1-24)
knat2L	CTCTCGGTCTAGAACTCGGTAAAGAATGTTTC	(R: bp 913-930)

d) Als Kontrolle in der RT-PCR:

gapCf	ACCACTAACTGCCTTGCTC
gapCr	CAATTTCAAACTTGTCGCTC

Ergeben ein 474 bp langes Produkt der gapC cDNA (Shih et al., 1991).

e) Sequenzierungsprimer:

K1seq1	ATGGAAGAATATCAGCATG	(<i>KNAT1</i> F: bp 1-19)
K1seq2	AAGCTTACTTGGACTGC	(<i>KNAT1</i> F: bp 446-462)
K1seq3	TTGTTCTTCGTCTGATG	(<i>KNAT1</i> R: bp 758-774)
K1seq4	TGGACCGAGACGATAAG	(<i>KNAT1</i> R: bp 1178-1194)
35S_1	TCATTTTCATTTGGAGAGG	(CaMV35S Promoter F: bp 401-418)
engstm2	GTGGATCTGCTGGAGTTTAGC	(EN ²⁹⁸ F: bp 661-681)
prt3	CCTTATCTGGGAACTACTCAC	(pRT R)
M13F20	GTA AACGACGGCCAGT	
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7/T3	AACAGCTATGACCATG	

2.1.3.2 Plasmide

pCR [®] II-TOPO [®]	TOPO TA Cloning [®] Kit von Invitrogen (Karlsruhe)
pBluescriptIIKS(+/-)	Alting-Mees et <i>al.</i> , (1992)
pCHRIS	modifizierter pRT Ω 100 (Töpfer et <i>al.</i> , 1987; Überlacker & Werr, 1996), NcoI und BamHI Schnittstelle eingefügt (Nolte, 2000), enthält den aminoterminalen Bereich (298 AS) des <i>Drosophila</i> Proteins Engrailed (Repressordomäne, Jaynes & O'Farrell, 1991; Han & Manley, 1993; Smith & Jaynes, 1996), NcoI-Schnittstelle erlaubt translationelle Fusion mit Engrailed-Repressordomäne, über AscI kann die komplette Expressionskassette in den binären Expressionsvektor pGPTV-Bar-Asc umgesetzt werden
pRT Ω GFP	modifizierter pRT Ω 100 (Töpfer et <i>al.</i> , 1987; Überlacker & Werr, 1996) mit GFP-S65C (Reichel et <i>al.</i> , 1996), nach Ausspaltung von GFP mit NcoI und BamHI ist direktionale Klonierung der DNA-Fragmente hinter den CaMV35S möglich, über AscI kann die komplette Expressionskassette in den binären Expressionsvektor pGPTV-Bar-Asc umgesetzt werden
pGPTV-Bar-Asc	Überlacker & Werr, (1996), enthält das BASTA Resistenzgen

2.1.3.3 Konstrukte

Bac F9M13	GenBank <i>Accession</i> Nummer AC006267 (IGF_B122M139Q3, RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin)
pRSTM4	pBlueskriptIIKS+ (Alting-Mees et <i>al.</i> , 1992) mit <i>SHOOTMERISTEMLESS</i> cDNA (U32344) bp 1-1149, HindIII/XbaI kloniert, freundlicherweise von Dr. Rüdiger Simon (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt
pRT-KNAT1-7	KNAT1 cDNA in pCHRIS (s.o.)

2.1.3.4 DNA-Sonden

<i>engrailed</i>	Repressordomäne, SplI(BsIWI)/BamHI Fragment aus Topo engSPL (Petra Comelli), 900 bp
<i>KNAT1</i> -ORF	NcoI/BamHI Fragment aus pRT-KNAT1-7, 1201 bp

2.1.4 Bakterienstämme

Escherichia coli:

DH10B	Grant et al., 1990, F ⁻ , <i>endA1</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> λ^{-} , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>
TOP 10	TOPO TA Cloning [®] Kit von Invitrogen (Karlsruhe), F ⁻ , <i>mrcA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>

Agrobacterium tumefaciens:

GV3101	Koncz & Schell, 1986, Rif ^r , die Virulenz wird über das enthaltene Plasmid pMP90RK (Gm ^r , Km ^r) vermittelt
--------	--

2.1.5 Pflanzenmaterial

Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
Ler	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Landsberg <i>erecta</i>
<i>bp</i>	<i>brevipedicellus</i> , Koornneef et al. (1983), in Ler, (NW30, NASC, University of Nottingham, Loughborough)
<i>bp-R</i>	Allel von <i>bp</i> , in Ler, aus EMS-Screen mit homozygoter <i>ufo-6</i> Mutante (Beschreibung der <i>ufo</i> Mutation: Bowman, 1997), Samen freundlicherweise von Dr. Rüdiger Simon (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt

2.1.6 Anzuchtbedingungen

Die Pflanzen wurden auf Erde bei durchschnittlich 23°C unter Langtagbedingungen (mindestens 16 Stunden Licht) im Gewächshaus angezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Ausubel et al. (1996) oder Anleitung des jeweiligen Herstellers der verwendeten Materialien (Enzyme, Chemikalien, Kits) ausgeführt.

2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (*E.coli*)

Für Transformationen wurden elektrokompetente *E.coli* (Mühlhardt, 2000) hergestellt. Die Transformation fand in 0,1 cm Elektroporationsküvetten in einem *GenePulser*TM (Geräteeinstellung: Kapazität 25 µF, Spannung 1,8 kV, Widerstand 200 Ω) der Firma BIORAD statt. Die Transformation von pCR[®]II-TOPO[®]-Konstrukten in TOP10 Zellen erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Agrobakterien (GV3101)

- Ausstreichen einer Glycerinkultur auf YEB/Rif⁺/Gent⁺-Agarplatten und 2 Tage bei 28°C inkubieren
- 40 ml YEB-Medium mit einer vereinzelt Kolonie animpfen und 2 Tage bei 28°C auf Schüttler wachsen lassen
- 800 ml YEB/Rif⁺/Gent⁺-Medium mit der Vorkultur versetzen und bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 – 0,5 (ca. 4 h) wachsen lassen
- 10 min bei 2°C und 3000 rpm in einem GS-3-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellets in insgesamt 240 ml 1 mM Hepes (sterilfiltriert, eiskalt) vorsichtig resuspendieren und 10 min auf Eis inkubieren
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Waschschrift mit 1mM Hepes noch 2x wiederholen
- Pellet in insgesamt 80 ml 1 mM Hepes mit 10% Glycerol (sterilfiltriert, eiskalt) resuspendieren
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Überstand vollständig verwerfen
- Pellet in 1 Volumen 1mM Hepes mit 10% Glycerol vorsichtig auf Eis resuspendieren, zu je 90 µl aliquotieren und auf Trockeneis einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Elektrokompetente Agrobakterien auf Eis langsam auftauen und je 1 µl DNA (50 – 500 ng) mit 50 µl Agrobakterien mischen. Die Transformation findet in 0,1 cm Elektroporationsküvetten in einem *GenePulser*TM (Geräteeinstellung: Kapazität 25 µF, Spannung 1,8 kV, Widerstand 200 Ω) der Firma BIORAD statt. Zügig 1 ml YEB-Medium (RT) zugeben, in einem Reaktionsgefäß 2 Stunden bei 28°C inkubieren, anschließend die gewünschte Menge auf YEB/Rif⁺/Gent⁺/Kan⁺-Platten ausplattieren und 2 Tage bei 28°C inkubieren.

2.2.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

- 10 ml YEB/Rif⁺/Gent⁺/Kan⁺-Medium mit vereinzelter Agrobakterienkolonie animpfen und 24 h bei 28°C inkubieren
- 250 ml YEB/Rif⁺/Gent⁺/Kan⁺-Medium mit 2,5 ml Vorkultur animpfen und mit dem Rest der Kultur Glycerinkultur anlegen und Plasmid-Präparation durchführen (s.u.)
- Die Kultur ca. 30 h bei 28° im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von >2 wachsen lassen
- 15 min bei RT und 5000 rpm zentrifugieren
- Pellet in insgesamt 1l Infiltrationsmedium aufnehmen bis OD₆₀₀ etwa 0,8 beträgt
- Drei 250 ml Messbecher in einem Exsikkator platzieren, mit Agrobakterinsuspension befüllen und die zu transformierenden Pflanzen (je Becher 1 Topf mit ca. 8 Pflanzen) kopfüber mit den Infloreszenzen eintauchen
- Für zweimal 4 min Vakuum anlegen, dazwischen abrupt belüften
- Nach der Infiltration die Pflanzen bis zur Samenreife kultivieren
- Die Samen ernten, auf mit H₂O befeuchtetem Filterpapier auslegen (in Petrischalen) und bei 4°C für 4 Tage lagern (Vernalisation)
- Auf Erde aussäen und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus keimen lassen
- Zur Selektion die jungen Pflanzen mit dem Herbizid BASTA (200 g/l Glufosinateammonium, Hoechst (Hattersheim)) besprühen, sobald die Primärblätter der Keimlinge entwickelt sind
- Transgene Pflanzen sind BASTA resistent, so dass nach 3 Tagen nur die transformierten Pflanzen weiterwachsen, während alle anderen absterben.

2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Minipräparationen wurden nach der von Holmes und Quigley (1981) beschriebenen TELT-Methode durchgeführt. Größere DNA-Mengen oder DNA-Proben für die Sequenzierung und *in-situ* Hybridisierung wurden mit Kits (Plasmid Mini, Midi, Maxi) der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller isoliert.

2.2.6 Präparation von BAC-DNA

Stabile BAC-DNA wurde nach Sinnott et al. (1998) hergestellt.

2.2.7 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Genomische DNA wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll von Doyle & Doyle (1987) aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen isoliert. Bis zu 30 g Blattmaterial lassen sich mit dieser Methode aufarbeiten.

- 5 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver mörsern, in 50 ml Falcon mit 3 Teflonkugeln vortexen
- Blattmaterial mit 25 ml Extraktionspuffer und 25 µl β-Mercaptoethanol versetzen
- Bei 60°C für 30 min im Wasserbad schütteln

- Inkubierte Probe durch Miracloth jeweils in 2 x 50ml Falcons filtrieren und Filter gut ausdrücken
- Filtrat mit gleicher Menge Chloroform mischen
- 10 min bei RT und 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neue Falcons transferieren, 0,8 V Isopropanol zugeben und 5 min bei RT inkubieren
- 15 min bei RT und 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet 10 min trocknen lassen und in 500 µl TE/RNase (20µl/ml) aufnehmen
- Für die folgende Phenol/Chloroformextraktion *Heavy Phase Lock* Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (Hamburg) verwenden
- Einmal mit 1 V Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) und einmal mit einem Volumen Chloroform/IAA (24:1) extrahieren
- DNA direkt nach Zugabe von 1/10 V 3 M NaAc und 2,5 V EtOH fällen
- 10 min bei RT und 13.000 rpm bzw. wenn 15 ml Falcons verwendet werden 20 min bei 4000 rpm
- Pellet mit 600 µl 70% EtOH waschen, trocknen und in 500 µl TE resuspendieren.

Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromide)

2.2.8 Restriktionsverdau von genomischer DNA

Es werden 200 µl (0,1 µg/µl) genomische DNA mit 1µl 1M Spermidin (Endkonzentration 2,5 mM) und 50 U Enzym in einem Endvolumen von 400 µl bei geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen (laut Herstellerangaben) für 6 bis 16 Stunden inkubiert. Anschließend noch 2-mal die gleiche Menge an Enzym zugegeben und jeweils erneut für 6 bis 16 Stunden inkubiert. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel werden die Proben mit 1/10V 3M NaAc und 3V EtOH gefällt und in einem angemessenen Volumen H₂O resuspendiert.

2.2.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* Infloreszenzen wurden mit Hilfe des *TRIzol*[®] *Reagent* von Life Technologies (Karlsruhe) nach Herstellerangaben isoliert. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser pro 100 mg Gewebe resuspendiert, so dass die RNA Konzentration der Präparation in etwa 1 µg/µl beträgt.

Für ein *Northern*-Gel werden 30 µg Gesamt-RNA gefällt, in 7 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mit 15 µl deionisiertem Formamid, 5,25 µl 37% Formaldehyd und 3 µl 10x MEN versetzt. Vor dem Auftragen werden die Proben für 3 min bei 62°C denaturiert und mit 2 µl EtBr (2µg/µl) versetzt.

10x MEN: 0,2 M Na-MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Plasmid-DNA erfolgt in 0,8 - 1% TAE-Agarosegelen/EtBr (0,5µg/µl) bei einer Feldstärke von ca. 10V/cm.

Für die Auftrennung genomischer DNA (*Southern-Gele*) wird 1x TBE *long run buffer* verwendet, die genomischen DNA-Fragmente werden über Nacht (ca. 16 h) in einem 0,9% TBE-Agarosegel mit einer Feldstärke von ca. 1,5V/cm aufgetrennt und anschließend in TBE/EtBr (0,5 µg/µl) für 30 min angefärbt.

Für die Auftrennung von RNA werden 1,2% denaturierende Agarosegele verwendet, die 1,85% Formaldehyd und 1x MEN-Puffer enthalten. Die Elektrophorese findet über Nacht bei 1,5V/cm in MEN-Puffer statt.

Als Größenmarker wurden die 1kb plus DNA-Leiter sowie die 0,24 – 9,49 kb RNA-Leiter von *Life Technologies* (Karlsruhe) verwendet.

In Agarosegelen aufgetrennte DNA- bzw. RNA-Fragmente wurden mit einem UV-Transiluminator ($\lambda=312$ nm) sichtbar gemacht, über Videokamera und das *Bioprint DS-System* (*Froebel Labor-Technik*, Software *Amibios* von *American Megatrends*) fotografiert und das Bild über einen *Mitsubishi Video Copy Processor*-Thermodrucker ausgegeben.

2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden das *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) sowie das *CONCERT Rapid Gel Extraction Kit* von Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde auf dem *PE/Applied Biosystems 377 Sequenzer* mit den unter 2.1.3.1 aufgeführten Primern und dem DNA-Sequenzierungskit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* der Firma Perking Elmer Applied Biosystems nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden durch radioaktives [α^{32} P] dCTP erfolgt mit Hilfe des *Ladderman™ Labeling Kits* der Firma TaKaRa (Japan). Die markierten DNA-Fragmente werden über *Micro Spin Columns S-200 HR* (Amersham Pharmacia Biotech) von den ungebundenen radioaktiven Nukleotiden getrennt und vor der Zugabe zum Hybridisierungspuffer (s. 2.2.14.2) für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.14 Southern-Blot

2.2.14.1 Transfer von DNA auf Membranfilter

Das 0,9%ige TBE-Gel mit den aufgetrennten genomischen DNA-Fragmenten wird zunächst zur Denaturierung für 30 min in 3M NaCl/0,4M NaOH und anschließend 15 min in Transferpuffer vorsichtig geschwenkt. Der Transfer erfolgt in Transferpuffer auf S&S *Nytran Supercharge* (Schleicher & Schüll, Dassel) nach Herstellerangaben über Nacht. Anschließend wird die Membran für 3 min in 0,2M Na-Phosphatpuffer, pH 6,8 neutralisiert und die DNA auf dem noch feuchten Filter mit einem *UV-Crosslinker* (Stratagene) auf der Membran fixiert.

Transferpuffer: 3M NaCl, 8mM NaOH

2.2.14.2 Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an filtergebundene DNA

Die Prähybridisierung erfolgt in Prähybridisierungspuffer in einem entsprechenden Gefäß liegend im Wasserbad für 3 h bei 68°C. Die Hybridisierung erfolgt in Hybridisierungspuffer in einem *Hybritube* (Life Technologies) über Nacht. Anschließend werden die Filter einmal für 20 min in 2xSSC/0,1% SDS und für weitere 20 min in 0,5xSSC/0,1% SDS bei 68°C gewaschen, in Folie verpackt und nach dem Auflegen des Films bei -70°C für die Autoradiographie exponiert

Prähybridisierungspuffer: 6x SSC, 4x Denhardt's, 0,4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/ml CT-DNA

Hybridisierungspuffer: 6x SSPE, 1x Denhardt's, 4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/ml CT-DNA

2.2.15 Northern-Blot

2.2.15.1 Transfer von RNA auf Membranfilter

Das denaturierende Agarosegel wird zunächst kurz in ddH₂O gewaschen. Die aufgetrennte RNA wird dann über Nacht in 20x SSC auf Hybond N+ Membran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Die RNA wird auf dem noch feuchten Filter mit einem *UV-Crosslinker* (Stratagene) auf der Membran fixiert.

2.2.15.2 Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an filtergebundene RNA

Die Prähybridisierung erfolgt für 3 h in Hybridisierungspuffer in einem entsprechenden Gefäß liegend bei 65°C (Gesamt-RNA) bzw. 45°C (mRNA). Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in frischem Hybridisierungspuffer. Anschließend werden die Filter einmal für 15 min in 2xSSC/1% SDS und für weitere 15 min in 0,5xSSC/1% SDS bei 65°C

gewaschen, in Folie verpackt und nach dem Auflegen des Films bei -70°C für die Autoradiographie exponiert.

Mit einer Methylenblaufärbung (Filter 10 min in 5% Essigsäure inkubieren, dann 10 min in 0,4% Methylenblau/0,5M NaAc färben, mit ddH₂O entfärben; Herrin und Schmidt, 1988) kann man die RNA auf der Membran nachweisen.

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 6x SSPE, 4x Denhards-Lösung, 0,4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/µl CT-DNA, 100 µg/µl t-RNA

2.2.16 Reverse Transkriptase Reaktion

Die Reverse Transkriptase Reaktion zur Herstellung von cDNA wurde mit der *SUPERSCRIPT™ II, RNase H⁻ Reverse Transcriptase* von Life Technologies (Karlsruhe) mit Oligo(dt)₁₇ Primern nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Reaktion wurden etwa 500 ng mRNA bzw. 4 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.2.17 PCR-Amplifikation

Um das offene Leseraster von *KNAT1* bzw. *KNAT2* zu amplifizieren, wurden 2 µl der cDNA in einer PCR mit den Primern knat1U und knat1L bzw. knat2U und knat2L eingesetzt. Zur Amplifikation der *STM* Deletionsfragmente wurden 50 ng des Vektors pRSTM4 und die entsprechenden unter 2.1.3.1 angegebenen Primer verwendet. Für die Amplifikation von Fragmenten aus genomischer DNA wurden etwa 2 µg eingesetzt. Zur Kontrolle wurde ein *STM*-Fragment und die *gapC* cDNA von den gleichen cDNA *Pools* unter den gleichen Bedingungen amplifiziert. Alle Reaktionen wurden jeweils in 50 µl Gesamtvolumen mit 2.5U *Pfx*-Polymerase (Life Technologies) angesetzt und folgendes Programm durchgeführt:

0	Denaturierung:	45 Sekunden bei 95°C
1	Denaturierung:	45 Sekunden bei 95°C
2	Annealing:	45 Sekunden bei der errechneten Temperatur (Mülhardt 2000)
3	Elongation:	1 Minute / kb Länge PCR-Fragment bei 72°C
4	Schritt 1 bis 3 wiederholen 29-mal	
5	Elongation	10 Minuten bei 72°C
6	Pause	4°C

Für Abbildung 18 wurden anschließend 10 µl des PCR-Reaktionsansatzes auf ein EtBr gefärbtes Agarosegel aufgetragen.

2.2.18 Nicht-radioaktive RNA *in-situ* Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde leicht modifiziert nach Coen et al. (1990) und Jackson (1991) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Fixierung des frischen Gewebes, dessen Einbettung in Paraffin, die Herstellung der Schnitte, die Herstellung der Sonde, sowie die Detektion der Transkripte von Interesse mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde und einem Anti-Digoxigenin AP-gekoppelten Antikörper.

2.2.18.1 Gewebefixierung und Einbettung

Herstellung des Fixativs

- 100 ml PBS-Puffer werden mit NaOH auf pH 11 eingestellt und in der Mikrowelle auf etwa 70°C erhitzt
- 4 g Paraformaldehyd zugeben und kräftig schütteln bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst ist
- Auf Eis stellen
- pH 7 mit konzentrierter H₂SO₄ einstellen
- 30 µl Tween 20 zugeben

Fixierung des Gewebes

Für die Präparation von *Arabidopsis* Infloreszenzen werden diese 5 mm unterhalb der Sprossspitze abgeschnitten und Keimlinge am Hypokotyl. Bis zu 20 Infloreszenzen oder Keimlinge werden in ein 20 ml Glasgefäß mit Fixativ eingelegt und für 3 x 10 min in einem Vakuum-Exsikkator infiltriert. Danach werden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Proben werden nun dehydriert, gefärbt und schließlich in Paraffin (Paraplast Plus[®], Sigma, Deisenhofen) überführt. Die Temperatur der Proben sollte 60°C niemals überschreiten.

- Austauschen des Fixativs durch eiskalten 50% EtOH, 90 min auf Eis
- Überführen in eiskalten 70% EtOH, 90 min auf Eis
- In 85% EtOH für 90 min bei 4°C
- In 95% EtOH mit 0,1% Eosin Y für 90 min bei 4°C
- In 100% EtOH mit 0,1% Eosin Y über Nacht bei 4°C
- In frischem 100% EtOH mit 0,1% Eosin Y für 90 min bei 4°C
- In 100% EtOH für 60 min bei RT
- In 50% EtOH/50% Rotihistol für 60 min bei RT
- In 100% Rotihistol für 60 min bei RT
- Rotihistol Schritt noch zweimal wiederholen
- Entnehmen des Rotihistols und Auffüllen des Glasgefäßes mit 50% (v/v) frischem Rotihistol und 50% (v/v) Paraplast Plus[®], Inkubation bei 50°C über Nacht
- Austauschen des Rotihistol/Paraffingemisches durch frisch geschmolzenes Paraplast Plus[®], Inkubation bei 60°C für 8 h
- Austauschen gegen frisches Paraplast Plus[®], Inkubation über Nacht bei 60°C
- In den nächsten 2 Tagen jeweils morgens und abends durch frisches Paraplast Plus[®] ersetzen

2.2.18.2 Herstellung der Gewebeblöcke

Die Gewebeblöcke werden in Wägeschalen gegossen. Hierzu wird diese auf einen 60°C warmen Heizblock gestellt und mit etwas geschmolzenem Paraplast Plus[®] gefüllt. Darauf wird das Glasgefäß mit den Proben entleert und die Gewebeproben mit einer zuvor erhitzten Pinzette orientiert. Zur Aushärtung wird die Wägeschale in ein kühles Wasserbad gelegt. Die eingebetteten Proben können bei 4°C gelagert werden.

2.2.18.3 Herstellung der Mikrotomschnitte

Die in den Wägeschalen eingebetteten Gewebeproben werden zunächst zu kleinen Blöcken von ca. 1,5 cm Seitenlänge zurechtgeschnitten, das Paraffin auf der Rückseite der Gewebelöcke mit einem in einer Bunsenbrennerflamme erhitzten Spatel geschmolzen und die Blöcke jeweils auf einem Holzblöckchen fixiert. Nach 20 min werden die einzelnen Gewebelöcke auf ein rechteckiges Format geschnitten, wobei seitlich des eigentlichen Gewebes eine 1–2 mm breite Paraffinschicht erhalten bleibt. Die Gewebelöcke werden mit der längeren Seite parallel zum Messer im Mikrotom eingespannt. Es werden Schnittbänder mit einer Schnittbreite von 7 µm hergestellt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf beschichtete Objektträger (Superfrost-Plus™, Roth) platziert werden. Die Schnittbänder werden mit sterilem H₂O überschichtet und auf eine 42°C warme Heizplatte gelegt, bis sich die Schnittbänder vollends gestreckt haben; verbleibendes H₂O kann mit feinem Saugpapier abgezogen werden. Die Schnitte bleiben über Nacht auf der 42°C warmen Heizplatte liegen und können dann bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert werden.

2.2.18.4 Präparation der antisense RNA Sonde

Die DNA-Fragmente wurden in den Transkriptionsvektor pBluescript kloniert, das Plasmid durch geeignete Restriktionsendonukleasen linearisiert und über Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung gereinigt. Das linearisierte Plasmid wird in ddH₂O ad 0,5 µg/µl resuspendiert.

In-vitro Transkription

- Die Reaktion wird bei RT angesetzt und für 60 bis 120 min bei 37°C inkubiert.
- Die Wahl der RNA-Polymerase (T3, T7 oder SP6) hängt von der Orientierung der zu transkriptierenden DNA im Vektor ab.

Reaktionsansatz:

8,5 µl H₂O
2,5 µl 10 x Transkriptionspuffer
1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
2,5 µl 5 mM ATP
2,5 µl 5 mM CTP
2,5 µl 5 mM GTP
2,5 µl 1mM DIG-UTP
2 µl linearisierte Matrize (= 1 µg)
1 µl RNA-Polymerase (20 U/ml)

- Die Reaktion wird durch Zugabe von 75 µl TMS Puffer, 2 µl tRNA (100mg/ml) sowie 1 µl DNase (RNase-frei) und Inkubation für 10 min bei 37°C abgestoppt.
- Zur Fällung der RNA werden 100 µl 3,8 M NH₄Ac und 600 µl EtOH zugegeben und die Reaktion für 1 h bei -20°C inkubiert.
- Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm
- Waschen des Pellets mit eiskaltem 70% EtOH/0,15 M NaCl
- Zentrifugation für 5 min bei 14 000 rpm
- Resuspension des Pellets in 50 µl H₂O

Hydrolyse

Die optimale Länge von RNA-Sonde für die *in-situ* Hybridisierung auf Pflanzengewebe beträgt 150 bp. Die *in-vitro* synthetisierten RNA-Sonden können unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert werden, um ein Gemisch von RNA-Sonden zu erzielen, deren durchschnittliche Länge in etwa 150 bp beträgt. Die Hydrolysedauer wird mit folgender Formel berechnet.

$$t = \frac{L_i - L_f}{K \times L_i \times L_f}$$

t = Zeit (min), K = Ratenkonstante (0,11 kb/min), L_i = initiale Länge (kb), L_f = endgültige Länge (kb)

- 50 µl RNA-Probe mit 50 µl 200 mM Carbonat-Puffer pH 10,2 versetzen
- Inkubation bei 60°C im Wasserbad für die kalkulierte Zeit
- Auf Eis stellen
- + 10 µl 10% HAc
- + 12 µl 3 M NaAc, vorsichtig mischen, Gasbläschen treten auf
- + 312 µl EtOH
- 60 min bei -20°C und Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm
- Waschen des Pellets mit eiskaltem 70% EtOH/0,15 M NaCl
- Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm
- Resuspension des Pellets in 50 µl H₂O
- Lagerung bei -20°C

Kontrolle der Sonde mit dem Anti-DIG-Antikörper

- Auftragen von 1 µl Probe auf ein kleines Stück Nitrozellulosemembran
- Fixierung durch *UV cross linking* der RNA mit der Membran
- 1 min waschen in Puffer 1
- Inkubation für 30 min in Puffer 2
- 1 min waschen in Puffer 1
- Inkubation für 30 min in Puffer 1 versetzt mit 1 µl Anti-DIG-Antikörper (Roche)
- 2x für jeweils 15 min waschen in Puffer 1
- 1 min waschen in Puffer 5
- Entwicklung der Membran in 5 ml Puffer 5 mit 5 µl NBT und 5 µl X-P für 10 min
- Abstoppen der Reaktion durch Waschen des Filters in Wasser
- An der Stelle des Probenauftrags wird ein dunkelblauer Punkt sichtbar

2.2.18.5 Hybridisierungsreaktion

Reinigung der Deckgläser

Die Deckgläser (24 x 50 mm) werden für 15 min in Aceton gewaschen, anschließend getrocknet, in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 180°C für 2 h gebacken.

Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die Objektträger mit den gewünschten Schnitten werden in einen Träger gestellt und nacheinander für die angegebene Zeit in folgenden Lösungen inkubiert:

10 min	100% Rotihistol
10 min	100% Rotihistol
1 min	100% EtOH
1 min	100% EtOH
1 min	95% EtOH
1 min	85% EtOH
1 min	50% EtOH
1 min	30% EtOH
1 min	ddH ₂ O
10 min	0,2 M HCl
5 min	ddH ₂ O
2 min	PBS
10 min	Pronase (0,125 mg/ml Pronase-Puffer)
2 min	Glycin (0,2% in PBS)
2 min	PBS
10 min	Formaldehyd (4% in PBS)
2 min	PBS
2 min	PBS
10 min	Essigsäureanhydrid (1 ml in 100 ml 0,1 M Triethanolamin pH 8)
2 min	PBS

Die Gewebeschnitte werden nun in einer aufsteigenden Ethanolreihe bis zum zweiten 100% EtOH dehydriert, dann nochmals in 100% EtOH gewaschen. Während der Vorbereitung des Hybridisierungspuffers können sie in einer Box mit wenig 100% EtOH im Kühlschrank gelagert werden.

Hybridisierung

In der Regel werden 2 µl der hydrolysierten DIG markierten RNA-Sonde pro Objektträger eingesetzt. Die Menge kann jedoch je nach der zu erwartenden Intensität des Signals variiert werden. Es werden 80 µl Hybridisierungsgemisch pro Objektträger eingesetzt.

Probengemisch:

- 2 µl hydrolysierte RNA-Sonde
- ad 8 µl H₂O
- + 8 µl deionisiertes Formamid
- mischen,
- Inkubation im Wasserbad bei 80°C für 2 min,
- sofort auf Eis stellen

Hybridisierungspuffer:

- für 24 Objektträger
- 200 µl 10x Salzlösung
 - + 800 µl deionisiertes Formamid
 - + 400 µl 50% Dextransulfat
 - + 20 µl 100 mg/ml tRNA
 - + 40 µl 50x Denhardt's
 - + 140 µl H₂O

16 µl Probengemisch mit 64 µl Hybridisierungspuffer versetzen und auf den Gewebeschnitt auftragen. Das Deckglas wird unter Vermeidung von Luftbläschen aufgelegt. Die Hybridisierungsreaktion findet in einer mit in 2x SSC/50% Formamidlösung getränkten Papiertüchern ausgelegten Box über Nacht bei 50°C in einem Ofen statt.

2.2.18.6 Waschen der Schnitte

- Waschen in Waschpuffer und Inkubation bei 50°C für 15 min, dabei fallen die Deckgläser von den Objektträgern
- Waschen in Waschpuffer und Inkubation bei 50°C zweimal für 60 min
- Waschen in NTE bei 37°C zweimal für je 5 min
- Inkubation in NTE + 20 µg/ml RNase A bei 37°C für 30 min
- Waschen in NTE bei RT zweimal für je 5 min
- Waschen in Waschpuffer bei 50°C für 60 min
- Waschen in PBS bei RT für 5 min

2.2.18.7 Detektion

Die hybridisierte Proben-DNA wird mit einem Anti-DIG-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen. Die folgenden Reaktionen finden in kleinen Schalen auf einem Schüttler statt. Die Schalen sollten nach jedem Schritt gewechselt und gespült werden. Alle Inkubationen finden bei RT statt. Der Puffer sollte die Objektträger während des Schüttelns gleichmäßig bedecken.

5 min Puffer 1
 60 min Puffer 2
 60 min Puffer 3
 60 min Puffer 4
 4mal 20 min Puffer 1 mit 0,3% Triton X 100
 5 min Puffer1
 5 min Puffer 5
 bis 3 Tage Puffer 6 im Dunkeln

Puffer 6 beinhaltet die Substrate für die alkalische-Phosphatase Reaktion. Die Inkubation findet in durchsichtigen Plastikschaalen statt, so dass die Reaktion leicht unter dem Binokular verfolgt werden kann. Inkubationszeiten länger als drei Tage führen zu einer Verstärkung des Hintergrunds.

2.2.18.8 Abstoppen der Reaktion und Schlussbehandlung der Gewebeschnitte

- Kurz in H₂O waschen
- Waschen in H₂O für 5 min
- Waschen in 70% EtOH für 5 min
- Waschen in 95% EtOH für 5 min

Anschließend die Gewebeschnitte mit 2-3 Tropfen Entellan (Merck Eurolab) bedecken und mit einem Deckglas versiegeln.

2.2.18.9 Puffer und Stammlösungen

<u>10x PBS:</u>	1,3 M NaCl, 0,07 M Na ₂ HPO ₄ , 0,03 M NaH ₂ PO ₄
<u>2x Carbonate-Puffer:</u>	80 mM NaHCO ₃ , 120 mM Na ₂ CO ₃ , pH 10,2
<u>TMS Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl
<u>10x Pronase-Puffer:</u>	0,5 M Tris-Cl, pH 7,5, 0,05 M EDTA
<u>Pronase:</u>	Herstellung einer Stammlösung mit 40 mg/ml in H ₂ O. Vorverdau des Enzyms zur Aktivierung durch Inkubation für 4 h bei 37°C
<u>Triethanolamin:</u>	Herstellung einer 2 M Lösung in ddH ₂ O, mit HCl auf pH 8 einstellen
<u>10x Salz:</u>	3 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 M NaPO ₄ - Puffer, 50 mM EDTA
<u>Formamid:</u>	Deionisierung durch Verwendung eines Kationen- Anionenaustauschers
<u>Waschpuffer:</u>	2x SSC, 50% Formamid
<u>10x NTE:</u>	5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA
<u>RNase A:</u>	Stammlösung mit 10 mg/ml in H ₂ O
<u>10x Puffer 1:</u>	1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl
<u>Puffer 2:</u>	1x Puffer 1, 0,5% Blocking reagent (Roche)
<u>Puffer 3:</u>	1x Puffer 1, 1% BSA, 0,3% Triton X-100
<u>Puffer 4:</u>	Puffer 3 mit Anti-DIG Antikörper-AP (Roche, 1:3000)
<u>Puffer 5:</u>	100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂
<u>Puffer 6:</u>	Puffer 5 mit 7,5% Polyvinylalkohol; Lösen des Polyvinylalkohols durch Aufkochen auf einem Heizrührer. Nach Abkühlen 1,5 µl NBT und 1,5 µl BCIP pro ml zugeben.
<u>NBT:</u>	100 mg/ml Nitrobluetetrazolium Salz in 70% Dimethylformamid, Roche
<u>BCIP:</u>	50 mg/ml 5-Bromo-4chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid, Roche

2.2.19 Mikroskopie und Fotografie

Die Gewebeschnitte wurden nach der *in-situ* Hybridisierung unter dem *Axioskop* von Zeiss analysiert. Die Bilder wurden über die AxioCam und der Software AxioVision auf dem Computer betrachtet. *Arabidopsis* Keimlinge wurden unter einem Binokular von Zeiss betrachtet und mit einer Olympus OM-4 bzw. OM-2 oder der Digitalkamera Nikon Coolpix 995 fotografiert.

2.2.20 Computeranalysen

Die Analysen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden unter Benutzung des UWGCG-Programmpakets Version 7.0 (University of Wisconsin Genetics Computer Group) durchgeführt. Zur Verarbeitung und Analyse von DNA- bzw. Proteinsequenzen wurden die Programme *Gene Construction Kit*, *Oligo4*, Programme des *Lasergene* Software Pakets und *DNASTAR* verwendet. Die in dieser Arbeit vorhandenen Abbildungen wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop* Version 5.5/6 erstellt.

3 ERGEBNISSE

Um die Einsatzfähigkeit des *Chimeric Repressor Interference System (CHRIS)* in Pflanzen zu testen, wurde der Transkriptionsfaktor *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* gewählt und als chimäres 35S::*en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt in *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Die Auswertung der erhaltenen Primärtransformanten hat gezeigt, dass die *En*²⁹⁸ Domäne auch in Pflanzen funktionell zu sein scheint.

Im ersten Abschnitt meiner Arbeit (Kapitel 3.1) wurden Experimente durchgeführt, um mehr Informationen über den Mechanismus von *CHRIS* zu erhalten. Im zweiten Teil (Kapitel 3.2) wurden die Transkriptionsfaktoren *KNAT1* und *KNAT2*, für die zu Beginn meiner Arbeit keine Funktionsverlust Mutanten bekannt waren, mit Hilfe von *CHRIS* analysiert.

3.1 Untersuchungen zum Mechanismus von *CHRIS*

Um den Mechanismus von *CHRIS* eingehender zu untersuchen, wurden eine Reihe *STM*-Deletionskonstrukte sowie einzelne Domänen mit und ohne die *En*²⁹⁸ Domäne in *Arabidopsis* Pflanzen unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert. Darüber hinaus wurde in einige dieser Konstrukte Leserasterverschiebungen eingefügt und ebenfalls in *Arabidopsis* exprimiert. Die erhaltenen Primärtransformanten wurden analysiert.

3.1.1 Das 35S::*en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt

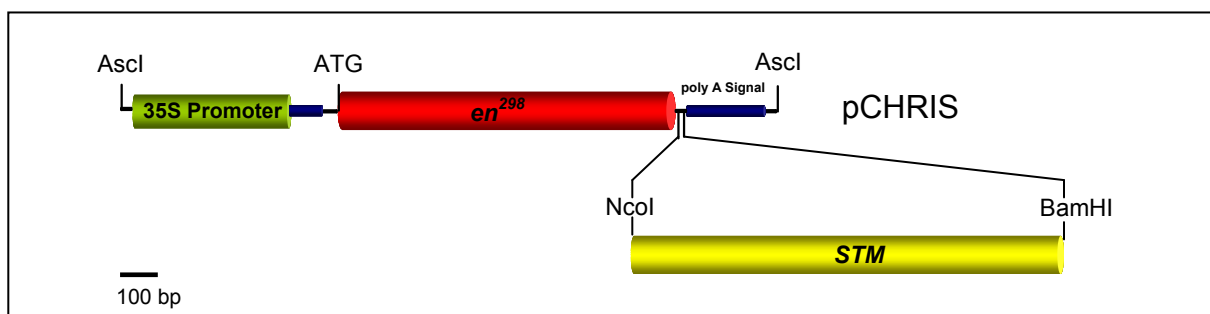


Abb. 1: Schematische Darstellung des 35S::*en*²⁹⁸-*STM* Konstruktes.

Das offene Leseraster von *STM* wurde mit den unter 2.1.3.1 angegebenen Primern mittels PCR aus dem Konstrukt pRSTM4, das die *STM* cDNA enthält amplifiziert und mit Hilfe der angefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NcoI* (enthält das native Startcodon) und *BamHI* direktional in pCHRIS (s. 2.1.3.2) kloniert. Das offene Leseraster von *STM* befindet sich dadurch im Leseraster von *en*²⁹⁸ und dies ermöglicht die korrekte Translation des chimären *En*²⁹⁸-*STM* Proteins. Die in der Abbildung 1 dargestellte Expressionskassette wurde dann über die flankierenden Schnittstellen für *Ascl* in den binären Vektor pGPTV-Bar *Ascl* (s. 2.1.3.2.) kloniert.

3.1.2 Beschreibung und Klassifizierung der Phänotypen der transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden mit dem pGPTV-*en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt transformiert und die BASTA resistenten Primärtransformanten 19 – 21 Tage nach der Aussaat analysiert (s. 2.2.4). Wildtypische *Arabidopsis* Keimlinge weisen unter den gewählten Bedingungen (s. 2.1.6) zu diesem Zeitpunkt neben den zwei Kotyledonen im Durchschnitt 7 Blätter auf und das Sprossapikalmeristem ist verdeckt durch weitere angelegte Blätter. Transgene *Arabidopsis* Keimlinge (77, s. Abb. 5), die als Kontrolle ein 35S::*en*²⁹⁸ Konstrukt trugen, hatten zu diesem Zeitpunkt 4 bis 7, im Durchschnitt 5 Blätter. Auch hier war das Meristem verdeckt durch weitere Blattprimordien (Abb. 2 A, B). Die *En*²⁹⁸ Domäne allein führt also zu keiner phänotypischen Veränderung der transgenen Pflanzen, sie sehen wildtypisch aus. Die Entwicklung wird lediglich kurzfristig durch die Behandlung mit BASTA verlangsamt. Dagegen zeigten 74,3% der *Arabidopsis* Keimlinge, die das 35S::*en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt trugen, eine Kopie des *stm* Funktionsverlust Phänotyps (s. Abb. 5). Das heißt, die Expression der trans-dominanten Genfunktion *en*²⁹⁸-*STM* interferiert mit der endogenen *STM* Funktion.

Die Entwicklungsstörungen besonderes stark betroffener transgener *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen (33,9%, 125/369, Abb. 5) zeigte sich nach der Ausbildung der beiden Primärblätter (Abb. 2 C, D). Es wurden keine weiteren Blattprimordien angelegt und ein sichtbares Sprossapikalmeristem (SAM) fehlt (Abb. 2 D, Pfeil). Bei anderen *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen trat dieser Entwicklungsblock erst nach der Bildung von 3 (Abb. 2 E, F) bis maximal 6 Blättern auf (40,4%, 149/369, s. Abb. 5). Auch bei diesen Pflanzen fehlt ein sichtbares SAM (Abb. 2 F).

Bei 24,1% der transgenen *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen (89/369) waren im Vergleich mit der wildtypischen Situation nach langer zeitlicher Verzögerung unter dem Binokular einzelne sehr kleine Blattprimordien zu erkennen, die allerdings in der Regel nicht vollständig ausgewachsen sind (Abb. 2 G, H). Zu einem relativ frühen Zeitpunkt wurden in *en*²⁹⁸-*STM* Keimlingen ein oder mehrere sekundäre Meristeme aktiviert (Abb. 2 I, J), die im folgenden Blattprimordien gebildet haben (Abb. 2 J, Pfeil). Darüber hinaus waren weitere Veränderungen zu beobachten, wie Blätter mit fusionierten Blattstielen (Abb. 2 K) und Kotyledonen in veränderter Position (Abb. 2 C).

Die mit dem kompletten *STM* Leseraster als *en*²⁹⁸ Fusion beobachteten Phänotypen dienten als Standard für die im Folgenden durchgeführten Experimente. Um die Phänotypen vergleichen zu können, wurden sie in unterschiedliche Klassen gruppiert, die in Tabelle 1 (S. 30) zusammengefasst sind.

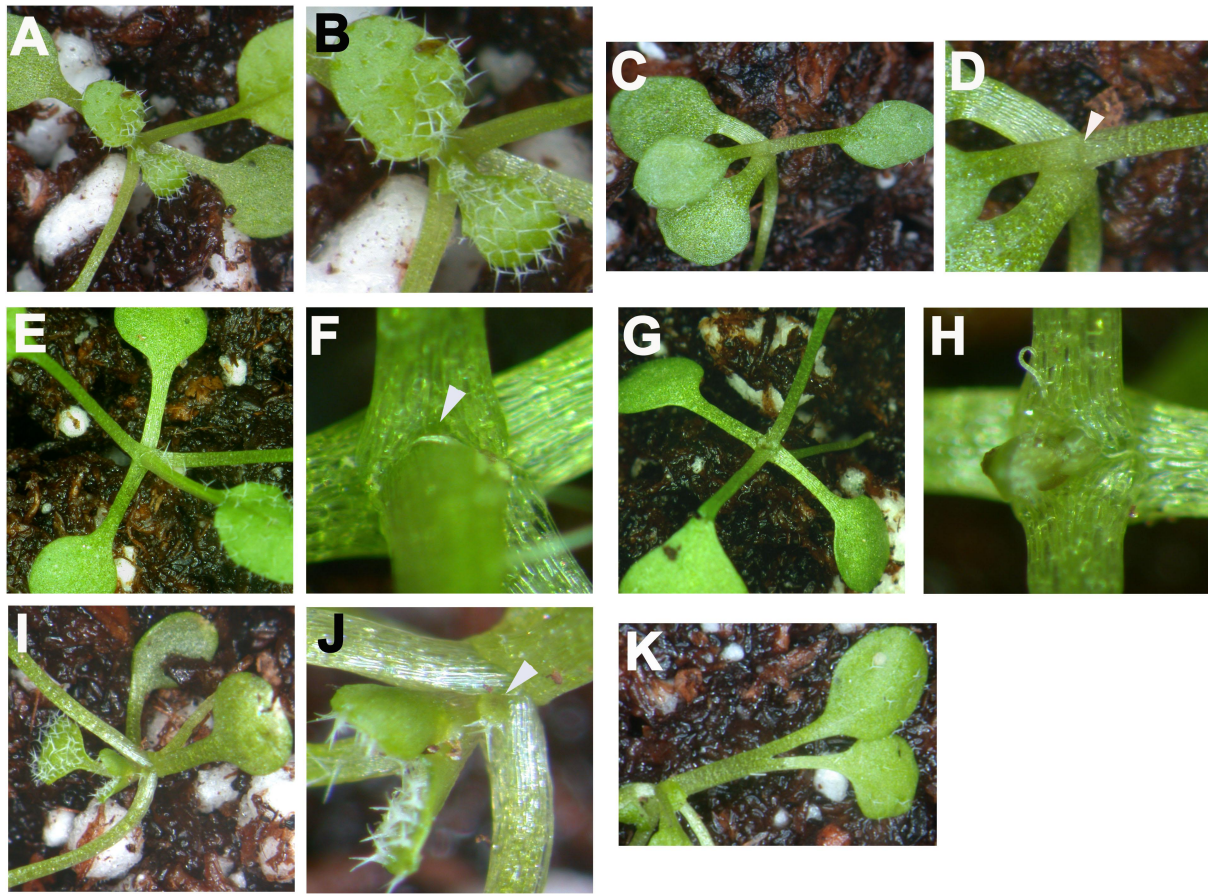


Abb. 2: Phänotyp der transgenen 35S::en²⁹⁸-STM *Arabidopsis thaliana* Keimlinge verglichen mit 35S::en²⁹⁸ Keimlingen, Ökotyp Columbia-0 (Col-0). (A) 35S::en²⁹⁸ *Arabidopsis* Keimling Col-0 mit 6 Blättern, das SAM ist durch weitere angelegte Blätter verdeckt (B, Detailansicht), (C) – (K) en²⁹⁸-STM Keimlinge, (C) Keimling mit 2 Primärblättern, veränderte Stellung der Kotyledonen, kein sichtbares SAM (D, Pfeil), (E) Keimling mit 3 Blättern, kein sichtbares SAM (F, Pfeil), (G) und (H) Keimling mit 2 Primärblättern und 2 sehr kleinen Blattprimordien, (I) Keimling mit 5 Blättern, Blatt 4 und 5 sehr klein, gleich groß und an der Basis fusioniert, kein sichtbares SAM, in Achselmeristem Blattprimordium zu erkennen (J, Pfeil), (K) fusionierte Blattstiele. SAM: Sprossapikalmeristem, Analyse 19 Tage nach der Aussaat.

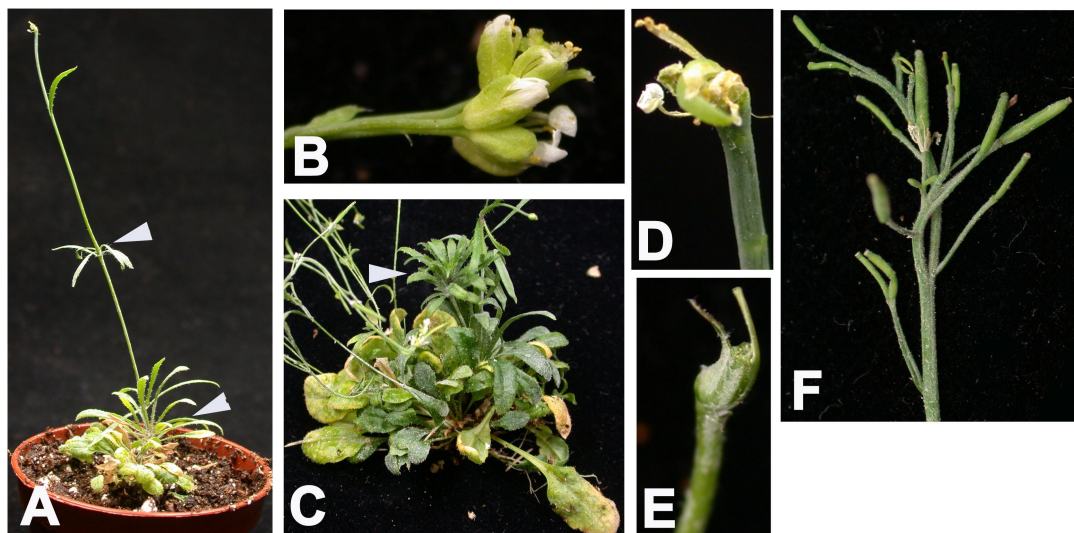


Abb. 3: Phänotyp der transgenen 35S::en²⁹⁸-STM *Arabidopsis thaliana* Pflanzen im Infloreszenzstadium. (A) Infloreszenz bildet sich aus Achselmeristem, Luftrosetten aus Hochblättern (Pfeile), (B) fusionierter Blütenstand, (C) „buschiger“ Phänotyp mit Luftrosetten (Pfeil) (D) und (E) endständige Blüten, (D) deformiert, (E) fehlende Blütenorgane, (F) fasziierter Spross.

Phänotyp	Beschreibung
1	kein sichtbares SAM, Entwicklungsblock nach 2 Primärblättern (Abb. 2 C, D)
2	kein sichtbares SAM, Block nach 3 – 4 Blättern bzw. Blattprimordien (Abb. 2 E, F)
3	kein sichtbares SAM, Block nach mehr als 4 Blättern bzw. Blattprimordien (Abb. 2 I)
WT	SAM durch Blattprimordien verdeckt, kein Entwicklungsblock (Abb. 2 A, B)

Tabelle 1: Klassifizierung der *en*²⁹⁸-*STM* Phänotypen. Analyse der Pflanzen 19 – 21 Tage nach der Aussaat. SAM: Sprossapikalmeristem.

Ältere *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen zeigten häufig einen buschigen Phänotyp (Abb. 3 C) aufgrund einer stark erhöhten Anzahl von Rosettenblättern, die kontinuierlich von aktivierten Achselmeristemen gebildet wurden. Bei etwa 41% der Pflanzen (105/255) kam es nicht zur Ausbildung einer Infloreszenz. Entwickelten sich Infloreszenzen ausgehend von sekundären Meristemen, wiesen diese jedoch Störungen im internodalen Wachstum auf. Dies zeigte sich in der Bildung so genannter „Luftrosetten“, bei 29,1% der untersuchten *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen (74/255). Die Infloreszenz streckt sich, stoppt das Wachstum und gliedert eine Reihe von Hochblättern ab (Abb. 3 A, C). In einigen Fällen verbleibt sie in diesem Zustand (Abb. 3 C, Pfeil), bei anderen Infloreszenzen setzt das internodale Wachstum wieder ein (Abb. 3 A). Wenn diese Infloreszenzen Blütenstände ausgebildet haben, waren diese zum Teil miteinander fusioniert (Abb. 3 B). Gelegentlich (4,3%, 11/255) bildete sich je Infloreszenz lediglich eine terminale sterile Blüte, deren Blütenorgane deformiert waren oder fehlten (Abb. 3 D, E). Bei 5,5% der *en*²⁹⁸-*STM* Pflanzen (14/255) konnte eine starke Fasziation der Infloreszenz beobachtet werden (Abb. 3 F).

3.1.3 Die *En*²⁹⁸-Domäne fusioniert mit verschiedenen *STM*-Deletionskonstrukten

Um den Anteil bestimmter Domänen von *STM* an der Ausprägung des *stm* Phänotyps zu bestimmen, wurden verschiedene *STM*-Deletionskonstrukte als *EN*²⁹⁸-Fusionsproteine in *Arabidopsis* exprimiert. In Abbildung 4 sind diese in Relation zum vollständigen Protein schematisch dargestellt. Die interessanten Domänen *KNOX*, *ELK* und die Homöodomäne (*HD*) sind farbig hervorgehoben. Die Feststellung, welche Domäne welchen Anteil an der *stm* Phänotypie hat, sollte Rückschlüsse auf den Mechanismus von *CHRIS* erlauben. Darüber hinaus ist jeweils die Länge des Transkriptes beginnend mit der Ω *leader* Sequenz bis zum Polyadenylierungssignal sowie die Länge des Translationsproduktes angegeben, um eine eventuelle Korrelation mit zu beobachtenden Phänotypen herstellen zu können

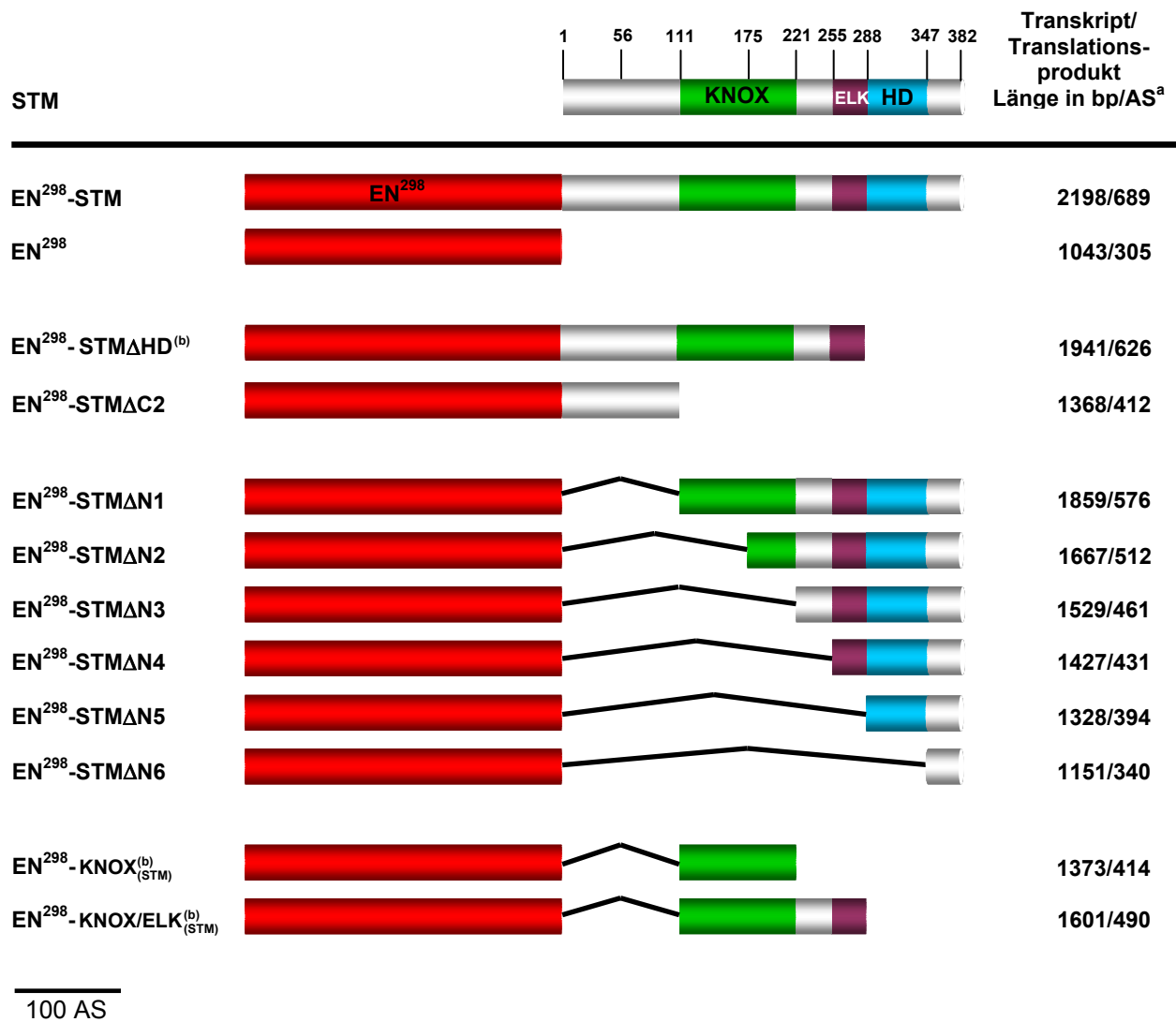


Abb. 4: Schematische Darstellung der als EN²⁹⁸ Fusionsproteine exprimierten STM-Deletionskonstrukte. Die Zahlen oberhalb der STM Domänenstruktur geben die Aminosäureposition an. ^(a) Länge des Transkriptes in bp inklusive Ω leader Sequenz bis Polyadenylierungssignal, ^(b) Diese Konstrukte wurden von Carolin Nolte (Diplomarbeit, 2000) hergestellt.

Die N-terminalen Deletionskonstrukte *STMΔN1* bis *STMΔN6* sowie das C-terminale Deletionskonstrukt *STMΔC2* wurden mit den unter 2.1.3.1 aufgeführten Primern über PCR aus pRSTM4 (s. 2.1.3.3) amplifiziert, über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* in pCHRIS (s. 2.1.3.2) kloniert und die Expressionskassette über die flankierenden *Ascl* Schnittstellen in pGPTV-Bar *Ascl* umgesetzt (s. 2.1.3.2). Die Konstrukte pGPTV-*en*²⁹⁸-*STMΔHD*, pGPTV-*en*²⁹⁸-*KNOX*_(STM) und pGPTV-*en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(STM) sind von Carolin Nolte (Diplomarbeit, 2000) hergestellt worden. Anschließend wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit diesen pGPTV-*en*²⁹⁸-*STM* Deletionskonstrukten transformiert und die BASTA resistenten Primärtransformanten etwa drei Wochen nach der Aussaat analysiert (s. 2.2.4).

3.1.3.1 Frequenzen der Phänotypen

Die Frequenzen der beobachteten Phänotypen sind in Abbildung 5 dargestellt. Wie bereits beschrieben, zeigten 74,3% (274/369) der transgenen Pflanzen, die das *en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt trugen, eine *stm* Phänokopie. Jeweils 1/3 der analysierten Pflanzen waren dem *stm* Phänokopie Phänotyp 1 (33,9%, 125/369) bzw. Phänotyp 2 (34,4%, 127/369) zuzuordnen, lediglich 6% der Pflanzen (22/369) zeigten die *stm* Phänokopie erst nach der Ausbildung von mehr als vier Blättern.

Die C-terminale Deletion EN²⁹⁸-STM Δ C2, bei der lediglich die ersten 110 Aminosäuren mit der EN²⁹⁸ Domäne fusioniert sind, reichte nicht aus, um eine *stm* Phänokopie zu erzeugen. 98,7 % (76/77) der transgenen Keimlinge waren wildtypisch. Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die das *STM* Deletionskonstrukt *en*²⁹⁸-STM Δ HD trugen, zeigten hingegen sogar in 79% der Fälle (188/238) eine *stm* Phänokopie (s. a. Nolte, 2000), obwohl die DNA-bindende Domäne fehlte. Lediglich die Verteilung war leicht in Richtung des schwächeren Phänotyps 3 verschoben. Die Homöodomäne scheint demnach für die Erzeugung der *stm* Phänokopie nicht notwendig zu sein.

Die N-terminalen *STM* Deletionskonstrukte erzeugten bis auf *en*²⁹⁸-STM Δ N6 (nur 4,6%, 8/174) alle *stm* Phänokopien, vom längsten Konstrukt *en*²⁹⁸-STM Δ N1 (65,3%, 49/75) zum kürzesten *en*²⁹⁸-STM Δ N5 (30,1%, 97/322) mit abnehmender Frequenz. Also auch Konstrukte, die lediglich die kodierende Sequenz der ELK und Homöodomäne enthielten, führten zu einem gewissen Prozentsatz an Phänokopien. Hier kann eine Korrelation zwischen der Länge des Transkriptes und der Frequenz an auftretenden *stm* Phänokopien bestehen (vgl. Abb. 4). Es fiel allerdings auf, dass deutlich weniger sehr starke Phänokopien des Typs 1 beobachtet werden konnten. Bei transgenen Pflanzen, die die Konstrukte *en*²⁹⁸-*STM* und *en*²⁹⁸-STM Δ HD trugen, lag der Anteil der Typ1 Phänokopien an den Phänokopien insgesamt bei etwa 46% (125/274) bzw. 37% (69/188), während bei den N-terminalen *STM*-Deletionskonstrukten dieser Anteil lediglich zwischen 2% (1/49) und 15% (20/132) lag. Der Anteil der schwächeren Typ 3 Phänokopien lag dagegen bei diesen Pflanzen deutlich höher, zwischen 31% (41/132) und 47% (23/49) im Vergleich zu 8% (22/274) und 19% (35/188). Das Fehlen der ersten 110 Aminosäuren im Konstrukt EN²⁹⁸-STM Δ N1 führte neben der *stm* Phänokopie zusätzlich zu einem Blattphänotyp, der nur mit diesem Konstrukt aufgetreten ist (s. 3.1.3.2).

Die Expression der KNOX Domäne als EN²⁹⁸ Fusion führte zu 55,2% (224/406) *stm* Phänokopien. Dies sind signifikant mehr Pflanzen, als von Konstrukten vergleichbarer Transkriptlänge (*en*²⁹⁸-KNOX: 1373 bp, vgl. Abb. 4) erzeugt wurden. Das etwas längere N-terminale Deletionskonstrukt *en*²⁹⁸-STM Δ N4 (1427 bp) erzeugte 45,4% *stm* Phänokopien; das etwas kürzere Konstrukt *en*²⁹⁸-STM Δ N5 (1328 bp) führte lediglich zu 30,1% *stm* Phänokopien. Transgene Pflanzen, die das nahezu gleichlange C-terminale Deletionskonstrukt *en*²⁹⁸-STM Δ C2 (1368 bp) trugen, wiesen sogar lediglich 1,3% *stm* Phänokopien auf.

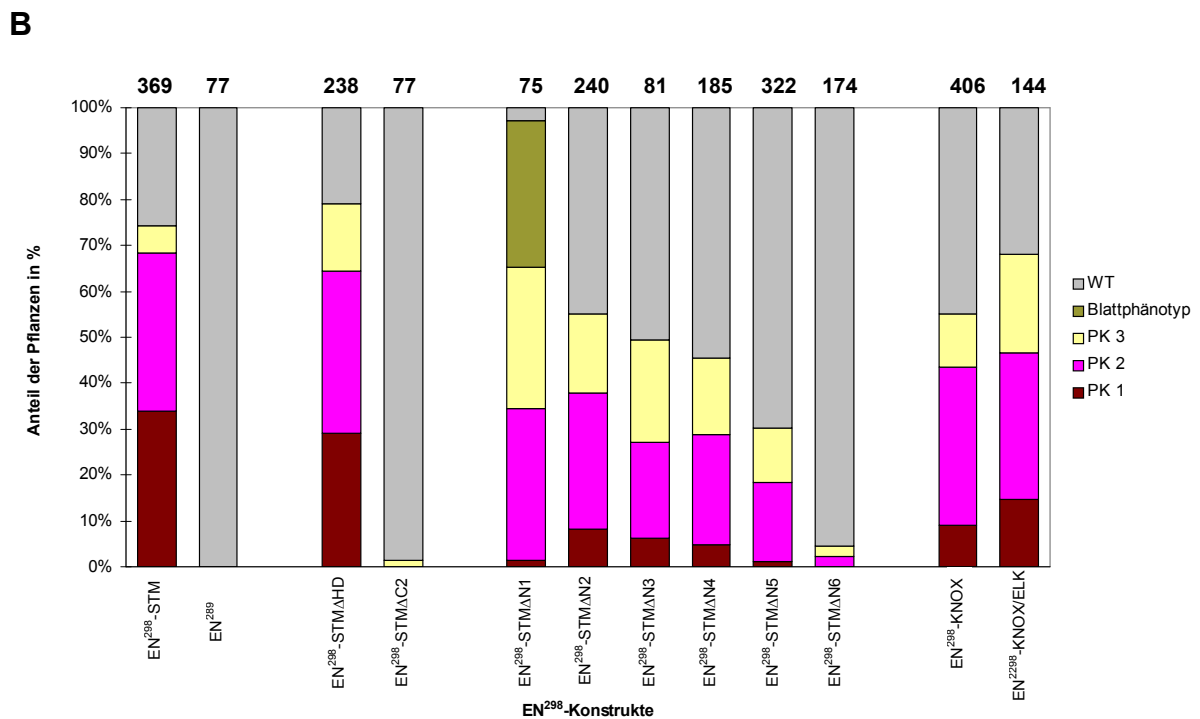
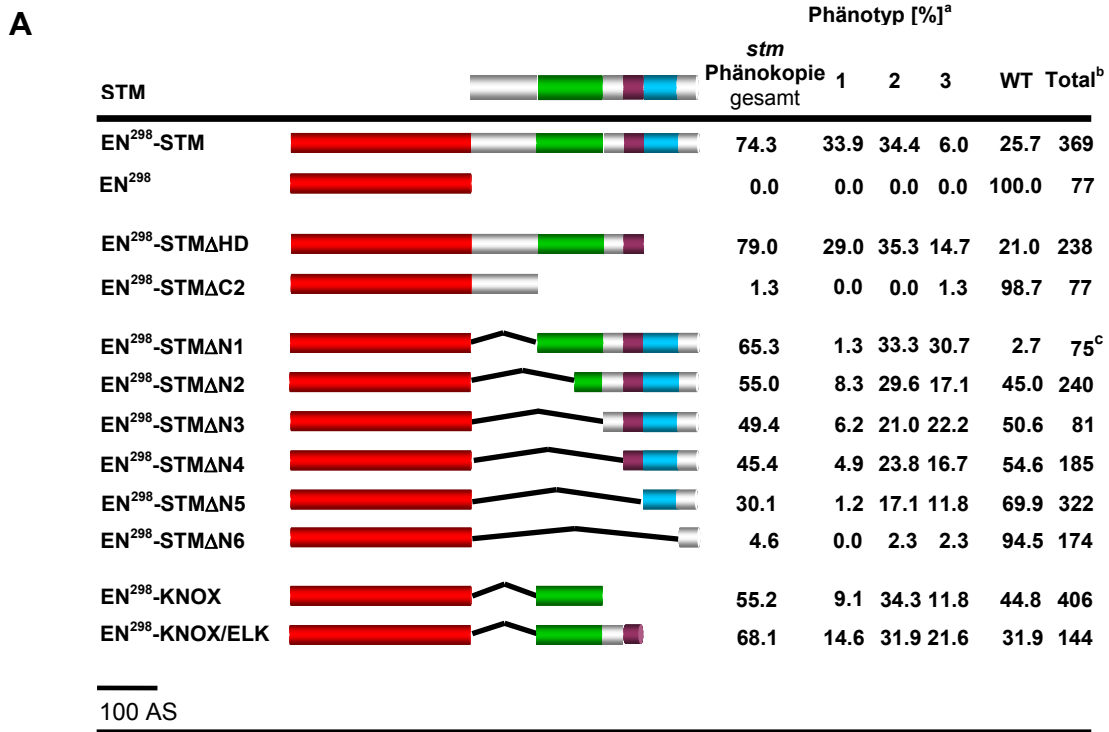


Abb. 5.: Phänokopie Frequenzen der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen mit 35S::en²⁹⁸-STM Deletionskonstrukten verglichen mit 35S::en²⁹⁸ und 35S::en²⁹⁸-STM Pflanzen. Analyse 21 Tage nach Aussaat. (A) Frequenz der Phänotypen in %, (a) Die Zuordnung der transgenen Pflanzen basiert auf der Klassifizierung in Tabelle 1. (b) Gesamtanzahl der analysierten BASTA resistenten *Arabidopsis* Pflanzen. (c) 21,3 % der BASTA resistenten Pflanzen zeigten *stm* Phänokopie Typ 2 und Blattphänotyp, 26,7% zeigten *stm* Phänokopie Typ 3 und Blattphänotyp, 32% zeigten keine *stm* Phänokopie, aber Blattphänotyp (s. 3.1.3.2). (B) Darstellung der Ergebnisse aus (A) als Säulendiagramm. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der analysierten BASTA resistenten Pflanzen an, auf die sich jeweils die 100% beziehen. Die en²⁹⁸-STMΔN1 Pflanzen, die zusätzlich zur *stm* Phänokopie einen Blattphänotyp zeigen sind in dieser Darstellung nicht gesondert hervorgehoben.

Diese Zahlen sprechen gegen eine reine Abhängigkeit der Phänokopie Frequenz von der Transkriptlänge. Die KNOX Domäne scheint demnach einen größeren Beitrag zur Ausbildung der *stm* Phänokopie zu leisten als andere Domänen (s. a. Nolte, 2000). Auch der Anteil an Typ 1 Phänokopien an den Phänokopien insgesamt liegt höher als bei dem *en*²⁹⁸-*STMΔN5* Konstrukt, 16,5% (37/224) im Vergleich zu 4% (4/97). Die KNOX Domäne in Kombination mit der ELK Domäne im Fusionsprotein EN²⁹⁸-KNOX/ELK erhöht den Anteil der *stm* Phänokopien auf 68,1% (98/144) und auch der Anteil der Typ 1 Phänokopien lag höher, bei etwa 21% (21/98).

In der generativen Phase konnten auch bei transgenen Pflanzen mit *en*²⁹⁸-*STM* Deletionskonstrukten „Luftrosetten“ und Fasziation der Infloreszenz beobachtet werden, mit Ausnahme der *en*²⁹⁸-*STMΔC2* und *en*²⁹⁸-*STMΔN6* Pflanzen. Der Prozentsatz an Pflanzen pro *STM* Deletionskonstrukt, der eine Fasziation der Infloreszenz zeigte, war recht unterschiedlich und lag zwischen 13% und 34%. Luftrosetten traten lediglich bei Pflanzen auf, die EN²⁹⁸ Fusionsproteine exprimierten, die die ELK Domäne umfassten, jeweils in etwa ¼ der transgenen Pflanzen.

3.1.3.2 Zusätzlicher Phänotyp der transgenen 35S::*en*²⁹⁸-*STMΔN1 Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Neben den unter 3.1.2 beschriebenen *stm* Phänokopie Phänotypen, die bei den einzelnen Konstrukten unterschiedlich häufig auftraten (s. 3.1.3.1), konnte bei transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die mit dem *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Konstrukt transformiert wurden, ein zusätzlicher Phänotyp beobachtet werden (s. Abb. 5).

Bei 80% (60/75) der BASTA resistenten Primärtransformanten, die das *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Konstrukt trugen, zeigte sich ein deutlicher Blattphänotyp. Bei 48% (36/75) der transgenen Pflanzen trat dieser zusätzlich zur *stm* Phänokopie auf, während 32% (24/75) der Pflanzen lediglich phänotypisch veränderte Blätter aufwiesen (s. 3.1.3.1). Die Stärke des Blattphänotyps variierte, wie in Abbildung 6 zu sehen ist.

Einige stark betroffene transgene Keimlinge waren deutlich kleiner als gleich alte wildtypische Keimlinge und wiesen stark veränderte Kotyledonen auf. Die Rosettenblätter waren deutlich dicker als im Wildtyp, nach oben gewölbt und der Blattstiel nicht ausgebildet (Abb. 6 A, B). Die Blattspreite war zum Teil sehr tief „eingekerbt“, was den Blättern ein stark „gelapptes“ Aussehen verleiht (Abb. 6 B, C). Die *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Pflanzen mit einem weniger starken Phänotyp waren etwas größer und der gelappte Blattphänotyp reichte von stark (Abb. 6 D) über mittel (Abb. 6 E) bis schwach (Abb. 6 F). Bei den transgenen *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Pflanzen, die eine Kopie des *stm* Phänotyps zeigten und gelappte Blätter aufwiesen, trat der Blattphänotyp frühestens ab dem dritten Rosettenblatt und damit meist erst in Blättern der Achselmeristeme auf und war eher mittel bis schwach.

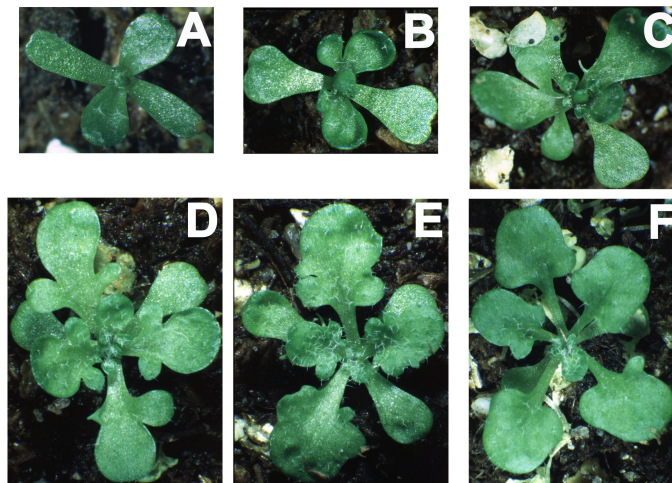


Abb. 6: Blattphänotypen der transgenen $35S::en^{298}-STM\Delta N1$ *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Analyse 21 Tage nach der Aussaat. Alle Keimlinge sind im gleichen Maßstab dargestellt. Die Stärke des Blattphänotyps variiert (von A – F abnehmend). **(A)** Keimling mit stark veränderten Kotyledonen; sehr kleine dicke Blätter, Blattstiele fehlen, **(B)** Keimling mit sehr kleinen, stark nach oben gewölbten Blättern, eingekerbt, Blattstiele fehlen **(C)** Keimling mit Blättern, die sehr tief eingekerbt sind, **(D)** Keimling mit sehr stark gelappten Blättern, **(E)** mit weniger stark gelappten Blättern und **(F)** mit Blättern, die nur sehr leicht gelappt sind.

In der weiteren Entwicklung gliederten $en^{298}-STM\Delta N1$ Pflanzen mit starkem Blattphänotyp wie in Abbildung 6 A und B weitere dieser kleinen dicken Blätter ab. Es bildete sich aber nur in einem Fall eine Infloreszenz, allerdings mit einer terminalen sterilen Blüte. Bei transgenen Pflanzen mit schwächerem Blattphänotyp (Abb. 6 D – E) zeigten sich gelappte Hochblätter nach dem Übergang in die reproduktive Phase, die Pflanzen waren fertil. Bei $en^{298}-STM\Delta N1$ Pflanzen mit gelappten Blättern und *stm* Phänokopie wurden, wie bei $en^{298}-STM$ Pflanzen, eine Reihe Achselmeristeme aktiviert, die in erster Linie Rosettenblätter produzierten und in einem „buschigen“ Phänotyp resultierten (Abb. 7 A). Wenn es zur Bildung einer Infloreszenz kam, konnten Luftrosetten beobachtet werden (Abb. 7 B, C). Setzte die Elongation der Infloreszenz anschließend wieder ein, wurden nur wenige fertile Blüten gebildet (Abb. 7 C).

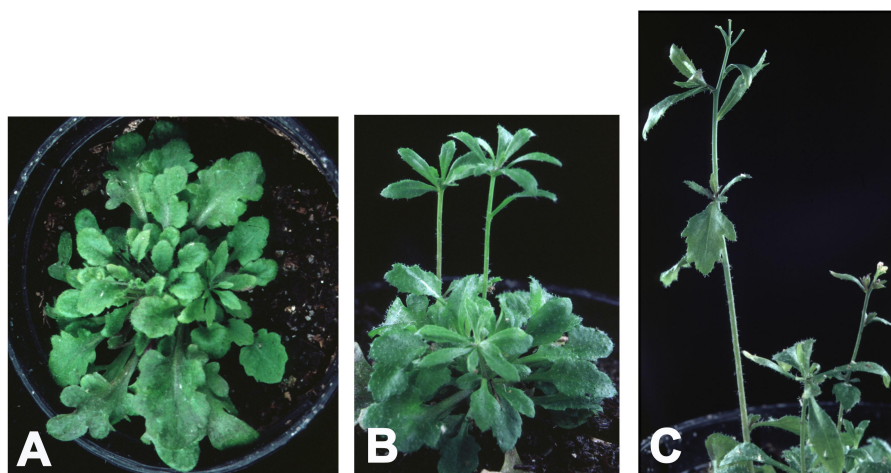


Abb. 7: Phänotyp älterer transgener $35S::en^{298}-STM\Delta N1$ Pflanzen mit gelappten Blättern und *stm* Phänokopie **(A)** Achselmeristeme bilden viele Rosettenblätter, keine Infloreszenz, **(B)** „buschige“ Pflanze mit Luftrosetten, **(C)** Infloreszenz mit gelappten Hochblättern und 4 terminalen sterilen Blüten, die zweite Infloreszenz trägt fertile Blüten.

3.1.3.3 Keine Korrelation zwischen Expressionsstärke und Phänotyp

Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke des Konstruktes in den transgenen Pflanzen und der Stärke der beobachteten phänotypischen Veränderungen bestand, wurde dies für das *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Konstrukt auf *Northern*-Ebene getestet.

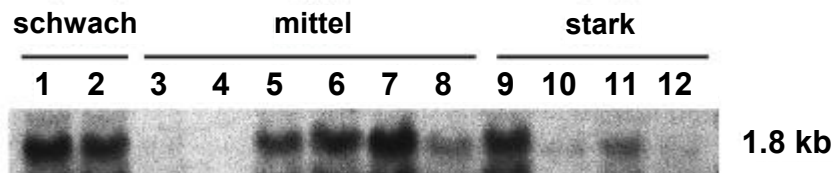


Abb. 8: Expression des *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Konstruktes in den transgenen Pflanzen. *Northern*-Analyse mit Gesamt-RNA aus Blättern, bzw. bei Pflanze in Spur 11 aus der kompletten Pflanze inklusive der Infloreszenz. Über der abgebildeten Autoradiographie sind die Nummer der Spur und die Stärke des Phänotyps angegeben. Der RNA-Filter wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert, die das *engrailed*²⁹⁸ Fragment umfasst (2.1.3.4). Die Stärke des Signals korreliert nicht mit der Stärke des Phänotyps. Die Spur, in der Wildtyp Gesamt-RNA aufgetragen wurde, zeigte kein Signal (nicht abgebildet).

Die *Northern*-Analyse (s. 2.2.16) wurde mit Gesamt-RNA (s. 2.2.9) aus Blattmaterial von 12 ausgewählten *en*²⁹⁸-*STMΔN1* exprimierenden Pflanzen durchgeführt, die repräsentativ für die verschiedenen beobachteten Phänotypen waren. Das Ergebnis der Autoradiografie ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Pflanzen mit starkem Phänotyp (Spur 9 – 12) entsprachen den in Abbildung 6 A und B gezeigten Pflanzen. Die Pflanze, deren Gesamt-RNA in Spur 11 aufgetragen wurde, entwickelte als einzige dieser Gruppe eine Infloreszenz. Die Pflanzen mit mittlerem Phänotyp zeigten eine *stm* Phänokopie des Typs 2 (Spur 5 - 8) bzw. des Typs 3 (Spur 3 und 4) und zeigten den etwas schwächeren Blattphänotyp, wie in Abbildung 6 E bzw. 7 A dargestellt. Die dritte Gruppe der hier analysierten Pflanzen (Spur 1 und 2) zeigten den schwachen Blattphänotyp (Abb. 6 F) und ein wildtypisches Sprossapikalmeristem.

In allen Pflanzen ließ sich das Transkript nachweisen, in den Pflanzen, deren RNA in Spur 3 und 4 zu sehen ist, allerdings nur sehr schwach. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen der detektierten Transkriptmenge und der Stärke des beobachteten Phänotyps. Hieraus lässt sich schließen, dass andere Faktoren als die vorhandene Menge an Transkript für die Variationen des Phänotyps verantwortlich sein müssen.

3.1.4 Überexpression einiger STM-Deletionskonstrukte, der KNOX_(STM) und der KNOX/ELK_(STM) Domäne ohne die En²⁹⁸-Domäne

Um den Beitrag der En²⁹⁸-Domäne am *stm* Phänokopie Phänotyp näher zu bestimmen, wurden transgene Pflanzen hergestellt, die verschiedene STM-Deletionskonstrukte, die KNOX_(STM) und die KNOX/ELK_(STM) Domäne ohne die En²⁹⁸-Domäne exprimieren.

A

STM		Transkript/ Translations- produkt Länge in bp/AS	<i>stm</i> Phänokopie gesamt	Phänotyp [%]			Gelappte Blätter	Elongierte Internodien	WT	Total ^b
				1 ^a	2 ^a	3 ^a				
STMΔN1		933/277	4.4/21.6 ^c	3.2/1.2	1.0/18.0	0.2/2.4	72.4	—	1.6	504
STMΔN2		741/213	29.5	1.5	11.7	16.3	—	—	70.5	264
STMΔN3		603/167	21.1	0.3	9.9	10.9	—	—	78.9	284
STMΔN5		402/100	4.7	0.7	1.4	2.6	—	—	95.3	274
KNOX		447/115	16.8/23.2 ^d	16.2/3.3	0.6/16.2	0.0/3.7	—	56.4	3.6	328
KNOX/ELK		675/191	73.6/3.0 ^d	58.9/0.0	14.5/3.0	0.2/0.0	—	21.1	2.3	440

100 AS

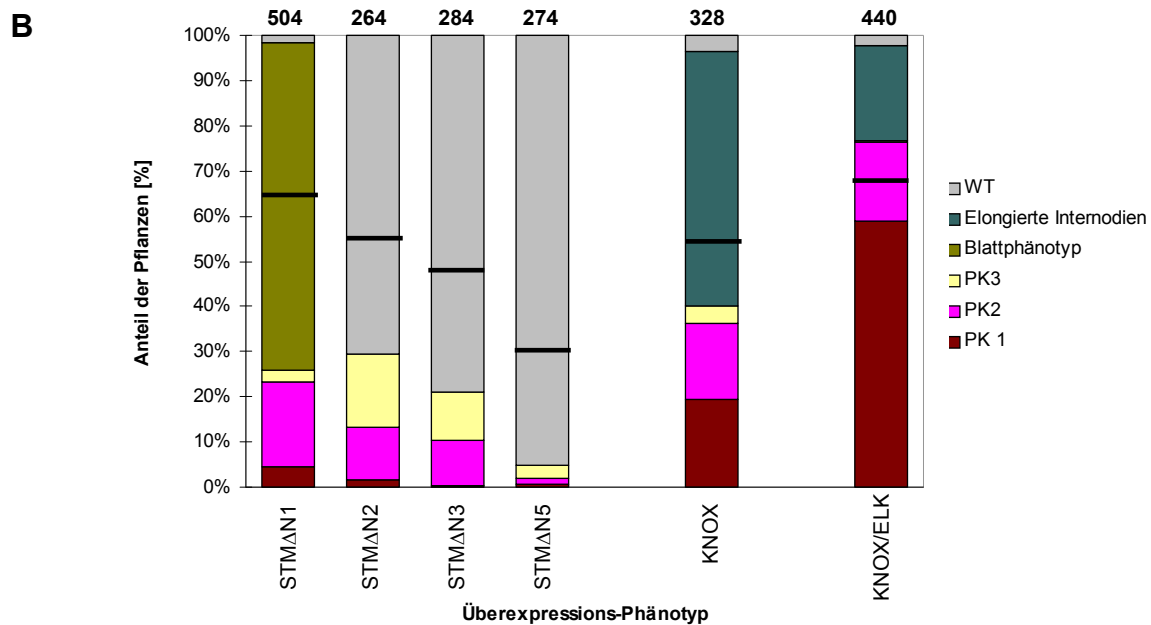


Abb. 9: Phänotyp Frequenzen der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen. (A) Frequenzen der Phänotypen in %. ^(a) Die Zuordnung zu Typ 1, 2 oder 3 basiert auf Tabelle 1. ^(b) Gesamtanzahl der analysierten transgenen *Arabidopsis* Pflanzen. ^(c) ^(d) Die erste Zahl gibt die Frequenz der Pflanzen mit reiner *stm* Phänokopie an, die zweite die Frequenz der Pflanzen mit zusätzlichem Blattphänotyp ^(c) bzw. die Frequenz der Pflanzen, die zusätzliche elongierte Internodien zeigen ^(d). **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus (A) als Säulendiagramm. Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der analysierten transgenen Pflanzen an, auf die sich jeweils die 100% beziehen. Die *STMΔN1* Pflanzen, die zusätzlich zur *stm* Phänokopie einen Blattphänotyp zeigen, sind nicht gesondert hervorgehoben. Die Säulen für KNOX und KNOX/ELK zeigen Pflanzen, die zusätzlich zur *stm* Phänokopie elongierte Internodien haben, ebenfalls nicht gesondert an. Die schwarzen Balken geben *stm* Phänokopie Prozentsatz aus Abb.5 an.

Alle Fragmente wurden mit den unter 2.1.3.1 aufgeführten Primern über PCR aus pRSTM4 (s. 2.1.3.3) amplifiziert und mit *NcoI* und *BamHI* nachgeschnitten. Aus dem Vektor pRTΩGFP (s. 2.1.3.2) wurde mit *NcoI* und *BamHI* das GFP-Fragment herausgeschnitten, um an dessen Stelle die amplifizierten Fragmente hinter den CaMV 35S Promotor zu klonieren. Die Expressionskassette wurde anschließend über die flankierenden *AscI* Schnittstellen in pGPTV-Bar *AscI* (s. 2.1.3.2) umgesetzt, um *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit diesen pGPTV Konstrukten zu transformieren. Die BASTA resistenten Primärtransformanten wurden etwa drei Wochen nach der Aussaat analysiert (s. 2.1.4). Die Frequenzen der beobachteten Phänotypen sind in Abbildung 9 dargestellt und werden im folgenden mit den in Abbildung 5 dargestellten Frequenzen der entsprechenden EN²⁹⁸-STM Deletionskonstrukte verglichen.

Für die N-terminalen STM Deletionskonstrukte ließ sich feststellen, dass deutlich weniger Pflanzen die *stm* Phänokopie zeigten. Der Anteil lag zwischen 4,7% (13/2749) für STMΔN5 und 29,5% (78/264) für STMΔN2. Für die N-terminalen EN²⁹⁸-STM Deletionskonstrukte lag der Anteil an *stm* Phänokopien zwischen 30,1% (97/322) für das EN²⁹⁸- STMΔN5 Konstrukt und 65,3 % (49/75) für das EN²⁹⁸- STMΔN1 Konstrukt. Darüber hinaus gilt für die Konstrukte STMΔN2, STMΔN3 und STMΔN5, dass bei über 54% der transgenen Pflanzen die *stm* Phänokopie erst nach 4 Blättern auftrat, der Phänotyp also relativ schwach war. Bei den entsprechenden EN²⁹⁸-STM Deletionskonstrukten hingegen trat der Entwicklungsblock des Sprossapikalmeristems bei über 60% der Pflanzen bereits vor Ausbildung des vierten Blattes ein.

Damit lässt sich sagen, dass die Expression der Konstrukte als EN²⁹⁸ Fusion die Ausbildung des Funktionsverlust Phänotyps deutlich unterstützt. Es konnten zwischen 46% (EN²⁹⁸-STMΔN2) und 84% (EN²⁹⁸-STMΔN5) mehr *stm* Phänokopien beobachtet werden. Der mit den Konstrukten ohne EN²⁹⁸-Domäne beobachtete Anteil an *stm* Phänokopien lässt sich möglicherweise durch Cosuppression erklären.

Nur mit dem STMΔN1 Konstrukt wurde neben den *stm* Phänokopien eine große Anzahl an Pflanzen (94,4%, 476/504) mit einem Blattphänotyp erzeugt. Dieser war deutlich stärker als bei den *en*²⁹⁸- STMΔN1 Pflanzen (Abb. 6 und 7), aber schwächer als der beschriebene 35S::*STM* Phänotyp (Williams, 1998).

Die STMΔN1 Pflanzen mit Blattphänotyp waren deutlich kleiner als gleich alte wildtypische Pflanzen. Bei 67,1% (338/504) der Pflanzen wurden vom Sprossapikalmeristem lediglich sehr kleine dicke und mit Trichomen besetzte blattähnliche Strukturen gebildet (Abb. 10 A, B), die nicht weiter ausgewachsen sind. Bei 20,2% (106/504) der Pflanzen wurden rosettenartig sehr viele kleine dicke Blätter ohne Blattstiel abgegliedert (Abb. 10 C). Die restlichen 7,1 % (36/504) der STMΔN1 Pflanzen mit Blattphänotyp wiesen in der Regel zwei annähernd wildtypisch aussehende Primärblätter auf, gefolgt von einer großen Anzahl der kleinen „fleischigen“ Blätter. Diese Pflanzen entwickelten meistens eine Infloreszenz, allerdings mit wenigen meist sterilen Blüten (Abb. 10 D).

Der mit dem *STMΔN1* Konstrukt beobachtete Blattphänotyp scheint ein schwächerer *STM* Überexpressions-Phänotyp zu sein, der allerdings nur auftritt, wenn das Konstrukt die komplette KNOX Domäne enthält. Fehlt der 110 Aminosäure umfassende N-Terminus von *STM*, der Polyhistidin und Polyglutamin Bereiche enthält (s. Anhang Abb. A2), fällt also der Überexpressions-Phänotyp schwächer aus. Die Fusion von *STMΔN1* mit der *EN²⁹⁸* Domäne hat dazu geführt, dass der Überexpressions-Phänotyp deutlich unterdrückt wird und der Phänokopie Phänotyp überwiegt.

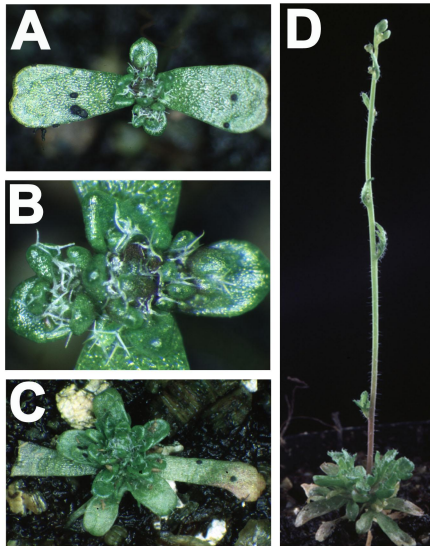


Abb. 10: Blattphänotypen der transgenen 35S:: *STMΔN1* *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. 36 Tage nach der Aussaat. (A) Pflanze mit sehr kleinen dicken blättähnlichen Strukturen, besetzt mit Trichomen. Strukturen wachsen nicht aus (B) Detailaufnahme der blättähnlichen Strukturen von (A). (C) Pflanze, die rosettenartig sehr viele kleine dicke Blätter abgegliedert hat, ohne Blattstiel. (D) Pflanze mit Infloreszenz, sterile Blüte.

Die Überexpression der $KNOX_{(STM)}$ und der $KNOX/ELK_{(STM)}$ Domäne führte zu sehr starken Phänotypen. Lediglich 3,6% bzw. 2,3% dieser transgenen Pflanzen sahen wildtypisch aus.

Die Frequenz an *stm* Phänokopien (alle: 40%, 131/328; reine *stm* Phänokopie: 16,8%, 55/328) war mit dem $KNOX_{(STM)}$ Konstrukt zwar niedriger als mit dem entsprechenden *en²⁹⁸-KNOX_(STM)* Konstrukt (55,2%, 224/406), allerdings war der Anteil an Typ 1 Phänokopien deutlich größer, d.h. der *stm* Phänokopie Phänotyp war deutlich stärker. Der Anteil lag bei 96,4% (53/55) der *stm* Phänokopien, betrachtet man nur die Pflanzen mit reinen *stm* Phänokopien und bei 48,8% (64/131) der *stm* Phänokopien, wenn die Pflanzen, die zusätzlich elongierte Internodien (s. 3.1.4.1) aufwiesen, miteinbezogen werden. Dieser Prozentsatz lag bei Pflanzen mit *en²⁹⁸-KNOX_(STM)* Konstrukt lediglich bei 16,5% (37/224). Wie bereits angedeutet, trat mit dem $KNOX_{(STM)}$ Konstrukt ein neuer Phänotyp auf. Insgesamt 79,6% (261/328) der transgenen Pflanzen wiesen keine wildtypische Rosette auf, sondern zeigten elongierte Internodien, wobei bei 56,4% (185/328) der Pflanzen die Aktivität des Sprossapikalmeristems über die gesamte Entwicklung erhalten blieb. Bei 23,2% (76/328) dieser transgenen Pflanzen stellte das Sprossapikalmeristem seine Aktivität ein, allerdings überwiegend (85,8%, 65/76) erst nach der Ausbildung von 4 Blättern.

Mit dem $KNOX/ELK_{(STM)}$ Konstrukt lag die *stm* Phänokopie Frequenz (alle: 76,6%, 337/440; reine *stm* Phänokopie: 73,3%, 324/440) etwas über der Frequenz mit dem entsprechenden en^{298} - $KNOX/ELK_{(STM)}$ Konstrukt (68,1%, 98/144). Der Anteil der Typ 1 *stm* Phänokopien war mit 80% (352/324) ebenfalls deutlich größer als mit dem en^{298} - $KNOX/ELK_{(STM)}$ Konstrukt (21,4%, 21/98). Im Vergleich zum $KNOX_{(STM)}$ Konstrukt zeigte ein geringerer Prozentsatz an transgenen Pflanzen (24,1 %, 106/440) elongierte Internodien in der vegetativen Phase, wobei bei der überwiegenden Anzahl dieser Pflanzen (87,6%, 93/106) die Aktivität des Sprossapikalmeristems erhalten blieb.

Mit dem $KNOX_{(STM)}$ und dem $KNOX/ELK_{(STM)}$ Konstrukt war ein neuer Phänotyp zu sehen, der bisher nicht mit *STM* in Verbindung gebracht wurde und auch nicht mit den entsprechenden EN^{298} Fusionen beobachtet werden konnte. Die Fusion mit der EN^{298} Domäne hat also in diesem Fall die Spezifität für Phänokopien erhöht. Mit dem $KNOX_{(STM)}$ Konstrukt lag die Frequenz für elongierte Internodien höher als bei transgenen $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanzen, was möglicherweise mit der Abwesenheit der *ELK* Domäne zusammenhängt, die mit der Kernlokalisierung in Verbindung gebracht wird (Meisel & Lam, 1996).

3.1.4.1 Transgene 35S:: $KNOX_{(STM)}$ und 35S:: $KNOX/ELK_{(STM)}$ *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zeigten einen bisher nicht mit *STM* assoziierten Phänotyp

Neben der *stm* Phänokopie, die bei $KNOX_{(STM)}$ Pflanzen und $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanzen deutlich stärker ausfiel (Abb. 11 A, D), konnte bei diesen transgenen Pflanzen ein bisher nicht mit *STM* assoziierter Phänotyp beobachtet werden. Bei 79,6% (261/328) der $KNOX_{(STM)}$ Pflanzen und 24,1 % (106/440) der $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanzen haben sich die Internodien der Rosettenphytomere gestreckt.

Die Aktivität des Sprossapikalmeristems blieb bei der überwiegenden Anzahl dieser Pflanzen erhalten (Abb. 11 C, F), jedoch stellte sich bei einigen Pflanzen ein Entwicklungsblock nach der Ausbildung des vierten Blattes ein (Abb. 11 B, E). Diesen Pflanzen fehlte ein sichtbares Sprossapikalmeristem (Abb. 11 E). Dass die Funktion des Sprossapikalmeristems in irgendeiner Weise gestört ist, zeigte sich allerdings auch bei den anderen Pflanzen. Die bei wildtypischen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen spiralig mit einem Winkel von 137 Grad angeordneten Blätter der Rosette entstanden bei $KNOX_{(STM)}$ und $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanzen mit elongierten Internodien zum Teil mit einem Winkel von nahezu 360 Grad zueinander, d. h. die Blätter waren fast übereinander angelegt (Abb. 11 G). Die Aktivierung der Achselmeristeme konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Bei den $KNOX_{(STM)}$ und $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanzen mit aktivem Sprossapikalmeristem bildete sich nach dem Übergang in die generative Phase eine Infloreszenz aus mit wenigen fertilen Blüten (Abb. 11 H).

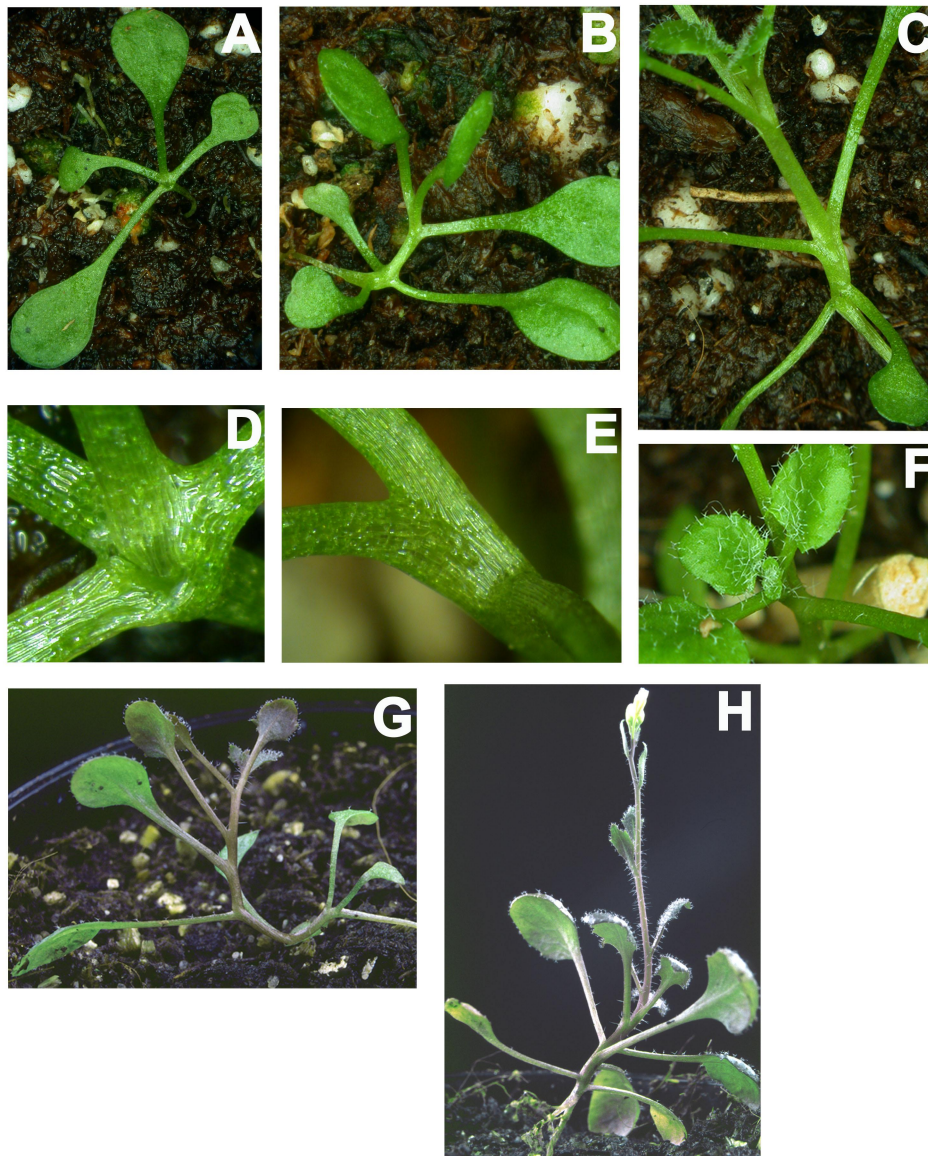


Abb. 11: Phänotypen der transgenen $35S::KNOX_{(STM)}$ und $35S::KNOX/ELK_{(STM)}$ *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. (A) $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanze mit *stm* Phänokopie Typ 1, kein sichtbares Sprossapikalmeristem vorhanden, Detailansicht in (D), (B) $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanze mit *stm* Phänokopie und elongierten Internodien, fusionierte Blattstiele, sichtbares Sprossapikalmeristem fehlt, Detail in (E), (C) $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanze mit elongierten Internodien, Aktivität des Sprossapikalmeristems ist erhalten geblieben, Detail in (F), (G) $KNOX/ELK_{(STM)}$ Pflanze, bei der sich drei aufeinander folgende Blätter in einem Winkel von nahezu 360 Grad gebildet haben, Blätter stehen fast übereinander, (H) $KNOX_{(STM)}$ Pflanze mit elongierten Internodien, Infloreszenz mit fertilen Blüten.

3.1.5 Einfügen von Leserasterverschiebungen in einige der Konstrukte

Um zu testen inwieweit die Frequenz der Phänokopien tatsächlich mit der korrekten Translation zusammenhängt, wurden in einige der Konstrukte Leserasterverschiebungen eingefügt, so dass sich STM-Proteinfragmente ohne Sinn ergaben (s. Abb. 12). Die EN²⁹⁸-Domäne wurde weiterhin korrekt translatiert.

A

STM	Transkript/ Translations- produkt Länge in bp/AS	Phänotyp [%] ^a				WT	Total ^b
		<i>stm</i> Phänokopie gesamt	1	2	3		
EN ²⁹⁸ -fsSTM	2190/317	53.6	2.7	14.2	36.7	46.4	528
EN ²⁹⁸ -fsSTMΔN1	1858/140	49.7	10.5	22.2	17.0	50.3	153
EN ²⁹⁸ -fsKNOX	1377/367	2.7	0.0	0.4	2.3	97.3	556
fsKNOX	446/137	25.3	3.5	9.6	12.2	74.7	572
fsKNOX/ELK	674/140	23.0	2.0	12.3	8.7	77.0	506

100 AS

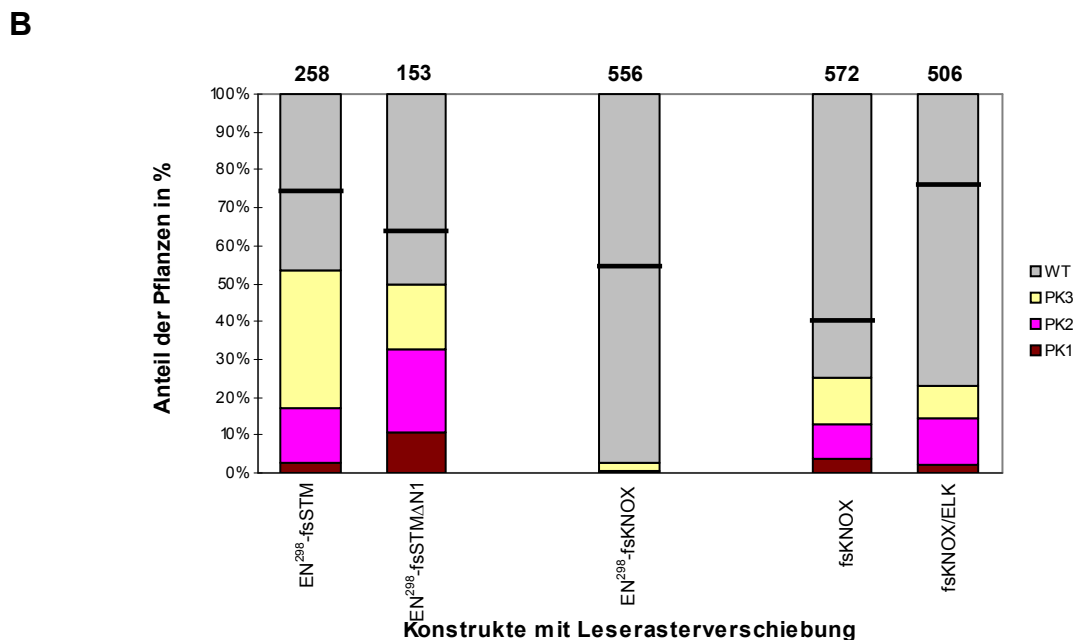


Abb. 12: Phänokopie Frequenzen der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen, die Konstrukte mit Leserasterverschiebungen tragen. (A) Frequenzen der Phänotypen in %. Die Schraffur deutet an, dass sich das *STM*-Fragment nicht mehr im Leseraster von en²⁹⁸ bzw. dem ATG befindet und stattdessen das +1 Leseraster exprimiert wird. ^(a) die Zuordnung zu Phänokopie Typ 1, 2 oder 3 basiert auf Tabelle 1. ^(b) Gesamtanzahl der analysierten transgenen *Arabidopsis* Pflanzen. **(B)** Darstellung der Ergebnisse aus (A) als Säulendiagramm. Die Zahlen über den Säulen geben die Anzahl der analysierten transgenen Pflanzen an, auf die sich jeweils die 100% beziehen. Die schwarzen Balken geben den *stm* Phänokopie Prozentsatz aus Abb.5 an. *fs*: frameshift (Leserasterverschiebung).

























Alle Konstrukte bis auf *en*²⁹⁸-*fsKNOX* wurden mit Hilfe der PCR hergestellt. Die Fragmente wurden mit den unter 2.1.3.1 aufgeführten Primern aus pRSTM4 (s. 2.1.3.3) amplifiziert mit *Nco*I und *Bam*HI nachgeschnitten und in den entsprechenden Konstrukten an Stelle der Fragmente ohne Leserasterverschiebung eingesetzt. Das Konstrukt *en*²⁹⁸-*fsKNOX* ergab sich durch Schneiden mit *Nco*I, Auffüllen der Restriktionsschnittstelle, gefolgt von der Re-Ligation. Die Expressionskassetten wurden anschließend über die flankierenden *Asc*I Schnittstellen in pGPTV-Bar *Asc*I (s. 2.1.3.2) umgesetzt, um *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit diesen pGPTV Konstrukten zu transformieren. Die BASTA resistenten Primärtransformanten wurden etwa drei Wochen nach der Aussaat analysiert (s. 2.2.4.). Die Frequenzen der beobachteten Phänotypen sind in Abbildung 12 dargestellt.

Es hat sich gezeigt, dass die Phänotypen gelappte Blätter und elongierte Internodien nur mit Konstrukten ohne Leserasterverschiebung auftreten, also abhängig sind von der Anwesenheit des korrekten Proteins. Mit den *en*²⁹⁸-*fsSTMΔN1*, *fsKNOX*_(STM) und *fsKNOX/ELK*_(STM) Konstrukten konnten nur *stm* Phänokopien beobachtet werden.

Die Frequenz an *stm* Phänokopien mit den Konstrukten *en*²⁹⁸-*fsSTM* und *en*²⁹⁸-*fsSTMΔN1* (53,6%, 283/528 bzw. 49,7%, 76/163) war deutlich geringer als die *stm* Phänokopie Frequenz mit den entsprechenden Konstrukten ohne Leserasterverschiebung (74,3%, 274/369 bzw. 65,3%, 49/75). Darüber hinaus waren die beobachteten *stm* Phänokopien relativ schwach. Bei 68,5% (194/283) der transgenen *en*²⁹⁸-*fsSTM* Pflanzen mit *stm* Phänokopie trat der Entwicklungsblock des Sprossapikalmeristems erst nach Ausbildung des vierten Blattes ein. Im Unterschied dazu ist die *stm* Phänokopie mit dem *en*²⁹⁸-*STM* Konstrukt bei 68,3% (252/369) der Pflanzen bereits vor der Ausbildung des vierten Blattes erkennbar. Ein gewisser Prozentsatz an Phänokopien muss also möglicherweise durch Cosuppression erklärt werden, ist also lediglich abhängig von der eingebrachten RNA. Ohne korrekte Translation fällt die Phänokopie jedoch deutlich schwächer aus.

Es wird allerdings auch deutlich, dass die KNOX Domäne einen großen Beitrag zur Entstehung der *stm* Phänokopien leistet. Mit den Konstrukten *fsKNOX* und *fsKNOX/ELK* liegt die *stm* Phänokopie Frequenz lediglich bei 25,3% (145/572) bzw. 23% (116/506). Dies zeigt, dass der Anteil an Cosuppression relativ niedrig ist. Mit dem *en*²⁹⁸-*fsKNOX* Konstrukt zeigten sogar nur 2,7% (15/556) der transgenen Pflanzen eine *stm* Phänokopie. Durch Isolierung und anschließende Sequenzierung dieses Konstruktes aus transgenen Pflanzen konnte die Anwesenheit in den Pflanzen und die Integrität des CaMV 35S Promotors nachgewiesen werden. Dasselbe Ergebnis wurde auch mit einem unabhängig hergestellten und ebenfalls verifizierten *en*²⁹⁸-*fsKNOX* Konstrukt in einem weiteren Transformationsexperiment erzielt.

3.1.6 Zusammenfassung der Daten

STM		Transkript/ Translations- produkt Länge in bp/AS	Phänokopie <i>stm</i> gesamt	Phänotyp [%]		WT	Total ^a
				Gelappte Blätter	Elongierte Internodien		
EN ²⁹⁸		1043/305	0.0			100.0	77
EN ²⁹⁸ -STM		2198/689	74.3			25.7	369
EN ²⁹⁸ -fsSTM		2190/317	53.6			46.4	528
EN ²⁹⁸ -STMΔHD		1941/626	79.0			21.0	238
EN ²⁹⁸ -STMΔC2		1368/412	1.3			98.7	77
EN ²⁹⁸ -STMΔN1		1859/576	65.3	32.0	2.7	75	
EN ²⁹⁸ -fsSTMΔN1		1858/140	49.7		50.3	153	
STMΔN1		933/277	26.0	72.4	1.6	504	
EN ²⁹⁸ -STMΔN2		1667/512	55.0		45.0	240	
STMΔN2		741/213	29.5		70.5	264	
EN ²⁹⁸ -STMΔN3		1529/461	49.4		50.6	81	
STMΔN3		603/167	21.1		78.9	284	
EN ²⁹⁸ -STMΔN4		1427/431	45.4		54.6	185	
EN ²⁹⁸ -STMΔN5		1328/394	30.1		69.9	322	
STMΔN5		402/100	4.7		95.3	274	
EN ²⁹⁸ -STMΔN6		1151/340	4.6		94.5	174	
EN ²⁹⁸ -KNOX		1373/414	55.2		44.8	406	
EN ²⁹⁸ -fsKNOX		1377/367	2.7		97.3	556	
KNOX		447/115	40.0		56.4	328	
fsKNOX		446/137	25.3		74.7	572	
EN ²⁹⁸ -KNOX/ELK		1601/490	68.1		31.9	144	
KNOX/ELK		675/191	76.6		21.1	440	
fsKNOX/ELK		674/140	23.0		77.0	506	

100 AS

Abb. 13: Phänotyp Frequenzen der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen. ^(a) Gesamtanzahl der Phänotypen in %. Die Schraffur deutet an, dass sich das *STM*-Fragment nicht mehr im Leseraster von *en*²⁹⁸ bzw. dem ATG befindet und stattdessen das +1 Leseraster exprimiert wird. *fs*: *frameshift* (Leserasterverschiebung).

3.2 Analyse der Transkriptionsfaktoren *KNAT1* und *KNAT2* mit der Hilfe von *CHRIS*

CHRIS wurde entwickelt, um die biologische Funktion von Transkriptionsfaktoren besser erforschen zu können, für die im Rahmen klassischer Untersuchungen bisher kein Funktionsverlust Phänotyp identifiziert werden konnte. Um zu belegen, dass *CHRIS* bei der Beantwortung dieser Fragestellung hilfreich ist und um die Spezifität von *CHRIS* bei sehr ähnlichen Proteinen zu untersuchen, habe ich im Rahmen dieser Arbeit *KNAT1* und *KNAT2* mit Hilfe von *CHRIS* analysiert.

KNAT1 und *KNAT2* sind wie *STM* Transkriptionsfaktoren der *KNOX*-Genfamilie. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von *KNAT1* und *KNAT2* miteinander, lässt sich eine Übereinstimmung von 45,8% feststellen (s. Anhang Abb. A7). Auffällig sind im N-terminalen Bereich von *KNAT1* mehrere kurze Asparagin- und Histidin-reiche Regionen (s. Anhang Abb. A3), ähnlich der Glutamin- und Histidin-reichen Region im N-terminalen Bereich von *STM* (s. Anhang Abb. A2). In *KNAT2* ist dagegen kein vergleichbarer Bereich zu finden (s. Anhang Abb. A4).

STM und *KNAT2* stimmen ebenfalls in etwa 45,8 % ihrer Aminosäuresequenz überein (s. Anhang Abb. A6). *KNAT2* wird im inneren Bereich des Sprossapikalmeristems exprimiert. Das Expressionsmuster entspricht also nahezu dem von *STM*. Im Infloreszenzmeristem ist *KNAT2* allerdings im Unterschied zu *STM* nicht aktiv (Dockx et al., 1995; Laufs et al., 1998).

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen *STM* und *KNAT1* liegt mit 49,3% etwas höher (s. Anhang Abb. A5). Das Expressionsmuster von *KNAT1* im Sprossapikalmeristem ist ähnlich dem Expressionsmuster von *STM*, beschränkt sich allerdings auf die periphere Zone. In der generativen Entwicklungsphase wird *KNAT1* im Unterschied zu *STM* in den inneren Zellschichten des Kortex entlang der primären Sprossachse, der Seitensprosse und der Pedicels exprimiert (Lincoln et al., 1994; Ori et al., 2000).

3.2.1 Die Konstrukte: 35S::*en*²⁹⁸-*KNAT1* und 35S::*en*²⁹⁸-*KNAT2*

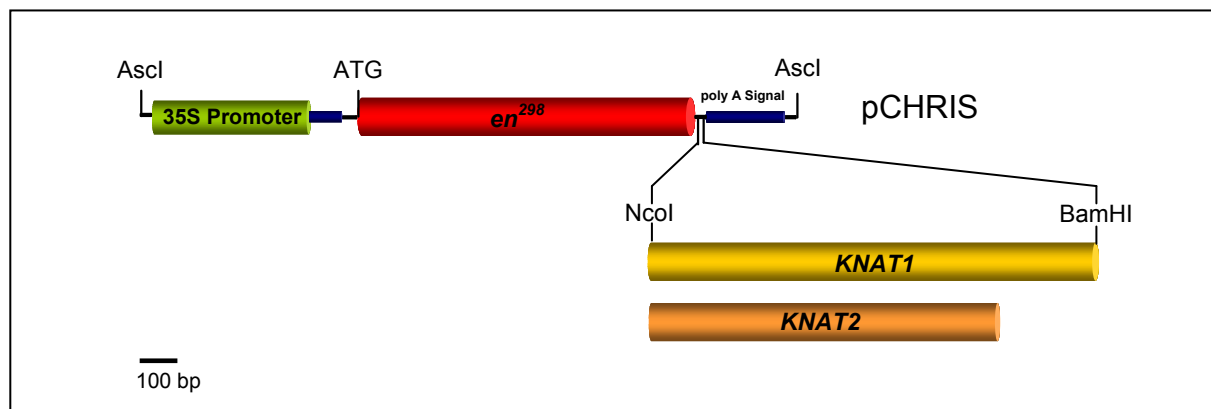


Abb. 14: Schematische Darstellung des 35S::*en*²⁹⁸-*KNAT1* und des 35S::*en*²⁹⁸-*KNAT2* Konstruktes

Das offene Leseraster von *KNAT1* bzw. das von *KNAT2* wurde jeweils mit den unter 2.1.3.1 angegebenen Primern mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia amplifiziert. Um die Expression als *En*²⁹⁸ Fusion zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Fragmente wie für die *STM* cDNA unter 3.1.1 beschrieben in pCHRIS kloniert. Die in Abb. 14 dargestellten Expressionskassetten wurden dann über die flankierenden Schnittstellen für *Ascl* in den binären Vektor pGPTV-Bar *Ascl* kloniert.

3.2.2 Phänotyp der transgenen *en*²⁹⁸-*KNAT2* Pflanzen

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden mit dem pGPTV-*en*²⁹⁸-*KNAT2* Konstrukt transformiert und alle BASTA resistenten Primärtransformanten analysiert. Lediglich 22,5% (49/218) dieser Pflanzen zeigten einen Phänotyp, der allerdings dem beschriebenen 35S::*KNAT2* Phänotyp entsprach (Lincoln et al., 1994; Pautot et al., 2001). Etwa 19% (41/218) der Keimlinge war recht klein und hatte stark gelappte Blätter mit sehr vielen Trichomen. Weitere 3,7% (8/218) waren etwas größer und zeigten nur mäßig gelappte Blätter. Ältere Blätter waren hier stärker gelappt als jüngere. Alle übrigen Pflanzen (77,5%, 169/218) unterschieden sich nicht von wildtypischen *Arabidopsis thaliana*, sowohl in der vegetativen, als auch in der generativen Entwicklungsphase.

Es konnten also in diesem Experiment der *EN*²⁹⁸-*KNAT2* Fusion leider keine zum Überexpressions-Phänotyp unterschiedlichen phänotypischen Veränderungen zugeordnet werden. Anzumerken ist allerdings, dass der *EN*²⁹⁸-*KNAT2* Phänotyp sehr stark dem Blattphänotyp der *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Pflanzen ähnelte (s. 3.1.3.2), der als Überexpressions-Phänotypanteil identifiziert wurde (s. 3.1.4). Diesem *STM* Deletionskonstrukt fehlten die N-terminalen Histidin- und Glutamin-reichen 110 Aminosäuren. Ähnliche Bereiche fehlen bereits dem nativen *KNAT2* Protein (s. Anhang Abb. A4, A6). Hier besteht möglicherweise ein Zusammenhang.

3.2.3 Phänotyp der transgenen *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen

In drei unabhängigen Experimenten wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit dem pGPTV-*en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt transformiert und die BASTA resistenten Primärtransformanten analysiert. Die transgenen Pflanzen, die *en*²⁹⁸-*KNAT1* exprimierten, zeigten keine Veränderung in der vegetativen Entwicklung im Vergleich zu wildtypischen *Arabidopsis thaliana* Columbia Pflanzen (Abb. 15 A und B). Ebenso wie im Wildtyp bildete sich nach im Durchschnitt 13 Rosettenblättern eine Infloreszenz, die allerdings in insgesamt 75,6% (508/672) der Primärtransformanten (Tabelle 2) phänotypische Veränderungen aufwies.

Experiment	Infloreszenz-Phänotyp		wildtypischer Phänotyp		Total ^a
	Anzahl	%	Anzahl	%	
1	56	74,6	19	25,4	75
2	345	75,5	112	24,5	457
3	107	76,4	33	23,6	140
Gesamt	508	75,6	164	24,4	672

Tabelle 2: Auszählung der transgenen *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen. ^(a) Die Gesamtanzahl der untersuchten BASTA resistenten Pflanzen, die das pGPTV-*en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt trugen.

Zum einen war die Länge der Internodien und der Pedicels (Blütenstiele) verkürzt. Darüber hinaus waren die Pedicels nach unten gebogen, so dass die Blüten bzw. die Schoten im Vergleich mit dem wildtypischen Phänotyp nicht nach oben sondern nach unten zeigten (Abb. 15 C verglichen mit D, F). Nicht nur der Winkel zwischen Pedicel und Sprossachse war verändert, sondern auch der Winkel zwischen Sprossachse und Seitenspross. Die Seitensprosse befanden sich nahezu im rechten Winkel zur primären Sprossachse (Abb. 15 D). Einige wenige Pflanzen wiesen teilweise zwischen zwei aufeinander folgenden Pedicels helle Steifen auf, d.h. einen schmalen Bereich, der scheinbar weniger Chlorophyll aufwies, als das umgebende Gewebe (Abb. 15 E, Pfeil). Des Weiteren ist in Abbildung 15 F und G zu sehen, dass in den transgenen Pflanzen, die das *en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt trugen, unter den gewählten Wachstumsbedingungen verstärkt sekundäre Infloreszenzen ausgewachsen sind. Dies ist ein Hinweis auf verminderte Apikaldominanz.

Die transgenen Pflanzen in Experiment 1 wurden etwas genauer hinsichtlich der Stärke des Phänotyps betrachtet. 57,3% (43/75) der Pflanzen zeigten sehr stark hängende Blüten und Schoten mit recht kurzen Pedicels und vielen sekundären Infloreszenzen, wie in Abbildung 15 D, F und G dargestellt. In 17,3% (13/75) der *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen zeigte sich dieser Phänotyp in leicht abgeschwächter Form. Der Phänotyp wird darüber hinaus in die nächste Generation vererbt, was am Beispiel von 23 T₂ Linien ausgehend von den *en*²⁹⁸-*KNAT1* Primärtransformanten (T₁) gezeigt wurde. In 20 dieser Linien konnte eine variierende Anzahl an Nachkommen mit dem beschriebenen Phänotyp beobachtet werden.

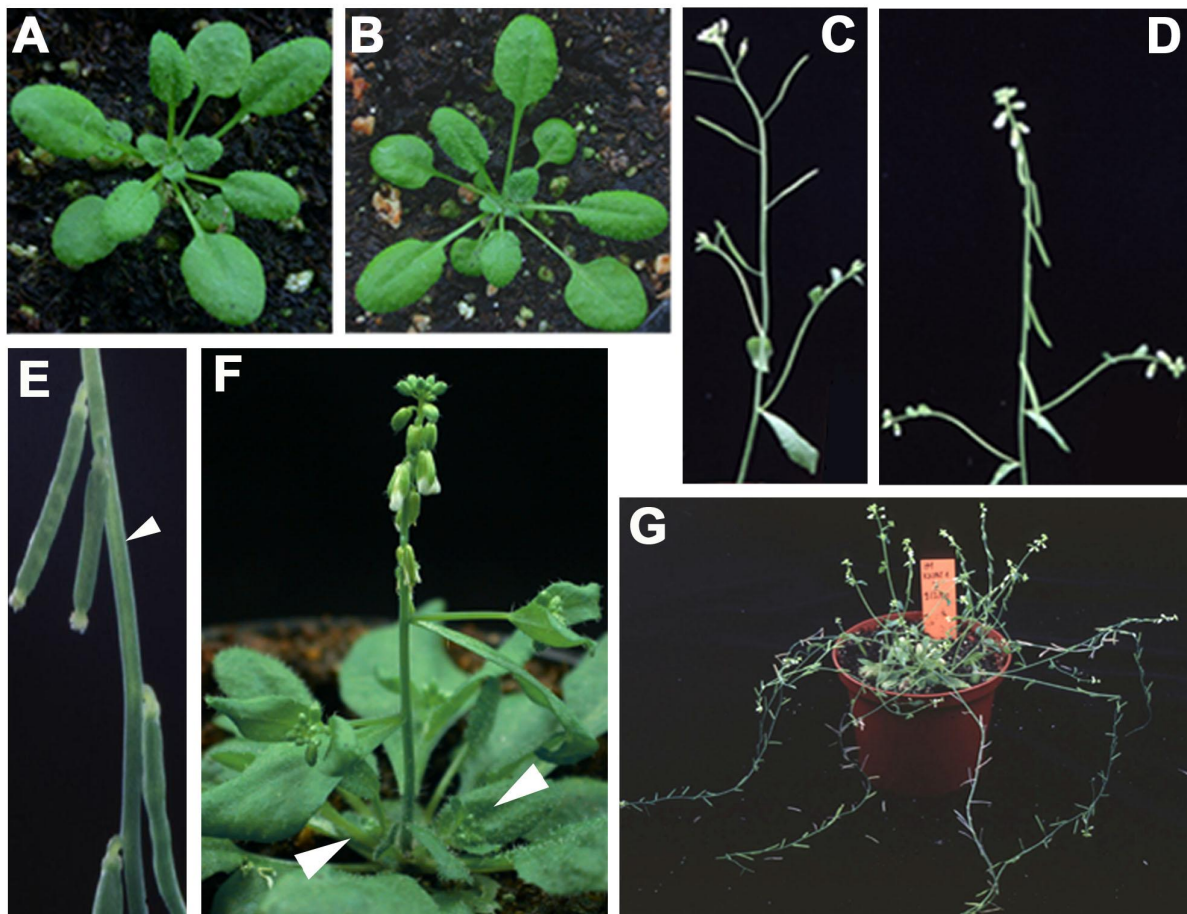


Abb. 15: Phänotyp der en^{298} -*KNAT1* Pflanzen verglichen mit Wildtyp *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia (Col-0). (A) Vegetative Rosette eines Wildtyp Keimlings, Col-0, (B) Vegetative Rosette einer en^{298} -*KNAT1* Pflanze, (C) Infloreszenz einer Wildtyp Pflanze, (D) Infloreszenz einer en^{298} -*KNAT1* Pflanze mit hängenden Schoten, Winkel zwischen Sprossachse und Seitenspross im Vergleich zum Wildtyp verändert (E) Detailaufnahme der Infloreszenz einer en^{298} -*KNAT1* Pflanze. Deutlich zu sehen sind die kurzen nach unten gebogenen Pedicels. Der Pfeil markiert einen hellen Steifen im Gewebe von der Länge eines Internodiums, (F) en^{298} -*KNAT1* Pflanze mit auswachsenden sekundären Infloreszenzen (Pfeile), (G) en^{298} -*KNAT1* Pflanze mit vielen ausgewachsenen sekundären Infloreszenzen

3.2.4 Identifizierung der *Arabidopsis thaliana* Mutante *brevipedicellus* (*bp*) als Funktionsverlustmutante von *KNAT1*

Der beschriebene Phänotyp der en^{298} -*KNAT1* Pflanzen ähnelt der in der Literatur beschriebenen Ethylmethansulfonat-induzierten Mutante *brevipedicellus* (*bp*) (Koornneef et al., 1983), die, zu dem Zeitpunkt als ich im Rahmen meiner Dissertation diese Experimente durchgeführt habe, molekular nicht weiter charakterisiert war.

Die Ähnlichkeit der Phänotypen sowie die Tatsache, dass sowohl *KNAT1* als auch *bp* auf Chromosom 4 kartieren, führte zu der Annahme, dass *bp* der Funktionsverlust Phänotyp von *KNAT1* sein könnte.

3.2.4.1 Der Phänotyp der *Arabidopsis thaliana* Mutante *brevipedicellus* (*bp*)

Die Abbildung 16 zeigt den Phänotyp des *bp-1* Allels im Vergleich mit dem *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* Wildtyp.

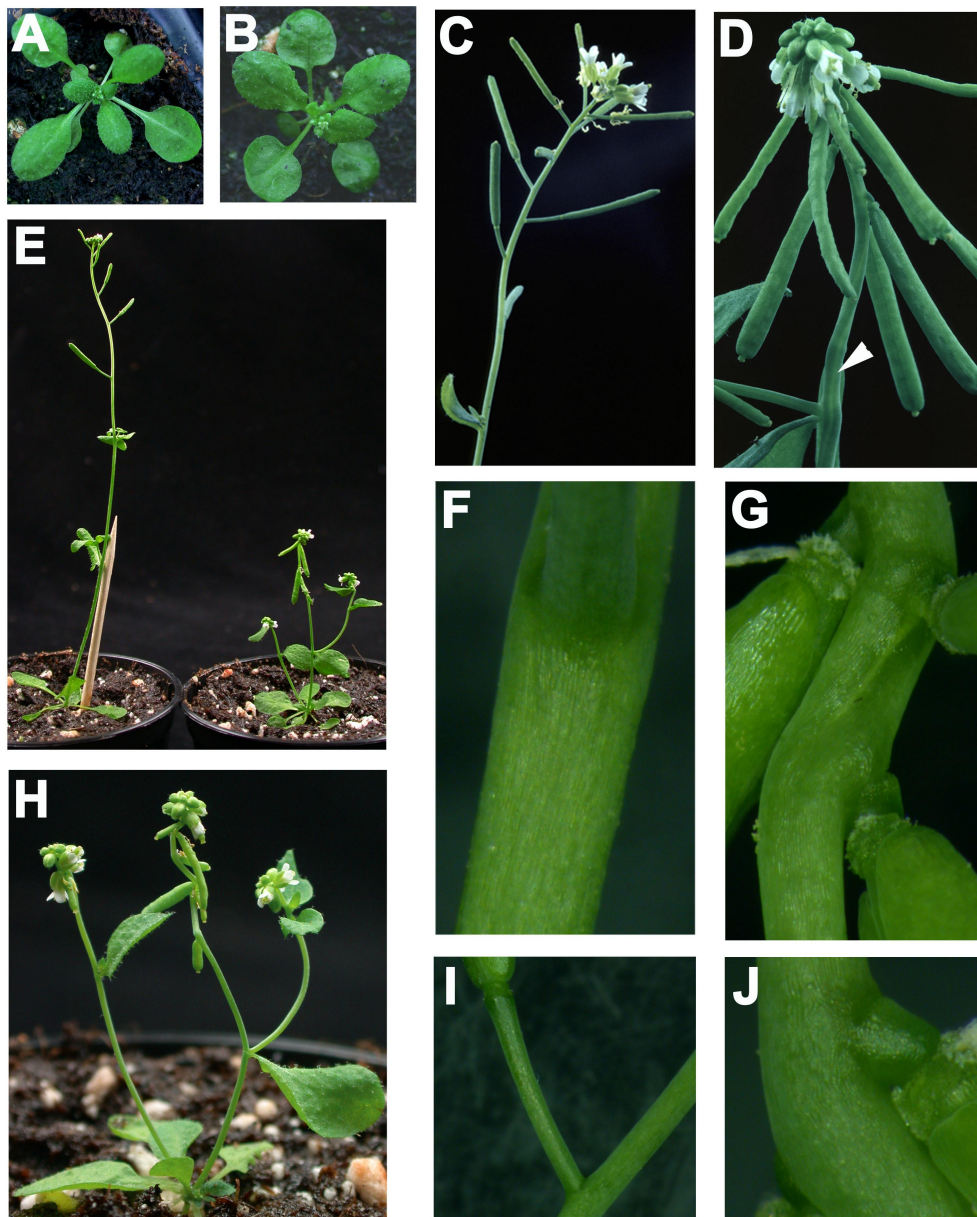


Abb. 16: Phänotyp der *brevipedicellus* Mutante (*bp-1*) verglichen mit Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* (Ler). (A) Ler Wildtyp, Rosette, (B) *bp-1* Mutante im Ler Hintergrund, Rosette, (C) Ler Infloreszenz mit nach oben stehenden Blüten und Schoten, lange Pedicels, (D) *bp-1* Infloreszenz mit nach unten hängenden Blüten und Schoten, kurze Pedicels. Die Sprossachse ist im Bereich der Nodien gekrümmt. Der Pfeil markiert einen hellen Streifen im Gewebe. (E) Wildtyp Ler Pflanze (links) im Größenvergleich mit *bp-1* Mutante (rechts). In Wildtyp Ler Achselmeristeme der Rosette nicht aktiviert, Seitensprosse nicht ausgewachsen. Die *bp-1* Mutante mit sekundärer Infloreszenz und Seitenspross (F) Detailaufnahme eines Bereichs der Sprossachse von Wildtyp Ler, (G) Detailaufnahme eines Bereichs der Sprossachse von *bp-1*. Ein heller Gewebestreifen, der unterhalb des Nodiums entspringt, schraubt sich entlang der Sprossachse nach unten. (H) *bp-1* Mutante mit sekundärer Infloreszenz, die annähernd die gleiche Größe hat wie die primäre Infloreszenz, (I) Wildtyp Ler Detailaufnahme eines Pedicels, (J) Detailaufnahme eines kurzen Pedicels von *bp-1*.

Die *bp-1* Mutante zeigt eine wildtypische Rosette (Abb. 16 B). Erst nach der Ausbildung der Infloreszenz wird der Phänotyp deutlich. Die Internodien und die Pedicels sind verkürzt, die Sprossachse ist gekrümmt (Abb. 16 D). Die gesamte Pflanze ist dadurch wesentlich kleiner als gleich alte Wildtyp *Ler Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Abb. E). Die Pedicels sind nach unten gebogen, so dass die Blüten und Schoten im Gegensatz zum Wildtyp nach unten zeigen (Abb. 16 D, G, J). Ein heller Gewebestreifen, der scheinbar weniger Chlorophyll enthält als das umgebende Gewebe, schraubt sich entlang der Sprossachse (Abb. 16 D (Pfeil), G).

Darüber hinaus wachsen in *bp-1* Mutanten unter gleichen Wachstumsbedingungen mehr sekundäre Infloreszenzen aus als in Wildtyp Pflanzen. Auch die Seitensprosse entwickeln sich früher (Abb. 16 E, H). Dies lässt auf eine verminderte Apikaldominanz schließen.

3.2.4.2 Vergleich zwischen *en*²⁹⁸-*KNAT1* und *bp-1* Pflanzen

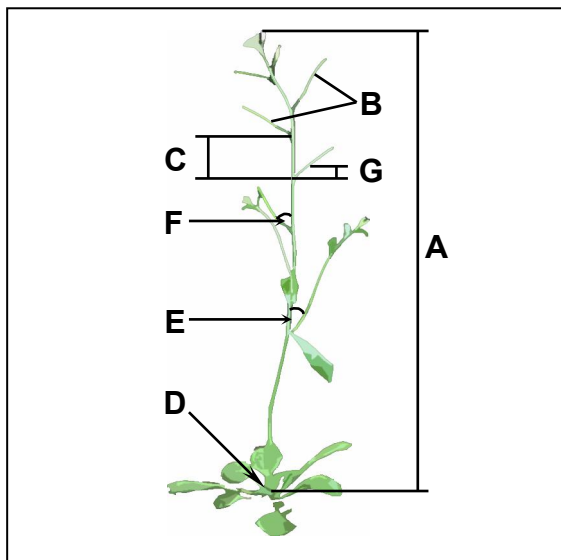


Abb. 17: *Arabidopsis thaliana*. Verglichen wurden (A) die Höhe der Pflanzen, (B) die Anzahl an Blüten/Schoten, (C) die durchschnittliche Länge der Internodien, (D) die Anzahl sekundärer Infloreszenzen, (E) der Winkel zwischen Sprossachse und Seitenspross, (F) der Winkel zwischen Sprossachse und Pedicel und (G) die Länge der Pedicels.

Wie die Beschreibungen der *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen und der *brevipedicellus* (*bp-1*) Mutante zeigen, kopieren die *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen unterschiedliche Merkmale der *bp* Mutante.

Um dies mit Daten zu belegen, wurden die in Abbildung 17 angegebenen Größen 50 Tage nach der Aussaat bei *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen, dem *brevipedicellus* Allel *bp-1*, sowie bei *Arabidopsis thaliana* Columbia und Landsberg *erecta* Wildtyp Pflanzen bestimmt. Da sich die *bp-1* Mutante im *Ler* Hintergrund, das *en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt aber im Ökotyp Columbia befindet, wurden die Messergebnisse zunächst mit den Zahlen der entsprechenden Wildtyp-Pflanzen und anschließend diese Ergebnisse untereinander verglichen. Die entsprechenden Wildtyp-Pflanzen wurden unter den gleichen Bedingungen, d.h. in der gleichen Pflanz-

schale, wie die *bp-1* Mutanten bzw. die *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen herangezogen, um die Messergebnisse vergleichbar zu machen. Dies ist notwendig, da alle untersuchten Aspekte von Umweltfaktoren wie Temperatur, Lichtqualität, Wasserstress und Insektenbefall beeinflusst werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

	A	B	C	D	E	F	G
Genotyp	Höhe (cm)	Anzahl Blüten/Schoten	Länge Internodien (cm)	Anzahl sekundärer Infloreszenzen	Winkel (°) Seitenspross	Pedicel	Länge Pedicel (cm)
Ler	17.7 ± 0.2	28.3 ± 0.2	0.56 ± 0.01	0.14 ± 0.03	53 ± 2	56 ± 2	0.52 ± 0.05
bp-1/Ler	5.9 ± 0.2	29.1 ± 0.2	0.18 ± 0.01	1.8 ± 0.1	92 ± 3	132 ± 3	0.09 ± 0.01
Δ	11.8 / 67%		0.38 / 68%				0.43 / 83%
Col	35.5 ± 0.3	43.9 ± 0.3	0.66 ± 0.03	0.04 ± 0.01	62 ± 2	77 ± 1	0.69 ± 0.10
en ²⁹⁸ -KNAT1/Col	23.6 ± 0.4	45.2 ± 0.5	0.46 ± 0.04	2.2 ± 0.2	92 ± 1	127 ± 1	0.20 ± 0.10
Δ	11.9 / 34%		0.2 / 30%				0.49 / 71%

Tabelle 3: Vergleich zwischen en²⁹⁸-KNAT1/Col und bp-1/Ler Pflanzen. Die Pflanzen (n ≥ 20, en²⁹⁸-KNAT1: n=60) wurden 50 Tage nach der Aussaat analysiert. Die durchschnittliche Länge der Internodien wurde für die ersten 3 cm (bp-1/Ler) bzw. 10 cm (en²⁹⁸-KNAT1/Col) der Infloreszenz bestimmt, beginnend an der ersten Blüte. Die Buchstaben A bis G oberhalb der Tabelle beziehen sich auf Abbildung 16. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Obwohl sich das bp-1 Allel im Landberg erecta Ökotyp befindet, führt die Expression von en²⁹⁸-KNAT1 im Columbia Hintergrund zu nahezu identischen Veränderungen des entsprechenden Wildtyp Phänotyps. Die Länge des Pedicels in en²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen ist um 71% reduziert im Vergleich zu 83% in bp-1 Mutanten (Spalte G) und der Winkel zwischen Sprossachse und Pedicel lag bei 127° im Vergleich zu 132° (Spalte F). Im Wildtyp beträgt dieser Winkel lediglich 56° bzw. 77°.

Darüber hinaus standen sowohl in bp-1 Mutanten als auch in en²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen die Seitensprosse nahezu im rechten Winkel zur Sprossachse (92°), während die Winkel in den entsprechenden Wildtyp Pflanzen bei 53° bzw. 62° liegen (Spalte E).

Vergleichbar ist auch die erhöhte Anzahl an sekundären Infloreszenzen (Spalte D). Unter den gewählten Wachstumsbedingungen sind in nahezu allen Wildtyp Pflanzen keine sekundären Infloreszenzen ausgewachsen, während die en²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen und bp-1 Mutanten im Durchschnitt etwa zwei sekundäre Infloreszenzen aufwiesen.

Die durchschnittliche Länge der Internodien (Spalte C), die in bp-1 Mutanten um 68% reduziert ist, war in den en²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen ebenfalls verkürzt, allerdings lediglich um 30%. Dies spiegelt sich dann in der Höhe der Pflanzen wieder (Spalte A). Bp-1 Mutanten sind um 67% kleiner als Ler Pflanzen, während en²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen nur um

34% kleiner waren als die Col Pflanzen. Die Anzahl der Blüten bzw. Schoten ist sowohl in *bp-1* Mutanten als auch in *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen nicht betroffen (Spalte B).

In einigen der *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen ist, wie in *bp-1* Mutanten der Fall, entlang der Sprossachse ein heller Gewebestreifen zu sehen, der scheinbar weniger Chlorophyll enthält als das umgebende Gewebe. Unterschiedlich ist allerdings, dass sich dieser Streifen in *bp-1* Mutanten um die Sprossachse windet, während er in den *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen gerade von Nodium zu Nodium verläuft (vgl. Abb. 15 E, 16 G). Die Windung ist bedingt durch die mehrfache Krümmung der Sprossachse in *bp-1* Mutanten, die in den *en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen nicht zu beobachten ist. Hier ist die Sprossachse gerade.

Dieser Unterschied ist möglicherweise bedingt durch den *Arabidopsis thaliana* Ökotyp. Das *bp-1* Allel befindet sich im *Ler* Hintergrund, während mit dem *en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt *Arabidopsis thaliana* Columbia Pflanzen transformiert wurden. Die Krümmungen in der Sprossachse könnten sich also durch den gleichzeitigen Ausfall des *ERECTA* Gens ergeben.

3.2.4.3 Ein weiteres *brevipedicellus* Allel: *bp-R*

In einem Mutagenese Experiment bei dem Samen von homozygoten *ufo-6* Mutanten (Beschreibung des *ufo* Phänotyps siehe Bowman, 1995) mit Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt wurden, konnte eine Pflanze identifiziert werden, die neben dem *ufo* Phänotyp den *brevipedicellus* Phänotyp zeigte (Simon, persönliche Mitteilung). Dies spricht dafür, dass in diesem Experiment möglicherweise ein weiteres unabhängiges Allel von *bp* induziert wurde. Für meine Arbeit wurden mir von Rüdiger Simon freundlicherweise Samen dieser Pflanze zur Verfügung gestellt, weshalb diese Mutante als *bp-R* bezeichnet wurde.

3.2.4.3.1 Phänotyp der *bp-R* Mutante

Die *bp-R* Mutante ist ebenso wie die *bp-1* Mutante deutlich kleiner als gleich alte *Arabidopsis thaliana* *Ler* Pflanzen (Abb. 17 A). Dies liegt auch bei *bp-R* Pflanzen an stark verkürzten Internodien (Abb. 17 B, C, D). Die Pedicels sind ebenfalls stark verkürzt und nach unten gebogen, so dass die Blüten bzw. Schoten nach unten hängen. Der Phänotyp der Blüten und Schoten ist bedingt durch die *ufo* Mutation (Abb. 17 D, F, G).

Auch in *bp-R* Mutanten ist entlang der Sprossachse ein heller Gewebestreifen zu finden, der weniger Chlorophyll enthält als das umgebende Gewebe (Abb. 17 G, Pfeil). Dieser Streifen windet sich allerdings nicht um die Sprossachse.

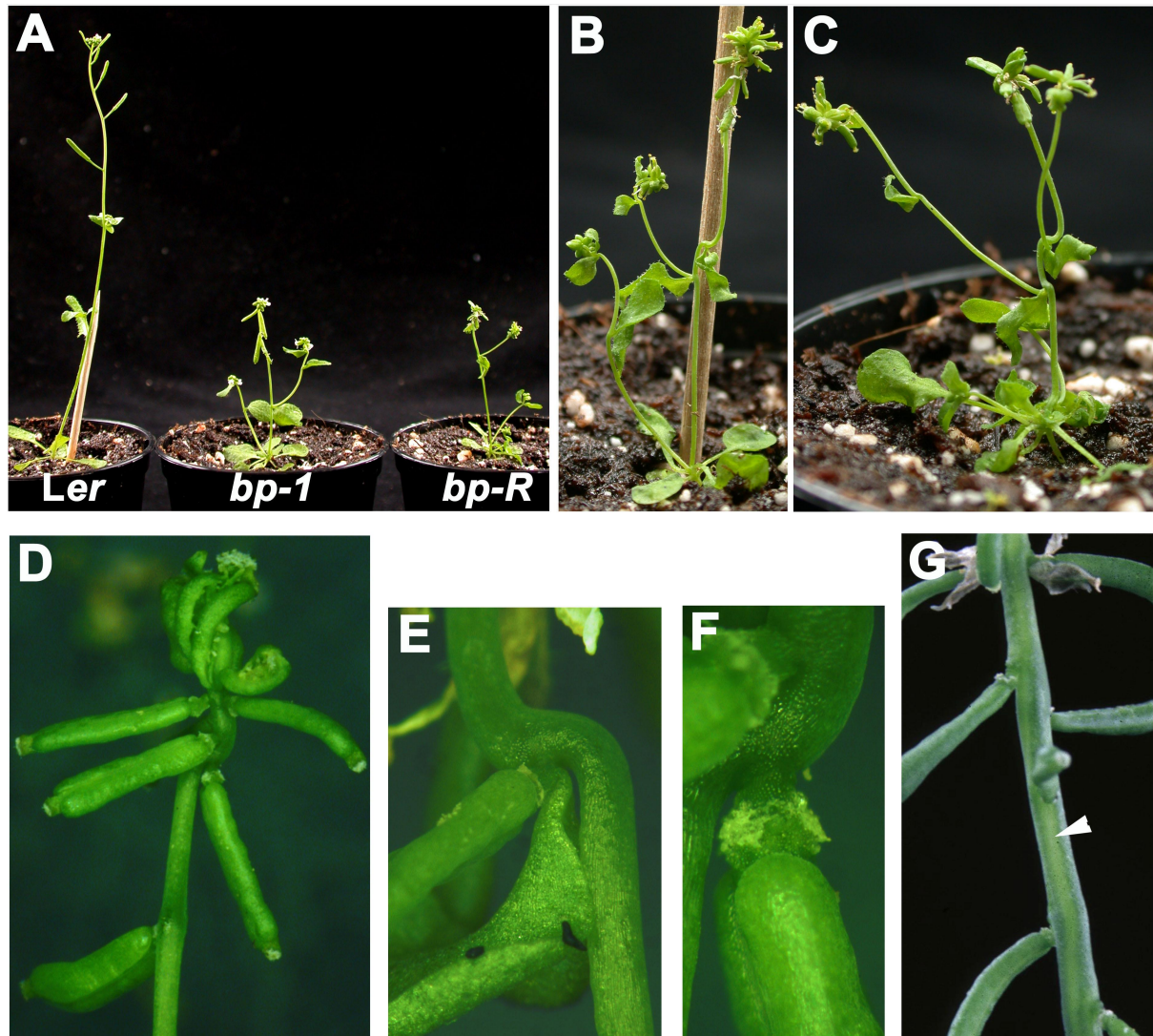


Abb. 17: Phänotyp der *bp-R* Mutante (A) Größenvergleich zwischen Wildtyp *Ler* Pflanze, *bp-1* Mutante und *bp-R* Mutante. Achselmeristeme der Rosette in *Ler* nicht aktiviert, Seitensprosse sind nicht ausgewachsen. *bp-1* und *bp-R* Mutanten mit sekundären Infloreszenzen und Seitensprossen. (B) *bp-R* Pflanze mit ausgewachsener sekundärer Infloreszenz. Rosette ist wildtypisch. (C) *bp-R* Pflanze mit sekundären Infloreszenzen und zwei Seitensprossen, die die Hauptsprossachse überragen. (D) *bp-R* Infloreszenz mit nach unten hängenden Schoten, kurze Pedicels. Die Form der Schoten hängt mit der *ufo* Mutation zusammen. (E) Detailaufnahme eines Bereichs der Sprossachse von *bp-R*. Die Sprossachse ist im Bereich des Nodiums gekrümmt. (F) Detailaufnahme eines Pedicels von *bp-R*, (G) *bp-R* Infloreszenz mit hellem Gewebestreifen (Pfeil)

Die Krümmung der Sprossachse im Bereich der Nodien, ein weiteres Merkmal der *bp-1* Mutanten, ist auch in *bp-R* Mutanten zu beobachten (Abb. 17 E).

Darüber hinaus scheint wie in *bp-1* Mutanten die Apikaldominanz vermindert zu sein. Es wachsen unter gleichen Wachstumsbedingungen mehr sekundäre Infloreszenzen aus als in Wildtyp *Ler* Pflanzen (Abb. 17 B, C). Die Seitensprosse überragen in einigen *bp-R* Pflanzen sogar die Hauptsprossachse (Abb. 17 C).

3.2.4.3.2 Vergleich zwischen *bp-R*, *bp-1* und *Ler* Pflanzen

In Tabelle 4 werden die unter 3.2.4.3.1 beschriebenen phänotypischen Merkmale der *bp-R* Mutante mit Daten belegt und mit denen der *bp-1* Mutante aus Tabelle 3 verglichen.

	A	C	D	E	F	G
Genotyp	Höhe (cm)	Länge Internodien (cm)	Anzahl sekundärer Infloreszenzen	Winkel (°) Seitenspross	Pedicel	Länge Pedicel (cm)
<i>Ler</i> ^a	17.7 ± 0.2	0.56 ± 0.01	0.14 ± 0.03	53 ± 2	56 ± 2	0.52 ± 0.05
<i>bp-1/Ler</i> ^a	5.9 ± 0.2	0.18 ± 0.01	1.8 ± 0.1	92 ± 3	132 ± 3	0.09 ± 0.01
Δ ^a	11.8 / 67%	0.38 / 68%				0.43 / 83%
<i>Ler</i>	16.3 ± 1.9	0.78 ± 0.09	0.45 ± 0.15	52 ± 7	53 ± 9	0.35 ± 0.06
<i>bp-R/Ler</i>	4.6 ± 0.8	? ^b	2.9 ± 0.9	85 ± 7	122 ± 10	< 0,05
Δ	11.7 / 72%	? ^b				> 0.3 / 86%

Tabelle 4: Vergleich zwischen *bp-R* und *bp-1* Pflanzen. Die Pflanzen (*Ler*^a und *bp-1/Ler*^a: n ≥ 20, *Ler*: n = 11, *bp-R*: n = 20) wurden 50 Tage nach der Aussaat analysiert. Die durchschnittliche Länge der Internodien wurde für die ersten 3 cm der Infloreszenz bestimmt, beginnend an der ersten Blüte. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Buchstaben A bis G oberhalb der Tabelle beziehen sich auf die Abbildung 16. ^(a) Die Daten für die *bp-1* Pflanzen sind Tabelle 3 entnommen. ^(b) Die Blüten bzw. Schoten drängten sich bei den hier untersuchten *bp-R* Pflanzen an der Spitze der Infloreszenz auf weniger als 3 cm (s. Abb. 17 A – C), so dass es nicht möglich war, die Länge der Internodien genau zu bestimmen.

Die *bp-R* und die *Ler* Pflanzen wurden alle unter den gleichen Wachstumsbedingungen, das heißt in der gleichen Pflanzschale, herangezogen. Trotzdem sind die Pflanzen weniger einheitlich gewachsen als die *bp-1* Pflanzen und ihre entsprechenden *Ler* Kontrollpflanzen, was sich in der Standardabweichung widerspiegelt.

Die Tabelle 4 zeigt, dass alle gemessenen Werte der *bp-R* Mutante den Werten für die *bp-1* Mutante nahezu entsprechen. Die *bp-R* Mutanten sind um 72% kleiner als die Wildtyp Pflanzen, verglichen mit 62% bei den *bp-1* Mutanten (Spalte A). Die genaue Länge der Internodien (Spalte C) konnte bei den ausgemessenen *bp-R* Pflanzen nicht bestimmt werden, da sich unter den herrschenden Wachstumsbedingungen die Schoten auf weniger als 3 cm an der Spitze der Infloreszenz drängten (s. Abb. 17 A - C). Es kann jedoch gesagt werden, dass die Internodien deutlich kürzer sind als im Wildtyp. Wie in Abbildung 17 G zu sehen ist, verteilten sich bei einer anderen Aussaat

zu einem früheren Zeitpunkt die Schoten allerdings auf einen längeren Bereich der Sprossachse. Diese Pflanzen waren aber ebenfalls deutlich kleiner als die entsprechenden *Ler* Kontrollpflanzen.

Vergleichbar ist auch die erhöhte Anzahl an sekundären Infloreszenzen (Spalte D). Unter den herrschenden Wachstumsbedingungen ist beim Wildtyp lediglich bei jeder zweiten Pflanze eine sekundäre Infloreszenz ausgewachsen. Die *bp-R* Pflanzen wiesen im Durchschnitt drei sekundäre Infloreszenzen auf, was vergleichbar mit den zwei sekundären Infloreszenzen der *bp-1* Pflanzen unter anderen Bedingungen ist.

Die Seitensprosse stehen in *bp-R* Mutanten ebenso wie in *bp-1* Mutanten nahezu im rechten Winkel von der Sprossachse ab (85°, Spalte E). Die Länge der Pedicels und der Winkel der Pedicels zur Sprossachse (Spalte F und G) ist ebenfalls vergleichbar. Sie sind 86% kürzer als im Wildtyp und stehen in einem Winkel von 122° zur Sprossachse.

3.2.4.3.3 Kreuzung der *bp-R* mit *bp-1* Pflanzen

Der Nachweis, dass *bp-R* ein weiteres Allel von *brevipedicellus* ist, wurde durch drei unabhängige Kreuzungen von homozygoten *bp-R* mit homozygoten *bp-1* Pflanzen erbracht, aus denen 15 Linien hervorgegangen sind. Die rezessive Mutation *ufo-6* fungierte dabei als Marker, dass tatsächlich eine Kreuzung stattgefunden hatte.

Alle 15 F₁ Nachkommen zeigten den *brevipedicellus* Phänotyp aber nicht den *ufo-6* Phänotyp. Das bedeutet, da *brevipedicellus* ebenfalls eine rezessive Mutation ist, dass *bp-R* und *bp-1* allelisch sind.

3.2.4.4 **Das *KNAT1* Transkript in *bp-1* und *bp-R* Mutanten**

Bp-1 und *bp-R* sind EMS-induzierte Mutationen. Die Mutagenese mit EMS führt vornehmlich zu Punktmutationen (Sega, 1984; Burns et al., 1986). Aufgrund der beobachteten und beschriebenen Phänotypen ergab sich die Annahme, dass bei *bp-1* und *bp-R* Pflanzen diese Punktmutationen im *KNAT1* Gen liegen könnten.

Es wurde eine RT-PCR (s. 2.2.16, 2.2.17) durchgeführt, um das *KNAT1* Transkript aus *bp-1* und *bp-R* RNA zu amplifizieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt. Zu sehen ist, dass lediglich in der cDNA von *bp-R* Infloreszenzen das *KNAT1* Transkript nachgewiesen werden konnte. Die schwache Bande im Bereich von 2,6 kb resultiert aus einer geringen Verunreinigung mit genomischer DNA. Es war nicht möglich das *KNAT1* Transkript aus zwei unabhängigen *bp-1* Infloreszenz cDNA Präparationen zu isolieren (Abb. 18, bp und bp*). Dieses Ergebnis sprach für eine Deletion.

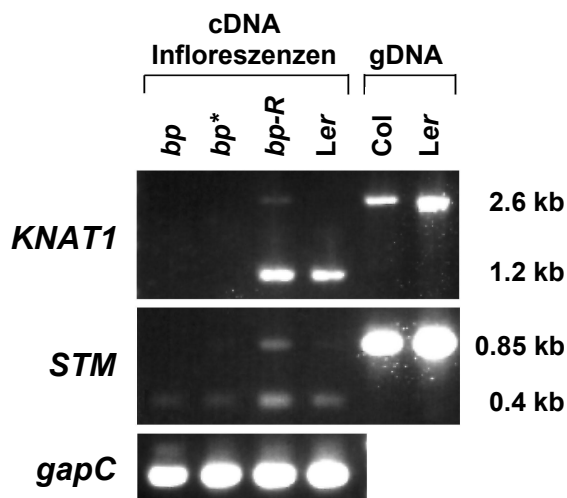


Abb. 18: Nachweis des *KNAT1* Transkriptes mittels PCR in cDNA von Infloreszenzen und genomischer DNA (gDNA). *Bp* und *bp** sind zwei unabhängige cDNA Präparationen. Zur Kontrolle der cDNA Qualität wurden die gleichen cDNA Präparationen mit Primern spezifisch für ein *STM* Fragment und ein Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*gapC*) Fragment (Primer s. 2.1.3.1) amplifiziert.

Um die Qualität der beiden *bp* cDNA Präparationen zu testen, das heißt, um nachzuweisen, dass es möglich ist gering exprimierte Gene aus diesen Präparationen zu amplifizieren, wurden *STM* spezifische Primer eingesetzt. Die Abbildung 18 zeigt, dass in beiden *bp* cDNA Präparationen das 400 bp *STM*-Fragment genau wie in der Wildtyp *Ler* und der *bp-R* cDNA nachgewiesen werden konnte, allerdings in einer geringeren Konzentration.

Die anschließende Sequenzierung des *KNAT1* Transkriptes aus *bp-R* Infloreszenz cDNA hat allerdings gezeigt, dass die Sequenz des offenen Leserasters im Vergleich mit der wildtypischen *Ler KNAT1* Sequenz (s. Anhang A3) keine Unterschiede aufwies. Es handelt sich bei der *bp-R* Mutation auch nicht um eine große Deletion der Promotorregion, wie in einem *Southern* Experiment gezeigt wurde (Abb. 20). Weitere Möglichkeiten sind eine kleinere Deletion, die bei der *Southern* Analyse nicht aufgedeckt werden konnte, oder Basenaustausche in der Promotorregion. Um dies zu klären, wurde versucht mit einer großen Anzahl unterschiedlicher Primer die Promotorregion zu amplifizieren. Dies war leider bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erfolgreich.

Neben der RT-PCR wurde eine *in-situ* Hybridisierung einer DIG-markierten *KNAT1 antisense* RNA-Sonde (s. 2.2.18) auf Gewebeschnitten von *Ler*, *bp-1* und *bp-R* Infloreszenzen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt. Zur Kontrolle wurde mit einer *KNAT1 sense* RNA-Sonde hybridisiert, was kein Signal ergab.

Die Hybridisierung der *KNAT1 antisense* RNA-Sonde auf *Ler* Gewebeschnitten zeigte wie erwartet das unter 1.3.2 beschriebene Expressionsmuster von *KNAT1* (Abb. 19 B). Expression ist in den inneren Zellschichten des Kortex entlang der Sprossachse und der Pedicels zu finden, aber nicht im Infloreszenzmeristem. In *bp-1* Infloreszenzen war das *KNAT1* Transkript mit der gleichen Sonde, wie nach dem RT-PCR Ergebnis zu erwarten, nicht detektierbar (Abb. 19 A).

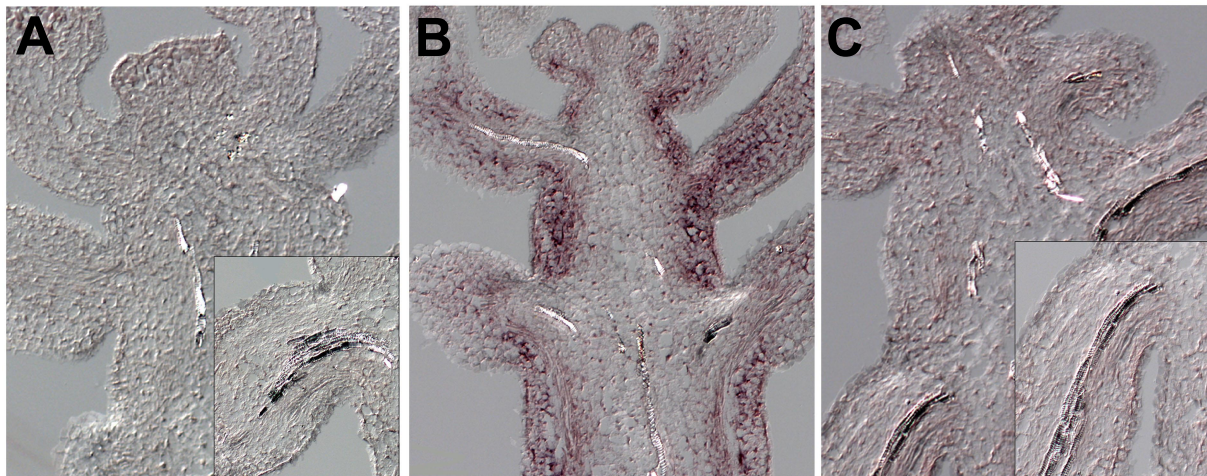


Abb. 19: In-situ Hybridisierung mit DIG markierter *KNAT1 antisense* RNA Sonde. Gewebeschnitte von *Arabidopsis thaliana* (A) *bp-1* Infloreszenz, (B) Wildtyp Ler Infloreszenz sowie (C) *bp-R* Infloreszenz. Die Vergrößerungen in (A) und (C) zeigen die nach unten gebogenen Pedicels im Detail.

Die *in-situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten von *bp-R* Infloreszenzen mit der *KNAT1 antisense* RNA-Sonde führte allerdings ebenfalls zu keinem spezifischen Signal (Abb. 19 C), obwohl das *KNAT1* Transkript über RT-PCR in Infloreszenz-cDNA nachgewiesen werden konnte. Ein schwaches Signal, über die gesamte Infloreszenz verteilt, ist bei Betrachtung unterschiedlicher Schnitte jedoch denkbar. Das heißt, das Transkript ist möglicherweise unspezifisch über die gesamte Infloreszenz verteilt aufgrund eines gestörten räumlichen Expressionsmusters. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Mutation in der *KNAT1* Promotorregion liegen, die eine Sequenzierung dieser Region aufdecken wird.

In Abbildung 19 A und C wird darüber hinaus deutlich, dass die ganz jungen Blüten in *bp-1* und *bp-R* Pflanzen genau wie im Wildtyp nach oben zeigen. Erst im Laufe der Entwicklung kommt es zu der beschriebenen charakteristischen Krümmung der Pedicels und damit zu den hängenden Schoten (Abb. 19 A, C, Detailbild).

3.2.4.5 Southern-Analyse mit genomischer DNA von *bp-1* und *bp-R* Mutanten

Um festzustellen, ob es sich bei den *bp-1* und *bp-R* Mutationen um Deletionen handelt wurde ein genomischer *Southern-Blot* (s. 2.2.14) angefertigt und mit einer radioaktiv-markierten DNA Sonde hybridisiert, die das komplette offene Leseraster von *KNAT1* umfasste (*KNAT1*-ORF, 2.1.3.4)

Abbildung 20 A zeigt schematisch die genomische Struktur des *KNAT1* Gens. Das nächste Gen stromaufwärts ist 8 kb, das nächste Gen stromabwärts ist 11 kb entfernt. Die genomische DNA wurde mit unterschiedlichen Enzymen geschnitten, so dass mit der Sonde *KNAT1*-ORF ein möglichst großer Bereich zwischen den flankierenden Genen abgedeckt wurde.

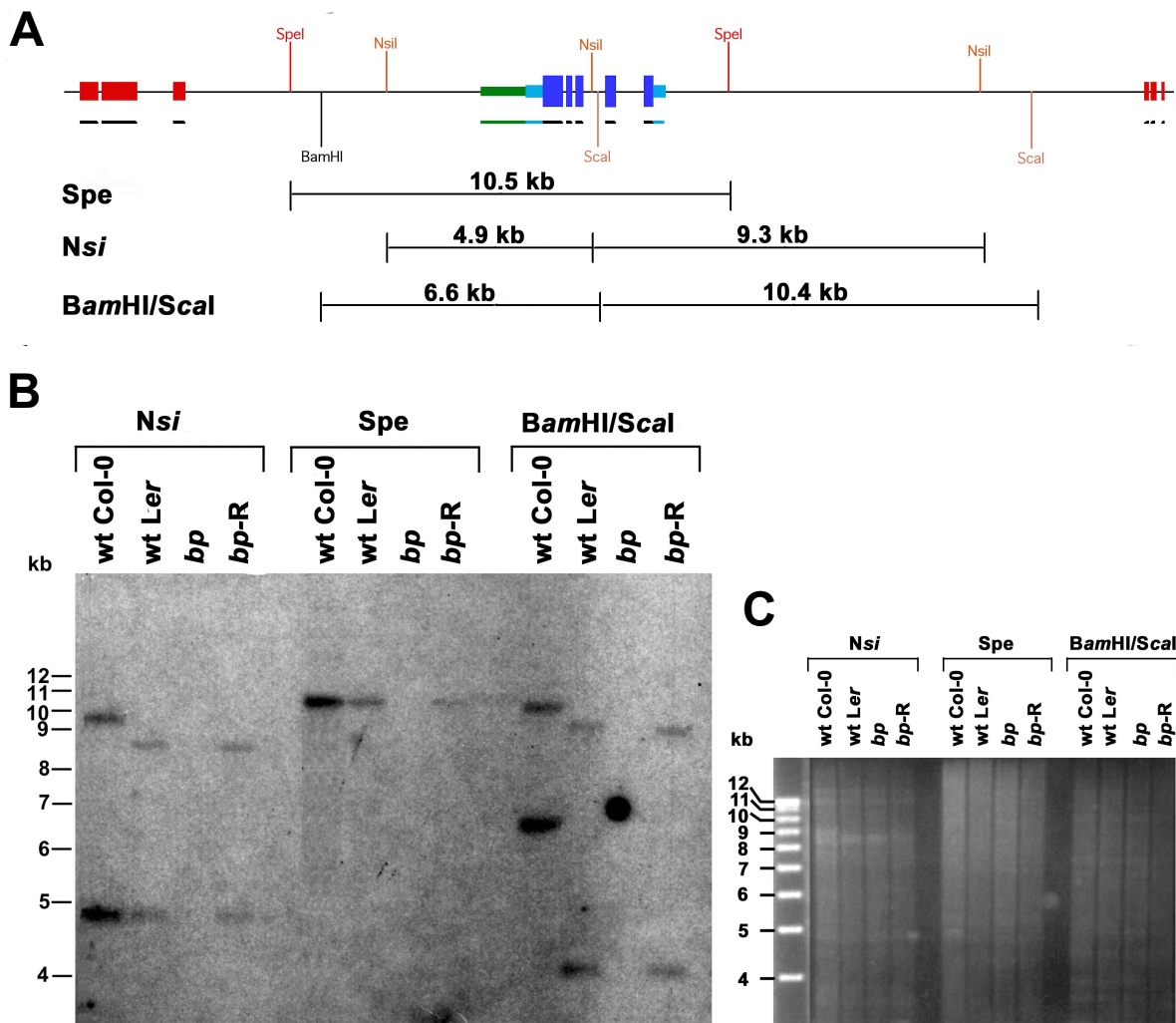


Abb. 20: Southern Analyse: genomische DNA von Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 und Ler sowie von *bp-1* und *bp-R* Mutanten hybridisiert mit *KNAT1*-ORF DNA Sonde. (A) Genomische Struktur des *KNAT1* Gens und erwartete Fragmentlängen nach Restriktionsverdau der genomischen DNA von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 mit den angegebenen Enzymen, (B) Autoradiographie nach Hybridisierung des Southern-Blots mit *KNAT1* DNA Sonde, die das gesamte offene Leseraster umfasst (*KNAT1*-ORF), (C) EtBr gefärbtes Agarosegel, das die vergleichbaren Mengen genomischer DNA zeigt. ORF: *open reading frame* (offenes Leseraster).

Die Autoradiografie nach der Hybridisierung des *Southern-Blots* mit der *KNAT1*-ORF Sonde zeigte kein Signal in den Spuren mit genomischer DNA von *bp-1* Mutanten, das heißt die Deletion umfasst mindestens 15 kb. In den Spuren mit genomischer DNA von *bp-R* Mutanten ergab sich ein Muster, das dem von wildtypischer Ler DNA entsprach. Bei der Mutation in *bp-R* Pflanzen handelt es sich also nicht um eine größere Deletion in diesem Bereich. Darüber hinaus zeigte die mit *Nsi* bzw. *BamH1/Sca* geschnittene Ler DNA einen Restriktionslängenpolymorphismus (*RFLP*) im Vergleich mit der genomischen DNA von Col-0 Pflanzen (Abb. 20 B).

In allen Spuren befand sich eine vergleichbare Menge an genomischer DNA, wie das in Abbildung 20 C abgebildete Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel zeigt.

3.2.4.6 Komplementation des *brevipedicellus* Phänotyps durch Expression eines 35S::*KNAT1* Konstruktes in *bp-1* Mutanten

Ein weiteres Indiz für die Annahme, dass es sich bei *bp* um die Funktionsverlust Mutation von *KNAT1* handelt, lieferte die Expression eines 35S::*KNAT1* Konstruktes, das das komplette offene Leseraster von *KNAT1* enthielt, im *bp-1/Ler* Hintergrund. Wie die Abbildung 21 zeigt, führte dies in den transgenen BASTA resistenten Pflanzen zur Komplementation des Infloreszenz-Phänotyps.

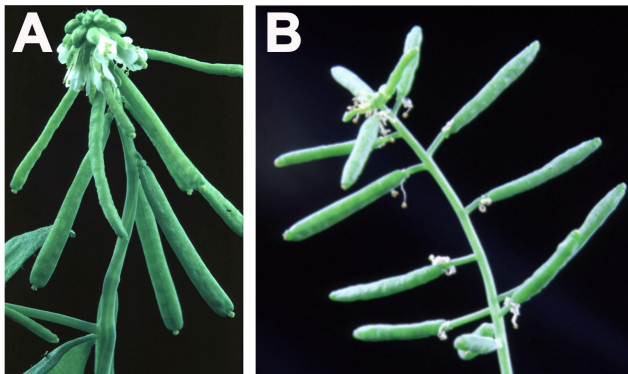


Abb. 21: Partielle Komplementation des *bp-1* Phänotyps durch Expression eines 35S::*KNAT1* Konstruktes. (A) *bp-1* Infloreszenz mit kurzen Internodien, kurzen Pedicels und nach unten hängenden Blüten und Schoten (siehe auch Abb. 16), (B) Infloreszenz einer transgenen 35S::*KNAT1*/*bp-1* Pflanze. Die Internodien und Pedicels sind verlängert, die Schoten stehen im rechten Winkel zur Sprossachse.

Die Internodien und Pedicels der transgenen 35S::*KNAT1*/*bp-1* Pflanzen waren verglichen mit denen der *bp-1* Mutante verlängert (Abb. 21 A, B). Die Blüten bzw. Schoten waren nach oben gerichtet oder standen zumindest im rechten Winkel zur Sprossachse. Die kodierende Region von *KNAT1* scheint damit auszureichen, um die *bp* Mutation zu retten. Die 35S::*KNAT1*/*bp-1* Pflanzen hatten darüber hinaus stark gelappte Blätter. Dieser Blattphänotyp ergibt sich aus der ektopischen Expression des *KNAT1* Transkriptes in den Blättern und ist typisch für den *KNAT1* Überexpressions-Phänotyp (s. 1.3.2).

Das Ergebnis von RT-PCR, *in-situ* Hybridisierung, *Southern*-Analyse und Komplementations-Experiment bestätigte die Annahme, dass *KNAT1* von *BREVIPEDICELLUS* kodiert wird und der Phänotyp der 35S::*en*²⁹⁸-*KNAT1* Pflanzen eine Kopie des *KNAT1* Funktionsverlust-Phänotyps ist.

3.2.5 Die Expression der beiden Domänen KNOX_(KNAT1) und KNOX/ELK_(KNAT1) als EN²⁹⁸-Fusionen

Die KNOX_(KNAT1) bzw. die KNOX/ELK_(KNAT1) Domäne (s. Abb. 22) wurde mit den unter 2.1.3.1 angegebenen Primern über PCR aus pRT-KNAT1-7 (s. 2.1.3.3) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI in pCHRIS (s. 2.1.3.2) kloniert, so dass sich die Domänen im Leseraster von *en*²⁹⁸ befanden. Die 35S::*en*²⁹⁸-KNOX_(KNAT1) und 35S::*en*²⁹⁸-KNOX/ELK_(KNAT1) Expressionskassetten wurden dann über die flankierenden Ascl Schnittstellen in pGPTV-Bar Ascl (s. 2.1.3.2) umgesetzt. Anschließend wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit diesen pGPTV Konstrukten transformiert und die BASTA resistenten Primärtransformanten analysiert (s. 2.2.4).

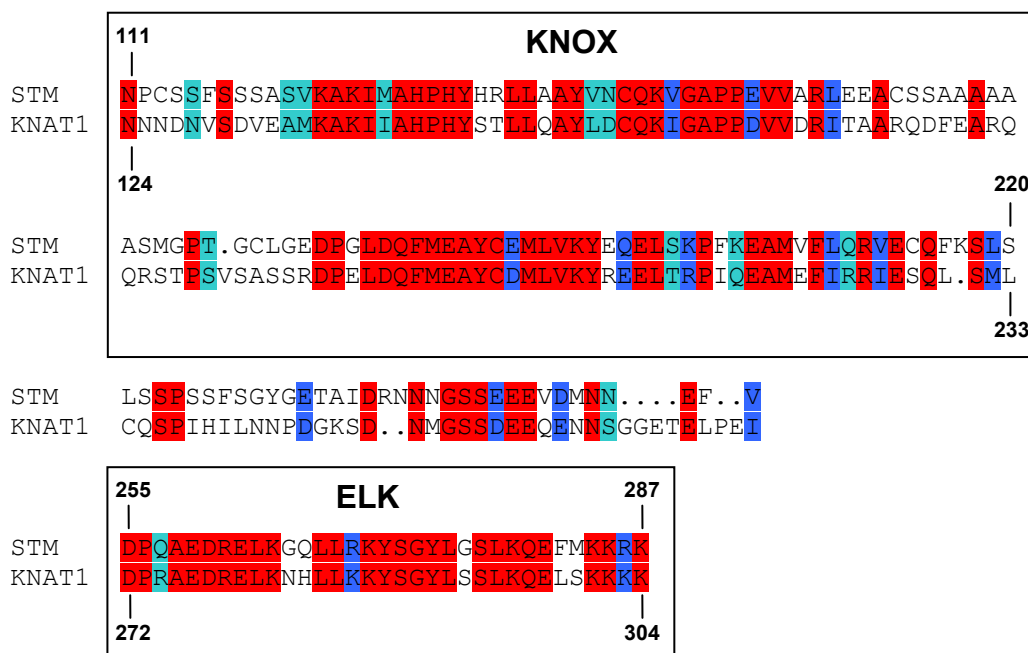


Abb. 22: Sequenzvergleich zwischen den KNOX/ELK Domänen von STM und KNAT1. Konservierungsgrad + ■ ■ ■ -. Die Zahlen geben die Aminosäureposition an. Die Übereinstimmung der Aminosäuren beträgt im Bereich der KNOX Domäne 50%, die Ähnlichkeit 67%. Die Übereinstimmung im Bereich der ELK Domäne beträgt 76%, die Ähnlichkeit 85%. Über den gesamten Bereich der KNOX/ELK Domäne betrachtet, beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuren 50%, die Ähnlichkeit 65%.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der KNOX/ELK Domänen von STM und KNAT1 miteinander wie in Abbildung 22 durchgeführt, so stellt man fest, dass die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz 50,3% beträgt und damit etwa 1% über dem Wert für den gesamten Proteinbereich liegt. Werden auch ähnliche Aminosäuren miteinbezogen liegt der Prozentsatz für die KNOX/ELK Domäne sogar bei 65,2% im Vergleich zu 58,5% über den gesamten Proteinbereich. Im Bereich der ELK Domäne stimmen die Aminosäuren sogar in 75,8% überein (Abb. 22, Anhang Abb. A5).

Interessant war nun die Frage, ob sich trotz der großen Ähnlichkeit der KNOX/ELK Domänen von STM und KNAT1 spezifische Phänotypen mit dem en^{298} -KNOX_(KNAT1) und en^{298} -KNOX/ELK_(KNAT1) Konstrukt ergeben.

Zu beobachten war, dass starke *bp* Phänotypen mit hängenden Blüten und Schoten nur mit dem en^{298} -KNOX/ELK_(KNAT1) Konstrukt erzielt wurden. Etwa 29% der transgenen Pflanzen (18/62) waren betroffen. Die übrigen Pflanzen waren wildtypisch. Damit zeigten deutlich weniger Pflanzen den *bp* Phänotyp als mit dem en^{298} -KNAT1 Konstrukt (vgl. Tabelle 2). Fehlte die ELK Domäne zeigten lediglich 9,5% der transgenen Pflanzen (10/105) eine *bp* Phänotypie, die darüber hinaus schwächer ausfiel als mit den Konstrukten en^{298} -KNAT1 und en^{298} -KNOX/ELK_(KNAT1). Die Schoten standen lediglich im rechten Winkel zur Sprossachse. Dies verdeutlicht, dass die ELK Domäne, und damit verbunden wahrscheinlich der Transport in den Kern, von Bedeutung ist für die Funktion des KNAT1 Proteins

Keine der transgenen Pflanzen, die eines der beiden Konstrukte trugen, zeigte eine phänotypische Veränderung des Sprossapikalmeristems, die vergleichbar gewesen wäre mit dem beobachteten Phänotyp bei en^{298} -KNOX_(STM) bzw. en^{298} -KNOX/ELK_(STM) Pflanzen

4 DISKUSSION

4.1 Dominant-negative EN²⁹⁸ Fusionen erzeugen in Pflanzen eine Kopie des Funktionsverlust-Phänotyps

Die Umwandlung von Proteinen in dominant-negative Proteinchimären durch die Fusion mit der Repressordomäne des *Drosophila* Engrailed Proteins (En²⁹⁸), um durch deren Überexpression eine Kopie des Funktionsverlust-Phänotyps zu erzeugen, wurde in *Drosophila*, *Xenopus* und Maus bereits erfolgreich eingesetzt (John et al., 1995; Conlon et al., 1996; Lyon & Watson, 1996). Diese Experimente haben wichtige Informationen über die Funktion der untersuchten Gene geliefert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz dieser Methode, im Folgenden mit *CHRIS* bezeichnet für *Chimeric Repressor Interference System*, auch in Pflanzen geeignet ist, um Funktionsverlust-Phänotypen von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Die ektopische Expression von N-terminalen Fusionsproteinen zwischen der EN²⁹⁸ Domäne und STM oder KNAT1 in *Arabidopsis thaliana* resultierte in transgenen Pflanzen, die eine Phänokopie des entsprechenden Funktionsverlust-Phänotyps zeigten. Darüber hinaus konnten in der Arbeitsgruppe auch mit *en*²⁹⁸-AP3 und *en*²⁹⁸-PI Konstrukten Phänokopien erzeugt werden (Markel et al., 2002).

Die gut charakterisierten Transkriptionsfaktoren STM, AP3 und PI wurden als Testgene gewählt aufgrund des vorhersagbaren Funktionsverlust-Phänotyps. Im Unterschied dazu war für KNAT1 zu Beginn meiner Untersuchungen keine Funktionsverlust Mutante bekannt. Aufgrund der Analyse von KNAT1 mit der Hilfe von CHRIS konnte dann eine Verbindung zwischen der bereits beschriebenen aber bis zu diesem Zeitpunkt molekular nicht weiter charakterisierten Mutante *brevipedicellus* (*bp*, Koornneef et al., 1983) und KNAT1 hergestellt werden. Die transgenen *en*²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen kopierten den Phänotyp der *bp* Mutante. Über RT-PCR, *in-situ* Hybridisierung, *Southern*-Analyse und Komplementations-Experiment konnte anschließend nachgewiesen werden, dass in *bp-1* Mutanten das KNAT1 Gen betroffen ist. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Douglas et al. (2002) und Venglat et al. (2002), die kürzlich veröffentlicht wurden.

Die *en*²⁹⁸-KNAT1 Pflanzen kopieren den Phänotyp der *bp-1* Mutante im Detail, wie der Vergleich einzelner Merkmale gezeigt hat (s. 3.2.4.2). Dies ist der Fall, obwohl sich das *en*²⁹⁸-KNAT1 Konstrukt im Columbia Hintergrund und die *bp-1* Mutation im Landsberg *erecta* Hintergrund befindet. Dieses Ergebnis unterstützt damit nicht die These, dass der *bp* Phänotyp hauptsächlich mit der *erecta* Mutation zusammenhängt (Douglas et al., 2002). Der Ausfall der *ERECTA* Funktion führt ebenfalls zu verkürzten Internodien und Pedicels (Torii et al., 1996) Die gezeigten Daten weisen nun darauf hin, dass dies möglicherweise in *bp* Mutanten einen additiven Effekt auf die Verkürzung der Internodien und weniger stark auch auf die Verkürzung der Pedicels hat, aber keinen Einfluss auf

den Winkel zwischen Pedicel und Sprossachse. Sowohl *bp-1/Ler* als auch *en²⁹⁸-KNAT1/Col* Pflanzen haben stark nach unten hängende Blüten und Schoten.

Die *en²⁹⁸-KNAT1* Pflanzen haben darüber hinaus gezeigt, dass *KNAT1/BP* auch den Winkel zwischen Sprossachse und Seitensprossen beeinflusst. Die Seitensprosse stehen in *en²⁹⁸-KNAT1* und *bp* Pflanzen im Gegensatz zum Wildtyp im rechten Winkel zur Sprossachse. Es gibt eine ganze Reihe von Untersuchungen über Regulationsmechanismen, die für die Initiation und das Auswachsen von sekundären Meristemen in den Achseln von vegetativen Blättern und Hochblättern verantwortlich sind und damit das Verzweigungsmuster der Pflanzen bestimmen. Zu den hier beteiligten Genen zählen zum Beispiel *LATERAL SUPPRESSOR* in Tomate (Schmitz & Theres, 1999), sowie *REVOULTA*, *SUPERSHOOT*, *MAX1* und *MAX2* in *Arabidopsis* (Talbert et al., 1995; Tantikanjana et al., 2001; Stirnberg et al., 2002). Es gibt allerdings relativ wenig Informationen über die Entwicklung der Seitensprosse, das heißt über bei der Initiation ablaufende Wachstums- und Differenzierungsprozesse, die unter anderem den Winkel zur primären Sprossachse bestimmen. Aufgrund der Beobachtungen an *en²⁹⁸-KNAT1* und *bp* Pflanzen lässt sich sagen, dass hier möglicherweise zumindest zum Teil ähnliche Prozesse ablaufen, wie von Venglat et al. (2002) für die Entwicklung der Pedicels beschrieben, wobei *KNAT1/BP* ebenfalls daran beteiligt zu sein scheint.

Transgene Pflanzen, die mit den Konstrukten *en²⁹⁸-STMΔN1* bzw. *en²⁹⁸-KNAT2* transformiert wurden, zeigten zum Teil oder sogar nur einen Überexpressionsphänotyp. Es scheint so, dass hier *CHRIS* nicht oder nur zum Teil erfolgreich eingesetzt werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den N-terminalen 110 Aminosäuren liegen, die der STM-Deletion *STMΔN1* fehlen. Dieser Bereich enthält Histidin- und Glutamin-reiche Regionen. Ähnliche Bereiche sind auch in *KNAT1* zu finden, hier sind es Histidin- und Asparagin-reiche Regionen. Diese Bereiche fehlen aber dem nativen *KNAT2* Protein. Polyhistidin, Polyasparagin und Polyglutamin Abschnitte sind in den unterschiedlichsten Transkriptionsfaktoren zu finden, wobei ihre Funktion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Smoller et al., 1990; Mével-Ninio et al., 1991). Es gibt Hinweise darauf, dass Glutamin- und Prolin-reiche Regionen an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sind (Gerber et al., 1994). Denkbar ist also, da dieser Bereich in *KNAT2* fehlt, dass *KNAT2 in vivo* primär nicht als Transkriptionsaktivator agiert. Die Fusion mit der *EN²⁹⁸* Domäne würde in diesem Fall keine Umwandlung in eine dominant-negative Genfunktion bewirken, sondern eher die native Funktion des Proteins unterstützen. Sowohl die Proteinsequenzen von *STM* und *KNAT1*, als auch die von *KNAT2* enthalten eine Reihe negativ geladener Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) im Bereich direkt stromaufwärts der *ELK* Domäne, die ebenfalls mit der Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht werden (Ptashne & Gann, 1990; Frankel & Kim, 1991). Diese reichen aber möglicherweise nicht aus, sondern erst die Kombination mit den Polyhistidin, Polyasparagin und/oder Polyglutamin Bereichen kann letztendlich die Aktivierung der Zielgene bewirken.

4.2 Möglicher Mechanismus von *CHRIS*

Der Frage nach dem molekularen Mechanismus, der der Wirkungsweise von *CHRIS* zugrunde liegt, wurde auf verschiedene Weise nachgegangen. Mögliche Mechanismen sind neben der direkten Transkriptionsrepression der Zielgene des untersuchten Gens (Levine & Manley, 1989) auch Cosuppression und das so genannte *Squelching*. Als Cosuppression wird das Phänomen bezeichnet, dass die RNA des eingebrachten Transgens mit der RNA des homologen endogenen Gens interagieren kann, was zur Bildung von anormaler RNA und/oder cRNA führt. Die auf diese Weise gebildeten doppelsträngigen RNA Moleküle (dsRNA) initiieren dann den Abbau der transgenen und der homologen endogenen RNA. In Pflanzen wird diese Antwort auf dsRNA auch als *post-transcriptional gene silencing (PTGS)* bezeichnet. (Napoli et al., 1990; Vaucheret et al., 1998). *Squelching* resultiert aus der Interaktion des überexprimierten Proteins mit anderen Faktoren, mit denen das zu untersuchende Protein normalerweise interagiert, wodurch die Bildung von funktionstüchtigen Komplexen verhindert wird (Gill & Ptashne, 1988). Denkbar ist auch eine Form der Repression, die sich aus unterschiedlichen Aspekten dieser Mechanismen zusammensetzt.

Die *stm* Phänokopie Frequenzen, die sich aus der Expression der N-terminalen *STM* Deletionskonstrukte als EN²⁹⁸ Fusionen ergeben haben, deuten sicherlich auf einen gewissen Cosuppressionsanteil hin, da eine Korrelation zwischen Länge des Transkriptes und Höhe der Frequenz festgestellt werden kann. Die hohe *stm* Phänokopie Frequenz mit *en*²⁹⁸-*KNOX*_(STM) im Vergleich mit der *stm* Phänokopie Frequenz, die mit dem etwa gleichgroßen *en*²⁹⁸-*STMΔC2* Konstrukt beobachtet wurde, weist allerdings darauf hin, dass nicht allein das Transkript für die Phänokopie verantwortlich sein kann. Hier wird deutlich, dass es eine Rolle spielt, was translatiert wird. Die *KNOX* Domäne scheint einen größeren Beitrag zur Ausbildung des Phänotyps zu leisten als andere Domänen (s. a. Nolte, 2000).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die korrekte Translation des EN²⁹⁸-Fusionsproteins von Bedeutung für die Frequenz an *stm* Phänokopien ist, lieferten die Konstrukte mit Leserasterverschiebung. Der Prozentsatz an *stm* Phänokopien ist größer, wenn sich das *STM* Fragment im Leseraster von *en*²⁹⁸ befindet, das heißt ein korrektes Fusionsprotein translatiert wird. Die mit einem Fusionsprotein ohne Sinn erzeugten Phänokopien, hier wurde C-terminal der *en*²⁹⁸-Sequenz eine Leserasterverschiebung eingefügt, sind darüber hinaus deutlich schwächer. Besonders deutlich wird die Abhängigkeit der *stm* Phänokopie von der Anwesenheit des korrekten Fusionsproteins bei Pflanzen, die das *en*²⁹⁸-fs*KNOX*_(STM) Konstrukt tragen. Mit diesem Konstrukt traten lediglich 2,7% *stm* Phänokopien auf. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also schließen, dass es zwar einen Anteil an Cosuppression gibt, der aber nicht die hohe Frequenz an Phänokopien erklären kann.

Darüber hinaus wird der Phänotyp durch Dexamethason induzierbar, wenn en^{298} -STM mit der Hormonbindungsstelle des Glucocorticoid Rezeptors (GR) kombiniert wird. Die Behandlung der Pflanzen mit Dexamethason ermöglicht den Transport des Fusionsproteins in den Kern (Lloyd et al., 1994). Und EN^{298} -STM/GR bewirkt erst dann, dass die Entwicklung des Sprossapikalmeristems stoppt und im Unterschied zu unbehandelten en^{298} -STM/GR Pflanzen keine weiteren Blätter mehr gebildet werden (Markel et al., 2002). Diese Induzierbarkeit belegt erneut, dass *CHRIS* hauptsächlich ein Mechanismus zugrunde liegen muss, der auf der Anwesenheit des Proteins basiert.

Squelching ist nach den Ergebnissen ein sehr wahrscheinlicher Mechanismus. Hierfür sprechen die Beobachtungen, dass *stm* Phänokopien auch in Abwesenheit der DNA Bindungsdomäne erzielt werden und insbesondere die isolierte $KNOX_{(STM)}$ bzw. $KNOX/ELK_{(STM)}$ Domäne als EN^{298} Fusion eine hohe Frequenz an *stm* Phänokopien bewirkt. Vorstellbar ist also, dass das EN^{298} -Fusionsprotein über die $KNOX$ Domäne mit Proteinpartnern des endogenen STM interagiert, STM aus den Proteinkomplexen verdrängt und damit die Bildung funktionstüchtiger Komplexe verhindert.

Die hochkonservierte $KNOX$ Domäne ist auch in tierischen Proteinen zu finden und wird dort als MEIS Domäne bezeichnet (Bürglin, 1997). Die Bedeutung der $KNOX$ Domäne als Protein-Protein Interaktionsdomäne konnte zunächst am Beispiel des MEIS Homöodomänen Proteins Prep1 aus Säugern nachgewiesen werden. Prep1 interagiert über die MEIS Domäne mit Pbx, einem weiteren Homöodomänen Protein der TALE Familie (Berthelsen et al., 1998). Mittlerweile wurde dies über das Hefe Zwei-Hybrid System auch für die pflanzliche $KNOX$ Domäne gezeigt. Die Interaktion zwischen BELL1 und spezifischen $KNAT$ Homöodomänen Proteinen wird durch die $KNOX$ Domäne vermittelt (Bellaoui et al., 2001).

Ein weiteres Indiz für *Squelching* ist, dass die Überexpression der $KNOX_{(STM)}$ und $KNOX/ELK_{(STM)}$ Domäne ohne die EN^{298} Domäne in etwa 97% der Primärtransformanten zu Veränderungen des wildtypischen Phänotyps geführt hat. Diese Veränderungen sind überwiegend abhängig von der korrekten Translation des Proteins, denn Konstrukte mit Leserasterverschiebung bewirkten lediglich in weniger als 25% der transgenen Pflanzen den gleichen Effekt.

Auch die Spezifität der Phänokopien lässt sich über *Squelching* erklären. Die über den CaMV 35S Promotor ubiquitär exprimierten EN^{298} -Fusionsproteine finden ihre spezifischen Interaktionspartner nur im Sprossapikalmeristem (EN^{298} -STM) oder in der Infloreszenz (EN^{298} - $KNAT1$). Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass auch die isolierten $KNOX$ Domänen von STM und $KNAT1$ als EN^{298} Fusionen spezifische Phänokopien zeigen, die entweder das Sprossapikalmeristem oder die Infloreszenz betreffen.

Squelching als möglicher Mechanismus schließt aber nicht aus, dass die Protein-chimären auch mit fehlender DNA bindender Domäne in den gebildeten multimeren Proteinkomplexen zu den entsprechenden Zielgenen rekrutiert, dort mit der DNA assoziiert werden und die EN²⁹⁸ Domäne direkt die Transkription beeinflusst. Dass dies prinzipiell möglich ist, wurde in einem Experiment mit dem Fushi tarazu (Ftz) Protein gezeigt, dem die Homöodomäne deletiert wurde. Das Ftz Δ HD Protein ist über die Interaktion mit anderen Proteinen immer noch in der Lage die Segmentierung des *Drosophila* Embryos zu kontrollieren (Copeland et al., 1996).

Die Bindung an die DNA scheint für die Ausbildung der *bp* Phänokopien in transgenen Pflanzen mit dem *en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt stärker von Bedeutung zu sein. Lediglich 29% der Primärtransformanten mit *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(*KNAT1*) Konstrukt wiesen verkürzte Internodien und hängende Schoten auf. Mit dem vollständigen offenen Leseraster also inklusive der DNA-bindenden Domäne lag dieser Prozentsatz bei 75,6%. Hier scheint *Squelching*, wenn man dies mit den Ergebnissen mit dem *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(*STM*) Konstrukt vergleicht, eher einen geringeren Anteil an der Ausprägung der Phänokopien zu haben. Die Bedeutung der Homöodomäne für die *in vivo* Funktion von *KNAT1* zeigt sich auch in *bp-2* Mutanten. Hier führt eine Punktmutation zu einem Stopcodon, was in einem verkürzten Protein ohne ELK und Homöodomäne resultiert. Der Phänotyp der *bp-2* Mutanten entspricht nahezu dem der *bp-1* Mutanten, in denen die codierende Region von *KNAT1* vollständig deletiert ist (Venglat et al., 2002). Unter der Annahme, dass hier *Squelching* eine geringere Rolle spielt, sprechen die Beobachtungen mit dem *en*²⁹⁸-*KNAT1* Konstrukt demnach für die Möglichkeit, dass aktive Repression durch die EN²⁹⁸ Domäne Anteil an der Ausprägung der Phänokopien haben könnte.

Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Anwesenheit des Konstruktes im Kern. Die Induzierbarkeit des Phänotyps in *en*²⁹⁸-*STM/GR* Pflanzen spricht dafür. Darüber hinaus ist die Frequenz an *stm* Phänokopien höher, wenn die ELK Domäne, die unter anderem als Kernlokalisierungssignal fungieren kann (Meisel & Lam, 1996), anwesend ist. Dies zeigt sich, wenn man die Phänokopie Frequenzen von *en*²⁹⁸-*KNOX*_(*STM*) mit der von *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(*STM*) Pflanzen vergleicht. Noch deutlicher wird der Einfluss der ELK Domäne bei Betrachtung der *en*²⁹⁸-*KNOX*_(*KNAT1*) und *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(*KNAT1*) Pflanzen. Nur die *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(*KNAT1*) Pflanzen zeigten die starke *bp* Phänokopie. Es gibt also Hinweise darauf, dass der Wirkungsort der Konstrukte der Kern ist. Daraus lässt sich selbstverständlich nicht schließen, dass auch tatsächlich direkte Transkriptionsrepression der Zielgene stattfindet. Dies kann aufgrund der durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen aber auch nicht abschließend geklärt werden.

Es wird aber deutlich, dass die Anwesenheit der EN²⁹⁸ Domäne zum einen die Frequenz an *stm* Phänokopien (gilt nicht für KNOX/ELK_(STM)) und zum anderen die Spezifität des Phänotyps erhöht. Das heißt, die EN²⁹⁸ Domäne leistet auf jeden Fall einen gewissen Beitrag. Die erhöhte Spezifität zeigt sich bei der Expression des *en*²⁹⁸-*STMΔN1* Konstruktes im Vergleich mit dem *STMΔN1* Konstrukt. Die EN²⁹⁸ Domäne bewirkt, dass der auftretende Überexpressions-Phänotyp deutlich unterdrückt wird und der Phänokopie Phänotyp überwiegt. Noch offensichtlicher wird dies, wenn man die transgenen *en*²⁹⁸-KNOX_(STM) bzw. *en*²⁹⁸-KNOX/ELK_(STM) Pflanzen mit den Pflanzen vergleicht, die die beiden Domänen ohne die EN²⁹⁸ Domäne exprimieren. Zwar ist die Anzahl an Primärtransformanten, die einen Phänotyp zeigen, mit den *en*²⁹⁸-KNOX_(STM) und *en*²⁹⁸-KNOX/ELK_(STM) Konstrukten deutlich niedriger (55% bzw. 68%) als mit den entsprechenden Konstrukten ohne die EN²⁹⁸ Domäne (97%), allerdings zeigen diese Pflanzen nur die *stm* Phänokopie und keine elongierten Internodien. Die EN²⁹⁸-Fusionen geben also eindeutigeren Hinweise auf die biologische Funktion der untersuchten Proteine als die einfache Überexpression der Domänen.

Inwieweit der neue bisher nicht mit *STM* assoziierte Phänotyp der elongierten Internodien dennoch mit der *in vivo* Funktion von *STM* zusammenhängt, muss noch geklärt werden. Festzuhalten ist, dass in *stm1/as1* Doppelmutanten, obwohl in bisherigen Veröffentlichungen nicht weiter darauf eingegangen wird, ebenfalls elongierte Internodien beobachtet werden können (Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung). Allerdings ist der Phänotyp deutlich schwächer. Unter Berücksichtigung der bisher festgestellten Interaktionen zwischen *STM*, *AS1* (*ASYMMETRIC LEAVES1*), *AS2* (*ASYMMETRIC LEAVES2*) und *KNAT1* (Byrne et al., 2002) ist die Beteiligung von *KNAT1* an der Streckung der vegetativen Internodien denkbar. Das Fehlen von *KNAT1/BP* führt zu verkürzten Internodien der Infloreszenz, wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt wurde. Fallen *STM* und *AS1* bzw. *AS2* aus, ist in den Mutanten eine Überexpression von *KNAT1* festzustellen (Ori et al., 2000), die dann möglicherweise zu den elongierten Internodien führt.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der Ergebnisse also sagen, dass der Mechanismus von *CHRIS* wahrscheinlich auf einer Mischung der verschiedenen Möglichkeiten beruht. *Squelching* scheint den größten Anteil an der Ausprägung der Phänokopien zu haben, wobei Cosuppression zu einem geringen Teil ebenfalls dazu beiträgt. Ob die EN²⁹⁸ Fusionsproteine auch über direkte Repression der Zielgene die Phänokopien erzeugen, kann nicht eindeutig festgestellt aber auch nicht ausgeschlossen werden. Auf jeden Fall trägt die EN²⁹⁸ Domäne wesentlich zur Spezifität der zu beobachtenden Phänotypen bei.

4.2.1 Cosuppressor-abhängige und -unabhängige Repression durch EN²⁹⁸

Die für *CHRIS* verwendete EN²⁹⁸ Domäne umfasst die Repressordomäne, die sich in zwei Subdomänen unterteilen lässt (Jaynes & O'Farrell, 1991; Han & Manley, 1993; Smith & Jaynes, 1996; Jimenez et al., 1997). Die erste Domäne, die mit eh1 (Engrailed homology 1) bezeichnet wird, ist in allen Engrailed Homologen hoch konserviert und scheint *in vivo* die Hauptrepressoraktivität zu beinhalten (Logan et al., 1992; Smith & Jaynes, 1996). Es wurde gezeigt, dass eh1 die Bindung an den Corepressor Groucho vermittelt, der *in vivo* notwendig ist, damit Engrailed bestimmte Zielgene reprimieren kann (Jimenez et al., 1997; Tolkunova et al., 1998). Darüber hinaus werden Groucho Proteine von einer großen Anzahl weiterer DNA-bindenden Proteine als Corepressor genutzt (Paroush et al., 1994; Aaronson et al., 1997; Dubnicoff et al., 1997). Groucho ähnlich Proteine, vor allem die genetische Funktion und die Motivstruktur betreffend, sind nicht nur in unterschiedlichen tierischen Spezies gefunden wurden sondern auch in Hefe (Tup1, Williams & Trumbly, 1990). Die zweite Domäne, die als Region D bezeichnet wird, hat eine Groucho-unabhängige Repressoraktivität (Han & Manley, 1993; Smith & Jaynes, 1996). Denkbar ist also, dass einige Zielgene durch eh1/Groucho vermittelte Repression reprimiert werden, während die Repression anderer Zielgene durch die Region D vermittelt wird (Fisher & Caudy, 1998).

Ob *CHRIS* in Pflanzen einen Corepressor benötigt oder der Mechanismus auf der Nutzung der Region D beruht, kann nicht gesagt werden. Hierin könnte auch eine mögliche Erklärung liegen, dass die Analyse von *KNAT2* mit der Hilfe von *CHRIS* nicht zum Erfolg geführt hat. Sollten in Pflanzen keine Groucho-ähnlichen Proteine vorhanden sein, die von EN²⁹⁸ genutzt werden könnten, wäre für die Repression der Zielgene von STM und *KNAT1* die Nutzung der Region D denkbar, während für die Repression der Zielgene von *KNAT2* aus unbekanntem Gründen ein Corepressor notwendig wäre. In *Arabidopsis thaliana* wurde mit *LEUNIG* mittlerweile eine zu *Groucho* und *Tup1* analoge Genfunktion gefunden. *LEUNIG* reguliert als möglicher Corepressor die *AGAMOUS* Expression während der Blütenentwicklung (Conner & Zhongchi, 2000). Ob *LEUNIG* auch *ENGRAILED* als Corepressor dienen könnte oder weitere Groucho ähnliche Proteine in *Arabidopsis* vorhanden sind, müsste weiter untersucht werden.

4.3 CHRIS im Vergleich mit anderen Methoden

Nachdem das *Arabidopsis* Genom mittlerweile vollständig sequenziert ist (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), sind die Sequenzen nahezu aller putativer Transkriptionsfaktoren bekannt. Für die meisten dieser Gene ist allerdings ihre biologische Funktion weiterhin unklar. Sequenzanalyse und Bestimmung des Expressionsmusters geben zwar recht schnell erste Hinweise, am aussagekräftigsten sind aber immer noch Funktionsverlust Mutanten. Ein effizientes System zum gezielten Ausschalten der Gene basierend auf homologer Rekombination, wie es routinemäßig in Maus eingesetzt wird (Babinet & Cohen-Tannoudji, 2001), fehlt in höheren Pflanzen. Nur im Moos *Physcomitrella patens* kann diese Form der gerichteten Mutagenese seit einiger Zeit genutzt werden (Schaefer, 2002). Alle Versuche ein solches System in höheren Pflanzen zu etablieren, blieben bisher nahezu ohne Erfolg. Erst seit kurzem gibt es erste Ansätze für die Nutzung der homologen Rekombination in Reis (Terada et al., 2002). Aus diesem Grund ist man darauf angewiesen in großen Transposon oder T-DNA Populationen über PCR nach Insertionen in dem gewünschten Gen zu suchen. Häufig sind anschließend Kreuzungen der Einfachmutanten mit Mutanten verwandter Gene, die ebenfalls zum Teil erst identifiziert werden müssen, notwendig, da sich aufgrund von Redundanz erst in Doppel- oder Dreifachmutanten ein Phänotyp zeigt. Insgesamt ein recht zeitaufwendiges Verfahren, das dazu noch große Ressourcen benötigt. Es wurde kalkuliert, dass, um eine 90% Chance zu haben ein spezifisches Gen von etwa 1kb über T-DNA Insertionsmutagenese in *Arabidopsis* zu finden, etwa 350000 unabhängige Transformanten notwendig sind (Krysan et al., 1999).

CHRIS bietet nun die Möglichkeit in Pflanzen durch die Umwandlung der Transkriptionsfaktoren in dominant-negative Genfunktionen recht einfach Informationen über deren Funktion zu erhalten. Es muss lediglich die kodierende Sequenz des Gens im Leseraster mit der en^{298} Sequenz kloniert und Pflanzen mit dem en^{298} -Konstrukt transformiert werden. Damit kann CHRIS nicht nur in *Arabidopsis thaliana* genutzt werden, sondern in allen Spezies die transformiert werden können. Außerdem sind diese Informationen sehr schnell zugänglich. Die mit den EN^{298} Fusionen erzeugten Phänokopien waren bereits in den Primärtransformanten zu beobachten. Darüber hinaus war die Effizienz der en^{298} -Konstrukte sowohl mit der kompletten kodierenden Region von *STM* als auch mit der von *KNAT1* sehr hoch. Die Frequenz an Phänokopien unter den Primärtransformanten lag in etwa bei 75%. Die beobachteten Phänotypen waren sehr homogen, was die Interpretation erleichtert. Es bestanden lediglich Unterschiede in der Stärke der Phänokopien.

Daneben besteht recht einfach die Möglichkeit, wenn eine EN^{298} Fusion nicht erfolgreich ist, d.h. wenn die transgenen Pflanzen keinen Phänotyp zeigen, das entsprechende en^{298} Konstrukt zusammen mit weiteren en^{298} Konstrukten verwandter Gene zu transformieren. Hier sind alle denkbaren Kombinationen möglich, auch mit Genen, für die noch keine Funktionsverlust Mutante identifiziert wurde, da lediglich die

Sequenz vorhanden sein muss. Diese Mehrfachtransformationen erhöhen die Wahrscheinlichkeit einen Phänotyp zu identifizieren. Mit transgenen Pflanzen, die *CUP-SHAPED COTYLEDON1* und *CUP-SHAPED COTYLEDON2* (Aida et al., 1997) als *en*²⁹⁸ Fusionen exprimierten, konnte dies bereits erfolgreich gezeigt werden (John Chandler, persönliche Mitteilung).

Es ist möglich dominant-negative Genfunktionen durch einfache Deletion oder Mutation der DNA-bindenden Domäne zu erzeugen. Die auf diese Weise veränderten und anschließend in Pflanzen überexprimierten Proteine interagieren über ihre Protein-Protein Interaktionsdomänen mit Proteinpartnern des endogenen Proteins, verdrängen dieses und verhindern auf diese Weise die Ausbildung funktionstüchtiger Komplexe (Rieping et al., 1994, Pontier et al., 2001). Auch durch die Überexpression einzelner funktionaler Interaktionsdomänen lassen sich dominant-negative Funktionen erzeugen, die zunächst einmal effizienter scheinen als die Fusion mit EN²⁹⁸. Mit der Expression der *KNOX*_(STM) bzw. der *KNOX/ELK*_(STM) Domäne zeigten 97% der transgenen Pflanzen einen im Vergleich mit dem Wildtyp veränderten Phänotyp. Allerdings müssen hier zunächst Domänen identifiziert werden. Darüber hinaus führt die Expression als EN²⁹⁸ Fusion zu spezifischeren Phänotypen. Mit den *en*²⁹⁸-*KNOX*_(STM) und *en*²⁹⁸-*KNOX/ELK*_(STM) Konstrukten trat nur die Phänokopie auf und nicht wie ohne die EN²⁹⁸ Domäne zusätzlich ein neuer, bisher nicht mit STM assoziierter Phänotyp, Pflanzen mit elongierten Internodien.

Die Herstellung dominant-negativer Genfunktionen durch Deletion der DNA-bindenden Domäne ist nur erfolgreich, wenn das Protein eine intakte Protein-Protein Interaktionsdomäne umfasst. Obwohl dies im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, da alle hier untersuchten Proteine *in vivo* höchstwahrscheinlich über die Interaktion mit weiteren Proteinen agieren, eröffnet die Herstellung von dominant-negativen Proteinchimären durch die Fusion mit der EN²⁹⁸ Domäne auch die Analyse von Faktoren, die keine Protein-Protein Interaktionsdomäne enthalten.

Zum Teil ergeben sich als Nebeneffekt über das Phänomen der Cosuppression (Vaucheret et al., 1998) in transgenen Pflanzen Erkenntnisse über den Phänotyp einer Funktionsverlust Mutante. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass der Prozentsatz an Primärtransformanten mit den *en*²⁹⁸ Konstrukten über dem liegt, der mit *en*²⁹⁸ Konstrukten mit Leserasterverschiebung erzielt werden kann. Also über dem Prozentsatz an Pflanzen, deren Phänotyp höchstwahrscheinlich auf reiner Cosuppression beruht. Dieser Vorteil von *CHRIS* würde sich deutlich bemerkbar machen, wenn der Phänotyp schwach ist und sich nur in relativ wenigen Pflanzen zeigt.

Seit kurzem wird in Pflanzen eine in *Caenorhabditis* bereits erfolgreich angewendete Methode eingesetzt, die als RNAi für RNA *interference* bezeichnet wird. Das Einbringen doppelsträngiger RNA (dsRNA) resultiert im gezielten Ausschalten der untersuchten Gene (Fire et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass Transgene, die doppelsträngige oder einzelsträngige in-sich komplementäre (hairpin) RNA (hpRNA) exprimieren, einen ähnlichen Effekt in Pflanzen haben (Wang & Waterhouse, 2000; Waterhouse et al., 1998). Der Effekt wird noch verstärkt, wenn Pflanzen mit hpRNA Konstrukten transformiert werden, die ein Intron enthalten (ihpRNA, Smith et al., 2000). Deshalb wurden Vektoren konstruiert, die es ermöglichen einzelne PCR-Fragmente des gewünschten Gens sehr einfach in sehr effektive ihpRNA Konstrukte umzuwandeln, die in transgenen Pflanzen gezielt das untersuchte Gen ausschalten. Die Effizienz dieser Konstrukte liegt ebenfalls deutlich über der von Cosuppression und *antisense* Konstrukten (Wesley et al., 2001).

Im Vergleich mit *CHRIS* hat RNAi zwei Vorteile. Es können zum einen sehr kurze Fragmente genutzt werden, unter Umständen lediglich 21 bis 25 Nukleotide umfassende hpRNAs (s. Hamilton & Baulcombe, 1999; Waterhouse et al., 2001). Dies ermöglicht auch einzelne Mitglieder größerer Genfamilien auszuschalten, da unikale Sequenzen dieser Länge in den meisten Genfamilien vorhanden sind. Zum anderen können neben der kodierenden Region auch Sequenzen aus der 3' oder 5' untranslatierten Region verwendet werden. Ein Vorteil von *CHRIS* könnte allerdings sein, dass das System höchstwahrscheinlich, wie weiter oben diskutiert, auf Proteinebene arbeitet, was bei RNAi nicht der Fall ist. Dies eröffnet zusätzliche Wirkungsmechanismen, die unter Umständen von Bedeutung sein können, was aber noch nicht näher untersucht wurde.

4.4 Ausblick

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist der Mechanismus von *CHRIS* eine Mischung unterschiedlicher Formen der Repression. Inwieweit aktive Repression unter Verwendung von Corepressoren daran beteiligt ist, konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht eindeutig geklärt werden. Um Informationen hierüber zu bekommen, sollte die EN²⁹⁸ Domäne in unterschiedliche Fragmente unterteilt und diese mit STM fusioniert in *Arabidopsis* transformiert werden. Hier würde sich zeigen, ob die eh1 Domäne und/oder die Region D notwendig ist, um die hohe Frequenz an Phänokopien zu erzielen.

CHRIS wird darüber hinaus zur Analyse weiterer Transkriptionsfaktoren herangezogen, die den unterschiedlichsten Genfamilien angehören.

Um den Einfluss der Histidin-, Glutamin- und Asparagin-reichen Bereiche im N-Terminus von STM und KNAT1 näher zu bestimmen, könnte die Fusion dieser Region mit der Sequenz von *KNAT2* und der anschließenden Transformation des *en*²⁹⁸-*STM110-KNAT2* Konstruktes in *Arabidopsis* interessant sein. Außerdem sollte die Analyse von transgenen Pflanzen, die ein 35S::*KNAT1-VP16* Konstrukt tragen unter Umständen Informationen über die Aktivität von *KNAT2* liefern.

Um den Zusammenhang der elongierten Internodien mit einer Überexpression von *KNAT1* zu klären, könnten unter anderem Gewebeschnitte von Bereichen der Infloreszenz von *KNOX*_(STM) bzw. *KNOX/ELK*_(STM) Pflanzen mit einer DIG-markierten *KNAT1* Sonde hybridisiert und mit wildtypischen Schnitten verglichen werden.

Nicht zuletzt wird weiterhin versucht die Promotorregion von *KNAT1/BP* aus *bp-R* Mutanten zu amplifizieren, um diese anschließend sequenzieren zu können. Es wird erwartet, dass sich die Mutation in einem regulatorischen Element von *KNAT1* befindet, das für das räumliche Expressionsmuster verantwortlich ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem das *Arabidopsis* Genom vollständig sequenziert ist, sind hier die Sequenzen aller putativer Transkriptionsfaktoren bekannt, aber für die meisten dieser Gene ist ihre biologische Funktion weiterhin unklar, vor allem weil Funktionsverlust Mutanten vieler Gene bisher noch nicht identifiziert wurden. Eine Möglichkeit schnell Informationen über die biologische Funktion eines bestimmten Transkriptionsfaktors zu bekommen, ist die Umwandlung in dominant-negative Genfunktionen, um dann durch die Überexpression dieses veränderten Proteins eine Kopie des Funktionsverlust Phänotyps zu erzeugen. Die Herstellung dominant-negativer Proteinchimären durch Fusion mit der Repressordomäne des *Drosophila* Engrailed Proteins (EN²⁹⁸) wurde in *Drosophila*, *Xenopus* und Maus erfolgreich eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz dieser Methode, im Folgenden mit *CHRIS* bezeichnet für *Chimeric Repressor Interference System*, auch in Pflanzen geeignet ist, um Funktionsverlust-Phänotypen von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Die ektopische Expression von N-terminalen Fusionsproteinen zwischen der EN²⁹⁸ Domäne und STM oder KNAT1 in *Arabidopsis thaliana* resultierte in transgenen Pflanzen, die eine Phänokopie des entsprechenden Funktionsverlust-Phänotyps zeigten. Der gut charakterisierte Transkriptionsfaktor STM wurde als Testgen gewählt aufgrund des vorhersagbaren Funktionsverlust-Phänotyps. Für KNAT1 konnte erst mit Hilfe von CHRIS die zu diesem Zeitpunkt molekular nicht weiter charakterisierte EMS-Mutante *brevipedicellus* (*bp*) als Funktionsverlust Mutante von KNAT1 identifiziert werden. Über 75% der transgenen 35S::en²⁹⁸-KNAT1 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zeigten die für *bp* charakteristischen nach unten gebogenen Pedicels und den daraus resultierenden hängenden Blüten und Schoten sowie verkürzte Internodien. Über RT-PCR, *in-situ* Hybridisierung, *Southern*-Analyse und Komplementations-Experiment konnte dann gezeigt werden, dass in *bp-1* Mutanten in der Tat das KNAT1 Gen betroffen ist.

Um den Mechanismus von *CHRIS* näher zu untersuchen wurden C- und N-terminale Deletionen von STM sowie einzelne Domänen mit und ohne der EN²⁹⁸ Domäne in *Arabidopsis* Pflanzen überexprimiert. Darüber hinaus wurden in einige dieser Konstrukte Leserasterverschiebungen eingefügt. Aufgrund der Analyse der mit diesen Konstrukten erhaltenen Primärtransformanten lässt sich sagen, dass der Mechanismus wahrscheinlich auf einer Mischung unterschiedlicher Formen der Repression beruht. *Squelching* scheint den größten Anteil an der Ausprägung der Phänokopien zu haben, wobei Cosuppression zu einem geringen Teil ebenfalls dazu beiträgt. Ob die EN²⁹⁸ Fusionsproteine auch über direkte Repression der Zielgene die Phänokopien erzeugen, kann nicht eindeutig festgestellt aber auch nicht ausgeschlossen werden. Auf jeden Fall trägt die EN²⁹⁸ Domäne wesentlich zur Spezifität der zu beobachtenden Phänotypen bei.

6 ABSTRACT

The *Arabidopsis* genome has been completely sequenced and therefore the sequences of all putative transcription factors are available. However, for most genes, their biological function and contribution to regulatory networks remain unknown, not least because loss-of function mutants for many of the genes have not been so far identified. A suitable method to obtain rapid information about the biological function of a transcription factor of interest is the conversion of the transcriptional activator into a dominant-negative gene function. The expression of these dominant-negative gene functions lead to a copy of the loss-of function phenotype. In *Drosophila*, *Xenopus* and mouse, the repressor domain of the *Drosophila* Engrailed protein (EN²⁹⁸) has successfully been used to effect dominant-negative gene functions.

Evidence is provided that CHRIS (Chimeric Repressor Interference System) can also be used in plants to identify loss-of function phenotypes of transcription factors. The ectopic expression of N-terminal fusions of the EN²⁹⁸ domain and STM or KNAT1 in *Arabidopsis thaliana* results in dominant-negative functions that copy the loss-of function phenotype. The well characterized transcription factor STM was used to test the system because of its predictable phenotype. In contrast, at the time of this study the KNAT1 locus was not associated with any known mutant. With the help of CHRIS, the EMS mutant *brevipedicellus* (*bp*) could be identified as the loss-of function mutant of KNAT1. More than 75% of transgenic 35S::en²⁹⁸-KNAT1 *Arabidopsis thaliana* plants exhibited the characteristic *bp* phenotype in the inflorescence, with downward-pointing pedicels and shortened internodes. Using RT-PCR, *in-situ* hybridisation, Southern analysis and complementation experiments it was possible to confirm that the KNAT1 locus is affected in *bp-1* mutants.

To further understand the mechanism of CHRIS, C- and N-terminal deletions as well as individual domains of STM were expressed in *Arabidopsis* plants with or without the EN²⁹⁸ domain. Additionally, frameshifts were introduced into some of the constructs. The analysis of the primary transformants revealed that the mechanism of CHRIS probably relies on a mixture of different forms of repression. Protein squelching appears to be the main mechanism, although cosuppression may contribute to the phenocopy frequency at a low level. Whether the EN²⁹⁸ domain actively represses transcription of target genes remains an open question but cannot be excluded. However, the EN²⁹⁸ domain significantly increases the specificity of the observed phenotypes.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* **9**: 841-857.
- Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A., Short, J.M.** (1992). pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* **216**: 483-495.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Aronsons, B.D., Fisher, A.L., Blechman, K., Caudy, M. and Gergen, J.P.** (1997). Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5581-5587.
- Ausubel, F. et al.** (Hrsg. 1996). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Babinet, C. and Cohen-Tannoudji, M.** (2001). Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **73**: 365-383.
- Barton, M.K. and Poethig, R.S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**: 823-831.
- Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S.E., Modrusan, Z., Crosby, W.L. and Haughn, G.W.** (2001). The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* **13**: 2455-2470.
- Benfey, P.N. and Weigel, D.** (2001). Transcriptional networks controlling plant development. *Plant Physiol* **125**: 109-111.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F. and Blasi, F.** (1998). The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* **17**: 1434-1445.
- Bowman, J.** (1997). ARABIDOPSIS An Atlas of Morphology and Development, Springer Verlag, Berlin.
- Bürglin, T.A.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl. Acids Res.* **25**: 4173-4180.
- Burns, P.A., Allen, F.L. and Glickman, B.W.** (1986). DNA sequence analysis of mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in Uvr+ and UvrB- strains of Escherichia coli. *Genetics* **113**: 811-819.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. & Martienssen, R.A.** (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**: 967-971.
- Chuang, C.-F. and Meyerowitz, E.M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4985-4990.
- Chuck, G., Lincoln, C. and Hake, S.** (1996). *KNAT1* Induces Lobed Leaves with Ectopic Meristems When Overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**: 1277-1289.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. and Carpenter, R.** (1990). *floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311-1322.
- Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M. and Smith, J.C.** (1996) Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* **122**: 2427-2435.

- Conner, J. and Zhongchi, L.** (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12902-12907.
- Copeland, J.W., Nasiadka, A., Dietrich, B.H. and Krause, H.M.** (1996). Patterning of the *Drosophila* embryo by a homeodomain-deleted Ftz polypeptide. *Nature* **379**: 162-165.
- Dockx, J., Quaedvlieg, N. Keultjes, G. Kock, P., Weisbeek, P. and Smeekens, J.** (1995). The homeobox gene *ATK1* of *Arabidopsis thaliana* is expressed in the shoot apex of the seedling and in flowers and inflorescence stems of mature plants. *Plant Mol. Biol.* **28**: 723-737.
- Douglas, S.M., Chuck, G. Dengler, R.E., Pelecanda, L. and Riggs, C.D.** (2002). *KNAT1* and *ERECTA* Regulate Inflorescence Architecture in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 547-558.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**: 11-15.
- Dubnicoff, T., Valentine, S.A., Chen, G., Shi, T., Lengyel, J.A., Paroush, Z. and Courey, A.J.** (1997). Conversion of dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor groucho. *Gene & Dev.* **11**:2952-2957.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, S.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fisher, A.L. and Caudy, M.** (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes & Dev.* **12**: 1931-1940.
- Frankel, A.D. and Kom, P.S.** (1991). Modular structure of transcription factors: Implications for gene regulation. *Cell* **65**: 717-719.
- Gehring W.J.** (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252.
- Gerber, H.-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S., Schaffner, W.** (1994). Transcriptional Activation Modulated Homopolymeric Glutamine and Proline Stretches. *Science* **263**: 808-811.
- Gill, G. and Ptashne, M.** (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* **334**: 721-724.
- Goto, K. & Meyerowitz, E.M.** (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev* **8**: 1548-1560.
- Hake, S.** (1992). Unraveling the knots in plant development. *Trends Genet.* **8**: 109-114.
- Hake, S., Vollbrecht, E. and Freeling, M.** (1989). Cloning *Knotted*, the dominant morphological mutant in maize using *Ds2* as a transposon tag. *EMBO J.* **8**: 15-22.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Han, K. & Manley, J.L.** (1993). Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO J.* **12**: 2723-2733.
- Hannon, G.J.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**: 244-251.
- Herskowitz, I.** (1987) Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**: 219-222.
- Herrin, D.L. & Schmidt, G.W.** (1988). Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *BioTechniques* **6**: 196-200.

- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K. and Ohme-Takagi M.** (2002) The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett* **514**: 351-4
- Holmes, D.S. & Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**(1): 193-197.
- Jack, T., Brockman, L.L. and Meyerowitz, E.M.** (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamen. *Cell* **68**: 683-697.
- Jackson, D.P.**(1991). *In situ* hybridisation in plants. In: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach, Bowles, D.J., Gurr, S.J. and McPherson, M., eds. Oxford University Press, England.
- Jackson, D. Veit, B. & Hake, S.** (1994). Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**: 405-413.
- Jaynes, J.B. & O'Farrell, P.H.** (1991). Active Repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J.* **10**: 1427-1433.
- Jimenez, G, Paroush, Z. and Ish-Horowicz** (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including hairy and engrailed. *Gene & Dev.* **11**: 3072-3082.
- John, A., Smith, S.T. and Jaynes, J.B.** (1995) Inserting the Ftz homeodomain into Engrailed creates a dominant transcriptional repressor that specifically turns off Ftz target genes in vivo. *Development* **121**: 1801-1813.
- Kerstetter, R.A., Laudencia-Chingcuanco, D., Smith, L.G. and Hake, S.** (1997). Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development* **124**: 3045-3054.
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B. Yamaguchi, J. and Hake, S.** (1994). Sequence analysis and expression pattern divide the maize *knotted-1* like homeobox genes into two classes. *The Plant Cell* **6**: 1877-1887.
- Koncz, C. & Schell, J.** (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396.
- Koorneef, M., Eden, J. v., Hanhart, C.J., Stam, P., Braaksma, F.J. & Feenstra, W.J.** (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered* **74**: 265-272.
- Krysan, P.J. Young, J.C. and Sussman, M.R.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283-2290.
- Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger, J. and Traas, J.** (1998). MGOUN1 and MGOUN2: Two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**: 1253-1260.
- Levine, M. and Maley, J.L.** (1989). Transcriptional Repression of Eukaryotic Promoters. *Cell* **59**: 405-408.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S.** (1994). A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 1859-1876.
- Liu, L., White, M.J. and MacRae, T.H.** (1999). Transcription factors and their genes in higher plants – Functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem.* **262**: 247-257.
- Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V. and Davis, R.W.** (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**: 436-439.

- Logan, C.; Hanks, M.C., Noble-Topham, S., Nallainathan, D., Provart, N.J. and Joyner, A.L.** (1992). Cloning and sequence comparison of the mouse, human and chicken *engrailed* genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev. Genet.* **13**: 345-358.
- Long, J.A. and Barton, M.K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* **125**: 3027-3035.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**: 66-69.
- Lyon, J.J. and Watson R.J.** (1996) Interference of Myb transactivation activity by a conditional dominant negative protein: functional interference in a cytotoxic T-cell line results in G1 arrest. *Gene* **182**: 123-128
- Markel, H., Chandler, J. and Werr, W.** (2002). Translational fusions with the *engrailed* repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucleic Acids Res.* **30**: 4709-4719.
- Martin, C. & Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**: 67-73.
- Matsuoka, M., Ichikawa, H., Saito, A., Tamda, Y., Fujimura, T. and Kano-Murakami, Y.** (1993). Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. *Plant Cell* **5**: 1039-1048.
- McGinnis W., Levine M.S., Hafen E., Kuroiwa A. and Gehring W.J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-433.
- Meisel, L. and Lam, E.** (1996). The conserved ELK homeodomain of KNOTTED-1 contains two regions that signal nuclear localisation. *Plant Mol. Biol.* **30**: 1-14.
- Mével-Ninio M., Terracol, R. and Kafatos, F.C.** (1991). The ovo gene of *Drosophila* encodes a zinc finger protein required for female germ line development. *EMBO J.* **10**: 2259-2266.
- Mitchell, P.J. & Tijan, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
- Mühlhardt, C.** (2000). *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene intrans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
- Nolte, C.** (2000). Funktionsanalyse des *SHOOTMERISTEMLESS* Genprodukts in *Arabidopsis thaliana*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L. and Hake, S.** (2000). Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**: 5523-5532.
- Paroush, Z., Finley Jr., R.L., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**: 805-815.
- Pautot, V., Dockx, J., Hamant, O., Kronenberger, J., Grandjean, O., Jublot, D. and Traas, J.** (2001). *KNAT2*: Evidence for a Link between Knotted-like Genes and Carpel Development. *The Plant Cell* **13**: 1719-1734.
- Poethig, R.S.** (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* **250**: 273-277.

- Pontier, D., Miao, Z.-H. and Lam, E.** (2001). Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *The Plant Journal* **27**: 529-538.
- Poole, S.J., Kauvar, L.M., Drees, B. and Kornberg, T.** (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: structural analysis of embryonic transcript. *Cell* **40**: 37-43.
- Ptashne, M. and Gann, A.A.F.** (1990). Activators and targets. *Nature* **346**: 329-331.
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. and Maas, C.** (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5888-5893.
- Reiser, L., Sánchez-Baracaldo, P. and Hake, S.** (2000). Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Mol. Biol.* **42**: 151-166.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* **378**: 1079-1101.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.** (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110.
- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S. and Gatz, C.** (1994). A dominant Negative Mutant of PG13 Suppresses Transcription from a Cauliflower Mosaic Virus 35S Truncated Promoter in Transgenic Tobacco Plants. *The Plant Cell* **6**: 1087-1098.
- Sakamoto, T., Nishimura, A., Tamaoki, M., Kuba, M., Tanaka, H., Iwahori, S. and Matsuoka, M.** (1999). The Conserved KNOX Domain Mediates Specificity of Tobacco KNOTTED1-Type Homeodomain Proteins. *The Plant Cell* **11**: 1419-1431.
- Schaefer, D.G.** (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 477-501.
- Schmitz, G. & Theres, K.** (1999). Genetic control of branching in *Arabidopsis* and tomato. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 51-55.
- Schuch, W.** (1991) Using antisense RNA to study gene function. *Symp Soc Exp Biol* **45**:117-127
- Scott M.P., Carroll S.B.** (1987). The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* **51**: 689-697.
- Scott M.P. & Weiner, A.J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4115-4119.
- Sega, G.A.** (1984). A review of genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* **134**: 113-142.
- Serikawa, K.A., Martinez-Laborda, A. and Zambryski, P.** (1996). Three *knotted1*-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **32**: 673-683.
- Shih, M.-C., Heinrich, P.C. and Goodman, H.M.** (1991). Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **104**: 133-138.
- Sinnett, D., Richer, C. and Baccichet, A.** (1998). Isolation of Stable Bacterial Artificial Chromosome DNA Using a Modified Alkaline Lysis Method. *BioTechniques* **24**: 752-754.
- Smith, L.G., Greene, B., Veit, B. & Hake, S.** (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* **116**: 21-30.

- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P., Green, A. and Waterhouse, P.M.** (2000). Total silencing by intron-spiced haipin RNAs. *Nature* **407**: 319-320.
- Smith, S.T. & Jaynes, J.B.** (1996). A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2-, and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**: 3141-3150.
- Smoller, D., Friedal, C., schmid, A., Bettler, D., Lam, L. and Yedvobnick, B.** (1990). The *Drosophila* neurogenic locus *mastermind* encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers. *Genes Dev.* **4**: 1688-1700.
- Steeves, T.A. and Sussex, I.M.** (1989). *Patterns in Plant Development*, 2nd ed., Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Stirnberg, P., van De Sande, K. and Leyser, H.M.** (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131-1141.
- Sussex, I.M.** (1989). Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**: 225-229.
- Takatsuji, H.** (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 582-596.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W. & Cormai, L.** (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 2723-2735.
- Tantikanjana, T., Yong, J.W.H., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., Sandberg, G. and Sundaresan, V.** (2001). Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the *SUPERSHOOT* gene. *Genes Dev.* **15**: 1577-1588.
- Taylor, C.B.** (1997). *Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root.* *The Plant Cell* **9**: 981-988.
- Terada, R., Urawa, H., Inagaki, Y., Tsugane, K. & Iida, S.** (2002). Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat. Biotechnol.* Sep 9, elektronische Publikation vor Druck.
- Tolkunova, E.N., Fujioka, M., Kobayashi, M., Deka, D. and Jaynes, J.B.** (1998). Two distinct types of repression domain in Engrailed: One interacts with the Groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2804-2814.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H.** (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5890.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R. Whittier, R.F. and Komeda, Y.** (1996). The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**: 735-746.
- Überlacker, B. & Werr, W.** (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding* **2**: 293-295.
- Ueda, R.** (2001). Rnai: a new technology in the post-genomiv sequencing era. *J. Neurogenet.* **15**: 193-204.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Murrain, P., Palauqui, J.-C. and vernhettes, S.** (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal* **16**: 651-659.
- Venglat, S.P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., Martienssen, R., Selvaraj, G. and Datta, R.** (2002). The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4730-4735.

-
- Vollbrecht, E., Reiser, L. and Hake, S.** (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development* **127**: 3161-3172.
- Vollbrecht, E., Veit, B.; Sinha, N. and Hake, S.** (1991). The developmental gene *Knotted-1* is a member of maize homeobox gene family. *Nature* **350**: 241-243.
- Wang, M.-B. and Waterhouse, P.-M.** (2000). High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with respective transgene structure but independent of DNA Methylation. *Plant Mol. Biol.* **43**: 67-82.
- Walbot, V.** (1985). On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet* **1**: 165-168.
- Waterhouse, P.-M., Graham, M.W. and Wang, M.-B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**: 13959-13964.
- Waterhouse, P.-M., Wang, M.-B. and Lough, T.** (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-842.
- Weigel, D. and Jürgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**: 751-754.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Sing, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**: 581-590.
- Williams, F.E. and Trumbly, R.J.** (1990). Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell. Biol.* **10**: 6500-6511.
- Williams, R.W.** (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *BioEssays* **20**: 280-282.

8 ANHANG

8.1 Sequenzen

```

1  ATG GCC CTG GAG GAT CGC TGC AGC CCA CAG TCA GCG CCC AGC CCC ATT ACC CTA CAA ATG CAG CAT CTT
1▶Met Ala Leu Glu Asp Arg Cys Ser Pro Gln Ser Ala Pro Ser Pro Ile Thr Leu Gln Met Gln His Leu

70  CAC CAC CAG CAA CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAG CAG CAA ATG CAG CAC CTC CAC CAG CTG CAG CAA CTG
24▶His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Met Gln His Leu His Gln Leu Gln Gln Leu

139 CAG CAG TTG CAC CAA CAG CAA CTG GCC GCC GGT GTC TTC CAC CAT CCG GCA ATG GCC TTC GAT GCC GCT
47▶Gln Gln Leu His Gln Gln Gln Leu Ala Ala Gly Val Phe His His Pro Ala Met Ala Phe Asp Ala Ala

208  GCA GCC GCC GCT GCT GCA GCT GCT GCT GCG GCC GCC CAC GCT CAT GCT GCT GCA CTG CAG CAG CGC CTC
70▶Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala His Ala His Ala Ala Ala Leu Gln Gln Arg Leu

277  AGT GGC AGT GGA TCG CCC GCA TCC TGC TCC ACG CCC GCC TCG TCC ACG CCG CTG ACC ATC AAG GAG GAG
93▶Ser Gly Ser Gly Ser Pro Ala Ser Cys Ser Thr Pro Ala Ser Ser Thr Pro Leu Thr Ile Lys Glu Glu

346  GAA AGC GAC TCC GTG ATC GGT GAC ATG AGT TTC CAC AAT CAG ACG CAC ACC ACC AAC GAG GAG GAG GAG
116▶Glu Ser Asp Ser Val Ile Gly Asp Met Ser Phe His Asn Gln Thr His Thr Thr Asn Glu Glu Glu Glu

415  GCG GAG GAG GAT GAC GAC ATT GAT GTG GAT GTG GAT GAT ACG TCG GCG GGC GGA CGC CTG CCA CCA CCC
139▶Ala Glu Glu Asp Asp Asp Ile Asp Val Asp Val Asp Asp Thr Ser Ala Gly Gly Arg Leu Pro Pro Pro

484  GCC CAC CAG CAG CAG TCG ACG GCC AAG CCC TCG CTG GCC TTT TCC ATC TCC AAC ATC CTG AGC GAT CGT
162▶Ala His Gln Gln Gln Ser Thr Ala Lys Pro Ser Leu Ala Phe Ser Ile Ser Asn Ile Leu Ser Asp Arg

553  TTC GGA GAT GTC CAG AAG CCT GGC AAG TCG ATT GAG AAC CAG GCC AGC ATA TTC CGC CCC TTC GAG GCG
185▶Phe Gly Asp Val Gln Lys Pro Gly Lys Ser Ile Glu Asn Gln Ala Ser Ile Phe Arg Pro Phe Glu Ala

622  AAT CGC TCC CAG ACT GCC ACG CCC TCC GCC TTT ACA AGA GTG GAT CTG CTG GAG TTT AGC CGG CAA CAG
208▶Asn Arg Ser Gln Thr Ala Thr Pro Ser Ala Phe Thr Arg Val Asp Leu Leu Glu Phe Ser Arg Gln Gln

691  CAA GCT GCC GCC GCA GCC GCT ACT GCG GCC ATG ATG CTG GAA CGG GCC AAC TTC CTT AAC TGC TTC AAT
231▶Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Met Met Leu Glu Arg Ala Asn Phe Leu Asn Cys Phe Asn

760  CCG GCT GCC TAT CCC AGG ATA CAC GAG GAA ATC GTG CAG AGT CGC CTG CGC AGG AGT GCA GCC AAT GCC
254▶Pro Ala Ala Tyr Pro Arg Ile His Glu Glu Ile Val Gln Ser Arg Leu Arg Arg Ser Ala Ala Asn Ala

829  GTC ATC CCG CCG CCC ATG AGC TCC AAG ATG AGC GAT GCC AAT CCA GAG AAA TCT GCT CTG GGA TCT
277▶Val Ile Pro Pro Pro Met Ser Ser Lys Met Ser Asp Ala Asn Pro Glu Lys Ser Ala Leu Gly Ser

```

Abb. C1: Die Engrailed Repressordomäne (En²⁹⁸).

Poole, S.J., Kauvar, L.M., Drees, B. and Kornberg, T. (1985). The *engrailed* Locus of *Drosophila*: Structural Analysis of an Embryonic Transcript. *Cell* **40**: 37-43.

1 ATG GAG AGT GGT TCC AAC AGC ACT TCT TGT CCA ATG GCT TTT GCC GGG GAT AAT AGT GAT GGT CCG ATG
 1 ▶Met Glu Ser Gly Ser Asn Ser Thr Ser Cys Pro Met Ala Phe Ala Gly Asp Asn Ser Asp Gly Pro Met
 70 TGT CCT ATG ATG ATG ATG ATG CCG CCC ATC ATG ACA TCA CAT CAA CAT CAT GGT CAT GAT CAT CAA CAT
 24 ▶Cys Pro Met Met Met Met Met Pro Pro Ile Met Thr Ser His Gln His His Gly His Asp His Gln His
 139 CAA CAA CAA GAA CAT GAT GGT TAT GCA TAT CAG TCA CAC CAC CAA CAA AGT AGT TCC CTT TTT CTT CAA
 47 ▶Gln Gln Gln Glu His Asp Gly Tyr Ala Tyr Gln Ser His His Gln Gln Ser Ser Ser Leu Phe Leu Gln
 208 TCA CTA GCT CCT CCC CAA GGA ACT AAG AAC AAA GTT GCT TCT TCT TCT TCT CCT TCC TCT TGT GCT CCT
 70 ▶Ser Leu Ala Pro Pro Gln Gly Thr Lys Asn Lys Val Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ala Pro
 277 GCC TAT TCT CTA ATG GAG ATC CAT CAT AAC GAA ATC GTT GCA GGA GGA ATC AAC CCT TGC TCC TCT TTC
 93 ▶Ala Tyr Ser Leu Met Glu Ile His His Asn Glu Ile Val Ala Gly Gly Ile Asn Pro Cys Ser Ser Phe
 346 TCT TCT TCA GCC TCT GTC AAG GCC AAG ATC ATG GCT CAT CCT CAC TAC CAC CGC CTC TTG GCC GCT TAT
 116 ▶Ser Ser Ser Ala Ser Val Lys Ala Lys Ile Met Ala His Pro His Tyr His Arg Leu Leu Ala Ala Tyr
 415 GTC AAT TGT CAG AAG GTT GGA GCA CCA CCG GAG GTT GTG GCG AGG CTG GAG GAG GCA TGC TCG TCT GCC
 139 ▶Val Asn Cys Gln Lys Val Gly Ala Pro Pro Glu Val Val Ala Arg Leu Glu Glu Ala Cys Ser Ser Ala
 484 GCA GCC GCA GCC GCA TCT ATG GGG CCA ACA GGG TGT CTT GGT GAA GAT CCA GGG CTT GAT CAA TTC ATG
 162 ▶Ala Ala Ala Ala Ala Ser Met Gly Pro Thr Gly Cys Leu Gly Glu Asp Pro Gly Leu Asp Gln Phe Met
 553 GAA GCT TAC TGT GAA ATG CTC GTT AAG TAT GAG CAA GAG CTC TCC AAA CCT TTC AAG GAA GCT ATG GTC
 185 ▶Glu Ala Tyr Cys Glu Met Leu Val Lys Tyr Glu Gln Glu Leu Ser Lys Pro Phe Lys Glu Ala Met Val
 622 TTC CTT CAA CGT GTC GAG TGT CAA TTC AAA TCC CTC TCT CTA TCC TCA CCT TCC TCT TTC TCC GGT TAT
 208 ▶Phe Leu Gln Arg Val Glu Cys Gln Phe Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Pro Ser Ser Phe Ser Gly Tyr
 691 GGA GAG ACA GCA ATT GAT AGG AAC AAT AAT GGG TCA TCC GAG GAA GAA GTC GAT ATG AAC AAT GAA TTT
 231 ▶Gly Glu Thr Ala Ile Asp Arg Asn Asn Asn Gly Ser Ser Glu Glu Glu Val Asp Met Asn Asn Glu Phe
 760 GTA GAT CCA CAA GCT GAG GAT AGA GAG CTT AAA GGA CAG CTC TTG CGC AAG TAC AGT GGT TAC TTA GGG
 254 ▶Val Asp Pro Gln Ala Glu Asp Arg Glu Leu Lys Gly Gln Leu Leu Arg Lys Tyr Ser Gly Tyr Leu Gly
 829 AGC CTC AAG CAA GAG TTC ATG AAG AAG AGG AAG AAA GGA AAG CTC CCT AAA GAA GCT CGT CAA CAA CTC
 277 ▶Ser Leu Lys Gln Glu Phe Met Lys Lys Arg Lys Lys Gly Lys Leu Pro Lys Glu Ala Arg Gln Gln Leu
 898 CTT GAT TGG TGG AGC CGT CAC TAC AAA TGG CCT TAC CCT TCG GAG CAA CAA AAG CTC GCC CTT GCG GAA
 300 ▶Leu Asp Trp Trp Ser Arg His Tyr Lys Trp Pro Tyr Pro Ser Glu Gln Gln Lys Leu Ala Leu Ala Glu
 967 TCA ACG GGG CTG GAC CAG AAA CAG ATA AAC AAT TGG TTC ATA AAC CAG AGG AAA CGG CAT TGG AAG CCG
 323 ▶Ser Thr Gly Leu Asp Gln Lys Gln Ile Asn Asn Trp Phe Ile Asn Gln Arg Lys Arg His Trp Lys Pro
 1036 TCG GAG GAC ATG CAG TTT GTA GTA ATG GAC GCA ACA CAT CCT CAC CAT TAC TTC ATG GAT AAT GTC TTG
 346 ▶Ser Glu Asp Met Gln Phe Val Val Met Asp Ala Thr His Pro His His Tyr Phe Met Asp Asn Val Leu
 1105 GAC AAT CCT TTC CCA ATG GAT CAC ATC TCC TCC ACC ATG CTT TGA
 369 ▶Asp Asn Pro Phe Pro Met Asp His Ile Ser Ser Thr Met Leu ...

Abb. A2: Die SHOOT MERISTEMLESS Sequenz. GenBank Accession number U32344. Die Histidine und Glutamine im N-Terminus sind violett gekennzeichnet. Die KNOX Domäne ist in grün, die ELK Domäne ist in magenta und die Homöodomäne ist in blau dargestellt.

```

1 ATG GAA GAA TAC CAG CAT GAC AAC AGC ACC ACT CCT CAA AGA GTA AGT TTC TTG TAC TCT CCA ATC TCT
1▶Met Glu Glu Tyr Gln His Asp Asn Ser Thr Thr Pro Gln Arg Val Ser Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ser

70 TCT TCC AAC AAA AAC GAT AAC ACA AGT GAT ACC AAC AAC AAC AAC AAC AAT AAT AAT AGT AGC AAT TAT
24▶Ser Ser Asn Lys Asn Asp Asn Thr Ser Asp Thr Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Ser Asn Tyr

139 GGT CCT GGT TAC AAT AAT ACT AAC AAC AAC AAT CAT CAC CAC CAA CAC ATG TTG TTT CCA CAT ATG AGC
47▶Gly Pro Gly Tyr Asn Asn Thr Asn Asn Asn Asn His His His Gln His Met Leu Phe Pro His Met Ser
AAC Ler
208 TCT CTT CTC CCT CAA ACA ACC GAG AAT TGC TTC CGA TCT GAT CAT GAT CAA CCC AAC AAC AAC AAC AAC
70▶Ser Leu Leu Pro Gln Thr Thr Glu Asn Cys Phe Arg Ser Asp His Asp Gln Pro Asn Asn Asn Asn Asn
Asn Ler
277 CCA TCT GTT AAA TCT GAA GCT AGC TCC TCA AGA ATC AAT CAT TAC TCC ATG TTA ATG AGA GCC ATC CAC
93▶Pro Ser Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Arg Ile Asn His Tyr Ser Met Leu Met Arg Ala Ile His
AAC Ler
346 AAT ACT CAA GAA GCT AAC AAC AAC AAC AAT GAC AAC GTA AGC GAT GTT GAA GCC ATG AAG GCT AAA ATC
116▶Asn Thr Gln Glu Ala Asn Asn Asn Asn Asn Asp Asn Val Ser Asp Val Glu Ala Met Lys Ala Lys Ile
Asn Ler

415 ATT GCT CAT CCT CAC TAC TCT ACC CTC CTA CAA GCT TAC TTG GAC TGC CAA AAG ATT GGA GCT CCA CCT
139▶Ile Ala His Pro His Tyr Ser Thr Leu Leu Gln Ala Tyr Leu Asp Cys Gln Lys Ile Gly Ala Pro Pro

484 GAT GTG GTT GAT AGA ATT ACG GCG GCA CGG CAA GAC TTT GAG GCT CGA CAA CAG CGG TCA ACA CCG TCT
162▶Asp Val Val Asp Arg Ile Thr Ala Ala Arg Gln Asp Phe Glu Ala Arg Gln Gln Arg Ser Thr Pro Ser

553 GTC TCT GCC TCC TCT AGA GAC CCG GAG TTA GAT CAA TTC ATG GAA GCA TAC TGT GAC ATG TTG GTT AAA
185▶Val Ser Ala Ser Ser Arg Asp Pro Glu Leu Asp Gln Phe Met Glu Ala Tyr Cys Asp Met Leu Val Lys

622 TAT CGT GAG GAG CTA ACA AGG CCC ATT CAG GAA GCA ATG GAG TTT ATA CGT CGT ATT GAA TCT CAG CTT
208▶Tyr Arg Glu Glu Leu Thr Arg Pro Ile Gln Glu Ala Met Glu Phe Ile Arg Arg Ile Glu Ser Gln Leu

691 AGC ATG TTG TGT CAG AGT CCC ATT CAC ATC CTC AAC AAT CCT GAT GGG AAG AGT GAC AAT ATG GGA TCA
231▶Ser Met Leu Cys Gln Ser Pro Ile His Ile Leu Asn Asn Pro Asp Gly Lys Ser Asp Asn Met Gly Ser

760 TCA GAC GAA GAA CAA GAG AAT AAC AGC GGA GGG GAA ACA GAA TTA CCG GAA ATA GAC CCG AGG GCC GAA
254▶Ser Asp Glu Glu Gln Glu Asn Asn Ser Gly Gly Glu Thr Glu Leu Pro Glu Ile Asp Pro Arg Ala Glu

829 GAT CGG GAA CTC AAG AAC CAT TTG CTG AAG AAG TAT AGT GGA TAC TTA AGC AGT TTG AAG CAA GAA CTA
277▶Asp Arg Glu Leu Lys Asn His Leu Leu Lys Lys Tyr Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Leu Lys Gln Glu Leu

898 TCC AAG AAG AAA AAG AAA GGT AAA CTT CCT AAA GAA GCA CGG CAG AAG CTT CTC ACG TGG TGG GAG TTG
300▶Ser Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Leu Pro Lys Glu Ala Arg Gln Lys Leu Leu Thr Trp Trp Glu Leu

967 CAT TAC AAG TGG CCA TAT CCT TCT GAG TCA GAG AAG GTA GCG TTG GCG GAA TCA ACG GGG TTA GAT CAG
323▶His Tyr Lys Trp Pro Tyr Pro Ser Glu Ser Glu Lys Val Ala Leu Ala Glu Ser Thr Gly Leu Asp Gln

1036 AAA CAA ATC AAC AAT TGG TTC ATA AAC CAA AGA AAG CGT CAC TGG AAA CCA TCT GAA GAC ATG CAG TTC
346▶Lys Gln Ile Asn Asn Trp Phe Ile Asn Gln Arg Lys Arg His Trp Lys Pro Ser Glu Asp Met Gln Phe

1105 ATG GTG ATG GAT GGT CTG CAG CAC CCG CAC CAC GCA GCT CTG TAC ATG GAT GGT CAT TAC ATG GGT GAT
369▶Met Val Met Asp Gly Leu Gln His Pro His His Ala Ala Leu Tyr Met Asp Gly His Tyr Met Gly Asp

1174 GGA CCT TAT CGT CTC GGT CCA TAA
392▶Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Pro ...

```

Abb. A3: Die KNAT1 Sequenz. GenBank Accession number U14174. Die Histidine und Asparagine im N-Terminus sind violett gekennzeichnet. Die KNOX Domäne ist in grün, die ELK Domäne ist in magenta und die Homöodomäne ist in blau dargestellt. Die Sequenz von KNAT1 in *Landsberg erecta* enthält zwei zusätzliche Aminosäuren, die oberhalb der Columbia Sequenz angegeben ist.

```

1  ATG GAT AGA ATG TGT GGT TTC CGC TCG ACG GAA GAC TAT TCG GAG AAA GCG ACG TTG ATG ATG CCG TCC
1▶Met Asp Arg Met Cys Gly Phe Arg Ser Thr Glu Asp Tyr Ser Glu Lys Ala Thr Leu Met Met Pro Ser

70  GAT TAT CAG TCT TTG ATT TGT TCA ACC ACC GGA GAC AAT CAA AGA CTG TTT GGA TCC GAC GAA CTC GCT
24▶Asp Tyr Gln Ser Leu Ile Cys Ser Thr Thr Gly Asp Asn Gln Arg Leu Phe Gly Ser Asp Glu Leu Ala

139 ACC GCT TTG TCC TCG GAG TTG CTT CCG CGT ATT CGA AAA GCT GAG GAT AAT TTC TCT CTT AGT GTC ATC
47▶Thr Ala Leu Ser Ser Glu Leu Leu Pro Arg Ile Arg Lys Ala Glu Asp Asn Phe Ser Leu Ser Val Ile

208 AAA TCC AAA ATC GCT TCT CAT CCT TTG TAT CCT CGC TTA CTC CAA ACC TAC ATC GAT TGC CAA AAG GTG
70▶Lys Ser Lys Ile Ala Ser His Pro Leu Tyr Pro Arg Leu Leu Gln Thr Tyr Ile Asp Cys Gln Lys Val

277 GGA GCG CCT ATG GAA ATA GCG TGT ATA TTG GAA GAG ATT CAG CGA GAG AAC CAT GTG TAC AAG AGA GAT
93▶Gly Ala Pro Met Glu Ile Ala Cys Ile Leu Glu Glu Ile Gln Arg Glu Asn His Val Tyr Lys Arg Asp

346 GTT GCT CCA TTA TCT TGC TTT GGA GCT GAT CCT GAG CTT GAT GAA TTC ATG GAA ACC TAC TGT GAT ATA
116▶Val Ala Pro Leu Ser Cys Phe Gly Ala Asp Pro Glu Leu Asp Glu Phe Met Glu Thr Tyr Cys Asp Ile

415 TTG GTT AAA TAC AAA ACC GAT CTT GCG AGG CCG TTC GAC GAG GCT ACA ACT TTC ATA AAC AAG ATT GAA
139▶Leu Val Lys Tyr Lys Thr Asp Leu Ala Arg Pro Phe Asp Glu Ala Thr Thr Phe Ile Asn Lys Ile Glu

484 ATG CAG CTT CAG AAC TTG TGC ACT GGT CCA GCG TCT GCT ACA GCT CTT TCA GAT GAT GGT GCG GTT TCA
162▶Met Gln Leu Gln Asn Leu Cys Thr Gly Pro Ala Ser Ala Thr Ala Leu Ser Asp Asp Gly Ala Val Ser

553 TCT GAC GAG GAA CTG AGA GAA GAT GAT GAC ATA GCA GCG GAT GAC AGC CAA CAA AGA AGC AAT GAC CGC
185▶Ser Asp Glu Glu Leu Arg Glu Asp Asp Asp Ile Ala Ala Asp Asp Ser Gln Gln Arg Ser Asn Asp Arg

622 GAT CTG AAG GAC CAG CTA CTA CGC AAA TTT GGT AGC CAT ATC AGT TCA TTG AAA CTC GAG TTC TCT AAA
208▶Asp Leu Lys Asp Gln Leu Leu Arg Lys Phe Gly Ser His Ile Ser Ser Leu Lys Leu Glu Phe Ser Lys

691 AAG AAG AAG AAA GGG AAG CTA CCA AGA GAA GCA AGA CAA GCG TTG CTC GAT TGG TGG AAT GTT CAT AAT
231▶Lys Lys Lys Lys Gly Lys Leu Pro Arg Glu Ala Arg Gln Ala Leu Leu Asp Trp Trp Asn Val His Asn

760 AAA TGG CCT TAC CCT ACT GAA GGC GAC AAA ATA TCT CTG GCT GAA GAA ACA GGT TTG GAT CAA AAA CAA
254▶Lys Trp Pro Tyr Pro Thr Glu Gly Asp Lys Ile Ser Leu Ala Glu Glu Thr Gly Leu Asp Gln Lys Gln

829 ATC AAC AAT TGG TTT ATA AAC CAA AGG AAA CGC CAT TGG AAG CCT TCG GAG AAC ATG CCG TTT GAT ATG
277▶Ile Asn Asn Trp Phe Ile Asn Gln Arg Lys Arg His Trp Lys Pro Ser Glu Asn Met Pro Phe Asp Met

898 ATG GAC GAT TCT AAT GAA ACA TTC TTT ACC GAG TAA
300▶Met Asp Asp Ser Asn Glu Thr Phe Phe Thr Glu ...

```

Abb. A4: Die Sequenz von *KNAT2*. GenBank Accession number U14175.

Die KNOX Domäne ist in grün, die ELK Domäne ist in magenta und die Homöodomäne ist in blau dargestellt.

STM	ME SGS..NSTS.....CPMAFAG..DN.SDGPMCPMMMMMP...PIMTSHQHGHGDHGHQ	47
KNAT1	MEYQHDNSTTPQRVSFLYSPISSSNKN DNTSDTNNNNNNNNSSNYGPGYNNNTNNNNHHQH M	63
STM	QQEHDGYAYQSHHQSSSLFLQSLAPPQGTKNKVASSSSPSSCAPAYS.LMEIHHNEIVAGGI	109
KNAT1	LFPHMSSLLP...OTTENCERSDHDQENNNNNPSVKSEASSSRINHYSMLMRAIHNTQEANN.	122
STM	NPCSSFSSASVKAKIMAHPHYHRLLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACSSAAAAASMGPT.	171
KNAT1	NNNDNVS DVEAMKAKI IAHPHYSTLLQAYLDCQKIGAPPDVVDRI TAARQDFEARQQRSTPSV	185
STM	GCLGEPGLDQFMEAYCEMLVKYEQELSKPFKEAMVFLQRVFCQFKSLSLSPSSFSGYGETA	234
KNAT1	SASSRDEFLDQFMEAYCDMLVKYREELTRPIQEAMFIRRIEQL.SMLCQSPIHILNNDGK	247
STM	IDRNNNGSSEEEVDMN...EF..VDPOAEDRELKQQLIRKYSGYLGLSKQEFMCKRKKGKLI	291
KNAT1	SD..NMGSSDEEQENNSGGETELPEIDPRAEDRELKHNHLIKKYSGYLSLQKQELSKKKKGGKLI	308
STM	PKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSEQQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSEDMQFVVM	254
KNAT1	PKEARQKLLTWELHYKWPYPSESEKVALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSEDMQFVVM	371
STM	DA.THPHH..YFMDN..VLDNPFPMDHISSTML	382
KNAT1	DGLQHPHH AALYMDGHYMGDGPYRLGP.....	398

Abb. A5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von STM und KNAT1. Konservierungsgrad + ■■■ – STM und KNAT1 stimmen in etwa 49,3 % ihrer Aminosäuresequenz überein (End-weighted GAP, UWGCG)

STM	MES..GSNSTSCPMFAGDNSDGPMCPMMMMMP PIMTSHQHGHGDHGHQQQEHDGYAYQSHHQ	61
KNAT2	MDRMCFRSTEDYSEKAT...LMMP.....SD...YQSLIC	30
STM	QSSSLFLQSLAPPQGTKNKVASSSSPSSCAPAYS.LMEIHHNEIVAGGINPCSSFSSASVKAK	124
KNAT2	.STTGDNRIFGS..DELATALSSEL.....LPRIKAE.....DNFSLSV.IKSK	72
STM	IMAHPHYHRLLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACSSAAAAASMGPTGCLGEPGLDQFMEAY	187
KNAT2	JASHPLVPRLLQTYIDCQKVGAPMETIACILEEIQRENHVKRDVA.PLS CFGADPELDEFMETY	135
STM	CEMLVKYEQELSKPFKEAMVFLQRVFCQFKSLSLSPSSFSGYGETAIDRNNNGSSEEEVDMN	250
KNAT2	CDILVKYKTDLARPFDEATTFINKIEMQLQNL.CTGPASA.....TALSDDGAVSSDEELRED	192
STM	NE..FVDPO..AEDRELKQQLLRKYSGYLGLSKQEFMCKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKW	309
KNAT2	DDIAADDSQQRSNDRDLKDQLLRKFGSHISSLKLEFSKSKKKKGGKLPREARQALLDWWNVHNKW	255
STM	PYPSEQQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSEDMQFVVM DATHPHHYFMDNVLDPF	372
KNAT2	PYPTEGDKISLAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHWKPSENMPFDMMDSNET.FFTE.....	310
STM	PMDHISSTML	382
KNAT2	310

Abb. A6: Vergleich der Aminosäuresequenzen von STM und KNAT2. Konservierungsgrad + ■■■ – STM und KNAT2 stimmen in etwa 45,8 % ihrer Aminosäuresequenz überein. (End-weighted GAP, UWGCG)

KNAT1	M E Y Q H D N S T T P Q R V S F L Y S P I S S S N K N D N T S D T N N N N N N N S S N Y G P G Y N N T N N N N H H H Q H M	63
KNAT2	M D R M C G F R S T E D Y S E K A T L M	20
KNAT1	L F P H M S S L I P Q T T E N C F R S D H D Q P N N N N P S V K S E A S S S R I N H Y S M I M R A I H N T Q E A N N N N N D	126
KNAT2	M P S D Y Q S L I C S T T G D N Q R L F G S D E L A T A L S . . S E L L P R I R K A E D	62
KNAT1	N V S D V E A M K A K I I A H P H Y S T L L Q A Y L D C Q K I G A P P D V V D R I T A A R Q D F E A R Q Q R S T P S V S A S S	189
KNAT2	N F S . L S V I K S K I A S H P L Y P R L L Q T Y I D C Q K V G A P M E I A C I L E E I Q R E N H V . Y K R D V A P L S C F G	123
KNAT1	R D P E L D Q F M E A Y C D M L V K Y R E F L T R P I Q E A M E F I R R I E S Q L S M L C Q S P I H I L N N P D G K S D N M G	252
KNAT2	A D P E L D E F M E T Y C D I L V K Y K T D L A R P F D E A T T F I N K I E M Q L Q N L C T G P A S A T A L S D . . . D G A V	183
KNAT1	S S D E E Q E N N S G G E T E L P E I D P R A E D R E L K N H L I K K Y S G Y L S S L K Q E L S K K K K K G K L P K E A R Q K	315
KNAT2	S S D E E L R E D D . . D I A A D S Q Q R S N D R D L K D Q L I R K F G S H I S S L K L E F S K K K K K G K L P R E A R Q A	244
KNAT1	L I T W W E L H Y K W P Y P S E S E K V A L A E S T G L D Q K Q I N N W F I N Q R K R H W K P S E D M Q F M V M D G L Q H P H	378
KNAT2	L I D W W N V H N K W P Y P T E G D K I S L A E T G L D Q K Q I N N W F I N Q R K R H W K P S E N M P F D M M D D S	303
KNAT1	H A A L Y M D G H Y M G D G P Y R L G P	398
KNAT2	N E T F F T E	310

Abb. A7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von KNAT1 und KNAT2. Konservierungsgrad + ■■■ – KNAT1 und KNAT2 stimmen in etwa 45,8 % ihrer Aminosäuresequenz überein. (End-weighted GAP, UWGCG)

8.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
AS1	<i>ASYMMETRIC LEAVES1</i>
AS2	<i>ASYMMETRIC LEAVES2</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BASTA	Herbizid
bp	Basenpaare
<i>BP</i>	<i>BREVIPEDICELLUS</i>
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus 35S Promotor
cDNA	komplementäre DNA
<i>CHRIS</i>	<i>Chimeric Repressor Interference System</i>
Col-0	Ökotyp Columbia
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ct-DNA	Kalbsthymus-DNA
cRNA	komplementäre RNA
C-terminal	am C-Terminus
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELK-Domäne	benannt nach den invarianten Aminosäuren Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K)
EMS	Ethylmethansulfonat
EN ²⁹⁸	Engrailed Repressordomäne, 298 Aminosäuren
Gent	Gentamycin
GR	Hormon-Bindungsstelle des Glucocorticoid-Rezeptors
F	<i>forward</i>
<i>fs</i>	<i>frameshift</i>
Ftz	Fushi tarazu
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
HD	Homöodomäne
hpRNA	hairpin RNA
ihpRNA	hairpin RNA mit Intron
kb	Kilobase(n)
Kan	Kanamycin
<i>KN1</i>	<i>KNOTTED1</i>
<i>KNAT1</i>	<i>KNOTTED1-like from Arabidopsis thaliana1</i>
<i>KNAT2</i>	<i>KNOTTED1-like from Arabidopsis thaliana2</i>
<i>KNOX</i> -Gene	<i>KNOTTED1-like</i> Homöobox Gene
l	Liter
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
M	Molar

mg	Milligramm
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mRNA	Boten-(messenger) Ribonukleinsäure
N-terminal	am N-Terminus
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
poly(A) ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
R	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
Rif	Rifampicin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. a.	siehe auch
SAM	Sprossapikalmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
STM	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
TALE	<i>Three Amino acid Loop Extention</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit für Enzymaktivität)
üN	über Nacht
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden mit dem internationalen Ein- und Dreibuchstaben *Code* abgekürzt.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie an der Universität zu Köln unter wissenschaftlicher Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Werr angefertigt. Sie wurde aus Mitteln des SFB 273 und 572 der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Werr danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Themas, sowie für die Betreuung, Förderung und ständige Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus möchte ich ihm für die Anregung danken, mich als assoziiertes Mitglied beim Graduiertenkolleg zu bewerben. Außerdem danke ich ihm für seine Geduld, die er aufbringen musste, bis er diese Arbeit in Händen halten konnte. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Zweitgutachtens und an Prof. Dr. Martin Hülskamp für den Vorsitz bei meiner Prüfung.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Werr und Simon für die vielen Anregungen und Hilfen, aber vor allem für die sehr angenehme Laboratmosphäre und die gemeinsamen Spaziergänge zur Mensa bedanken: Petra Comelli und Thomas Kirch – wir waren da oben ein gutes Team und ich vermisse die Gespräche und natürlich die Kommentare von Thomas, es war nie langweilig, Melanie Cole – danke für deine sehr sehr hilfreiche Unterstützung bei *Southerns* und *Northerns*, Carolin Nolte und Jochen König – ihr habt euch „einfach aus dem Staub gemacht“ und es hat etwas gefehlt, Thorsten Halbach, Cora Fried, Peter Bommert, Roman Zimmermann, Mario Hohensee, Judith Nardmann – danke, dass du bei meiner Prüfung den Bleistift schwingst!, John Chandler – die Unterhaltungen und Diskussionen über *CHRIS* haben mir sehr geholfen, Rashid Mazari, Rüdiger Simon – danke für *bp-R* und die vielen nützlichen Informationen und Tipps, Margit Grünewald und Ulrike Brand – wir hätten viel häufiger „Frauenabende“ machen sollen, Martin Hobe, Ralf Müller und Lorenzo Borghi. Die angenehme Atmosphäre trifft auch auf den Rest des Ebio Instituts zu.

Liebe Ulrike, die wöchentlichen Autoren-Kaffees waren während der Zeit des Zusammenschreibens einfach lebenserhaltend.

Ein ganz lieber Dank geht an alle Mitglieder des Graduiertenkollegs, vor allem an den „harten Kern“, der den Stammtisch zu dem gemacht hat, was er ist (oder war?), besonders an Kirsten Haußühl – der Tag ist tatsächlich gekommen!, Brigitte Paap, Heike Kofler, Anika Wiese, Michael Eicks, Lars Voll, Silke Robatzek – Chicago war toll! und Stefanie Ernst.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern ganz herzlich danken für die liebevolle Unterstützung während der nicht enden wollenden Doktorarbeit und meinen lieben Schwestern Claudia und Birgit, die zum Teil auch diesmal wieder nach verirrtten Kommas und fehlenden Buchstaben gesucht haben.

LEBENS LAUF

Name	Heike Markel
Geburtstag	14.02.1971
Geburtsort	Gummersbach
Eltern	Alfred Markel und Gertrud Markel, geb. Hann
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
08/1977 – 07/1981	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Drabenderhöhe
08/1981 – 05/1990	Besuch des Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasiums in Wiehl, Abitur
10/1990 – 09/1992	Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln, Vordiplom
10/1992 – 11/1995	Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln, Hauptfach: Genetik, 1. Nebenfach: Biochemie, 2. Nebenfach: Organische Chemie
12/1995 – 03/1997	Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln in der Abteilung von Prof. Dr. W. Werr unter dem Titel: „Funktionelle Analyse von Protein-Domänen pflanzlicher Homeobox-Gene“
03/1997 – 11/2002	Promotion am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. W. Werr unter dem Titel: „Analyse pflanzlicher Transkriptionsfaktoren durch Überexpression dominant-negativer Proteinchimären“
05/1998	Aufnahme als assoziiertes Mitglied in das Graduiertenkolleg „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“, Leiter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
03/1997 – 02/1998	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie
03/1998 – 10/2002	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Entwicklungsbiologie

ERKLÄRUNG

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

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

Heike Markel

Teilpublikationen:

Markel, H., Chandler, J. & Werr, W. (2002). Translational fusions with the *engrailed* repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucleic Acids Res.* **30**: 4709-4719.