

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genetik

Molekularbiologische Analyse relevanter Keimblattgene der Pflanze  
*Arabidopsis thaliana*

Miriam Zweigardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz
2. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

Die Dissertation wurde am 21.05.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.07.2010angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.1     | Der Modellorganismus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                              | 1  |
| 1.1.1   | Die Vielfalt der Angiospermen .....   | 1  |
| 1.1.2   | Die Funktion der Keimblätter .....  | 1  |
| 1.1.3   | Die eigenständige Entwicklung der Keimblätter .....                                 | 3  |
| 1.2     | Die Embryogenese von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                              | 3  |
| 1.3     | Analysen zur Entwicklung der Keimblätter bei <i>Arabidopsis thaliana</i> .....      | 5  |
| 1.3.1   | Keimblattdefekte in <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten .....                      | 5  |
| 1.3.2   | <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten mit spezifischer Deletion der Keimblätter .... | 7  |
| 1.3.3   | Charakterisierung von ENP .....   | 8  |
| 1.3.4   | Genetische Variationen im <i>laterne</i> -Phänotyp .....                            | 9  |
| 1.4     | Der Einfluss von Auxin auf Phyllotaxis und Organogenese .....                       | 11 |
| 1.5     | Molekulare Mechanismen des Auxintransports .....                                    | 12 |
| 1.6     | Auxin – Auslöser entwicklungsabhängiger Veränderungen .....                         | 14 |
| 1.7     | Zielsetzung der Arbeit .....  | 15 |
| 2       | Material und Methoden .....   | 17 |
| 2.1     | Material .....  | 17 |
| 2.1.1   | Chemikalien und molekularbiologische Verbrauchsmittel .....                         | 17 |
| 2.1.2   | Antibiotika .....   | 17 |
| 2.1.3   | Längenstandards .....   | 17 |
| 2.1.4   | Primer .....  | 18 |
| 2.1.5   | cDNA-Klone .....  | 20 |
| 2.1.6   | Vektoren .....  | 20 |
| 2.1.7   | Bakterienstämme .....   | 20 |
| 2.1.8   | <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzenmaterial .....                                  | 21 |
| 2.1.8.1 | WT-Linien .....   | 21 |
| 2.1.8.2 | Mutante Linien .....  | 21 |
| 2.1.8.3 | Transgene Linien und Kreuzungen .....   | 22 |
| 2.1.9   | Lösungen .....  | 22 |
| 2.1.10  | Medien .....  | 29 |
| 2.2     | Methoden .....  | 30 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| 2.2.1       | Pflanzenanzucht.....   | 30 |
| 2.2.1.1     | Anzucht auf Erde.....  | 30 |
| 2.2.1.2     | Anzucht unter sterilen Bedingungen.....                        | 31 |
| 2.2.1.3     | Intraspezifische Kreuzungen .....                              | 31 |
| 2.2.2       | Molekularbiologische Methoden .....                            | 31 |
| 2.2.2.1     | Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren .....               | 31 |
| 2.2.2.1.1   | Ethanol-fällung .....  | 32 |
| 2.2.2.1.2   | Isopropanol-fällung.....                                       | 32 |
| 2.2.2.2     | Reinigung von Nukleinsäuren.....                               | 32 |
| 2.2.2.2.1   | Phenol-Chloroform-Extraktion .....                             | 32 |
| 2.2.2.2.2   | PEG-Fällung .....  | 32 |
| 2.2.2.2.3   | GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit .....                   | 33 |
| 2.2.2.3     | Restriktionsverdau von DNA .....                               | 33 |
| 2.2.2.4     | Agarose-Gele zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren .....  | 34 |
| 2.2.2.5     | PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren .....                  | 35 |
| 2.2.2.6     | Sequenzierung.....   | 37 |
| 2.2.2.6.1   | Standard-Sequenzierung .....                                   | 37 |
| 2.2.2.6.2   | Pyrosequenzierung .....  | 38 |
| 2.2.2.6.2.1 | Die Methode .....  | 38 |
| 2.2.2.6.2.2 | PSQ™96MA Software .....  | 39 |
| 2.2.2.6.2.3 | PCR .....  | 39 |
| 2.2.2.7     | Klonierung von DNA-Fragmenten .....                            | 41 |
| 2.2.2.7.1   | Gateway™-Klonierung .....                                      | 42 |
| 2.2.2.7.2   | Herstellung kompetenter Zellen .....                           | 45 |
| 2.2.2.7.2.1 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....            | 45 |
|             | nach der RbCl Methode.....                                     |    |
| 2.2.2.7.2.2 | Herstellung elektrokompetenter .....                           | 45 |
|             | <i>E. coli</i> Zellen (Easy Pore) .....                        |    |
| 2.2.2.7.2.3 | Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien .....             | 46 |
| 2.2.2.7.3   | Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen ..... | 46 |
| 2.2.2.7.4   | Elektroporation.....   | 47 |
| 2.2.2.8     | Methoden für die Präparation von Nukleinsäuren.....            | 47 |
| 2.2.2.8.1   | Plasmid-DNA Präparation (Mini- bzw. Midi-Präp).....            | 47 |
| 2.2.2.8.2   | Präparation genomischer DNA .....                              | 48 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 2.2.2.9    | Pflanzentransformation mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                      | 48  |
| 2.2.2.9.1  | Plasmid-Midi Präparation aus Agrobakterien .....   | 48  |
| 2.2.2.9.2  | Pflanzentransformation („floral dip“-Methode) .....  | 49  |
| 2.2.2.10   | Immunohistochemische Färbung .....   | 50  |
| 2.2.2.11   | Mikroarray .....   | 52  |
| 2.2.2.11.1 | Statistische Grundlagen zur Auswertung des Mikroarrays .....                                     | 53  |
| 2.2.2.11.2 | Gesamt-RNA Isolierung.....   | 53  |
| 2.2.2.11.3 | Bestimmung der RNA-Quantität.....  | 54  |
| 2.2.2.12   | Inhibitorexperimente.....  | 58  |
| 2.2.2.13   | Versuche zur Entstehung von Bilateralsymmetrie .....   | 58  |
| 2.2.2.14   | Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....  | 59  |
| 3.1        | Die Bedeutung von <i>ENP</i> .....   | 60  |
| 3.1.1      | Die zelluläre Lokalisation der ENP-Proteine .....  | 60  |
| 3.1.2      | Kolokalisation von ENP und PIN1 in der Epidermis der Kotyledonen .....                           | 62  |
| 3.2        | Die zelluläre Lokalisation von <i>At2g23050</i> .....  | 63  |
| 3.3        | Struktur von <i>At2g23050</i> .....  | 67  |
| 3.4        | Rettung von <i>enp</i> Defekten .....  | 68  |
| 3.4.1      | Phänotypische und molekulare Analyse.....  | 68  |
| 3.4.2      | Zelluläre und phänotypische Analyse der <i>p35S:EGFP::ENP</i> Wirkung in Folgegenerationen ..... | 72  |
| 3.5        | Inhibitorstudien zur Analyse von ENP .....   | 75  |
| 3.6        | Entstehung von Bilateralsymmetrie.....   | 83  |
| 3.7        | Differentielle Transkriptomanalyse keimblattloser und Wildtyp-Embryonen ...                      | 86  |
| 3.8        | Molekulare Kartierung von <i>ABANICO</i> .....   | 92  |
| 4          | Diskussion .....   | 94  |
| 4.1        | ENP und PIN1 kolokalisieren in der Epidermis der Kotyledonen.....                                | 94  |
| 4.2        | ENP und PIN1 werden in verschiedenen Vesikeln transportiert.....                                 | 96  |
| 4.3        | Die Bedeutung der BTB/POZ-Domäne für die polare Lokalisation.....                                | 99  |
| 4.4        | Parallelen zwischen ENP und <i>At2g23050</i> .....   | 101 |
| 4.5        | Entstehung von Bilateralsymmetrie aus Asymmetrie .....   | 104 |
| 4.6        | Störungen lokaler Auxinmaxima verändern die Keimblattentwicklung.....                            | 105 |
| 4.7        | Ektopische Expression von ENP in <i>laterne</i> -Mutanten .....                                  | 107 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4.8 | Transkriptomanalysen decken differentiell exprimierte Gene in <i>laterne</i> - und Wildtyp-Embryonen auf ..... | 108 |
| 4.9 | AGC-Kinasen und ihr Einfluss auf den gerichteten Auxintransport.....   | 109 |
| 5   | Zusammenfassung.....   | 111 |
| 6   | Literatur.....   | 114 |

## Abkürzungen

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen und dem Ein- bzw. Dreibuchstabencode für Aminosäuren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 2,4-D                          | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                            |
| A                              | Adenin  |
| ABA                            | Abscisinsäure   |
| <i>A. thaliana</i> , <i>At</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)           |
| <i>A. tumefaciens</i>          | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                        |
| Abb.                           | Abbildung   |
| ABRC                           | <i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>           |
| Amp                            | Ampicillin  |
| AK                             | Antikörper  |
| ATP                            | Adenosintriphosphat                                     |
| <i>att</i>                     | attachment  |
| AuxRE                          | Auxin-responsives Element                               |
| BAC                            | <i>bacterial artificial chromosome</i>                  |
| Basta                          | Phosphinothricin  |
| BFA                            | Brefeldin A   |
| bp                             | Basenpaare  |
| BSA                            | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )      |
| C                              | Cytosin   |
| cDNA                           | komplementäre DNA                                       |
| CHX                            | Cycloheximid  |
| Ci                             | Curie (1 Ci = 2.22 x 10 <sup>12</sup> Zerfälle/Minute)  |
| CLAV                           | CLAVATA   |
| cM                             | centi-Morgan  |
| Col (C)                        | Columbia (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )      |
| CTAB                           | Cetyltrimethylammoniumbromid                            |
| CFP                            | Cyan Fluorescent Protein                                |
| CUC                            | CUP-SHAPED COTYLEDON                                    |
| dATP                           | Desoxyadenosin-5'-triphosphat                           |
| dCTP                           | Desoxycytidin-5'-triphosphat                            |
| dd                             | bidestilliert   |
| DEPC                           | Diethylpyrocarbonat                                     |
| dGTP                           | Desoxyguanosin-5'-triphosphat                           |
| DMSO                           | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                            | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> ) |
| dNTP                           | Desoxynucleotidtriphosphat                              |
| dTTP                           | Desoxythymidin-5'-triphosphat                           |
| <i>E. coli</i>                 | <i>Escherichia coli</i>                                 |
| EDTA                           | Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz                  |
| EGTA                           | Ethylenglycoltetraacetat                                |
| EMS                            | Ethylmethansulfonat                                     |
| ENP                            | ENHANCER OF PINOID                                      |
| ER                             | Endoplasmatisches Retikulum                             |
| EST                            | <i>expressed sequence tag</i>                           |
| EtBr                           | Ethidiumbromid  |
| etc.                           | et cetera   |

|            |   |
|------------|---|
| EtOH       | Ethanol   |
| FN         | Fast Neutrons   |
| G          | Guanin  |
| Gen        | Gentamycin  |
| GFP        | Green Fluorescent Protein   |
| GUS        | $\beta$ -Glucuronidase  |
| i.d.R.     | in der Regel  |
| IPTG       | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid                        |
| kb         | Kilobasenpaare  |
| konz.      | konzentriert  |
| LacZ       | $\beta$ -Galactosidase  |
| <i>lat</i> | <i>laterne</i>  |
| Ler (L)    | Landsberg <i>erecta</i> (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> ) |
| Lsg.       | Lösung  |
| M          | molare Masse, $M = m \text{ (g)}/n \text{ (mol)}$                 |
| max.       | maximal   |
| MCS        | <i>multiple cloning site</i>                                      |
| MES        | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure                                  |
| min        | Minute(n)   |
| mind.      | mindestens  |
| MIPS       | <i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>            |
| mol (n)    | $6,0220943 \times 10^{23}$ (Avogadro-Konstante) Teilchen          |
| mRNA       | messenger RNA   |
| MS-Salze   | Murashige & Skoog-Salze   |
| MTSB       | Microtubule-Stabilizing-Buffer                                    |
| n          | Anzahl  |
| NAA        | 1-Naphtalene Acetic Acid  |
| NASC       | <i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>                        |
| NOA        | 1-Naphtoxy Acetic Acid  |
| NPA        | Naphtylphtalamic Acid   |
| OD         | optische Dichte   |
| Os         | <i>Oryza sativa</i> (Reis)  |
| OT, OTs    | Objektträger  |
| PAT        | polarer Auxintransport  |
| PCR        | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )     |
| pDONR      | Donor Vektor  |
| PEG        | Polyethylenglycol   |
| PFA        | Paraformaldehyd   |
| <i>PID</i> | <i>PINOID</i>   |
| <i>PIN</i> | <i>PIN-FORMED</i>   |
| PIPES      | Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)                            |
| PM         | Plasmamembran   |
| PVP        | Polyvinylpyrrolidon   |
| R          | Resistenz   |
| RFLP       | <i>restriction fragment length polymorphism</i>                   |
| Rif        | Rifampicin  |
| RNA        | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                      |
| RNase A    | Ribonuclease A  |
| rpm        | Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )               |
| rRNA       | ribosomale RNA  |

|                |  |
|----------------|--|
| RC             | Reagenzkartusche                                       |
| RT             | Raumtemperatur (18°C bis 24°C)                         |
| RT-PCR         | <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| SAM            | Sprossapikalmeristem                                   |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat                                   |
| sec            | Sekunde(n)   |
| sp.            | spirrig  |
| SSLP           | <i>short sequence length polymorphism</i>              |
| T              | Thymin   |
| Tab.           | Tabelle  |
| TAE            | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                                |
| TAIR           | <i>The Arabidopsis Information Resource</i>            |
| Taq-Polymerase | <i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase                |
| TBE            | Tris-Borat-EDTA-Puffer                                 |
| TE             | Tris-EDTA-Puffer                                       |
| TEA            | Triethanolamin   |
| Tet            | Tetracyclin  |
| TF             | Transkriptionsfaktor                                   |
| TIGR           | <i>The Institute for Genomic Research</i>              |
| TIBA           | 2,3,5- Triiodobenzoic Acid                             |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                         |
| tRNA           | transfer RNA   |
| U              | Unit (Einheit der Enzymaktivität)                      |
| u. a.          | unter anderem  |
| üN             | über Nacht   |
| usw.           | und so weiter  |
| UTR            | untranslatierte Regionen                               |
| UV             | Ultraviolett   |
| V              | Volt   |
| VBT            | Vacuum Prep Tool                                       |
| v/v            | Volumen zu Volumen                                     |
| vgl.           | vergleiche   |
| Vol            | Volumen  |
| w/v            | Gewicht zu Volumen                                     |
| WT, wt         | Wildtyp  |
| WUS            | <i>WUSCHEL</i>   |
| xg             | Zentrifugalbeschleunigung                              |
| YFP            | Yellow Fluorescent Protein                             |
| Y2H            | Yeast Two-Hybrid                                       |
| z. B.          | zum Beispiel   |
| z. T.          | zum Teil   |



# 1 Einleitung

## 1.1 Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*

### 1.1.1 Die Vielfalt der Angiospermen

Die im 16. Jahrhundert von Johannes Thal zum ersten Mal beschriebene Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* hat sich weltweit als Modellorganismus für genetische und molekularbiologische Untersuchungen etabliert. Sie gehört den (Eu-) Dikotyledonen (Zweikeimblättrige) an, die neben den Monokotyledonen (Einkeimblättrige) und Magnoliidae die größte Unterklasse der bedecktsamigen Blütenpflanzen (Angiospermen) bildet (Raven et al., 2006). Pflanzen wie Orchideen, Palmen, Süßgräser und Lilien gehören zu den Monokotyledonen und umfassen zusammen mit den (Eu-) Dikotyledonen ungefähr 97 % aller Arten der Angiospermen. Unter den restlichen 3 %, den Magnoliidae, finden sich die Arten mit den ursprünglichsten Merkmalen (Raven et al., 2006). Sie stehen an der Basis des Stammbaums der Angiospermen und wurden früher den Zweikeimblättrigen zugeordnet. Insgesamt umfassen die Angiospermen mit ca. 300000 Arten die größte Abteilung der photoautotrophen Organismen.

Die Arten innerhalb der Unterklassen der bedecktsamigen Blütenpflanzen gehören phylogenetisch eng zusammen und ähneln sich daher stark in ihrem Körperbauplan. Der Aufbau der Keimlinge ist dabei unter den verschiedenen Arten auffallend uniform, obwohl Monokotyle und Dikotyle morphologisch unterschiedliche Typen darstellen (Jürgens et al., 1994). Die zwei Keimblätter des dikotylen Keimlings sind symmetrisch entlang der Körperachse aus Epikotyl, Hypokotyl und embryonaler Wurzel angeordnet. Das Spross- und Wurzelmeristem liegen an den entgegengesetzten Enden der Achse. Ihnen kommt eine besondere Bedeutung zu, da aus diesen primären Meristemen die meisten Organe der adulten Pflanze hervorkommen. Der dikotyle Keimling wird als primitiv eingestuft. Auch bei monokotylen Keimlingen lässt sich die Primärachse in Epikotyl, Hypokotyl und Primärwurzel gliedern. Obwohl das Keimblatt, wie auch in Dikotylen, ein laterales Organ ist, markiert es hier vermeintlich das obere Ende der Achse, während das Sprossmeristem lateral zu liegen scheint. Die kurzlebige embryonale Wurzel besitzt kein Meristem und wird später durch sprossbürtige Wurzeln ersetzt, die aus dem unteren Ende des Hypokotyls stammen (Tillich, 1992).

### 1.1.2 Die Funktion der Keimblätter

Bei vielen dikotylen Pflanzen und einigen Monokotylen sind die Keimblätter spezialisierte Organe, die während der Embryogenese große Mengen Kohlenhydrate, Fette und Proteine akkumulieren, die sie vom Endosperm in ihr eigenes Gewebe absorbieren. Das Endosperm ist dabei in manchen Fällen bereits vor der Ruhephase des Samens aufgebraucht. Die Kotyledonen sind oft groß und fleischig wie an Walnuss, Erbse oder Bohne zu erkennen ist. Die im Keimblatt gespeicherten Stoffe stehen dem jungen Keimling für seine erste Wachstumsphase zur Verfügung. Hier

werden dann durch biochemische Prozesse die gespeicherten Nährstoffe mobilisiert, so dass die Kotyledonen, die ersten gebildeten Blätter bei Pflanzen, am Ende der Keimungsphase verbraucht sind und abfallen oder vertrocknen (Buchanan et al., 2000). Die Zellen der Kotyledonen erfüllen hier also eine Speicherfunktion.

Es gibt aber unter den Mono- und Dikotyledonen Vertreter, bei denen die Keimblätter nicht vollständig zu Speicherorganen differenziert sind, sondern als einziges Blattorgan weiterbestehen. So besitzt die Gesneriaceae *Streptocarpus*, die zur Klasse der Dikotyledonen zählt, nur ein einziges Blatt, das es während seines gesamten Lebenszyklus behält (Möller et al., 2001). Eines der Keimblätter (Makrokotyledon) wächst nach dem Ende der Keimungsphase weiter und stellt so die Photosynthese und damit die Nährstoffversorgung des Keimlings bzw. der adulten Pflanze sicher. Das andere Keimblatt entwickelt sich nicht weiter und wird als Mikrokotyledon bezeichnet (Nishii et al., 2004). Hier ist das Keimblatt also nicht nur Speicher- sondern auch Photosyntheseorgan.

Bei Monokotylen, zu denen die Getreidearten Mais, Weizen oder Gerste zählen, ist das Endosperm das größte Speichergewebe. Obwohl bei ihnen das einzige Keimblatt, das Scutellum (Mais), sehr dünn ist, wird die Absorption von Nährstoffen während der Keimung durch seine große Oberfläche erheblich verbessert (Raven et al., 2006). Das Scutellum führt ebenso wie die Keimblätter anderer monokotyler Pflanzen der jungen Pflanze während der Keimung Nährstoffe aus dem Endosperm zu. Sie haben sich morphologisch so verändert, um den Keimling mit dem Speicherorgan miteinander zu verbinden. Es ist im Endosperm eingebettet und nimmt die abgebauten Speicherstoffe auf und transportiert sie zu den Wachstumszonen des Embryos. Das Keimblatt ist also zu einer Art Transferorgan geworden.

Die stetig wachsende Weltbevölkerung erfordert einen beträchtlichen Zuwachs an Nahrungsmitteln. Da besonders die Versorgung mit pflanzlichen Proteinen sicher gestellt werden muss, bilden die Keimblätter der Dikotylen eine der wichtigsten Nahrungsquellen. Sie sind nicht nur reich an Kohlenhydraten (Erbsen) sondern auch an Fetten (Erdnuss) oder Proteinen (Sojabohne) (Raven et al., 2006). Auch das Endosperm der Monokotylen zeigt anhand von Mais, Reis, Gerste oder Weizen seine außerordentliche wirtschaftliche Bedeutung. Um die Qualität und Quantität von Feldfrüchten zu erhöhen, brachte die Forschung neue Mais-, Weizen-, und Reissorten hervor. Durch die wachsende Nachfrage an Biokraftstoffen hat die wirtschaftliche Relevanz von Endosperm und Keimblättern in den letzten Jahren erneut stark zugenommen. Das beweist der jährliche Bericht zur weltweiten kommerziellen Nutzung gentechnisch veränderter Pflanzen der ISAAA (*International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*). Insgesamt wurden demnach im Jahr 2009 134 Millionen Hektar GV-Pflanzen angebaut, ein Anstieg gegenüber 2008 von 7 % (ISAAA Brief No 41-2009). Die vier wichtigsten GV-Pflanzen nehmen weltweit mittlerweile einen erheblichen Teil der globalen Anbaufläche ein (GV-Sojabohnen 77 %, GV-Baumwolle 49 %, GV-Mais 26 %, GV-Raps 21 %). In der EU entwickelt sich dagegen die landwirtschaftliche Nutzung der grünen Gentechnik vor allem durch die Anbauverbote in Frankreich und Deutschland gegen den weltweiten Trend.

### 1.1.3 Die eigenständige Entwicklung der Keimblätter

Entwicklungsbiologisch gesehen ist eine der wichtigsten Eigenschaften der Kotyledonen ihre vom Sprossapikalmersitem (SAM) unabhängige Entstehung. Das SAM zeichnet sich nämlich relativ spät während der Embryogenese ab, nachdem die Kotyledonen bereits initiiert sind (Long und Barton, 1998; Trembl et al., 2005). In situ Hybridisierungen mit Sonden der Gene *STM*, *CUC1-3* und *WUS* deckten auf, dass die Anlage des SAM schon im 16-Zellstadium des Embryos zentral im Apex niedergelegt ist (Mayer et al., 1998). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Primordien der Keimblätter Produkte des SAM sind, das die gesamte obere Hälfte des globulären Embryos umfasst (Kaplan und Cooke, 1997), doch Nullmutationen in dem Gen *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), ein homeotischer TF, der für die Bildung des SAM während der Embryogenese benötigt wird, führt zu Keimlingen ohne SAM, aber mit Wurzel, Hypokotyl und Keimblättern (Barton und Poethig, 1993). Neben den Genen, die für die Etablierung des Meristems notwendig sind (*STM* und *WUS*), gibt es Gene (*CLAV1-3*), welche die Meristemgröße durch Reprimierung der Initialen regulieren (Clark et al., 1996, Schoof et al., 2000).

## 1.2 Die Embryogenese von *Arabidopsis thaliana*

Während der Embryogenese wird der Bauplan der Pflanze festgelegt, der zwei einander überlagernde Muster beinhaltet. Das apikal-basale Muster bildet einen Keimling mit einem oder zwei Kotyledonen, an deren Basis sich das SAM befindet. Darunter geht die apikal-basale Achse, das Hypokotyl, in die embryonale Wurzel (Radicula) über, deren basales Ende das Wurzelmeristem abschließt. Das zweite, radiäre Muster besteht aus den konzentrisch angeordneten Gewebesystemen. Die außen liegende Epidermis schließt die darunter liegenden Schichten des Grundgewebes (Cortex und Endodermis) und des Leitgewebes (Procambium) ein. Gleichzeitig wird der Embryo auf die Samenruhe vorbereitet. Dabei haben Pflanzen, die Samen mit ihrem reifen Embryo, Speicherstoffen und schützender Samenschale hervorbringen, gegenüber samenlosen Pflanzen einen selektiven Vorteil, da sie schlechte Umweltbedingungen überleben können und ihnen die Verbreitung ihrer Art erleichtert wird (Nabors, 2007).

Die aufeinander folgenden embryonalen Entwicklungsvorgänge in *Arabidopsis thaliana* lassen sich leicht auf Grund eines strikten Musters von Zellteilungen und Zelldifferenzierungen des Embryos verfolgen (Jürgens und Mayer, 1994; Torres Ruiz, 2000).

Nach der Befruchtung verlängert sich die Zygote auf das dreifache und teilt sich asymmetrisch quer zur Längsachse in eine apikale und eine basale Zelle. Durch diese Querteilung werden bereits die Polarität des Embryos und die apikal-basale Längsachse der Pflanze festgelegt. Die bei der Teilung entstandene apikale Zelle ist klein, plasmareich und teilt sich zweimal vertikal und einmal horizontal (Oktantstadium), wodurch zwei horizontale Ebenen aus jeweils vier Zellen entstehen. Aus der oberen Lage („upper tier“) entwickelt sich später die apikale Hälfte des Embryos mit SAM und Keimblätter, während die untere Lage („lower tier“) die zentrale Region des Embryos

darstellt, woraus sich vor allem das Hypokotyl und die Wurzel bilden. Die bei der ersten Teilung entstandene basale Zelle ist groß und stark vakuolisiert. Sie bildet nach bis zu neun horizontalen Teilungen eine einzige Zellreihe mit filamentöser Struktur, den Suspensor, der den Embryo an der Wand des Embryosacks verankert und ihn mit Nährstoffen versorgt. Die oberste Zelle dieser Zellreihe ist die Hypophyse, die in der weiteren Embryonalentwicklung zum Wurzelmeristem beiträgt.

Nach dem Oktantstadium wird durch perikline Teilungen eine äußere Zellschicht gebildet, die Epidermis. Ihre Vorläuferzellen (Protoderm), die sich vorrangig antiklin teilen, entstehen durch eine einzelne Runde tangentialer Teilungen. In diesem Globularstadium wird auch die radiäre Musterbildung erkennbar, da durch gerichtete antikline und perikline Zellteilungen neben dem Protoderm auch die Vorläuferzellen des Grundgewebes und des vaskulären Leitelementgewebes entstehen. Die Zellen der unteren Lage sind im Gegensatz zur oberen Lage weniger strikt orientiert und bis zur Initiation der Keimblätter nahezu isodiametrisch. Infolge fortwährender Teilungen entwickeln sich im Transitionsstadium Keimblattprimordien und wandeln die äußerliche radiäre Symmetrie in eine Bilateralsymmetrie um. Zu dieser Zeit hat sich die Hypophyse bereits mehrfach geteilt. Während die oben liegenden Tochterzellen mitotisch inaktiv bleiben und so das Ruhende Zentrum („Quiescent Center“) des späteren Wurzelmeristems bilden, werden die unteren Zellen zu Stammzellen der zentralen Wurzelhaube (Calyptra). Die Primordien der wichtigsten Organe des Keimlings (Keimblätter, Hypokotyl, Primärwurzel) sind bereits im frühen Herzstadium anatomisch wahrzunehmen und die Dreiteilung des Embryos wird im Folgenden noch deutlicher erkennbar. Bis zum Torpedostadium wird durch weitere perikline und antikline Teilungen der Embryo hauptsächlich vergrößert (Jürgens et al., 1991; Torres Ruiz, 2000). Das Wachstum führt zu einer Krümmung der Keimblattprimordien in Richtung der Wurzelanlage und die drei Zellschichten des SAM sind deutlich zu erkennen. Der Embryo füllt die Ovule in diesem Entwicklungsstadium fast komplett aus und das umgebende Nährgewebe (Endosperm) ist größtenteils aufgebraucht. In einer abschließenden Phase dominieren physiologische Reifeprozesse, die den Embryo auf die Samenruhe vorbereiten.

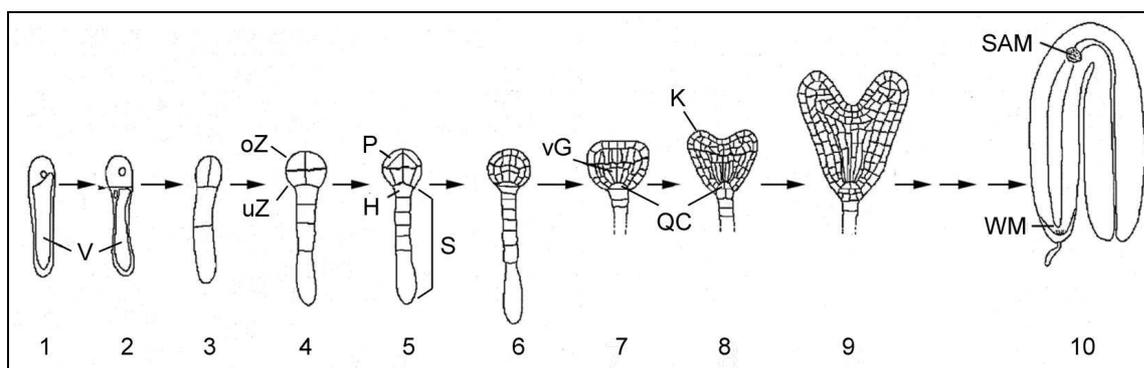


Abb. 1: Stadien der Embryonalentwicklung von *Arabidopsis thaliana* (verändert nach Torres Ruiz, 2000). (1) Zygote, (2) asymmetrische Teilung der Zygote, (3) Quadrant-, (4) Oktant-, (5) 16-Zell-, (6) Globular-, (7) Transitions-, (8) frühes Herz-, (9) spätes Herz-, (10) spätes Torpedostadium. H, Hypophyse; K, Keimblattprimordium; oZ, obere Zellschicht; P, Protoderm; QC, Quiescent Center (*Ruhendes Zentrum*); S, Suspensor; SAM, Sprossapikalmeristem; uZ, untere Zellschicht; V, Vakuole; vG, vaskuläres Vorläufergewebe; WM, Wurzelmeristem.

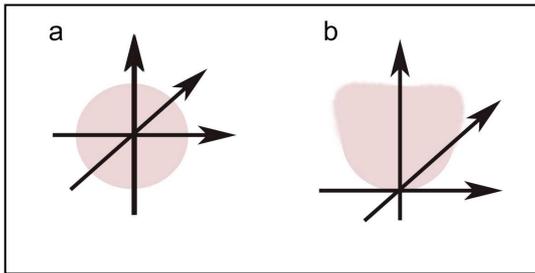


Abb. 2: Schematische Darstellung zum Symmetrieverhalten im *Arabidopsis* Embryo. (A) Radiärsymmetrie bis zum späten Globularstadium; (B) Bilateralsymmetrie ab dem Transitionsstadium.

### 1.3 Analysen zur Entwicklung der Keimblätter bei *Arabidopsis thaliana*

#### 1.3.1 Keimblattdefekte in *Arabidopsis thaliana* Mutanten

Zur Aufklärung der pflanzlichen Embryogenese und vor allem der an der Keimblattentwicklung beteiligten Gene, konnten durch Mutantenscreenings eine Reihe von Genen identifiziert werden (Mayer et al., 1991). Die meisten der bekannten Mutanten fallen durch Defekte im Apikalbereich des Embryos, in Form von einer Veränderung in der Anzahl, Form oder Größe der Keimblätter, auf. Sie weisen jedoch gleichzeitig weitere, pleiotrophe Effekte auf. Die Suche nach Genen, die spezifisch die Bildung der Keimblätter steuern, blieb ergebnislos. Die Analyse unterschiedlicher *Arabidopsis* Mutanten zeigte jedoch, dass die Keimblattbildung und -zahl sehr sensitiv gegenüber Störungen in etlichen biologischen Prozessen ist.

*GNOM* kodiert für einen GTP-Austauschfaktor und ist für die Bildung einer polaren apikal-basalen Achse notwendig, indem es durch gerichteten Vesikeltransport den Auxintransporter PIN1 (Gälweiler et al., 1998) in der frühen Embryogenese asymmetrisch lokalisiert (Steinmann et al., 1999). In *gnom* (*gn*) gibt es keine Zellverbindungen entlang der embryonalen Achse und auch keine embryonale Wurzel. Die Keimblätter sind fusioniert oder vollständig deletiert und in extremen Fällen kommt es durch die Fehllokalisierung der PIN-Proteine zum völligen Verlust der apikal-basalen Achse, wobei das radiäre Muster aber unverändert bleibt (Mayer et al., 1991). Die apikal-basale Defektmutante *monopteros* (*mp*) unterstützt den engen Zusammenhang zwischen der Organisation der apikal-basalen Achse und einem gerichteten Auxintransport. Durch den Verlust der zentralen provaskulären Zellen in *monopteros*, fehlen dem Keimling das Hypokotyl und die Primärwurzel. Die Keimblätter sind unterschiedlich stark fusioniert (Berleth und Jürgens, 1993; Przemeck et al., 1996; Hardtke und Berleth, 1998). Die Identifizierung von Genen wie *GNOM* und *MONOPTEROS* ermöglichte die Einteilung des Verlaufs der Musterbildung in zwei unabhängige Organisationsprozesse entlang einer apikalen-basalen und einer radiären Achse (Jürgens et al., 1991; Jürgens et al., 1994) und deckten so die molekularen Mechanismen für die Entwicklung des morphologischen Bauplans während der Embryogenese auf.

Ursprünglich wurde die Glutamat-Carboxypeptidase *AMP1* in einem Screen von EMS induzierten Mutanten, die eine veränderte Anzahl und ein schnelleres Wachstum der Keimblätter aufwiesen, identifiziert (Chaudhury et al., 1993). Doch *AMP1* kontrolliert daneben auch die Zellproliferation im SAM und die Photomorphogenese. In *amp1* Mutanten kommt es zu einer erhöhten Cytokininbiosynthese, die durch das vergrößerte SAM erklärt werden kann, und gelegentlich zur Entwicklung von Zwillingsembryonen durch eine Transformation des Suspensors. In manchen Fällen werden auch frühreife Blätter gebildet, die zusätzlichen Keimblättern ähneln (Helliwell et al., 2001). Eine Ursache für diesen Pleiotropismus ist die veränderte Sensitivität gegenüber einem oder mehreren Phytohormonen in *amp1* (Chin-Atkins et al., 1996; Nogué et al., 2000). Weitere *amp1*-Allele sind *pt* (*primordia timing*), *cop2* (*constitutively photomorphogenic*) und *hpt* (*häuptling*).

In *pep amp1* Doppelmutanten ist die abnorme Zellproliferation verstärkt, die das Niveau an Cytokinin in diesen mutanten Hintergrund ansteigen lässt. *PEPINO/PASTICINO2* (*PEP/PAS2*), eine putative Tyrosin-Phosphatase, beeinflusst Zellteilungsprozesse in meristematischem und differenziertem Gewebe. Die abnorme Zellproliferation ist bereits im frühen Herzstadium in *pep* Mutanten aber auch während des gesamten weiteren Verlaufs der Embryogenese und in der adulten Pflanze wahrzunehmen. Die Morphologie der Keimblätter ist verändert oder sie sind rudimentär oder fehlen ganz. Das Wachstum der Keimlingswurzel ist gehemmt. Die Mutante wurde durch eine veränderte Antwort auf Cytokinin entdeckt (Hypersensitivität). Sie zeigte, ebenso wie *gk* und *pas1-3*, bei exogener Zugabe von Cytokinin eine verstärkte Proliferation ihrer apikalen Bereiche (Faure et al., 1998; Haberer et al., 2002; Bellec et al., 2002). Diese Gene regulieren in *Arabidopsis* die Zellproliferation entweder durch die Unterdrückung der Zellteilung im Zusammenhang mit einer verminderten Cytokininantwort oder durch die Induzierung der Zelldifferentiation negativ (Haberer et al., 2002; Harrar et al., 2003)

Neben *AMP1*, *PEP/PAS2* und *GN* sind weitere Gene bekannt, die direkt oder indirekt auf den Hormonhaushalt von *Arabidopsis* einwirken und dadurch die Organisation des Embryos spezifisch verändern. Auxin, das in vielfacher Weise an der pflanzlichen Entwicklung beteiligt ist, nimmt durch seinen polaren Transport eine besondere Stellung ein. *PINFORMED1* (*PIN1*) und *PINOID* (*PID*) steuern dabei die Verteilung des Hormons und weisen unter anderem Keimblattdefekte auf. *PID* kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase und ist am gerichteten Auxintransport durch den Einfluss der Lokalisation von *PIN1* Proteinen in den Zellmembranen indirekt beteiligt (Friml et al., 2004; Kaplinsky und Barton, 2004). *PIN1*, ein putativer Auxin Efflux-Carrier, wirkt dagegen direkt auf den Transport des Phytohormons ein (Gälweiler et al., 1998). Mutation in *PIN1* und *PID* führen zu einer weitgehenden Reduktion der Hochblätter und zu einer eingeschränkten Fertilität als Folge von Veränderungen in den Infloreszenzen. Im Extremfall kommt es zur Ausbildung von blind endenden Stämmen. Die schwerwiegende Störung der Auxin-abhängigen Prozesse führen in *pin1* und *pid* zu deformierten oder fusionierten Keimblättern. In beiden Fällen treten auch häufig trikotyle Keimlinge auf (Okada et al., 1991; Bennet et al., 1995). In 50 % der *pin1 pid* Doppelmutanten fehlen die Keimblätter vollständig, wodurch keine bilaterale Symmetrie ausgebildet werden kann und der Keimling radiärsymmetrisch bleibt. Die expandierte Expressionsdomäne von *STM* und den *CUC*-Genen, die das Wachstum

von Keimblättern unterdrücken, verursacht vermutlich den Keimblattphänotyp in *pin1 pid* (Furutani et al., 2004).

Die molekularen Analysen von Mutanten wie *fackel (fk)* deckten die Signifikanz der Phytosterole als Signalmoleküle zur Regulation des Zellschicksals während der embryonalen Entwicklung auf. *fackel* Mutanten initiieren multiple Sprossapikalmeristeme, wobei die wachsenden Keimlinge oft mehr als zwei Keimblätter bilden, die durch das kaum entwickelte Hypokotyl direkt an die Wurzel angehängt zu sein scheinen. Der starke Einfluss von *FACKEL* auf die korrekte Organisation des Embryos ist bereits während der sehr frühen Phase der Embryogenese wahrzunehmen. Eine asymmetrische Zellteilung findet in *fackel* Embryonen im Globularstadium nicht statt. Sie entwickeln sich auch nicht weiter, sondern verbleiben in diesem desorganisierten Stadium (Clouse, 2000). *FACKEL* kodiert für eine Sterol C-14 Reduktase und stellt zwar eine Mutante der Sterolbiosynthese dar, doch kann der Phänotyp nicht durch Brassinosteroid, dem einzigen bisher bekannten Sterolsignalmolekül bei Pflanzen, gerettet werden (Schrack et al., 2000).

Eine weitere Keimblattdefektmutante, *knopf (knf)*, wurde ebenso in einem EMS Screen zur Identifizierung von Genen, die den Körperbauplan betreffen, isoliert (Mayer et al., 1991), doch die Mutation betrifft weniger die Organisation als vielmehr die Gestalt des Embryos. *KNF* kodiert für eine  $\alpha$ -Glucosidase I und beeinflusst die Synthese der Zellwand. Der Gehalt an Zellulose ist in den radial aufgeblähten *knf* Embryonen signifikant minimiert. Erste Veränderungen in *knf* zeigen sich im Herzstadium durch enorm vergrößerte Epidermis- und L2/L3-Zellen. Diese normale Differenzierung der einzelnen Zellschichten, aber die abnorme Zellgröße innerhalb der Schichten, setzt sich im Verlauf der Embryogenese weiter fort. Im Tropedostadium ähneln die *knf* Mutanten stark angeschwollenen Embryonen im Herzstadium. Die Anzahl der Keimblätter bleibt dabei unverändert, nicht jedoch ihre Morphologie (Gillmor et al., 2002).

### 1.3.2 *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit spezifischer Deletion der Keimblätter

Obwohl Keimblätter Organe sind, die für die Keimung der Pflanze essentiell sind und auch eine wesentliche Rolle für die Ernährung des Menschen spielen, ist über die molekularen Grundlagen der Entwicklung dieser Organe wenig bekannt. Durch das Fehlen keimblattspezifischer Gene ist es bisher nicht gelungen, ein umfassendes Model zur Musterbildung in *Arabidopsis* Embryonen aufzustellen (Berleth und Chatfield, 2002). Doch es konnten Schlüsselgene identifiziert werden, welche die Initiation der Keimblattbildung kontrollieren. Durch einen EMS Screen für Gene, die an der apikalen Musterbildung von *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind, wurde eine weitere Keimblattmutante (*laterne*) identifiziert, die spezifisch zum Verlust der Keimblätter führt und deren Phänotyp zu 100 % penetrant ist (Mayer et al., 1991; Torres Ruiz et al., 1996). Diese Linie hat die Existenz des Gens *ENHANCER OF PINOID (ENP)* aufgedeckt, das zusammen mit *PID* spezifisch die Initiation der Keimblätter kontrolliert (Trembl et al., 2005).

Neben dem vollständigen Fehlen der Keimblätter wird die *pid enp* Doppelmutante noch durch einen Blütenphänotyp charakterisiert. Adulte *laterne*-Pflanzen entwickeln keine Blütenstrukturen und ihre Sprossapices enden blind, was eine Sterilität der Pflanzen zur Folge hat. Folge- und Rosettenblätter sowie Hypokotyl und Wurzel weisen dagegen keine Anomalien auf. Die ersten morphologischen Abweichungen von *laterne*-Embryonen sind im frühen Herzstadium wahrzunehmen, wenn sich normalerweise die Keimblattprimordien ausbilden. Vermutlich bildet *laterne* durch das generelle Fehlen von Keimblattanlagen keine Kotyledonen. Die apikale Spitze bildet in *laterne* Embryonen eine Einkerbung, keine Erhebung. Eine homozygote *enp*-Pflanze ist durch einen schwachen Phänotyp mit teilweise fusionierten Sepalen und Stamina charakterisiert. Auch eine variierende Anzahl an Organen ist zu finden, was sich jedoch nicht auf die Fertilität auswirkt. Der starke Blütenphänotyp in *pid* zeigt sich in einer erhöhten Anzahl von Sepalen, die teilweise fusioniert sind, einer Verlängerung der Petalen und einem fehlenden Gynoeceum. Die abnormen Blüten sind am Stamm gebündelt und das Infloreszenzmeristem wächst weiter. In manchen Fällen kommt es zur Bildung von dünnen stammähnlichen Strukturen (Bennett et al., 1995).

### 1.3.3 Charakterisierung von ENP

Die Organogenese von Pflanzen ist von dem intrazellulären Transport von Auxin abhängig. Der Einfluss der Serin/Threonin-Kinase PINOID auf die subzelluläre Lokalisation von PIN1, in der Plasmamembran (PM) (Friml et al., 2004; Michniewicz et al., 2007) bringt ENP in Zusammenhang mit dem polaren Auxin Transport (PAT). ENP reguliert dabei vermutlich die PIN1 Polarität in Keimblattprimordien. Obwohl *enp* Einzelmutanten einen relativ schwachen Keimblatt- und Blütenphänotyp aufweisen, zeichnen sich *enp pid* Doppelmutanten durch einen vollständigen Verlust der Keimblätter und blind endende Sprossapices aus (Tremel et al., 2005).

ENP wird in den protodermalen Zellen während der frühen Embryogenese und an der Spitze der Keimblattprimordien exprimiert. Nach der Keimung ist ENP in der L1 Meristemschicht an der Seite der Organinitiation aktiv (Furutani et al., 2007). Eine Mutation in *ENP* führt zu einer reduzierten Häufigkeit von PIN1 an der PM protodermaler Zellen der Keimblattprimordien. In *pid enp* Embryonen ist die PIN1-Polarität vollständig revertiert (Tremel et al., 2005).

Bisher sind insgesamt vier *enp*-Allele identifiziert worden. In *mab4-1* Mutanten sind drei Aminosäurereste Glycin, Leucin und Tyrosin deletiert, im Fall von *enp-1* Mutanten erzeugt die Transition von C nach T an Position 468 ein Stoppcodon, das zum Transkriptionsabbruch führt. Weitere Allele sind die T-DNA Insertionslinien *enp-2* und *mab4-2*.

ENP ist ein Mitglied der pflanzenspezifischen NPH3-Proteinfamilie (*NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3*), die sowohl eine Signalübertragung in der phototropen Antwort vermittelt als auch die laterale Translokation von Auxin reguliert. Es kodiert für ein 571 Aminosäuren langes Protein und stellt damit eines der 33 NPH3-artigen Proteine in *Arabidopsis* dar. In der NPH3-Familie finden sich neben *ENP* vier weitere Gene, *At5g67440*, *At4g37590*, *At2g14820*, *At2g23050*, die untereinander eine hohe Ähnlichkeit aufweisen und weniger *NPH3* und *ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2)* gleichen, die als Signalübermittler phototroper Reaktionen identifiziert wurden

(Motchoulski und Liscum, 1999; Sakai et al., 2000). NPH3 bildet dabei einen Komplex mit NPH1, einem Photorezeptor mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität, der durch Blaulicht autophosphoryliert wird (Huala et al., 1997; Christie et al., 1998). *NPH3* und *RPT2* besitzen am N-Terminus eine BTB/POZ (Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-Complex/Poxvirus, Zinc Finger) Domäne, die jedoch nur bei 31 der 33 Mitgliedern der Genfamilie zu finden ist, und eine C-terminale Coiled-Coil Domäne, die charakteristisch für viele der NPH3-artigen Proteine ist. ENP dagegen weist keine Coiled-Coil Domäne auf, jedoch eine BTB/POZ- und eine konservierte NPH3-Proteindomäne. Die BTB/POZ-Domäne, ein in vielen eukaryotischen Genomen konserviertes, vielseitiges Motiv, wurde bereits in einem breiten Spektrum an Proteinen mit teilweise völlig verschiedenen Funktionen nachgewiesen. So ist es unter anderem an der Repression der Transkription oder der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt, fungiert allerdings in den meisten Fällen als Protein-Protein Interaktionsmodul und vermittelt dadurch die Multimerisierung mit nicht verwandten Proteinen (Stogios et al., 2005). Das BTB/POZ-Protein enthält eine konservierte Tertiärstruktur („core BTB-fold“) aus drei beta-Faltblättern (B1-B3) und fünf alpha-Helices (A1-A5) (Stogios et al., 2005). Die Primär- und Sekundärstruktur des BTB-Motivs variiert dagegen in den analysierten eukaryotischen Genomen stark. ENP besitzt auch ein „Auxin Responsive Element“ (AuxRE), das es in direktem Zusammenhang mit Auxin bringt (Furutani et al., 2007). Die subzelluläre Lokalisation von ENP und einem verkürzten Protein (ENP3-4), dem ein Teil der BTB/POZ-Domäne fehlt, wurde in mit zwei EGFP::ENP-Konstrukten transformierten *Arabidopsis* Embryonen analysiert. ENP ist in den epidermalen Zellen der Keimblätter an den apikalen Plasmamembranen lokalisiert (Furutani et al., 2007), ebenso wie PIN1 (Steinmann et al., 1999; Benkova et al., 2003). Eine teilweise Deletion der BTB/POZ-Domäne führt jedoch zu einer starken aber nicht lokalisierten, cytosolischen Verteilung des GFP-Signals in den Zellen (Trembl, 2007). Diesem Konstrukt fehlten die hoch konservierten B1 und B2 Beta-Faltblätter und auch ein Teil der A1 Alpha-Helix, deren Signifikanz als Kontaktstellen für andere Proteine bereits in anderen Organismen nachgewiesen wurden (Stogios et al., 2005). Eine Interaktion mit dieser Domäne scheint daher für eine polare Lokalisation notwendig zu sein.

### 1.3.4 Genetische Variationen im *laterne*-Phänotyp

Der entscheidende Unterschied zwischen der *laterne*-Mutante und anderen, bekannten Keimblattmutanten ist die Spezifität des Phänotyps und seine 100%ige Penetranz. Doch neben der simultanen Mutation in *enp* und *pid*, gibt es noch weitere genetische Kombinationen, die diesen Keimlings- bzw. Blütenphänotyp verursachen.

Der Blütenphänotyp adulter *laterne*-Pflanzen ähnelt dem von *pin1*- bzw. *pid*-Mutanten (Okada et al., 1991; Bennet et al., 1995). Die Initiation von Blütenorganen ist gestört und die Stämme adulter Pflanzen enden blind (Gälweiler et al., 1998). Einzelmutationen in *pin1* und *pid* führen zu einer veränderten Anzahl, Größe und Form der Keimblätter. In *pid* fällt vor allem die Bildung von drei, manchmal auch vier Kotyledonen auf, während *pin1* Keimlinge öfters nur ein Keimblatt ausbilden (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995). Eine Kombination einer *pin1*-Mutation zusammen mit einer Mutation in *pid* in einer Doppelmutante, führt zu einer zusätzlichen Verstärkung

des Keimblattphänotyps von *pin1* und *pid*. Bei ca. 50 % der Embryonen werden keine Keimblattprimordien angelegt und die Mutanten bleiben radiärsymmetrisch, eine Bilateralsymmetrie wird nicht ausgebildet (Furutani et al., 2004). Dies erinnert an den *laterne*-Phänotyp in *enp pid* Doppelmutanten (Trembl et al., 2005). Der keimblattlose Phänotyp ist vermutlich mit der vergrößerten Expressionsdomäne von *CUC1*, *CUC2* und *STM* in die peripheren Zonen des Embryoapex verbunden. Doch es wurden auch *pin1 pid* Keimlinge mit einem schwachen Phänotyp und kleinen Ausbuchtungen, die rudimentären Keimblättern ähneln, gefunden. Die überlappenden Funktionen von *PIN1* und *PID* sind jedoch hauptsächlich verantwortlich für die Entstehung von Bilateralsymmetrie und der Keimblattbildung.

Ein *enp pid* Doppelmutanten ähnlicher Phänotyp ist auch in *wag1 wag2 pid* Tripelmutanten zu erkennen. *WAG1* und *WAG2* kodieren für Serin/Threonin-Kinase Proteine, die, ebenso wie *PID2*, eng mit *PID* verwandt sind. Im Keimlingsstadium beeinflussen sie die Entwicklung der Wurzel und die gravitrope Antwort (Santner und Watson, 2006) und werden während der gesamten Embryogenese, besonders in den Keimblattprimordien im Herzstadium, exprimiert (Cheng et al., 2008). Während die Inaktivierung von *PID* häufig die Bildung von drei Kotyledonen zur Folge hat, sind in *wag1* und *wag2* Einzel- bzw. Doppelmutanten keine Defekte bei der Entwicklung des Embryos zu beobachten. Doch eine Kombination der Mutationen in *pid* und *wag1* führt bei 1 % zu Keimlingen mit vollständig deletierten Keimblättern, bei einer *pid wag2* Doppelmutation erhöht sich der Wert auf 14 %. Werden alle drei Mutationen in einer *pid wag1 wag2* Tripelmutante zusammengeführt, fehlen bei 88 % die Keimblätter ganz. Ist zusätzlich noch *PID2* mutiert, verursacht dies in den Quadrupelmutanten eine fast vollständige Penetranz des abnormen Keimblattphänotyps (98 %) (Cheng et al., 2008). Eine simultane Inaktivierung von *YUC1* und *YUC4*, die für eine Flavin-Monooxygenase kodieren und für die Auxin Biosynthese essentiell sind, führen zu Defekten in der Blütenbildung, die dem *laterne*-Phänotyp ähneln, und können durch ein Defizit an Auxin erklärt werden (Zhao, 2008). Eine Tripelmutation in *yuc1 yuc4* und *pid* bewirkt, ebenso wie *pid enp*, einen Verlust der Keimblätter, ein Phänotyp, der in den jeweiligen Einzelmutanten nicht auftritt. *ENP* wird auch *NPY1* genannt. *yuc1 yuc4 enp/np1* Tripelmutanten und *enp/np1 npy5* Doppelmutanten bilden *pin1*-ähnliche Infloreszenzen (Cheng et al., 2007; Cheng et al., 2008). Die Defekte in der Entwicklung der Blüten in adulten *enp/np1 npy3* ähneln denen in *enp/np1 npy5* und führen zur Sterilität der Pflanzen. Eine Inaktivierung von *NPY3* oder *NPY5* im *enp/np1* Hintergrund haben daher einen ähnlich starken Blütenphänotyp wie *pid* zur Folge (Cheng et al., 2008).

Der synergistische Effekt von *pid*-, *enp*- und *yuc*-Mutationen weist auf eine genetische Interaktion hin und reflektiert die komplexen molekularen Mechanismen der Auxin-vermittelten Organogenese in Pflanzen.

## 1.4 Der Einfluss von Auxin auf Phyllotaxis und Organogenese

Auxin (IAA) ist eines der bedeutendsten natürlich vorkommenden Phytohormone und ist an fast allen embryonalen und postembryonalen Entwicklungsprozessen beteiligt (Raven, 2006). So wird das Wachstum der Pflanzen in Relation zur Erdbeschleunigung (Gravitropismus) bzw. zum Licht (Phototropismus) aber auch die regelmäßige Anordnung von Blättern und Blüten entlang der zentralen Achse (Phyllotaxis) sowie die Bildung von Organen durch die einzigartige Wirkung von Auxin erst möglich. Dabei erfolgt die Verteilung des Hormons innerhalb pflanzlichen Gewebes entweder durch lokale Akkumulierung innerhalb einer Zelle bzw. einer kleinen Zellgruppe (Auxinmaxima) oder zwischen den Zellen in abnehmenden Konzentrationen (Gradient), die durch die PIN Efflux-Carrier gestützten polaren Auxintransport gebildet werden. Aber auch ein Auxindefizit in den Zellen scheint für die Auxin-vermittelte Entwicklung wichtig zu sein (Sorefan et al., 2009).

Insbesondere die Phyllotaxis hat seit dem frühen 19. Jahrhundert sowohl das Interesse von Biologen als auch Mathematikern geweckt. Doch erst neueste Experimente deckten die molekularen Prozesse und die zentrale Rolle des aktiven Auxintransports auf. Nach dem von Reinhardt et al. (2003) entwickeltem Modell zur Phyllotaxis wird Auxin akropetal in Richtung Meristem transportiert, wo es dann zu den Primordien umgeleitet wird, die als Auxin-„sinks“ fungieren. Auxin wird folglich von den Primordien absorbiert und nach und nach von der Umgebung entfernt, wodurch erst in einem gewissen Abstand Auxin erneut akkumuliert und neue Organe angelegt werden können (Reinhardt et al., 2003). Neuere auf dieser Theorie basierende Modelle gehen davon aus, dass in den epidermalen Zellen des Apex Auxin polar transportiert wird, vermittelt durch die PIN Efflux Proteine, die in Richtung der Zellen mit höherer Auxinkonzentration lokalisiert sind (Jönsson et al., 2006; Smith et al., 2006). Gemäß der Kanalisierungstheorie kommt es durch den Transport von Auxin zu kleinen lokalen Unterschieden in der Konzentration, die dann autokatalytisch verstärkt werden und zu einer lokalen Erhöhung von Auxin führen (Sachs, 1991). Dieser Mechanismus kombiniert positive Rückkopplung (Bildung von Auxinmaxima) mit lateraler Inhibierung (Auxinentwöhnung im umgebenden Gewebe), wodurch die Entstehung neuer Primordien durch bereits existierende verhindert wird (Meinhardt, 1982). Er bildet auch die Grundlage für die Differenzierung von Leitelementen der späteren Blätter, denn die positive Rückkopplung zwischen Auxintransport und der Lokalisation von Transportproteinen an der Zellmembran führt dazu, dass der Auxinfluss die Zellen polarisiert und sie ihre Polarität auch beibehalten (Sachs, 1991). Dies induziert die Bildung von bevorzugten Kanälen, den vaskulären Elementen (Scheres und Xu, 2006; Rolland-Lagan und Prusinkiewicz, 2005). Die Rolle von Auxin bei der Organogenese wurde anhand einer Inhibierung des polaren Auxintransports mit dem Toxin NPA gezeigt, wodurch die Bildung von Blättern am vegetativen Apikalmeristem (AM) bei der Tomate blockiert wird und blind endende Sprossapices mit intaktem Meristem entstehen (Reinhardt et al., 2000). Die Blattbildung setzt nach externer Applikation von exogenem IAA auf diese Apices wieder ein, ebenso wie die Blütenbildung an *pin1*-Infloreszenzspitzen. In *Arabidopsis* werden im Transitionsstadiums zwei symmetrisch angeordnete Keimblätter initiiert (Mayer et al., 1991), in deren Spitzen Auxinmaxima

nachgewiesen wurden (Benkova et al., 2003). Innerhalb des Primordiums positioniert sich PIN1 in den Zellen der späteren Leitelemente basal, doch durch die apikale Lokalisation des Auxin Efflux-Carriers in den epidermalen Vorläuferzellen kann Auxin in den Spitzen der entstehenden Primordien akkumulieren.

Auxinquellen und Auxin-„sinks“ koordinieren gemeinsam mit der auxinabhängigen Polarisation der PIN-Proteine die spezifische phyllotaktische Initiation von Blättern oder Blüten.

## 1.5 Molekulare Mechanismen des Auxintransports

Da Auxine schwache Säuren ( $pK_a = 4,75$ ) sind begünstigt die Ansäuerung des Apoplasten ( $pH 5,5$ ) durch Protonenpumpen die Protonierung eines geringen Teils IAA ( $\sim 15\%$ ) außerhalb der Zelle (Vanneste et al., 2009). Wegen ihrer lipophilen Form können die Moleküle dann in die Zelle diffundieren. Im neutralen Cytoplasma werden sie dann deprotoniert und können so die PM nicht mehr durchdringen. Doch Auxin kann auch über sekundär aktiven Cotransport durch Influx-Carrier, *AUX1*-Proteine ( $H^+/IAA^-$  Symporter), die gleichmäßig in der Zellmembran verteilt sind, aufgenommen werden. Die Aktivität von PIN Efflux-Carriern ermöglicht Auxin, die Zelle wieder zu verlassen. Sie bestimmen durch ihre polare Lokalisation die Richtung des Auxinflusses und bilden damit die Schnittstelle zwischen der Signalübertragung durch eine einzelne Zelle und gerichteter Signalübertragung innerhalb des Gewebes.

Die Polarität der PIN Proteine kann durch eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes, der von den antagonistisch wirkenden Aktivitäten der PINOID Kinase (Friml et al., 2004) und Protein-Phosphatase 2A (Michniewicz et al., 2007) abhängig ist, manipuliert werden und dadurch die Auxinverteilung vorhersehbar verändern. Voraussetzung für die Phosphorylierung von PIN durch PINOID ist seine eigene Phosphorylierung durch die Phospholipid-assoziierte Kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) (Christensen et al., 2000; Zegzouti et al., 2006). Erst die aktivierte Form der PID Kinase ist in der Lage, PIN-Proteine zu phosphorylieren (Michniewicz et al., 2007). In Zellen, in denen PID nicht exprimiert wird bzw. die Konzentration unter einem bestimmten Schwellenwert bleibt, wird der Auxin Efflux-Carrier basal lokalisiert, während hohe Aktivitätslevel von PID zu einer apikalen PIN-Lokalisation führen (Friml et al., 2004; Kaplinsky und Barton, 2004). In Wurzeln von Proteinphosphatase 2A (PP2A) Mutanten konnte ebenso eine Verlagerung der PIN-Polarität von basal nach apikal wie im Fall einer *PID*-Überexpression gezeigt werden (Michniewicz et al., 2007). Neue Studien haben den Einfluss der Phosphorylierung von PIN an einer spezifischen Stelle auf die Verbreitung von Auxin und die Auxin-abhängige Entwicklung gezeigt (Zhang et al., 2010). Dabei wurde eine in allen PIN-Proteinen konservierte Phosphorylierungsstelle innerhalb der zentralen hydrophilen Schleife der Proteine identifiziert, die für ihre apikale und basale Lokalisation verantwortlich ist. Die Inaktivierung der Phosphorylierungsstelle in PIN1 führt zu einer vorwiegend basalen Lokalisation und einem verstärkten Auxinfluss zur Wurzelspitze. Wird dagegen eine Phosphorylierung imitiert sind die PIN-Proteine PID-unabhängig an der apikalen Seite lokalisiert und der Auxinfluss ist entgegengesetzt. Diese Ergebnisse demonstrieren die Wichtigkeit von Phosphorylierungen für die PIN1 Polarisation.

Die subzelluläre Lokalisation der Auxin Efflux-Carrier ist jedoch äußerst dynamisch, da PIN-Proteine fortwährend zwischen der Plasmamembran und den internen sekretorischen Kompartimenten durch Clathrin-abhängige Endozytose (Dhonukshe et al., 2007) und ARF-GEF-abhängige Exozytose (Geldner et al., 2001) ausgetauscht werden. In *gnom* Mutanten und nach einer Behandlung mit dem Toxin Brefeldin A (BFA) kommt es zu einer veränderten polaren Lokalisation von PIN1 und damit zu einer Störung des Auxintransports. GNOM kodiert für einen membranassoziierten GDP/GTP Austauschfaktor (Guanine-nukleotide Exchange-Faktor; GEF) für kleine G-Proteine der ARF (ADP-Ribosylation Factor)-Klasse und ermöglicht durch das Abschnüren von Membranvesikeln sowie die selektive Aufnahme von Frachtproteinen die Aufrechterhaltung der polaren Lokalisation von PIN1 während der Embryogenese (Geldner et al., 2003; Steinemann et al., 1999). Der Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor gehört zu der Familie der GTPasen und bewirkt durch den zyklischen Wechsel zwischen GTP- und GDP-gebundener Form die Bildung von intrazellulären Proteintransportvesikeln am Golgi-Apparat. Der zyklische Nukleotidwechsel wird durch Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Dabei wirkt ARF-GEF GNOM vornehmlich auf die basale Lokalisation der PIN-Proteine (Kleine-Vehn et al., 2008). Durch die Bindung des von Pilzen gebildeten Antibiotikums BFA an den ARF-GEF wird die Aktivierung der ARF-Proteine inhibiert, was in einer intrazellulären Akkumulation von PIN1 resultiert (Peyroche et al., 1999; Geldner et al., 2001). Die konstitutive endozytotische Wiedergewinnung der PIN-Proteine ermöglicht eine Neuverteilung nach jedem Aufnahmeprozess und damit eine schnelle Umstrukturierung der Efflux-Carrier zwischen den verschiedenen Seiten der Zellen. Diese Polaritätsänderung erlaubt einen raschen Richtungswechsel im Auxinfluss z. B. als Reaktion auf bestimmte Umweltsignale, wie bereits anhand des Gravitropismus gezeigt werden konnte (Friml et al., 2002). Versuche belegen das Modell, dass PIN zunächst unpolar an die PM abgesondert und die Polarität erst durch endozytotisches Recycling gebildet wird (Dhonukshe et al., 2008).

Neue Studien zeigen, dass PID und GNOM antagonistisch auf die PIN-Polarität wirken und die PID-abhängige PIN-Phosphorylierung zu einer GNOM-unabhängigen Lokalisation der Auxin Efflux-Carrier führt (Kleine-Vehn, 2009). Kürzlich wurde eine Verlagerung der PIN-Polarität von basal nach apikal, identisch zu *PID*-Überexpressionsmutanten (Friml et al., 2004) und *pp2A*-Funktionsverlustmutanten (Michniewicz et al., 2007), auch im Fall von einer reduzierten GNOM Aktivität (*gnom*-Funktionsverlustmutanten) beobachtet (Kleine-Vehn et al., 2008). Da in den ersten beiden Mutanten die BFA Sensitivität der PIN Lokalisation an der apikalen PM reduziert ist, fördert eine Phosphorylierung von PIN1 vermutlich seine eigene BFA-Insensitivität bzw. seine GNOM-unabhängige Lokalisation (Kleine-Vehn et al., 2009). Nach einem neuen Model zur PID/GNOM-abhängigen polaren Transzytose von PIN-Proteinen wird der Auxin Efflux-Carrier an der PM durch die PID-Kinase phosphoryliert und anschließend in Endosome aufgenommen. Da phosphorylierte PIN-Moleküle eine reduzierte Affinität zu dem GNOM-abhängigen basalen Recycling Pathway haben, folgt der Großteil der Proteine einem apikalen GNOM-unabhängigen Pathway, was eine Reversion der Transzytose von basal nach apikal zur Folge hat. Durch die Wirkung der PP2A Phosphatase können die PIN-Proteine wieder zurück auf den GNOM-abhängigen basalen Recycling Pathway gebracht werden (Kleine-Vehn et al., 2009). Da PP2A verschiedene Substrate beeinflussen kann (Zhou et al., 2004) und sie

innerhalb der Zelle verstreut sind (Michniewicz et al., 2007), bleiben die genauen molekularen Mechanismen der Wirkung auf die polare Lokalisation der Auxin Efflux-Carrier unklar.

Die Polarität der PIN-Proteine kann sich im Verlauf unterschiedlicher Entwicklungsprozesse, z. B. durch Gravitropismus, die Bildung lateraler Primordien oder bei der Entwicklung vaskulärer Elemente verändern (Friml et al., 2002; Benkova et al., 2003; Heisler et al. 2005; Scarpella et al., 2006). Die PID/PP2A-abhängige Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von PIN induziert vermutlich die schnellen Polaritätsänderungen durch einen GNOM-abhängigen und GNOM-unabhängigen Mechanismus der Transzytose.

## 1.6 Auxin – Auslöser entwicklungsabhängiger Veränderungen

Die durch Auxin-vermittelten Entwicklungsprozesse werden nicht nur über zelluläre Signaltransduktion bestimmt, sondern auch über die differentielle Verteilung des Phytohormons innerhalb des Gewebes (Auxinmaxima und -gradienten), die zeitlich und räumlich durch die Synthese und den Transport geregelt wird. Ein Beispiel ist die Polarisation des PIN1 Transporters zur basalen Seite der proembryonalen Zellen, denn der basipetale Auxinfluss signalisiert dem basalen Pol die Bildung eines Wurzelmeristems (Friml et al., 2003). Eine Fehllokalisierung der PIN1-Proteine führt durch ektopische Akkumulation von Auxin im apikalen Teil des Embryos zur Wurzelinitiation und zur Bildung wurzelähnlicher Strukturen aus dem embryonalen Blattgewebe (Dhonukshe et al., 2008), in denen der auxinabhängige Transkriptionsfaktor (TF) PLT1 (PLETHORA1), der Hauptregulator der Wurzelbildung (Aida et al., 2004), ektopisch exprimiert wird. Die erhöhte Auxinkonzentration startet so ein wurzelspezifisches Entwicklungsprogramm. Die *PLT*-Gene sind maßgeblich an der Spezifizierung der Stammzellen des Wurzelmeristems beteiligt (Blilou et al., 2005; Galinha et al., 2007).

Die Akkumulierung von Auxin löst eine Veränderung in der Entwicklung aus, die vermutlich für jeden Zelltyp bereits vorprogrammiert ist. Studien mit genetischen Mosaiken zeigen, aus welchen Zellen des SAM sich bestimmte Sektoren (Gewebe) im Keimling entwickeln (Irish und Sussex, 1992; Woodrick et al., 2000). Diese Schicksalskartierung verdeutlicht das in dieser Arbeit behandelte Problem, wie und zu welchem Zeitpunkt der Embryogenese es zur Bildung von Keimblättern (Bilateralsymmetrie) durch die Verteilung von PIN1 kommt, denn das Schicksal der Zellen ist zu dieser Zeit bereits bestimmt. Durch spontan auftretende klonale Albinosektoren, die durch eine Mutation in *chloroplast mutator 1-2* verursacht werden, konnte eine Schicksalskarte für *Arabidopsis thaliana* aufgestellt werden. Sie deckte nicht nur die eine temporale Asymmetrie in der Entwicklung der beiden Keimblätter auf, sodass die Kotyledonen im späten Globularstadium in kurzer Abfolge nacheinander gebildet werden, sondern lässt auch eine Vorhersage zur phyllotaktischen Anordnung postembryonaler Blätter um die zentrale Achse im Verlauf der Entwicklung zu (Woodrick et al., 2000).

Die grundlegenden Mechanismen, die zur Anlage und Entwicklung der Kotyledonen führen, sind weitgehend unerforscht. Es ist jedoch zu erwarten, dass es Gene geben

muss, die der Initiation der Keimblattprimordien nachgeschaltet sind und die verschiedene Aspekte der Keimblattbildung (Bestimmung der Zahl und der Größe) steuern. Durch die Identifizierung und Analyse solcher Gene könnte die bisherige Kenntnis über die Entwicklung dieser Organe einem mechanistischem Verständnis auf molekularer Ebene zugeführt werden. Neue Studien haben gezeigt, dass die Expression des TCP3-Repressor (TCP3SRDX) zur Bildung von Sprossen auf den Keimblättern führt und gleichzeitig die *CUC*-Gene ektopisch exprimiert werden. Die Aktivität der miR164, dessen Produkt *CUC*-Transkripte spaltet, wird dabei supprimiert (Koyama et al., 2007). In TCP3-Überexpressionsmutanten ist die Expression der *CUC*-Gene unterdrückt und die Keimblätter sind fusioniert. Acht weitere TCPs übernehmen eine ähnliche Funktion. TCP TF beeinflussen damit die Bildung des SAM und die Entwicklung lateraler Sprossorgane und können dadurch Hinweise auf die Schritte nach der Initiation der Keimblätter geben.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ein EMS Mutagenese Screen hat die Keimblattmutante *laterne* identifiziert, welche die Existenz des Gens *ENP* enthüllt hat, das zusammen mit *PID* spezifisch die Initiation der Keimblätter kontrolliert (Tremel et al., 2005). Diese Erkenntnis gab erstmals einen Einblick in ein keimblattspezifisches, genetisches Programm und die der Auxin-abhängigen Organogenese zugrunde liegenden Prozesse. *ENP* ist offensichtlich ein entscheidender Faktor für die epidermale Zellpolarität, doch die molekularen Mechanismen, welche seine eigene Polarität regulieren, sind unbekannt (Tremel, 2007). Um diese Prozesse aufzuklären sollten Pharmazeutika appliziert werden, die mit Komponenten des Zytoskeletts (Oryzalin, Cytochalasin), der Protein- und Sterolsynthese (CHX, Filipin), des Vesikeltransports (BFA, Wortmannin) und des Auxintransports (NPA, NOA, NAA, 2,4-D, TIBA etc.) interferieren.

Eine Interaktion mit anderen zellulären Proteinen könnte ebenfalls Aufschluss über die Funktion von *ENP* geben. Yeast Two-Hybrid Screens deckten zwar keine Interaktion zwischen *PID* und *ENP* bzw. *PIN1* und *ENP* auf, doch innerhalb der *NPH3*-Familie gibt es vier Gene, die eine große Ähnlichkeit zu *ENP* aufweisen. Auch diese Möglichkeit sollte näher untersucht werden.

Eine Voraussetzung für die Bildung von Keimblattprimordien ist die Akkumulation von Auxin, vermittelt durch die *PIN1* Auxin Efflux-Proteine, die den *PAT* steuern. 3D-Rekonstruktionen, die das Verteilungsmuster von *PIN1* in Embryonen zeigen, könnten Hinweise auf die Mechanismen der Keimblattinitiation geben. Dies war eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit.

Zur Aufklärung des keimblattspezifischen, genetischen Programms sollten auch die Prozesse nach der Keimblattinitiation untersucht werden. Ein erster Schritt dazu sind genomweite Transkriptomanalysen zwischen keimblattlosen *enp pid*- und Wildtyp-Embryonen im Torpedostadium, in dem die Musterbildung bereits abgeschlossen ist. Dadurch können differentiell exprimierte Gene offen gelegt werden, die Aufschluss über den Aufbau des Keimblatts und seiner Reifung geben.

Eine weitere Möglichkeit, die Keimblattentwicklung zu untersuchen, ist die Charakterisierung von Mutanten, die nicht spezifisch von der Initiation der Kotyledonen betroffen sind, sondern von der Anzahl. Mutationen im Gen *ABANICO* (*ACO*), die im

Ökotyp Columbia durch Beschuss mit schnellen Neutronen induziert wurden, führen mit unvollständiger Penetranz zu monokotylen Keimlingen (Torres Ruiz, unveröffentlicht). *ABANICO* ist auf dem unteren Arm des Chromosom 1 lokalisiert, jedoch nicht kloniert. Die Region ließ sich aber zwischen zwei SNPs der BACs T26J14 und F2OP5 einschränken. *ACO* sollte näher kartiert bzw. mögliche Kandidatengene in seinem Intervall getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Verbrauchsmittel

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, im pro analysis Qualitätsstandard von den Firmen Biorad (USA), Biozym (Hamburg), Roche (Schweiz), Difco (USA), Duchefa (Niederlande), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), GE Healthcare (Großbritannien), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (USA) und USB (USA) bezogen. Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme lieferten die Firmen Roche, Gibco BRL (USA), MBI Fermentas (Litauen), New England Biolabs (USA), Serva (Heidelberg) und Stratagene (USA). Desoxynukleotide (dNTPs) wurden bei den Firmen Roche und GE Healthcare erworben. Für die Antikörper-Färbung wurde der Zweitantikörper Cy3 von Jackson ImmunoResearch (USA) eingesetzt, der über Dianova (Hamburg) vertrieben wird, sowie Citiflour, das von Plano (Wetzlar) bezogen wurde. Die RNA für den Mikroarray wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen isoliert.

Falls für ein Verfahren gezielt spezielle Chemikalien und Hilfsmittel erworben wurden, werden selbige in der jeweiligen Anleitung erwähnt.

#### 2.1.2 Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung (mg/ml)          |
|--------------|------------------------------|
| Ampicillin   | 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O |
| Kanamycin    | 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O |
| Tetracycline | 25 mg/ml in EtOH             |
| Rifampicin   | 50 mg/ml in Methanol         |
| Gentamycin   | 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O |
| Streptomycin | 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O |

Tab. 1 : Antibiotika und ihre Stammlösungen. Die Arbeitskonzentration beträgt 1/1000 der Konzentration der Stammlösung.

#### 2.1.3 Längenstandards

$\lambda$ -DNA und 1 kb Plus DNA-Leiter sind bei den Firmen MBI-Fermentas und Invitrogen erhältlich. Die  $\lambda$ -DNA (3  $\mu$ g/10  $\mu$ l) muss, bevor sie als Marker eingesetzt werden kann, noch mit  $\lambda$ -HindIII bei 37°C für mehrere Stunden verdaut werden.

50 µl Restriktionsansatz: 40 µl λ-DNA (3 µg/10 µl)  
 (0,24 µg λ-DNA/µl) + 5 µl 10x NEB Puffer 2  
 + 5 µl λ-HindIII

Die Endkonzentration von 1 µg/10 µl λ-HindIII Marker wird durch Zugabe von 12 µl 10x Auftragspuffer und 58 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> erreicht.

### 2.1.4 Primer

Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers (Ulm), Eurogentec (Belgien), Gibco BRL (USA), Invitrogen (Karlsruhe) und MWG (Ebersberg) synthetisiert. Die folgenden Tabellen fassen die Primer zusammen, die für Klonierungen (Tab. 2), für SNP-Kartierungen (Tab. 3) bzw. für Amplifikation genomischer Fragmente (Tab. 4) verwendet wurden.

| Name          | Sequenz   | Verwendung  |
|---------------|---|---|
| ENP - YFP     | TATGGAGGTGAAATGTGACC  | Sequenzierung ENP-Expression Clone nach 5' (35S-Promoter)                   |
| ENP - 35S     | CTGGGAAAGGAGAGATTAGC  | Sequenzierung ENP Expression-Clone nach 3' (CFP bzw. YFP)                   |
| 23050 - FP    | TAGACCTTGACATTGCCGAT  | Sequenzierung 23050-Expression Clone nach 5' (35S-Promoter)                 |
| 23050 - 35S   | GCAAGTTCTCTTCTTTGAAC  | Sequenzierung 23050-Expression Clone nach 5' (CFP bzw. YFP)                 |
| ENPB2fsREV    | GGGGACCACTTTGTACAAGAA<br>AGCTGGGTCCGATATCGAATG<br>TCTGCGGCG   | PCR-Primer für ENP zur Einführung der <i>attB2</i> -Stelle                  |
| ENPsfB1FW     | GGGGACAAGTTTGTACAAAA<br>AGCAGGCTTCATGAAGTTCAT<br>GAAGCTAGGGTC | PCR-Primer für ENP zur Einführung der <i>attB1</i> -Stelle                  |
| pDONRT207 fw  | TCGCGTTAACGCTAGCATGGA<br>TCTC                                 | Sequenzierung der Entry-Clones  |
| pDONRT207 rev | GTAACATCAGAGATTTTGAGA<br>CAC                                  | Sequenzierung der Entry-Clones  |
| ENPI23sfB1FW  | GGGGACAAGTTTGTACAAAA<br>AGCAGGCTTCATGAAGTTTAT<br>GAACTTGGAA   | PCR-Primer für ENP-like (At2g23050) zur Einführung der <i>attB1</i> -Stelle |
| ENPI23B2fsREV | GGGGACCACTTTGTACAAGAA<br>AGCTGGGTCAAACCTTTTCTC<br>ATGGTCCCATT | PCR-Primer für ENP-like (At2g23050) zur Einführung der <i>attB2</i> -Stelle |
| ccdB fw       | ATCTCAGCCACCGCGAAAAT  | Sequenzierung der Destination-Vektoren aus dem <i>ccdB</i> Gen              |
| ccdB rev      | CGCCCGGGCGTGTCAATAAT  | Sequenzierung der Destination-Vektoren aus dem <i>ccdB</i> Gen              |

Tab. 2: Primer für die Gateway-Klonierung. Fluoreszenzprotein (FP), forward (FW), reverse (REV)

| Name              | Sequenz          | Verwendung   |
|-------------------|------------------|--|
| SNP_ENP_01_F1_BIO | GCACGCTGCAGAACGA | Mit Biotin markierter PCR-Primer zur Amplifizierung von ENP              |
| SNP_ENP_01_R1     | GCCACGGGCTGATTT  | PCR-Primer zur Amplifizierung von ENP                                    |
| SNP_ENP_01_S1     | CGGGCTGTGATTTG   | Sequenzierprimer ENP   |
| SNP_pid-15_R1_BIO | CTTGACGACGGGAATC | Mit Biotin markierter PCR-Primer zur Amplifizierung von <i>At2g23050</i> |
| SNP_pid-15_F1     | CATGCGCGGATGATTT | PCR-Primer zur Amplifizierung von <i>At2g23050</i>                       |
| SNP_pid-15_S1     | GATCCGACTAGACTTG | Sequenzierprimer <i>At2g23050</i>  |

Tab. 3: Primer für die SNP-Analyse. Der Unterstrich steht für die jeweilige Nummer oder Bezeichnung. Biotinylierte (BIO), forward (F), (Pyro-) Sequenzierung (S), reverse (R), single nucleotide polymorphism (SNP).

| Name        | Sequenz                                       | Verwendung               |
|-------------|---|--------------------------|
| RTPANA1F    | attccctt <sup>1</sup> gtgtcatcatctttc         | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA1R    | accaccaccaccaccacaat                          | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA2F    | gg <sup>2</sup> tg <sup>3</sup> ggcttgaggagag | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA2R    | acatcaacacggccaagtaacg                        | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA3F    | ctcaggcatgtggaagac                            | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA3R    | cagcctgcaaagatatagtaacct                      | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA4F    | aaacttggcactctt <sup>4</sup> gaaaact          | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANA4R    | atg <sup>5</sup> cggtattatctcttacg            | Kartierung ACO, PAN-Test |
| PANA5fw     | cttactactacacgacgtttg                         | Kartierung ACO, PAN-Test |
| PANA5rev    | ggttattgaagaagacaaaag                         | Kartierung ACO, PAN-Test |
| PANA6fw     | tcttctctctctcacacac                           | Kartierung ACO, PAN-Test |
| PANA6rev    | gacaactatctcctctgtttt                         | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANX1F    | cctcattcattagcaaaacaaagt                      | Kartierung ACO, PAN-Test |
| RTPANX1R    | caggggaaaaagaagtgagc                          | Kartierung ACO, PAN-Test |
| ramonPANup  | cgggaggctgtaggaaaagt                          | Kartierung ACO, PAN-Test |
| ramonPANdwn | aagcgtctcgagaagtgtgttg                        | Kartierung ACO, PAN-Test |
| CRC13thup   | tcccctcaagccgaacat                            | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC13thdwn  | cgctggagggtggaggaagag                         | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC2fw      | aatctt <sup>7</sup> gttttaactaagcagatgcagag   | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC2rev     | ccactgtttgtgacattttcatttacaca                 | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC3fw      | gcctcctaactcataaaata                          | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC3rev     | ggcatgcaagtatatatatgc                         | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC4fw      | aaaatgcaattatggactgc                          | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC4rev     | gtagtagagatgttcggctt                          | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC5fw      | caattagggcttgggattcg                          | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC5rev     | cctactccttttcacagcg                           | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC2ndup    | cagccccctctccctcac                            | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC2nddwn   | tcttacattttggcagcagcact                       | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC1stup    | gccaatccggaaataccacac                         | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC1stdwn   | acgcagccactcgcacac                            | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC72ndup   | tacaccagaagtcattagt <sup>8</sup> tta          | Kartierung ACO, CRC-Test |
| CRC72nddwn  | acaccggacgtagtagagat                          | Kartierung ACO, CRC-Test |

Tab. 4: Primer für die Kartierung von *ABANICO*, forward (F, fw), reverse (R, rev)

## 2.1.5 cDNA-Klone

|                          |   |
|--------------------------|---|
| RAFL17-11-E06 (pda10515) | Riken Bio Ressource Center (Japan)<br>(At2g23050 cDNA, Kanamycin <sup>R</sup> ) |
| RAFL09-39-B04 (pda08292) | Riken Bio Ressource Center (Japan)<br>(ENP cDNA, Ampicilin <sup>R</sup> )       |

## 2.1.6 Vektoren

| Vektor          | Resistenzgen  | Quelle     | Verwendung  |
|-----------------|---|------------|---|
| pDONR 207       | <i>ccdB</i> -Gen<br>Gen <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>                                | Invitrogen | Klonierung von <i>attB</i> -flankierten PCR-Produkten im Gateway-System |
| pEarleyGate 101 | <i>ccdB</i> -Gen<br>Pflanzen: BASTA <sup>R</sup><br><i>E. coli</i> : Kan <sup>R</sup> | ABRC       | Expressionsplasmid im Gateway-System                                    |
| pEarleyGate 102 | <i>ccdB</i> -Gen<br>Pflanzen: BASTA <sup>R</sup><br><i>E. coli</i> : Kan <sup>R</sup> | ABRC       | Expressionsplasmid im Gateway-System                                    |

Tab. 5: Vektoren, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden

## 2.1.7 Bakterienstämme

| Stamm  | Genotyp   | Verwendung  | Literatur                    |
|--|---|---|------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1 Blue (Stratagene)                                     | supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1 lac- F'[proAB+ lacI lacZ ΔM15 Tn10 (tetR)]   | Pflanzentransformation-Test (Rücktransformation)                            | Bullock et al. (1987)        |
| <i>E. coli</i> One Shot® OmniMAX™ 2-T1 <sup>R</sup> (Invitrogen)         | F' {proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD | Gateway-Technologie-System zur Transformation der BP-Reaktion               | Blumenthal, R. M. (1989)     |
| <i>E. coli</i> One Shot® OmniMAX™ <i>ccdB</i> Survival™ T1R (Invitrogen) | F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG fhuA::IS2                      | Gateway-Technologie-System zur Erhaltung von Plasmiden mit <i>ccdB</i> -Gen | Bernard und Couturier (1992) |
| NEB 10-beta (New England Biolabs)  | araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 ga/K (Φ80 Δ(lacZ)M15) mcrA ga/U recA1 endA1 nupG rpsL (Str <sup>R</sup> ) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)                          | Gateway-Technologie-System zur Transformation der LR-Reaktion               | Casdaban und Cohen (1980)    |
| <i>A. tumefaciens</i> GV3101   | Gentamycin <sup>R</sup> , Rifampicin <sup>R</sup> , Ti-Plasmid ohne T-DNA   | Pflanzentransformation  | Koncz und Schell (1986)      |

Tab. 6: Bakterienstämme, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

## 2.1.8 *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial

### 2.1.8.1 WT-Linien

|               |      |
|---------------|------|
| Ler (NW20)    | NASC |
| Col-0 (N1092) | NASC |

### 2.1.8.2 Mutante Linien

|   |  |
|---|--|
| <i>laterne</i><br>(Treml et. al., 2005)                       | Die <i>laterne</i> Doppelmutation ( <i>enp pid</i> ) wurde im <i>Landsberg erecta</i> Ökotyp durch EMS Mutagenese induziert und durch wiederholtes Selbsten der Ursprungslinie isogenisiert.   |
| <i>enp</i><br>(Treml et. al., 2005;<br>Furutani et.al., 2007) | Die homozygote <i>enp</i> Linie wurde durch Auskreuzen aus der <i>laterne</i> Ursprungslinie und anschließendes wiederholtes Selbsten isogenisiert. Die EMS induzierte Transition von C nach T im Arg-468 Codon von ENP erzeugt ein Stop-Codon.  |
| <i>pid-15</i><br>(Treml et. al., 2005)                        | Die <i>pid-15</i> Linie wurde durch Auskreuzen aus der <i>laterne</i> Ursprungslinie und anschließendes wiederholtes Selbsten isogenisiert. Die durch EMS Mutagenese induzierte Transition von G nach A ändert Aminosäure 380 von Gly in Glu und resultiert in einem intermediären <i>pid</i> -Phänotyp. |
| <i>pid-8</i><br>(Bennett et. al., 1995)                       | Die spontane Mutation im Ws Hintergrund (T-DNA Insertions-Linie) führt zu einem schwachen <i>pid</i> -Phänotyp. Das <i>pid-8</i> Allel zeichnet sich durch einen Austausch der Aminosäure 300 von Pro nach Gln (CCA→CAA) aus.  |
| <i>pid-9</i><br>(Christensen et. al., 2000)                   | <i>pid-9</i> ist ein starkes <i>PINOID</i> -Allel im Col Hintergrund. Die durch T-DNA Insertion verursachte 23 bp Deletion (526-548) bedingt den Abbruch der mRNA Translation nach dem Arg175.   |
| III-2-A4 spirrig<br><i>enp + / enp pid-15</i>                 | Die Sepalen dieser Pflanzen sind regelmäßig zu einem Ring verwachsen, der die Petalen und Stamina einschnürt und dadurch von der Narbe (Stigma) des Stempels (Pistill) trennt. Eine Selbstbestäubung ist somit nur bedingt möglich und die Pflanzen sind semisteril.                                     |

### 2.1.8.3 Transgene Linien und Kreuzungen

#### Transgene Linien

|                             |               |                                 |
|-----------------------------|---------------|---------------------------------|
| <i>pPIN1::PIN1::GFP</i>     | Jiri Friml    | (Universität Gent)              |
| <i>pAtSNX1::AtSNX1::GFP</i> | Thierry Gaude | (CNRS Universität Lyon) über    |
|                             | M. T. Hauser  | (Universität für BOKU Wien)     |
| <i>p35S::EGFP::ENP1-4</i>   | Birgit Trembl | (Doktorarbeit 2007, TU München) |
| <i>p35S::EGFP::ENP3-4</i>   | Birgit Trembl | (Doktorarbeit 2007, TU München) |

#### Kreuzungen

- I) *ENP3-4::GFP* no.1 (Ler) X *enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl. 5/12 - Nr.1 bzw. Nr.3)  
*enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl. 5/12 - Nr.3) X *ENP3-4::GFP* no.2 (Ler)
- II) *ENP1-4::GFP* no.1- no.4 (Ler) X *enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl. 5/12 - Nr.1 - Nr. 4)  
*enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl. 5/12 - Nr.1- Nr. 3) X *ENP1-4::GFP* no.1- no.4 (Ler)
- III) *enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl.III-2-A4/2 - Nr.1 u. Nr.2) X 23050-YFP-2-1 Pfl.20/2 (C)
- IV) *enp pid/enp* + (Ler sp. Pfl.III-2-A4/2 - Nr.1 und Nr.2) X 23050-CFP-1 Pfl.1-3/1 (C)
- V) *enp pid/enp* + (Ler nicht sp. Pfl.III-2-A4Pfl.1) X 23050-YFP-2-1 Pfl.20/2 (C)
- VI) *enp pid/enp* + (Ler nicht sp. Pfl.III-2-A4Pfl.1) X 23050-CFP-1 Pfl.1-3/1 (C)
- VII) *enp* x *pid-15*
- VIII) *enp* x *pid-9*
- IX) *enp* x *pid-8*

### 2.1.9 Lösungen

#### Allgemeine Lösungen

##### $H_2O_{DEPC}$

0,1 % DEPC (v/v) in  $H_2O_{dd}$  lösen, üN einwirken lassen und anschließend autoklavieren. Diethylpyrocarbonat (DEPC) bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, u. a. auch an His-Seitenketten in den aktiven Zentren vieler RNasen. Die katalytische Wirkung der RNasen geht dadurch verloren und sie werden irreversibel inhibiert. Auf die gleiche Art wie  $H_2O_{dd}$  können auch die meisten Lösungen mit DEPC behandelt werden. Puffer die selbst primäre oder sekundäre Amine enthalten, z. B. Tris, werden alternativ mit DEPC-behandeltem Wasser ( $H_2O_{DEPC}$ ) angesetzt. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC in die beiden flüchtigen Produkte  $CO_2$  und Ethanol ( $(C_2H_5OCO)_2O + H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 2 C_2H_5OH$ ).

**0,5 M EDTA pH 8,0**

0,5 M EDTA·Na<sub>2</sub> pH 8,0

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH mit 10 N NaOH oder NaOH-Pellets auf pH 8,0 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. EDTA geht erst in Lösung, wenn pH 8,0 erreicht ist. Lösung autoklavieren.

**3 M NaAc pH 5,2**

3 M NaAc pH 5,2

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH unter dem Abzug mit 100 % Eisessig auf pH 5,2 einstellen und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugeben bis das Endvolumen erreicht ist. Lösung vor dem Gebrauch autoklavieren. Falls das 3 M NaAc zur gesamt-RNA Präparation verwendet werden soll, wird die Lösung vor dem Autoklavieren üN mit 0,1 % DEPC (0,5 ml DEPC auf 500 ml Lösung) behandelt.

**PEG (Polyethylenglykol )-Lösung**

|            |                  |
|------------|------------------|
| 15 % (w/v) | PEG 8000 (Sigma) |
| 1 M        | NaCl             |
| 5 mM       | EDTA pH 8,0      |

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen.

**Phenol**

Vor der Benutzung muss der pH des Phenols auf pH >7,8 erhöht werden. Ist der pH-Wert zu sauer, so befindet sich die DNA bei der Phenol-Chloroform-Extraktion auch in der organischen Phase und kann somit nicht von Proteinen gereinigt werden. Zu 250 g Phenol werden 250 mg 8-Hydroxychinolin und 150 ml 1 M Tris pH 8,0 zugegeben (Hydroxychinolin fungiert als Antioxidant, Inhibitor von RNasen und Chelator von Metallionen). Die Komponenten werden üN bei RT oder für 1 h bei 50°C mit Hilfe eines beheizbaren Magnetrührers gelöst. Danach wird der Rührer ausgeschaltet damit sich die Phasen trennen und die obere Phase mit einer Glaspipette abgenommen werden kann. Die untere Phase wird mit 200 ml 0,1 M Tris pH 8,0 und 0,2 % Mercaptoethanol ausgeschüttelt und 15 min bei RT gerührt. Danach wird die obere Phase erneut abgenommen. Der Vorgang wird so lange wiederholt bis der pH der phenolischen, unteren Phase >7,8 ist. Der pH-Wert im Überstand sollte zwischen 6,5 und 7,5 betragen (pH-Stäbchen (Merck) verwenden). Die phenolische Phase wird abschließend mit 0,1 M Tris pH 8,0 und 0,2 % β-Mercaptoethanol überschichtet. Phenol kann mehrere Monate in einer lichtgeschützten Flasche bei 4°C aufbewahrt werden.

**20 % SDS**

20 % SDS (w/v)

SDS in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> durch Erhitzen (68°C) und unter Verwendung eines Magnetrührers lösen. pH, falls nötig, auf 7,2 mit konzentrierter HCl einstellen. Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Nicht autoklavieren. Bei RT lagern.

**1x TE pH 8,0**

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8,0

Feststoffe in 0,75 des H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>-Endvolumens lösen. pH mit HCl<sub>konz.</sub> auf 8,0 einstellen, mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren. Alternativ kann der Puffer auch aus den Stammlösungen hergestellt werden.

**1 M Tris-HCl**

1 M Tris H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen. pH mit HCl<sub>konz.</sub> auf den gewünschten Wert einstellen, H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugeben bis das Endvolumen erreicht ist und die Lösung autoklavieren.

**Lösungen für Agarosegele****10x Auftragspuffer**

50 mM EDTA  
0,25 % Bromphenolblau (w/v)  
0,25 % Xylencyanol (w/v)  
25 % Ficoll 400 (w/v)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und sterilfiltrieren. Bei RT lagern.

Der Probenpuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung damit sie in die Taschen des Gels sinkt. Um die Wanderung der DNA im Verlauf der Gelelektrophorese verfolgen zu können fügt man den Auftragspuffern einen, oder mehrere Farbstoffe zu. Im 0,5-1,5 % Agarosegel migrieren z. B. Bromphenolblau und Xylencyanol wie DNA-Fragmente von ungefähr 300 bp bzw. 4 kb Länge.

**EtBr-Stocklösung**

5 mg/ml Ethidiumbromid

Für ein 100 ml Agarosegel sind 10 µl EtBr-Stocklösung ausreichend, was einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml entspricht. EtBr interkaliert in die DNA und wirkt stark mutagen. Auch wenn ein giftiger oder kanzerogener Effekt beim Menschen noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, sollte der Kontakt mit der Substanz vermieden werden.

**50x TAE**

242 g Tris  
57,1 ml Essigsäure  
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen.

**5x TBE**

54 g            Tris  
27,5 g        Borsäure  
20 ml 0,5 M   EDTA pH 8,0

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen.

TAE wird als 50x Vorratslösung gelagert und eignet sich für das Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen. Im Gegensatz dazu kann TBE nur als 5x Puffer hergestellt werden, da es bei höheren Konzentrationen ausfällt. Für die Gelextraktion von DNA ist es aufgrund seines Borat-Gehalts weniger gut geeignet. TAE hat dagegen im Verhältnis zu TBE eine geringe Pufferkapazität. TAE-Gele müssen folglich bei einer geringeren Spannung als TBE-Gele gefahren werden, da sie sonst schmelzen.

**Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl Methode****TBF1-Puffer**

100 mM        RbCl<sub>2</sub>  
30 mM        KAc  
10 mM        CaCl<sub>2</sub>  
50 mM        MnCl<sub>2</sub>  
15 %         Glycerin (w/v)

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH 5,0 mit Essigsäure einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Lösung sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

**TBF2-Puffer**

10 mM        NaMOPS pH 7,0 (pH mit NaOH einstellen)  
10 mM        RbCl<sub>2</sub>  
15 mM        CaCl<sub>2</sub>  
15 %         Glycerin (w/v)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

**Lösungen zur Plasmid-Isolierung aus *E. coli* und *A. tumefaciens*****Lösung I (Lyse)**

50 mM        Glucose  
25 mM        Tris-HCl pH 8,0  
10 mM        EDTA pH 8,0  
(3-5 mg/ml Lysozym)

Glucose sterilfiltrieren. Restliche Substanzen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren. Glucose zugeben.

**Lösung II (Denaturierung)**

0,2 M NaOH

1 % SDS

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Zum Mischen langsam invertieren, damit das SDS nicht schäumt. Die Lösung wird für jede Plasmid-Isolierung frisch hergestellt.

**Lösung III (Neutralisation)**

3 M NaAc pH 4,8

Mit 100 % Eisessig auf pH 4,8 einstellen, auf das gewünschte Endvolumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und autoklavieren.

Falls Plasmid DNA aus Agrobakterien isoliert werden soll, wird als Neutralisationslösung 7,5 M Ammoniumacetat (pH ~7,2) an Stelle von 3 M NaAc verwendet.

**Lösungen zur DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial****2x CTAB-Puffer**

2 % CTAB (w/v)

1 % PVP MG400 (w/v)

1,4 M NaCl

100 mM Tris-HCl pH 8,0

20 mM EDTA pH 8,0

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren. CTAB kann alternativ auch nach dem Autoklavieren zugegeben werden, da sich die Lösung sonst verfärbt.

**Lösungen für PCR-Reaktionen****dNTP-Stocklösungen**

100 mM dATP, dCTP, dGTP, oder dTTP

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen, aliquotieren und bei -20°C lagern.

**dNTP-Arbeitslösung (10x)**

2-2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das erwünschte Endvolumen auffüllen und bei -20°C lagern. Für eine Standard-PCR wird eine Konzentration von 200 µM je Nukleotid empfohlen. Um besonders lange PCR-Produkte zu amplifizieren, sollte die Nukleotidkonzentration erhöht werden. Zu hohe dNTP-Konzentrationen können allerdings nachweislich eine stark inhibierende Wirkung auf die Amplifikation haben.

## Lösungen für die Pflanzentransformation mittels *A. tumefaciens*

### 10 % Glycerin

10 % Glycerin (v/v)

Glycerin mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

### Pflanzentransformationspuffer

10 mM MgCl<sub>2</sub>

5 % Saccharose

In H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und kurz vor der Pflanzentransformation 0,05 % Silwet L-77 zugeben.

## Lösungen für die pharmazeutischen Tests

| Pharmazeutikum | Stammkonzentration        | Lagerung |
|----------------|---------------------------|----------|
| BFA            | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| Cytochalasin B | 10 mM in EtOH             | -20°C    |
| Oryzalin       | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| Cycloheximid   | 50 mM in H <sub>2</sub> O | -20°C    |
| NAA            | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| 2,4-D          | 9,04 mM in EtOH           | -20°C    |
| Wortmannin     | 2 mM in DMSO              | 4°C      |
| NOA            | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| NPA            | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| TIBA           | 100 mM in DMSO            | 4°C      |
| Filipin        | 100 µM in DMSO            | 4°C      |

Tab. 7: Stammlösungen für die pharmazeutischen Tests. Die Arbeitskonzentrationen sind in dem jeweiligen Versuch aufgeführt.

## Lösungen für immunohistochemische Färbungen

### 1x PBS

137 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH mit HCl oder NaOH auf 7,0 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Lösung autoklavieren.

### MTSB

50 mM Pipes (SIGMA, P-1851)  
 5 mM EGTA (SIGMA, E4378)  
 5 mM MgSO<sub>4</sub> mit H<sub>2</sub>O

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH mit KOH auf 6,9-7,0 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Lösung autoklavieren.

#### 4 % PFA in MTSB

MTSB mit KOH vorsichtig auf pH 11 einstellen und auf 60 °C erwärmen (PFA geht nur bei pH 11 und 60°C vollständig in Lösung). 4 g PFA für ein Endvolumen von 100 ml unter dem Abzug abwiegen und 80 ml MTSB zugeben. PFA für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubieren, bis sich das Paraformaldehyd depolymerisiert und damit gelöst ist. Fixierlösung aus dem Wasserbad nehmen und unter andauerndem Schütteln auf RT abkühlen lassen. Lösung unter Verwendung von pH-Papier mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 6,9-7,0 einstellen und in Aliquots (5 ml) bei -20°C lagern. HCl darf nicht verwendet werden, um den pH einzustellen, da die Kombination aus HCl und Formaldehyd ein starkes Karzinogen freisetzt. Die Formaldehyd-Fixierlösung muss immer frisch hergestellt werden, da Formaldehyd flüchtig ist.

#### Gelatine-Beschichtung von Objektträgern

98 OTs (Menzel Mattrand ohne Beschriftung) in einem Metallständer in einer Glasschale ca. 1 h in Spülmittel einweichen. Dann zuerst mit Leitungswasser mehrmals spülen und zum Schluss mit Millipore H<sub>2</sub>O (deionisiert). Ständer mit Alufolie abdecken und in Wärmeschrank trocknen.

2 % Gelatine in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> warm lösen (1 g)

0,2 % Chrom(III)Kaliumsulfat in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen (0,1 g)

Gelatine in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> warm lösen und etwas abkühlen lassen. Chrom(III)Kaliumsulfat in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und mit der Gelatine mischen. Durch einen Papierfaltenfilter in ein 100 ml Becherglas filtrieren. Die Objektträger bis zum Mattrand in die Lösung tauchen, abtropfen lassen und auf Papiertücher erst senkrecht, dann waagrecht stellen. Anschließend in eine mit Papiertüchern ausgelegte Objektträgerbox senkrecht aufstellen und unter der Sterilbank trocknen lassen. Bei -20°C lagern.

#### Lösungen für die Pyrosequenzierung

##### Binding Buffer

|       |          |
|-------|----------|
| 10 mM | Tris     |
| 2 M   | NaCl     |
| 1 mM  | EDTA     |
| 0,1 % | Tween 20 |

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH mit 1 M HCl auf 7,6 einstellen und 1 ml Tween 20 zugeben. Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen.

##### Annealing Buffer

|       |      |
|-------|------|
| 20 mM | Tris |
| 2 mM  | MgAc |

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, pH mit 4 M Essigsäure auf 7,6 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen.

**Denaturation Solution**

0,2 M NaOH

In 1 l H<sub>2</sub>O<sub>ds</sub> lösen.

**Washing Buffer**

10 mM Tris

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen, pH mit 4 M Essigsäure auf 7,6 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen.

**2.1.10 Medien****dYT-Medium**

16 g Pepton  
10 g Hefe-Extrakt  
5 g NaCl  
15 g Agar-Agar (für Festmedien)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

**LB-Medium**

10 g Bacto-Pepton (aus Casein)  
5 g Hefe-Extrakt  
10 g NaCl  
15 g Agar-Agar (für Festmedien)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und autoklavieren.

**Wasseragar**

3,5-4 g Agar-Agar in 400 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und autoklavieren.

**½ MS-Medium**

500 ml 1x MS-Salze und 500 ml 2x Saccharose nach dem Autoklavieren vereinigen (1:1). Vor dem Gießen der Platten dem handwarmen Medium 1 ml 1000x MS-Vitamine (und 25 µg/ml +D+L-Phosphinothricin, falls auf Basta-Resistenz selektioniert werden soll) zugeben.

**1x MS-Salze**

2,2 g Murashige & Skoog Medium

Unter Rühren zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und pH mit KOH auf 5,8 einstellen, mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 500 ml auffüllen und autoklavieren.

**2x Saccharose**

20 g Saccharose

9 g Agar-Agar

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 500 ml auffüllen und autoklavieren.

**SOC-Medium**

20 g Trypton  
5 g Hefe-Extrakt  
0,5 g NaCl  
10 ml KCl (250 mM)

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und pH mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen. Auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Vor Gebrauch 5 ml MgCl<sub>2</sub> (2 M) und 20 ml Glucose (1 M, sterilfiltriert) zugeben.

**YB-Medium**

5 g Hefe-Extrakt  
20 g Bactotryptone

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und pH mit KOH auf 7,6 einstellen. Auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Vor Gebrauch 4 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M) und 10 ml KCl (1 M) zugeben.

**YEB-Medium**

5 g Rinder-Extrakt  
1 g Hefe-Extrakt  
1 g Pepton/Trypton  
5 g Saccharose  
20 g Agar-Agar (für Festmedien)

Unter Rühren erst zu 0,75 mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und pH auf 7,4 einstellen. Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 l auffüllen und nach dem Autoklavieren 2 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M) zugeben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Pflanzenanzucht

#### 2.2.1.1 Anzucht auf Erde

Für die Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* eignet sich nährstoffarme Pikiererde Typ T (Bayerische Gärtnerei Genossenschaft), die zuerst gesiebt, dann 2:1 mit Quarzsand vermischt und autoklaviert wird. Die *A. thaliana* Samen werden in Töpfe mit feuchter Pikiererde ausgesät, wobei darauf zu achten ist, eine überschaubare Populationsdichte zu erhalten. Mit Hilfe eines lichtdurchlässigen Plastiksacks vor Austrocknung schützen. Nach einer zweitägigen Vernalisation bei 4°C werden die Töpfe in eine begehbare Heraeus-Pflanzenkammer (18°C, Dauerlicht) überführt. Wenn die Keimlinge mehrere Tage alt sind kann der Plastiksack entfernt werden. Bis die Pflanzen die Samenreife erreicht haben werden sie regelmäßig gegossen. Staunässe ist zu vermeiden, da diese zu Nanismus führt.

### 2.2.1.2 Anzucht unter sterilen Bedingungen

Alle nachfolgenden Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

- Samen in ein Eppendorfgefäß überführen und 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugeben.
- H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> durch 500 µl 70 % EtOH ersetzen und invertieren.
- Für maximal 2-3 min in 70 % EtOH inkubieren.
- EtOH abpipettieren, 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zugeben und invertieren.
- Insgesamt 3x mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen.
- 20 min in 500 µl Sterilisations-Lösung (5 % Hypochlorid, 0,05 % Triton X-100) unter andauerndem Invertieren (Rührarm) bleichen.
- 4x mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen. Nach dem vierten Waschgang wird das H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> nicht entfernt.

Nach der Oberflächensterilisation werden die Samen mit Hilfe des verbliebenen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf ½ MS-Medium oder Wasseragar-Platten übertragen und dabei so gut wie möglich vereinzelt. Die Petrischalen werden mit Parafilm abgedichtet und zwei Tage bei 4°C vernalisiert, bevor sie in den Lichtschrank (20°C, Dauerlicht) gestellt werden.

### 2.2.1.3 Intraspezifische Kreuzungen

*Arabidopsis thaliana* bildet hermaphroditische Blüten aus und vermehrt sich fast ausschließlich durch Selbstung. Um adulte Pflanzen kontrolliert kreuzen zu können, müssen Blüten mit reifen Staubblättern, bereits bestäubte Blüten und die Schoten der Empfängerpflanze abgeschnitten werden. Die ältesten verbleibenden Blüten der Infloreszenzen werden emaskuliert und alle weiteren entfernt. Die Narben der emaskulierten Blüten werden sofort oder am Folgetag mit dem Pollen reifer Antheren der Spenderpflanze bestäubt. Die gekreuzten Blüten müssen deutlich markiert werden.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren

Die Alkoholfällung ist eine gebräuchliche Methode um Nukleinsäuren auszufällen und höher zu konzentrieren. Die Nukleinsäure-Lösung wird dazu mit einem einwertigen Salz und Alkohol versetzt. Größere Mengen DNA fallen dadurch spontan aus. Ist die Nukleinsäure-Konzentration in der Lösung jedoch gering, lässt sich die Ausbeute durch einen Inkubationsschritt bei -20°C und die Zugabe von tRNA oder Glykogen erhöhen. Die durch Zentrifugation pelletierte DNA wird anschließend durch Waschen mit 70 % EtOH von Salz und Ethanolresten, sowie anderen wasserlöslichen Substanzen, die im Überstand gelöst bleiben, gereinigt und kann in 1x TE pH 8,0 oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> rückgelöst werden.

Der TE-Puffer enthält EDTA, ein Reagens, das zweiwertige Ionen komplexiert. Die meisten DNasen und andere Enzyme, wie z. B. Polymerasen, benötigen ein zweiwertiges Ion als Kofaktor und werden durch EDTA gehemmt. Deshalb eignet sich 1x TE besonders wenn die DNA für längere Zeit gelagert werden soll.

### 2.2.2.1.1 Ethanolfällung

- Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaAc pH 5,2 zur Nukleinsäure-Lösung.
- Ansatz mit 2 Vol 100 % EtOH versetzen und gut mischen.
- DNA 30 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder üN bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ausfällen.
- Zentrifugation bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für ~20 min.
- Überstand verwerfen und Pellet mit 70 % EtOH waschen.
- Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 10 min.
- Überstand abziehen und Pellet an der Luft für etwa 5 min trocknen lassen.
- Pellet im gewünschten Volumen 1x TE pH 8,0 oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  rüchlösen.

### 2.2.2.1.2 Isopropanolfällung

- Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaAc pH 5,2 zur Nukleinsäure-Lösung.
- Ansatz mit 0,7 Vol Isopropanol versetzen und gut mischen.
- 15 min bei RT inkubieren.
- Bei 14000 rpm und RT für 10 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Pellet mit 70 % EtOH waschen.
- Bei 14000 rpm und RT für 10 min zentrifugieren.
- Überstand abziehen und Pellet an der Luft für etwa 5 min trocknen lassen.
- Pellet im gewünschten Volumen 1x TE pH 8,0 oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  rüchlösen.

## 2.2.2.2 Reinigung von Nukleinsäuren

### 2.2.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Isolierung von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen. Proteine werden durch das organische Lösungsmittel Phenol denaturiert und sammeln sich zwischen beiden Phasen, in der sog. Interphase, an. Nukleinsäuren bleiben dagegen aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst. Mit Hilfe von Chloroform wird die wässrige Lösung im Anschluss von restlichem Phenol befreit.

- Ansatz mit 1 Vol Phenol-Chloroform (1:1) versetzen und vortexen.
- Bei 14000 rpm und RT für 5 min zentrifugieren.
- Die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführen.
- 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugeben und wie oben angegeben verfahren.
- DNA fällen (vgl. 2.2.2.1.1 oder 2.2.2.1.2) und im gewünschten Volumen rüchlösen.

### 2.2.2.2.2 PEG-Fällung

Die Fällung von Nukleinsäuren mit Polyethylenglycol (PEG) ist im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Extraktion weniger giftig, eignet sich auf Grund der geringen Ausbeute aber nur zur Reinigung von großen DNA-Mengen.

- Zugabe von: 1 Vol PEG-Lösung bei Fragmenten >0,4kb und Plasmiden  
2 Vol PEG-Lösung bei Fragmenten <0,4kb
- Lösung invertieren und 1 h bei 50°C oder üN bei 4° C inkubieren.
- 15 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen und das Pellet mit 70 % EtOH waschen.
- 10 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen und das Pellet an der Luft trocknen lassen.
- Pellet im gewünschten Volumen 1x TE pH 8,0 oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> rüchlösen.

### 2.2.2.2.3 GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit

Der GFX™ Kit von Amersham eignet sich vor allem zur Isolierung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten (50 bp bis 10 kb) aus PCR-Ansätzen, Agarosegelen und Restriktionsverdauen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Bei einem Restriktionsverdau werden meist palindromische, vier bis acht Basen lange DNA-Sequenzen (Restriktions-Schnittstellen), von Restriktionsendonukleasen spezifisch als Substrat erkannt und durch Hydrolyse je einer Phosphodiesterbindung in den beiden DNA-Strängen geschnitten.

Analytischer Standardverdau (20 µl Ansatz)

|                  |                                |
|------------------|--------------------------------|
| 0,2-1 µg         | DNA-Lösung                     |
| 2 µl             | 10x Puffer                     |
| (2 µl            | 10x BSA)                       |
| 2-5 U pro µg DNA | Restriktionsenzym              |
| x µl             | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |

Ob 10x BSA benötigt wird und welche Salzkonzentration der zum Einsatz kommende 10x Puffer haben muss, hängt dabei jeweils von dem verwendeten Restriktionsenzym ab. Die Inkubationsdauer sollte mindestens 60 min betragen. Bei größeren, präparativen Ansätzen (>1 µg DNA; 100-200 µl) kann aber auch eine Inkubation über Nacht nötig sein. Die Inkubationstemperatur richtet sich nach den Angaben des Herstellers. In der Regel beträgt sie 37°C. Wenn die DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden soll, wird ein Doppelverdau durchgeführt, falls beide im selben Puffer 100 % Aktivität erreichen. Ansonsten muss vor jedem weiteren Restriktionsverdau ein Fällungsschritt erfolgen. Nach dem Verdau können viele Enzyme durch Hitzeeinwirkung (65°C für 20 min) inaktiviert werden. Falls die DNA nach dem Verdau weiterprozessiert werden soll, ist jedoch eine Reinigung (z. B. durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion vgl. 2.2.2.2.1) empfehlenswert.

### 2.2.2.4 Agarose-Gele zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Größenfraktionierung doppelsträngiger DNA. Agarose ist ein Polysaccharid aus marinen Rotalgen, das sich bei Hitze (100°C) in Elektrophoresepuffer gut lösen lässt und beim Abkühlen ein starres, weitporiges Gel bildet. Die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente wandern, wenn Spannung angelegt wird, in Richtung der positiven Elektrode (Anode) durch das Gel. Ihre Geschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  der Anzahl ihrer Basenpaare. Der Nachweis der DNA erfolgt mittels Ethidiumbromid (EtBr), einer Substanz, die zwischen die Basenpaarstapel der Duplex-DNA interkaliert und unter UV-Lichteinwirkung (312 nm) orange fluoresziert. Die Größe und DNA-Konzentration der Fragmente wird mit Hilfe eines Längenstandards (z. B.  $\lambda$ -HindIII) abgeschätzt. DNA-Banden können aus dem Gel extrahiert (vgl. 2.2.2.2.3) und weiterverwertet werden.

- Agarose einwiegen: 1 % Gele (w/v) für Fragmenten  $\geq 0,4$  kb  
1,2-2,5 % Gele. (w/v) für Fragmente zwischen 0,4 und 0,1 kb
- Das gewünschten Volumen 1x TBE- oder 1x TAE-Laufpuffer zugeben.
- Agarose in der Mikrowelle bei 100°C vollständig lösen (Siedeverzug).
- 5  $\mu$ l EtBr (10 mg/ml) pro 100 ml zugeben.
- Gelschiffchen mit Klebeband abdichten und mit einem Kamm versehen.
- Handwarmes Gel gießen und ca. 30 min erkalten lassen.
- EtBr-Gel in eine mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführen.
- Auftragspuffer 1:10 zu den DNA-Proben pipettieren.
- Proben und einen Längenstandard in die Geltaschen laden.
- Gel bei einer Spannung von  $\sim 100$  V laufen lassen, bis die Bromphenolblau-Lauffront die Gelmitte erreicht hat.

Bestimmung der DNA-Konzentration mit  $\lambda$ -HindIII

Die Größe und DNA-Konzentration der Fragmente wird durch Abschätzen der Intensität der DNA-Banden mit der Intensität des Mengenstandards.

| Fragmentgrößen von $\lambda$ -HindIII [bp] | Prozentsatz an $\lambda$ -HindIII | DNA-Menge für 500 ng $\lambda$ -HindIII [ng] |
|--|-----------------------------------|--|
| 23130                                      | 47,80 %                           | $\sim 240$                                   |
| 9416                                       | 19,50 %                           | $\sim 100$                                   |
| 6557                                       | 13,60 %                           | $\sim 70$                                    |
| 4361                                       | 9 %                               | $\sim 45$                                    |
| 2322                                       | 4,80 %                            | $\sim 25$                                    |
| 2027                                       | 4,20 %                            | $\sim 20$                                    |
| 564  | 1,20 %                            | $\sim 5$                                     |

Tab. 8: Konzentrationsbestimmung mit  $\lambda$ -HindIII

### 2.2.2.5 PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der enzymatischen in vitro Amplifikation eines DNA-Fragments bis zu Größen von 6000 und mehr Basen. Zwei Oligodesoxynukleotide werden als Primer zusammen mit dem zu amplifizierenden Gensegment (Template) und den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) in einer repetitiven, synthetischen Reaktion eingesetzt. Diese wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase katalysiert.

#### 5´-3´-Polymerasen

Die *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase ermöglicht eine effiziente Amplifikation bis zu einer Fragmentlänge von ca. 4 kb mit einer Fehlerrate von  $2,4 \times 10^{-5}$ . Ihre Prozessivität liegt bei 1000 bp/min, was auf die fehlende 3´-5´ Exonukleaseaktivität zurückzuführen ist. Durch die Transferase Aktivität der *Taq* Polymerase werden zusätzliche Adenosin Nukleotide am 3´-Ende des PCR-Produkts anhängt. Dies ermöglicht das schnelle Klonieren in einen Vektor mit Poly-T Überhang.

Wenn Gene kloniert und exprimiert, oder sequenziert werden sollen, ist eine Polymerase mit geringer Fehlerrate geeigneter. Die ProofStart DNA Polymerase hat eine mehr als 10x niedrigere Fehlerrate ( $0,4 \times 10^{-5}$ ) als die *Taq* Polymerase. Sie wurde ursprünglich aus *Pyrococcus species* (*Psp*) isoliert und verfügt über eine 3´-5´ Exonukleaseaktivität. Allerdings liegt ihre Prozessivität bei nur 500 bp/min und sie erzeugt glatte Enden („blunt ends“), was eine Klonierung der Fragmente erschwert.

#### MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub>

Die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration kann die Spezifität und Ausbeute der PCR erheblich beeinflussen. Die Ionen bilden einen löslichen Komplex mit freien dNTPs. Hierdurch werden der dNTP- Einbau und die Polymeraseaktivität gesteigert. Die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration kann von PCR zu PCR verschieden sein. Ist sie zu niedrig, so sinkt die Ausbeute. Wenn Mg<sup>2+</sup> dagegen im Überschuss vorhanden ist, werden unspezifische PCR-Produkte amplifiziert. Ob MgCl<sub>2</sub> oder MgSO<sub>4</sub> verwendet wird hängt von der DNA-Polymerase ab.

| Polymerase       | <i>Taq</i>        | <i>Psp</i>        |
|------------------|-------------------|-------------------|
| Salz             | MgCl <sub>2</sub> | MgSO <sub>4</sub> |
| Endkonzentration | 1-4 mM            | 1-10 mM           |

Tab. 9: Optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration für die *Taq*- bzw. *Psp*-Polymerase

#### PCR-Primer

Die Länge der Primer sollte zwischen 12-50 Basen liegen. Sie dürfen intern keine zueinander komplementären Sequenzen aufweisen, denn diese bilden Sekundärstrukturen (Hairpin) aus und verhindern damit die Amplifikation des Templates. Sollen zusätzliche Nukleotide (z. B. für die Insertion einer Restriktionsschnittstelle) eingefügt werden, so werden an das 5´-Ende des Primers bis zu 9 zusätzliche Nukleotide angefügt. Bei der Berechnung des T<sub>m</sub>-Wertes werden diese nicht verrechnet.

**Standard PCR-Ansatz**

| Komponenten                    | Ausgangskonzentration der Arbeitslösung   | Endkonzentration im Ansatz  | Beispiel (50 µl Ansatz) |
|--------------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|
| Mg <sup>2+</sup>               | 10-40 mM (norm. 25 mM)                    | 1-4 mM (norm. 2,5 mM)       | 5 µl                    |
| PCR-Puffer                     | 10x                                       | 1x                          | 5 µl                    |
| dNTPs                          | 2-2,5 mM (je dNTP)                        | 0,2-0,25 mM (je dNTP)       | 5 µl                    |
| Primer Forward                 | 10 µM                                     | 1 µM                        | 5 µl                    |
| Primer Reverse                 | 10 µM                                     | 1 µM                        | 5 µl                    |
| Template-DNA                   | genomische DNA<br>Plasmid<br>PCR-Fragment | >100 ng<br>~40 ng<br>~20 ng | variabel                |
| Taq-Polymerase                 | 5 U/µl                                    | 5-10 U pro µg DNA           | 0,2 µl                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |   |                             | variabel                |

Tab. 10: Konzentrationsangaben für einen Standard PCR-Ansatz. Der PCR-Puffer kann (je nach Hersteller) bereits eine ausreichende Menge Mg<sup>2+</sup> enthalten.

**ProofStart PCR-Ansatz**

| Komponenten                    | Ausgangskonzentration der Arbeitslösung   | Endkonzentration im Ansatz                         | Beispiel (50 µl Ansatz) |
|--------------------------------|---|--|-------------------------|
| ProofStart PCR Puffer*         | 10x                                       | 1x   | 5 µl                    |
| dNTPs                          | 10 mM (je dNTP)                           | 300 µM (je dNTP)                                   | 1,5 µl                  |
| Primer Forward                 | 10 µM                                     | 1 µM   | 5 µl                    |
| Primer Reverse                 | 10 µM                                     | 1 µM   | 5 µl                    |
| Template-DNA                   | genomische DNA<br>Plasmid<br>PCR-Fragment | 100 -1000 ng<br>1-50 ng<br>1-50 ng                 | variabel                |
| ProofStart DNA Polymerase      | 2,5 U/µl                                  | 2,5 U<br>(Template <2kb)<br>5 U<br>(Template >2kb) | 1 µl<br>2 µl            |
| H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |   |  | variabel                |

Tab. 11: Konzentrationsangaben für einen Standard PCR-Ansatz.\* Enthält 15 mM MgSO<sub>4</sub> (Die Endkonzentration kann bei Bedarf mit 25 mM MgSO<sub>4</sub> auf max. 10 mM erhöht werden).

**Programmierung des Thermocyclers**

Damit der PCR-Ansatz nicht am Deckel des Eppendorfgefäßes kondensiert wird ein PCR-Block verwendet, der (wie z. B. der UNO Thermoblock oder der TGradient-Cycler von Biometra) mit einem Heizdeckel ausgestattet ist.

Berechnung von Schmelz- und Annealingtemperatur ( $T_m$  und  $T_a$ ) der Primer

Die  $T_m$  kann für Primer mit einer Länge um 20 Basen z. B. näherungsweise aus ihrem GC-Gehalt berechnet werden:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl (G)} + \text{Anzahl (C)}) + 2 \times (\text{Anzahl (A)} + \text{Anzahl (T)})$$

Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) wird hierbei 5-10°C unter der Schmelztemperatur angesetzt. Für die Berechnung der Schmelz- und Annealingtemperatur existieren auch

noch deutlich komplexere Gleichungen (Baldino et al.; 1989 und Rychlik et al.; 1990), die auch auf Primer von bis zu 100 Basen angewendet werden können. Mit ihrer Hilfe erstellen Programme, wie z. B. Vector NTI, Primerpaare. Die Schmelztemperatur der resultierenden Oligonucleotide wird dabei normalerweise ebenfalls angegeben.

### PCR-Programm

Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Syntheseschritt, und führt zur Verdoppelung der Zahl der Template-DNAs.

|                   |  |  |
|-------------------|--|--|
| 5 min             | 95°C   | Vollst. Denaturierung der Template-DNA   |
| 25-45 Zyklen:     |  |  |
| 30 sec            | 95°C   | Denaturierung                            |
| 30 sec            | 50-65°C  | Annealing                                |
| 1 min/kb Template | 68°C (Template >1 kb)<br>72°C (Template <1 kb) | Synthese                                 |
| 5 min             | 68°C (Template >1 kb)<br>72°C (Template <1 kb) | Vervollständigung begonnener DNA-Stränge |
| 5-15 min          | 4°C  | Kühlung                                  |

Tab. 12: Standard PCR-Programm.

|   |         |   |
|---|---------|---|
| 5 min   | 95°C    | Aktivierung der ProofStart DNA Polymerase |
| 35-45 Zyklen (in Abhängigkeit von der Menge an Template DNA): |         |   |
| 30 sec  | 94°C    | Denaturierung                             |
| 30 sec  | 50-65°C | Annealing                                 |
| 1 min/kb Template (Template <2kb)                             | 72°C    | Synthese                                  |
| 2 min/kb Template (Template >2kb)                             |         |   |
| 5 min   | 72°C    | Vervollständigung begonnener DNA-Stränge  |
| 5-15 min  | 4°C     | Kühlung                                   |

Tab. 13: ProofStart PCR-Programm.

## 2.2.2.6 Sequenzierung

### 2.2.2.6.1 Standard-Sequenzierung

Plasmide für die DNA-Sequenzierung wurden zuvor mittels PEG-Fällung gereinigt (vgl. 2.2.2.2.2). PCR-Produkte wurden mittels GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (vgl. 2.2.2.2.3) aufgereinigt. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde 1 µg, für die Sequenzierung von PCR-Produkten 20 ng/100bp DNA luftgetrocknet und eingeschickt (Eurofins MWG Operon: [www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com)).

### 2.2.2.6.2 Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung unterscheidet sich erheblich von der Sanger-Sequenzierung, da hier weder markierte Nukleotide noch Didesoxynukleotide eingebaut werden. Die Pyrosequenzierung ist ein Verfahren, das eine Analyse von Einzelbasen-Polymorphismen mit bis zu 4500 Proben am Tag erlaubt. Da sich das Lichtsignal gut quantifizieren lässt, kann man Allelhäufigkeiten bestimmen, indem man die zu untersuchenden Proben poolt und am Ende aus der Höhe des Signalpeaks die Häufigkeit der beiden erwarteten Allele bestimmt.

#### 2.2.2.6.2.1 Die Methode

##### PCR

Zunächst wird mittels PCR aus der zu untersuchenden DNA eine Region amplifiziert, die z. B. einen SNP enthält, wobei einer der beiden verwendeten Primer am 5'-Ende mit Biotin markiert sein muss. Das DNA-Fragment wird anschließend an streptavidin-gekoppelte Kügelchen aus Sepharose gebunden. Der nicht mit Biotin markierte Strang wird durch die Behandlung mit NaOH von dem biotinylierten Strang getrennt, der selbst weiter an die Kügelchen gebunden ist. Dabei bleibt ein einzelsträngiges Template zurück. Anschließend wird in einem Waschschrift der pH neutralisiert und die Streptavidin Kügelchen mit der gebundenen DNA in eine PSQ 96 Platte mit Puffer und Sequenzierprimer überführt.

##### Sequenzierung

- 1) Der Sequenzierprimer hybridisiert an das einzelsträngige Template und inkubiert zusammen mit dem Enzymmix (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase) und dem Substratmix (Adenosin-5'-phosphosulfat und Luciferin).
- 2) Das erste der vier dNTPs wird der Reaktion zugefügt. Ist das zugegebene dNTP komplementär zur nächsten Base des Templates, wird es von der DNA-Polymerase eingebaut. Dabei werden so viele Moleküle Pyrophosphat (PPi) freigesetzt wie sie der Anzahl der eingebauten Nukleotide entsprechen.
- 3) Die ATP-Sulfurylase synthetisiert aus PPi und APS ein Molekül ATP, das dann in einer weiteren Reaktion von der Luciferase zusammen mit Luciferin in Licht und Oxyluciferin umgewandelt wird. Die Lichtproduktion ist proportional zur ATP-Menge und wird mittels CCD-Kamera erfasst, quantifiziert, ausgewertet und in Form von Signalpeaks in einem Pyrogramm dargestellt. Sollten zwei oder drei gleiche Nukleotide im Template aufeinander folgen, dann werden in einer Runde mehrere Nukleotide eingebaut und die Lichtproduktion fällt doppelt bzw. dreimal so hoch aus. Die Höhe des Peaks (Lichtsignal) ist damit proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.
- 4) Um überschüssige dNTPs zu entfernen und die Reaktion schnell zu beenden, werden die dNTPs von der Apyrase zu dNDP und Phosphat abgebaut. Auch das ATP wird zu ADP und Phosphat zersetzt. Die Lichtproduktion wird gestoppt und das nächste dNTP hinzugefügt.

Im weiteren Verlauf wird ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert und die Nukleotidsequenz von den Signalpeaks im Pyrogramm bestimmt.

### 2.2.2.6.2.2 PSQ™96MA Software

Zunächst werden mit Hilfe der PSQ™96MA Software die spezifischen Einstellungen für jeden PSQ-Lauf vorgenommen. Dabei errechnet die Software die Volumina der Reagenzien (Enzym, Substrat, Nukleotide), mit der die RC befüllt werden müssen. Alle Schritte erfolgen gemäß dem PSQ™96MA Instrument Reference Manual.

### 2.2.2.6.2.3 PCR

Zur Herstellung des Templates für das Pyrosequencing werden die unter Punkt 2.1.4 aufgelisteten Primer sowie die zu den SNP-Primerpaaren zugehörigen PCR-Programme (vgl. Tab. 12 und 13) verwendet. Jeweils ein Primer ist dabei 5'-biotinyliert der andere ist nicht markiert. Als Template dienen je 5 ng/µl DNA der rekombinanten Linien.

Zur Kontrolle werden je 5 µl der Proben auf 1 % Agarose aufgetrennt.

### Vorbereitungen

- alle Reagenzien auf RT bringen.
- Sequenzier-Primer (vgl. 2.1.4, Tab. 3) und Proben auftauen.
- PSQ™96MA Reagent Kit: Enzym und Substrat in je 620 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen.
- NTPs schütteln und abzentrifugieren.

Schalen des Vacuum Prep Tools (VPT) befüllen:

| Anzahl der Schalen | Reagenz                        | Volumen (ml) |
|--------------------|--------------------------------|--------------|
| 2                  | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> | 180          |
| 1                  | 70 % Ethanol                   | 180          |
| 1                  | Denaturation solution          | 120          |
| 1                  | Washing Buffer                 | 180          |

Anordnung des VPT:

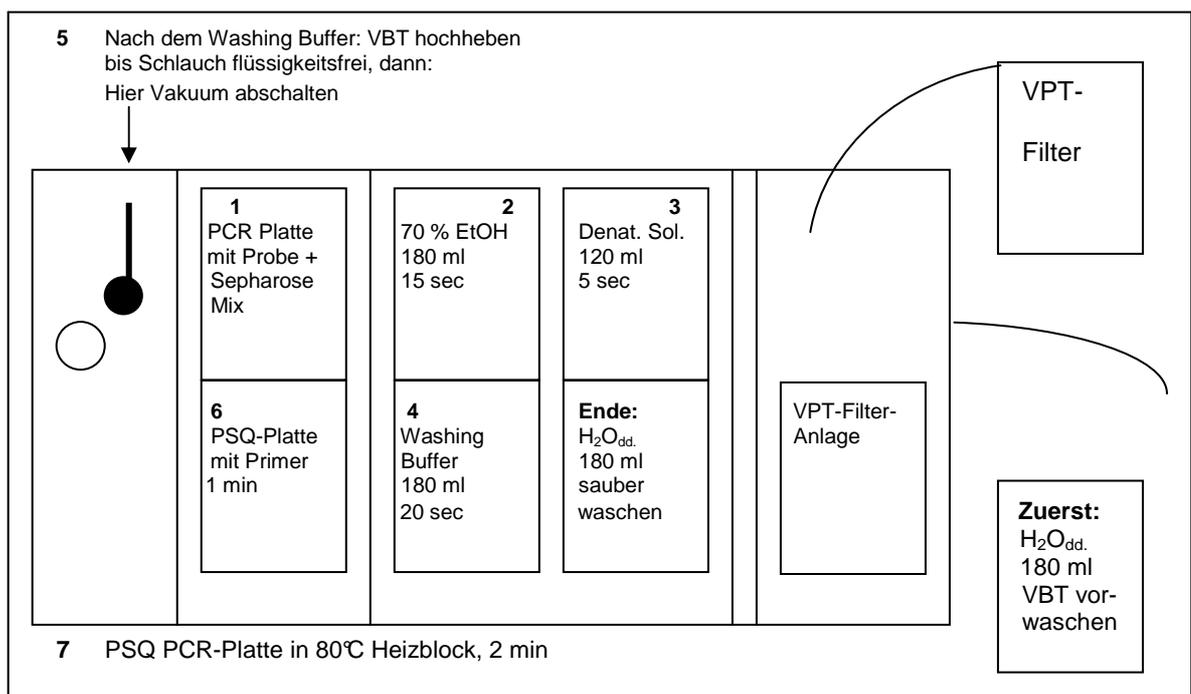


Abb. 3: Schematische Darstellung des VPT und Ablauf der Probenvorbereitung.

### Proben und PCR-Platte

- je 40 µl PCR Produkt in eine normale PCR-Platte pipettieren.
- je Probe 3 µl Sepharose Beads mit 37 µl Bindingpuffer mischen. Die Herstellung eines Mastermix ist möglich. Der Mix mit Sepharose Beads darf nicht abzentrifugiert werden! Beads müssen in der Lösung immer gut verteilt sein!
- je Probe 40 µl Beads/Binding Puffer Mischung zugeben und Platte mit Easy Peel Folie verschweißen.
- Platte mit Hilfe eines Eisblocks kurz abkühlen.
- Platte mind. 5 min auf dem Schüttler vortexen.
- vor Verwendung die Platte kurz auf höchster Stufe vortexen.

### Primer und PSQ 96 Platte

- Herstellung des Primer-Binding Buffer-Mixes

| Reagenz           | Ausgangskonz. | Volumen (µl) | Endkonz. |
|-------------------|---------------|--------------|----------|
| Primer            | 10 µM         | 1,2          | 0,3 µM   |
| Annealing Buffer  | 1 x           | 38,8         | ~ 1 x    |
| Gesamt (je Probe) |               | 40,0         |          |

- Mastermix mischen und abzentrifugieren.
- für jede Probe 40 µl des Mixes in ein Well einer PSQ Platte pipettieren.

### Abtrennung der Einzelstränge

- Waschen des VPT:  
Vakuum des VPT einschalten und zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen. Schalen erneut mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> befüllen.
- Aufnehmen der Proben:  
Das VPT in die PCR Platte mit den Proben eintauchen und kreisförmig bewegen bis die Proben vollständig abgesaugt sind. Das Absaugen der Proben muss innerhalb von 3 min nach Anhalten des Schüttlers geschehen, da sonst die Beads zu Boden sinken!
- Waschen:  
Das VPT für 15 sec in 70 % Ethanol eintauchen.
- Denaturieren:  
Das VBT für 5 sec in die „Denaturation solution“ eintauchen
- Waschen:  
Das VBT für 20 sec in den Washing Buffer eintauchen
- Abtropfen:  
Das VPT um 90°C senkrecht drehen und die Flüssigkeit abtropfen lassen.
- Ablösen der Proben:  
Vakuum abschalten! Das VPT in die vorbereitete PSQ PCR-Platte mit dem Primer-Binding Buffer-Mix tauchen und mit kreisförmigen Bewegungen die Beads lösen (ca. 1 min). Das VPT dabei nicht abstellen!
- Abschließende Reinigung des VPT:  
Vakuum wieder einschalten und das VPT zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen.

### Primer Anlagerung

- Die PCR-Platte mit dem PSQ Thermoelement im Thermoblock für 2 min bei 80°C denaturieren.
- Platte aus dem Thermoblock nehmen und Proben auf RT abkühlen lassen.

### Befüllen der Reagenz Kartusche

- Die Liste mit den vom PSQ™96MA Programm errechneten Volumina der Reagenzien vorbereiten.
- Die RC so auf den Tisch stellen, dass das Etikett sichtbar ist und befüllen

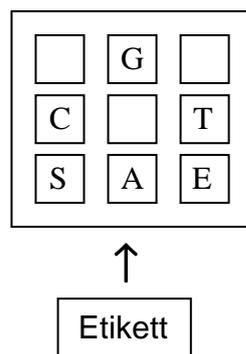


Abb. 4: Darstellung zur Befüllung der Reagenz Kartusche. Die Buchstaben in den einzelnen Kompartimenten entsprechen den Nukleotiden G (Guanin), C (Cytosin), T (Thymin), A (Adenin) sowie dem Substrat (S) und dem Enzym (E).

### Befüllen des Pyrosequencers

- PSQ Platte und befüllte RC in die dafür vorgesehenen Halterungen im Pyrosequenzer einsetzen.
- Lauf starten.

### Reinigen der Kartusche nach Gebrauch

- Restliche Lösungen ausleeren.
- RC viermal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ausspülen und auch die Nadeln abspritzen.
- Die Kompartimente vollständig mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> füllen. Durch Pressen mit dem Finger auf das gefüllte Kompartiment einen Strahl aus der Nadel drücken.
- Wasser abgießen und abschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ausspülen.
- RC seitlich auf fusselfreiem Papier trocknen lassen. Den Deckel erst nach dem Trocknen aufsetzen.
- RC staubfrei lagern.

### 2.2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Klonierung wird die Integration eines Gens oder DNA-Fragments in einen Klonierungs- bzw. Expressionsvektor sowie die nachfolgende Vermehrung und Expression dieser rekombinanten DNA in einem geeigneten Wirtssystem bezeichnet.

### 2.2.2.7.1 Gateway™-Klonierung

Es wurde das von Invitrogen vertriebene Gateway-Klonierungssystem verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Gateway-Klonierung basiert auf einem sequenzspezifischen Rekombinasesystem des Bakteriophagen  $\lambda$ , das eine Integration von Lambda in das Chromosom von *E. coli* ermöglicht. Dazu werden vier Erkennungssequenzen verwendet, die auf spezifische Weise miteinander rekombiniert werden ( $attB \times attP \leftrightarrow attL \times attR$ ). Zunächst müssen zur Amplifikation des Gens von Interesse Primer verwendet werden, welche die notwendigen *attB*-Sequenzen enthalten. Dadurch wird mittels Rekombination eine Integration in den mit den *attP*-Sequenzen enthaltenen Donor Vektor ermöglicht. Das Resistenzgen *ccdB* wird dabei gegen das PCR-Produkt ausgetauscht (BP-Reaktion, Abb. 5). Durch dieses „Killergen“ wird eine Selektion positiver Klone ermöglicht bevor das eigentliche Expressionskonstrukt hergestellt wird. Bakterien, die das Konstrukt nach der Transformation nicht aufgenommen haben, sind auf Selektionsmedium nicht lebensfähig. Nach einer erfolgreichen BP-Reaktion entsteht ein Entry Clone, der das mit *attL*-Sequenzen flankierende Gen enthält. Bei der Erzeugung des Expression Clones rekombinieren diese Sequenzen mit den *attR*-Sequenzen des Destination Vektors, der ebenfalls das *ccdB*-Gen enthält (LR-Reaktion, Abb. 6). Sowohl At4g31820 als auch At2g23050 wurden mit diesem System zunächst in pDONR 207 subkloniert und anschließend jeweils in die Destination Vektoren pEarlyGate 101 und pEarlyGate102 eingebracht.

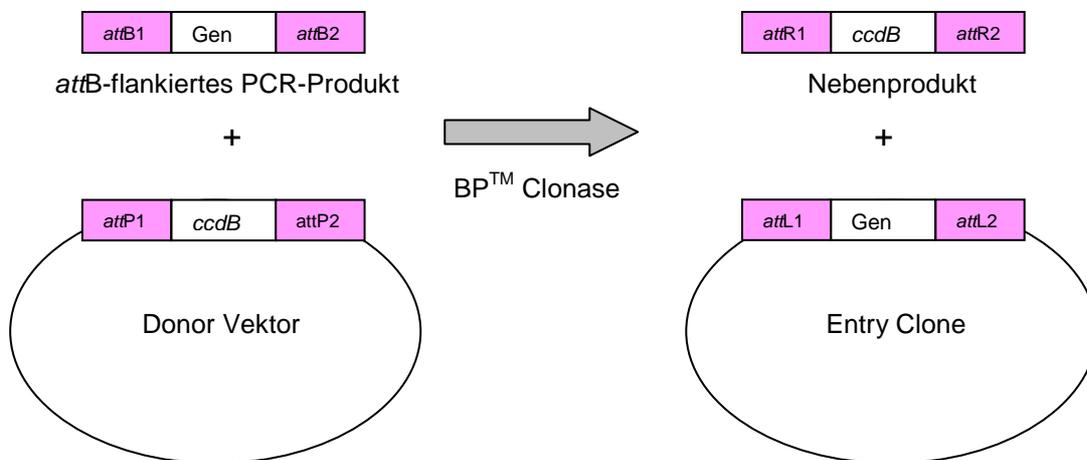


Abb. 5: BP-Reaktion der Gateway-Klonierung

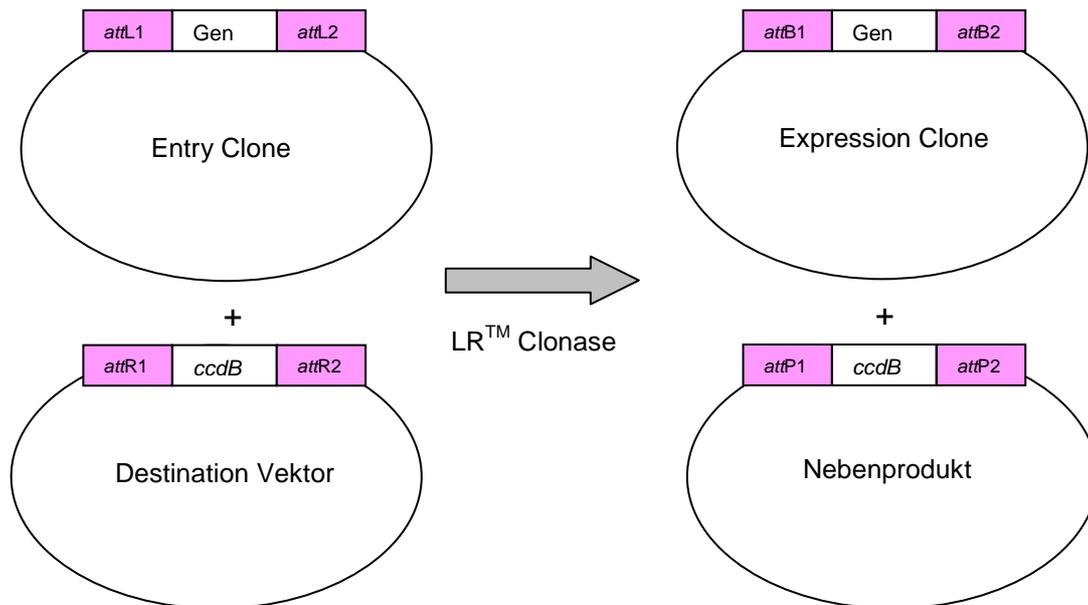


Abb. 6: LR-Reaktion der Gateway-Klonierung

#### Reinigung PCR-amplifizierter *attB*-Fragmente

In diesem Schritt werden die *attB* Primer und *attB* Primer-Dimere entfernt. Sie können sehr effizient mit dem Donor-Vektor in der BP-Reaktion rekombinieren und den Hintergrund nach der Transformation in *E. coli* erhöhen. Eine Reinigung mit Phenol/Chloroform mit anschließender Alkoholfällung ist nicht empfehlenswert, da Fragmente größer als 100 bp nicht entfernt werden. Das PCR-Produkt wird mit PEG gereinigt.

- Zugabe von 150 µl TE pH 8,0 zu 50 µl *attB*-PCR-Produkt.
- Zugabe von 100 µl 30 % PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub>, vortexen.
- Zentrifugation bei 10000 g für mind. 15 min bei RT.
- Überstand entfernen.
- Pellet in 50 µl TE pH 8,0 lösen (Konzentration > 10 ng/µl)
- Qualitätskontrolle durch Agarosegelelektrophorese:
  - Negativ → Reinigung mittels GelBand purification Kit
  - Positiv → BP-Reaktion

#### BP-Reaktion

Dabei wird das *attB*-PCR-Produkt in einen Donor-Vektor mit *attP*-Sequenzen transferiert, wodurch ein Entry Clone gebildet wird. Die dazu benötigte BP-Clonase zeigt die beste Effizienz bei linearen *attB*-flankierten Fragmenten und bei supercoiled *attP*-tragenden Vektoren.

## Berechnung der DNA-Konzentration

$$ng = (fmol)(N) \left( \frac{660 fg}{fmol} \right) \left( \frac{1ng}{10^6 fg} \right) \quad N = \text{Größe der DNA (bp)}$$

**Beispiel:**

Konzentration des Vektors: 50 fmol, Größe der DNA: 1446 bp

$$\Rightarrow (50 fmol)(1446 bp) \left( \frac{660 fg}{fmol} \right) \left( \frac{1ng}{10^6 fg} \right) = 47,7ng$$

## Regeln für die BP-Reaktion

1. *attB*-PCR Produkt und Donor Vektor müssen equimolar sein (Empfehlung: 50 fmol, *attB*-PCR Produkt auch 20-50 fmol möglich)
2. Ist das PCR-Produkt > 4 kb müssen mind. 50 fmol aber nicht mehr als 250 ng eingesetzt werden
3. In einem 10 µl Ansatz nicht mehr als 250 ng Donor Vektor und nicht mehr als 0,5 µg Gesamt-DNA einsetzen

Mix mit folgenden Komponenten herstellen

| Komponente                 | Volumen (µl)<br>pro Reaktion |
|----------------------------|------------------------------|
| <i>attB</i> -PCR (50 fmol) | 1 - 7                        |
| pDONR207 (150 ng/µl)       | 1                            |
| TE pH 8,0                  | 0 – 6                        |
| Gesamtvolumen              | 8                            |

Tab. 14: BP-Reaktionsmix

- BP Clonase™ 2 min auf Eis auftauen.
- 2x je 2 sec vortexen.
- Zugabe von 2 µl BP Clonase™ zum BP-Reaktionsmix.
- 2x je 2 sec vortexen.
- Inkubation für 1 h bei RT.
- Zugabe von 1 µl Proteinase K-Lösung zum Stoppen der Reaktion.
- Inkubation bei 37°C für 10 min.
- Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (vgl. 2.2.2.7.3) oder Lagerung bei -20°C für max. 1 Woche.

LR-Reaktion

Dabei wird das Gen von Interesse, das durch die BP-Reaktion jetzt von *attL*-Sequenzen flankiert ist, in einen Destination Vektor mit *attR*-Sequenzen transferiert, wodurch ein Expression Clone gebildet wird.

Mix mit folgenden Komponenten herstellen

| Komponente                  | Volumen (µl)<br>pro Reaktion |
|-----------------------------|------------------------------|
| Entry Clone (150 ng)        | 1 - 7                        |
| Destination Vektor (150 ng) | 1                            |
| TE pH 8,0                   | 0 - 6                        |
| Gesamtvolumen               | 8                            |

Tab. 15: LR-Reaktionsmix

- LR Clonase™ 2 min auf Eis auftauen.
- 2x je 2 sec vortexen.
- Zugabe von 2 µl LR Clonase™ zum LR-Reaktionsmix.
- 2x je 2 sec vortexen.
- Inkubation für 1 h bei RT.
- Zugabe von 1 µl Proteinase K-Lösung zum Stoppen der Reaktion.
- Inkubation bei 37°C für 10 min.
- Transformation in elektrokompetente *E. coli* (vgl. 2.2.2.7.4) oder Lagerung bei -20°C für max. 1 Woche.

## 2.2.2.7.2 Herstellung kompetenter Zellen

### 2.2.2.7.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen nach der RbCl Methode

Eine Möglichkeit Bakterien mit Hilfe von Chemikalien transformationskompetent zu machen ist die RbCl-Methode. Die Kompetenz der Bakterien wird in der Anzahl an Kolonien je µg Test-DNA angegeben. Als Test-DNA wird üblicher Weise ein Vektor wie pBR322 verwendet.

- 5 ml YB-Medium mit Einzelkolonie animpfen und üN bei 37°C und 140 rpm bebrüten.
- 100 ml YB-Medium mit 5 ml üN-Kultur animpfen.
- Zellen bis zu einer OD<sub>550</sub> von <0,5 bei 37°C und 140 rpm (für ca. 2 h) anzieh en.
- Bakterien (2x 50 ml) für 15 min bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugieren.
- Zellpellets auf Eis stellen und in je 15 ml eiskalter TFB1-Lösung suspendieren.
- 15 min auf Eis inkubieren und danach bei 4000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugieren.
- Pellets vorsichtig in je 1,8 ml TBF2 rücklösen.
- 100 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern.

### 2.2.2.7.2.2 Herstellung elektrokompeterer *E. coli* Zellen (Easy Pore)

Elektrokompeterer Zellen sind toleranter gegenüber großen DNA-Mengen (≥1 µg), bei denen sich chemisch kompetente Zellen häufig nur noch sehr schlecht transformieren lassen.

- 20 ml dYT-Medium (mit Selektions-Antibiotikum, z. B. Tetracyclin für XL-1 Blue Zellen) mit einer Einzelkolonie animpfen und bei 37°C und 120 rpm üN inkubieren.
- Vorkultur 1:100 mit frischem dYT-Medium verdünnen (1 l Endvolumen).
- Kultur bei 37°C und 120 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (ca. 2 h) anziehen.
- Kultur auf vier 250 ml Zentrifugierbehälter aufteilen.
- 30 min auf Eis unter zeitweiligem Schwenken abkühlen lassen.
- Für 15 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugieren und das Medium komplett abnehmen.
- Pellets vorsichtig in je 100 ml eiskalter Glycerinlösung (10 %, v/v) resuspendieren und erneut abzentrifugieren. Vorgang zwei Mal wiederholen.
- Pellets vorsichtig in 10 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendieren und vereinigen.
- Für 15 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Pellet in 2 ml eiskalter Glycerinlösung rücklösen.
- 50 µl Aliquote schockgefrieren und bei -70°C lagern, oder sofort verwenden.

#### 2.2.2.7.2.3 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

- 200 ml YEB-Medium (35 µg/ml Rif) mit Agrobakterien (GV3101) animpfen und üN bei 30°C inkubieren.
- Kultur in 50 ml Falcons aufteilen und bei 4500 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugieren.
- Pellets mit 45 ml eiskalter Glycerinlösung (10 %, v/v) waschen.
- Je 2 Pellets in insg. 45 ml eiskalter Glycerinlösung rücklösen und abzentrifugieren.
- Die verbleibenden 2 Pellets in insg. 20 ml eiskalter Glycerinlösung rücklösen.
- Zellen abzentrifugieren und mit 4 ml eiskalter Glycerinlösung waschen.
- Agrobakterien in 2 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendieren.
- 100 µl Aliquote sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern.

#### 2.2.2.7.3 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

- Aliquot kompetenter Zellen (XL-1 Blue, Gateway BP-Reaktion: One Shot® OmniMAX™ 2-T1<sup>R</sup>) auf Eis auftauen.
- 50-100 ng Plasmid-DNA (max. 10 µl, Gateway BP-Reaktion: 1 µl BP-Reaktion) zugeben und vorsichtig mischen.
- 20-30 min auf Eis inkubieren.
- 2-minütiger Hitzeschock (Gateway: 30 sec) bei 42°C im Wasserbad. Ansatz danach sofort auf Eis stellen.
- 0,9 ml LB- oder dYT-Medium (Gateway: 250 µl SOC-Medium) zugeben und für 60 min bei 37°C im Roller inkubieren.
- 100 µl (Gateway: 1:10 Verdünnung → 20 µl und 100 µl) auf einer LB- oder dYT-Platte mit Selektionsantibiotikum ausplattieren.
- Inkubation üN bei 37°C im Brutschrank.

#### 2.2.2.7.4 Elektroporation

- 50 µl Aliquot (Gateway LR-Reaktion: 25 µl NEB 10-beta) elektrokompetenter *E. coli* Zellen (vgl. 2.2.2.7.2.2) auf Eis auftauen.
- Mit ~100 ng Plasmid-DNA in H<sub>2</sub>O (Gateway LR-Reaktion: 1 µl LR-Reaktion) vorsichtig mischen und 2 min auf Eis inkubieren.
- In vorgekühlte Elektroporationsküvette (BIO-RAD, 0,2 cm) überführen.
- Küvette auf einem „BIO-RAD Gene Pulser“ Schlitten platzieren.
- Elektroporationsbedingungen: 25 µF („BIO-RAD Gene Pulser“), 200 Ω („Pulse Controller“) und 2,5 kV (elektrischer Impuls) für 4-5 ms (Zeitkonstante; wird automatisch eingestellt).
- Spannung anlegen bis ein surrendes Signal ertönt.
- Sofort nach dem Impuls 1 ml (Gateway LR-Reaktion: 970 µl) SOC-Medium zugeben.
- Ansatz in ein vorgekühltes Reagenzglas überführen und 30-120 min bei 37°C inkubieren.
- ≤10 % des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattieren und üN bei 37°C inkubieren.

Für die Elektroporation von Agrobakterien werden pro 100 µl Aliquot kompetenter Zellen (GV3101, vgl. 2.2.2.7.2.3) 30-50 ng DNA (max. 10 µl) eingesetzt. Nach der Elektroporation (25 µF, 400 Ω und 2,5 kV für 4-5 ms) wird, an Stelle von SOC-Medium, vorgekühltes YEB-Medium zugegeben. Man inkubiert die Agrobakterien bei 28°C für 2-3 h im Roller und plattiert anschließend max. 50 µl auf YEB-Festmedium (mit 35 µg/ml Rif und dem für das jeweilige Plasmid benötigten Antibiotikum) aus. Die Petrischale wird für mind. 2 Tage bei 28°C inkubiert.

#### 2.2.2.8 Methoden für die Präparation von Nukleinsäuren

##### 2.2.2.8.1 Plasmid-DNA Präparation (Mini- bzw. Midi-Präp)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Lösung I enthält Glucose als Osmotikum und EDTA zur Inhibierung von DNasen. Falls Lysozym zugefügt wurde zersetzt es die Membran der Bakterienzellen bereits stellenweise. Lösung II verursacht auf Grund ihres SDS-Gehalts die Denaturierung von Proteinen und damit die Auflösung der Zellmembran. Das Natriumacetat in Lösung III bewirkt dass der Protein-SDS-Komplex ausgefällt und das Zellpellet abzentrifugiert werden kann. Verbleibende Proteine und Saccharide werden später mit Lithiumchlorid gefällt.

- 1,5 ml bzw. 50 ml üN-Kultur in ein Eppendorfgefäß bzw. Falcon überführen.
- 5 min bei 4°C und 14000 rpm bzw. 4500 rpm abzentrifugieren.
- Medium komplett abnehmen.
- Pellet in 100 µl bzw. 1,5 ml Lösung I (4°C) rücklösen (vortexen) und 5-10 min auf Eis stellen.
- 200 µl bzw. 3 ml Lösung II zugeben.
- Durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig mischen und 5-10 min auf Eis inkubieren.
- 150 µl bzw. 2,25 ml Lösung III (4°C) zugeben.

- Mehrfach invertieren und für 10 min auf Eis neutralisieren.
- Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 bzw. 20 min
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß bzw. Zentrifugenröhrchen überführen.
- Mit 0,7 Vol Isopropanol fällen (vgl. 2.2.2.1.2; der 70 % EtOH Schritt ist unnötig).
- Pellet in 100 µl bzw. 0,8 ml 1x TE pH 8,0 lösen.
- 1 Vol 5 M LiCl (4°C) zugeben, invertieren und für 10 min auf Eis inkubieren.
- 10 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Überstand mit 1 Vol Isopropanol fällen (vgl. 2.2.2.1.2).

Nach der Plasmid Präparation wird die ebenfalls isolierte, störende gesamt RNA durch einen RNase A Verdau entfernt.

- 10-40 µg Rnase A (Stammlösung 10 mg/ml) pro ml DNA-Lösung zugeben.
- Für mind. 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren.

Da die RNase durch Hitzeeinwirkung nicht inaktiviert werden kann, muss sie (vor allem im Fall der Plasmid Midi-Präp) mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion (vgl. 2.2.2.2.1) wieder entfernt werden.

#### **2.2.2.8.2 Präparation genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe wird CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) verwendet. Das kationische Tensid komplexiert störende Polysaccharide und Proteine.

- Pflanzengewebe in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführen.
- 2 Edelstahl Kügelchen zugeben und in flüssigem Stickstoff tiefgefrieren.
- Pflanzenmaterial mit Hilfe der Kugelmühle (Retsch) homogenisieren.
- Umgehend 200 µl 2x CTAB-Puffer zugeben.
- Ansatz kurz vortexen und anschließend für mind. 30 min bei 65°C inkubieren.
- 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und 15 sec vortexen.
- 5 min abzentrifugieren und ~150 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues Gefäß überführen. Die Interphase darf nicht mit abpipettiert werden.
- 5 µl Glykogen-Lösung. (1 µg/µl) als „carrier“ zugeben (optional) und eine Isopropanol-fällung (vgl. 2.2.2.1.2) durchführen.

Nach der Isolierung der genomischen DNA kann die ebenfalls isolierte, störende gesamt RNA durch einen RNase A Verdau entfernt werden (vgl. 2.2.2.8.1).

#### **2.2.2.9 Pflanzentransformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens***

##### **2.2.2.9.1 Plasmid-Midi Präparation aus Agrobakterien**

Das Isolieren dieses Materials diente zur Kontrolle von Konstrukten, nachdem sie in Agrobakterien transformiert wurden.

10 ml YEB-Medium (mit 35 µg/ml Rif und dem für das jeweilige Plasmid benötigten Antibiotikum) werden mit einer Einzelkolonie transformierter Agrobakterien (vgl. 2.2.2.7.4) angeimpft und im Reagenzglas bei 28°C für 2-3 Tage im Roller inkubiert.

- 2x 2 ml der Kultur bei 14000 rpm für 1 min in Eppendorfgefäßen abzentrifugieren.
- Überstand verwerfen und in den gleichen Gefäßen nochmals 2 ml abzentrifugieren.
- Pellets in 150 µl Lösung I resuspendieren.
- 300 µl Lösung II zufügen, mehrmals invertieren und 5 min auf Eis inkubieren.
- Mit 225 µl 7,5 M Ammoniumacetat (Lösung III) neutralisieren, invertieren und 5 min auf Eis inkubieren.
- Lysierte Zellen bei 14000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugieren.
- 600 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- RNase-Verdau (20 µg/ml) im 37°C Wasserbad für 30 min in
- Phenol-Chloroform-Extraktion durchführen (vgl. 2.2.2.2.1).
- Wässrige Phasen der zwei Proben vereinigen und mit Isopropanol fällen (vgl. 2.2.2.1.2).
- In 1x TE resuspendieren (empfohlenes Volumen: 20 µl).

Zur Kontrolle sollte die isolierte Plasmid-DNA als PCR-Template eingesetzt, verdaut, oder in *E. coli* rücktransformiert werden.

#### 2.2.2.9.2 Pflanzentransformation („floral dip“-Methode)

*Arabidopsis thaliana* und einige verwandte Brassicaceen ermöglichen exogen applizierten Agrobakterien Kolonien in den sich entwickelnden Ovarien zu bilden und die weiblichen Gametophyten zu transformieren.

Die „floral dip“-Methode, ursprünglich nach Clough und Bent (1998), ist einfach und effizient. Blühende *Arabidopsis* Pflanzen werden in eine Agrobaktériensuspension getaucht. Sie produzieren später Nachkommen, welche auf Transgene selektiert werden. Die Transformationseffizienz liegt bei ca. 1 %. Um sie zu erhöhen wird der Hauptspross 1-2 Wochen vor der Transformation abgeschnitten, was die Bildung von mehreren Seitensprossen, und damit einer höheren Anzahl an Blütenständen, induziert. Außerdem werden bereits angelegte Schoten und zu kurze Stängel vor der Transformation entfernt. Pro Transformationsansatz benötigt man 4-7 Pflanzen.

- 200 ml YEB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) im 1000 ml Kolben mit 10 ml Starterkultur (Kultur mit Einzelkolonie transformierter Agrobakterien) animpfen. (Alternativ können auch die verbleibenden 2 ml aus der Plasmid Mini-Präparation als Starterkultur verwendet werden.)
- Bei 28°C und 220-250 rpm üN im Schüttler inkubieren.
- Zellen bei 3600 rpm und RT für 20-30 min abzentrifugieren und in 300-400 ml Pflanzentransformationspuffer resuspendieren.
- Blüten von 4-7 Pflanzen für 10-20 sec in die Agrobaktériensuspension tauchen.
- Jede Pflanze einzeln in ein Becherglas stellen und wässern.
- Plastiktüte über die Pflanze stülpen, aufblasen und so gut wie möglich verschließen um den CO<sub>2</sub>-Gehalt und die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen.
- 2-3 Tage in einer Pflanzenkammer (18°C, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus) inkubieren, dann Tüte entfernen und Pflanzen nach 2-3 Wochen nicht mehr gießen.

### 2.2.2.10 Immunohistochemische Färbung

Die immunohistochemische Färbung mit Antikörpern ermöglicht einen spezifischen Nachweis von Proteinen in Geweben, Organen und einzelnen Zellen. Auf diese Weise kann die gewebs- oder zellspezifische Lokalisation eines bestimmten Proteins verfolgt werden. Der Nachweis erfolgt durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der Antikörper, der gegen das Protein gerichtet ist als Primärantikörper bezeichnet wird. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper und wird bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt.

#### Primärantikörper:

PIN1 (rabbit) 1:1000 Verdünnung

ENP (rabbit) 1:500 Verdünnung

#### Sekundärantikörper:

Cy3 (rabbit) 1:600

#### **Fixierung (Tag 1)**

- 4 % PFA in MTSB vollständig auftauen
- 1 ml 4 % PFA in MTSB in 1,5 ml Eppendorfgefäß geben und mit 10 µl 10 % Triton mischen (Endkonzentration: 0,1 %).
- Ovulen mit Embryonen zwischen Herz- und frühem Torpedostadium aus den Schoten isolieren und in das Eppendorfgefäß geben.
- Eppi mit geöffnetem Deckel 1 h im Vakuum inkubieren.
- Werden die Embryonen nicht sofort weiter verwendet können sie bei 4°C gelagert werden.

#### **Waschen (Tag 1)**

- 4 x 10 min mit MTSB/ 0,1 % Triton.
- 2 x 10 min mit PBS/ 0,01 % Triton.
- 2 x 5 min mit PBS (beim 2. Mal auf Eis inkubieren und Embryonen vom Rand schnippen).
- 1 x 5 min mit H<sub>2</sub>O.

#### **Quetschen (Tag 1)**

- Vorbereiten: Gelbe Spitze abschneiden und auf Eis kühlen, gelatinisierte Objektträger mit Datum und Linien beschriften.
- Achtung: Eppi mit Ovulen immer auf Eis bzw. im Kühlschrank lagern.
- Ovulen auf gelatinisierte Objektträger auftragen. Auf dem OT sollte sich möglichst wenig Flüssigkeit befinden.
- 22 x 22 mm Deckglas auf die Ovulen legen und unter dem Bino mit einer Pinzette leicht quetschen, bis die Embryonen heraus gleiten.
- Tipp: Wenn Embryo nicht sofort heraus gleitet, mit den übrigen Ovulen weiter machen und am Schluss noch mal versuchen.
- Einzelne Embryonen leicht mit der Pinzette quetschen, überschüssige Flüssigkeit mit Kleenex absaugen. Dabei Daumen leicht über das Deckglas streifen.
- OT in flüssigen N<sub>2</sub> halten, bis es nicht mehr sprudelt. OT anhauchen und Deckglas sofort mit einer Rasierklinge absprennen.

- Rand des Deckglases mit einem Pap Pen (Liquid Blocker) mit 4 Punkten markieren.
- Objektträger ün bei RT trocknen (z. B. „feuchte Kammer“ ohne Deckel).
- Lagerung bei -20°C.
- Wärmeschrank auf 37°C stellen.

### **Vorbereitung für die Färbung (Tag 2)**

- Eingefrorene OTs auftauen und trocknen.
- Umranden des ehemaligen Randes des Deckglases mit einem Pap Pen (3 x ohne absetzen).
- Feuchte Kammer mit Papiertüchern auslegen.

### **Rehydrieren (Tag 2)**

- 1 ml MTSB auf OT innerhalb der Umrandung pipettieren und 10 min inkubieren.
- Achtung: MTSB erst entfernen, wenn Driselase-Cocktail vorbereitet ist!
- Vorbereitung: Lösungen zur Permeabilisierung der Membran.

### **Permeabilisieren der Zellwand (Tag 2)**

- Driselase-Cocktail aus 3 verschiedenen Enzymen immer frisch ansetzen (Lagerung bei -20°C, Parafilm).
- 2 % Driselase / MTSB (20 mg/ml), vortexen.
- Zentrifugation bei 1000 rpm und RT für 2 min.
- MTSB entfernen.
- 200 µl Driselase mit Hilfe von Parafilm auf OT verteilen.
- je nach Driselase-Batch 25-45 min in feuchter Kammer bei 37 °C inkubieren.

### **Waschen (Tag 2)**

- 4 x 5 min mit PBS waschen (1-1,5 ml pro OT neben die Umrandung geben).
- Hier und bei allen folgenden Waschschrinen immer doppelt waschen.

### **Permeabilisieren der Membran (Tag 2)**

- 200 µl 10 % DMSO/3 % NP40 in MTSB auf den OT innerhalb der Umrandung geben.
- Inkubation für 1 h bei RT.

### **Waschen (Tag 2)**

6 x 5 min mit PBS waschen.

### **Block (Tag 2)**

- 3 % - 5 % BSA in PBS lösen: für 3 % abwiegen, aber in etwas weniger PBS lösen. Für die 3 BSA-Schritte ansetzen, bei 4 °C aufbewahren.
- Lösung vortexen und auf Eis lagern.
- 500 µl BSA/PBS auf den OT geben.
- Inkubation für 1 h bei 37 °C (auch etwas länger möglich oder ün bei 4 °C).

**Primärantikörper (Tag 2)**

- Antikörper in BSA/PBS (s. Block!) verdünnen.  
PIN1 (rabbit) 1:1000  
PIN2 (rabbit) 1:1000  
GFP (mouse) 1:600
- Zentrifugation für 1 min bei < 10000 rpm und RT.
- 200 µl Lösung pro OT innerhalb der Umrandung geben.
- Feuchte Kammer mit Gewebeklebeband abdichten.
- Inkubation für 4 h bei 37 °C.
- Inkubation üN bei 4 °C.

**Waschen (Tag 3)**

- Klebeband entfernen.
- 3 x 10 min mit PBS + 0,01 % Triton waschen.
- 3 x 10 min mit PBS waschen.

**Sekundärantikörper (Tag 3)**

- Ab hier Licht ausschalten.
- Antikörper in BSA/PBS (s. Block!) verdünnen.  
Cy3 (rabbit), 1:600
- Zentrifugation für 1 min bei < 10000 rpm und RT.
- 200 µl Lösung pro OT innerhalb der Umrandung geben.
- Feuchte Kammer mit Gewebeklebeband abdichten.
- Inkubation für 3,5 h bei 37 °C.

**Waschen (Tag 3)**

- 4 x 10 min mit PBS waschen.
- 2 x 10 min mit H<sub>2</sub>O waschen.

**Eindeckeln (Tag 3)**

- ca. 300 µl Citiflour auf OT geben.
- 24 x 60 mm Deckglas auflegen.
- OTs in Karton mit Abstandhalter aufbewahren. Sie sind mehrere Monate bei 4°C haltbar. Alternativ können sie auch bei -20°C gelagert werden.

**2.2.2.11 Mikroarray**

Die in den 1990er Jahren entwickelten DNA-Mikroarrays haben die Analyse der Genexpression von Grund auf umgestaltet, da es möglich ist, die RNA-Produkte von tausenden von Genen parallel zueinander zu untersuchen. Dadurch können Expressionsmuster identifiziert und analysiert werden, die zellphysiologischen Prozessen zu Grunde liegen.

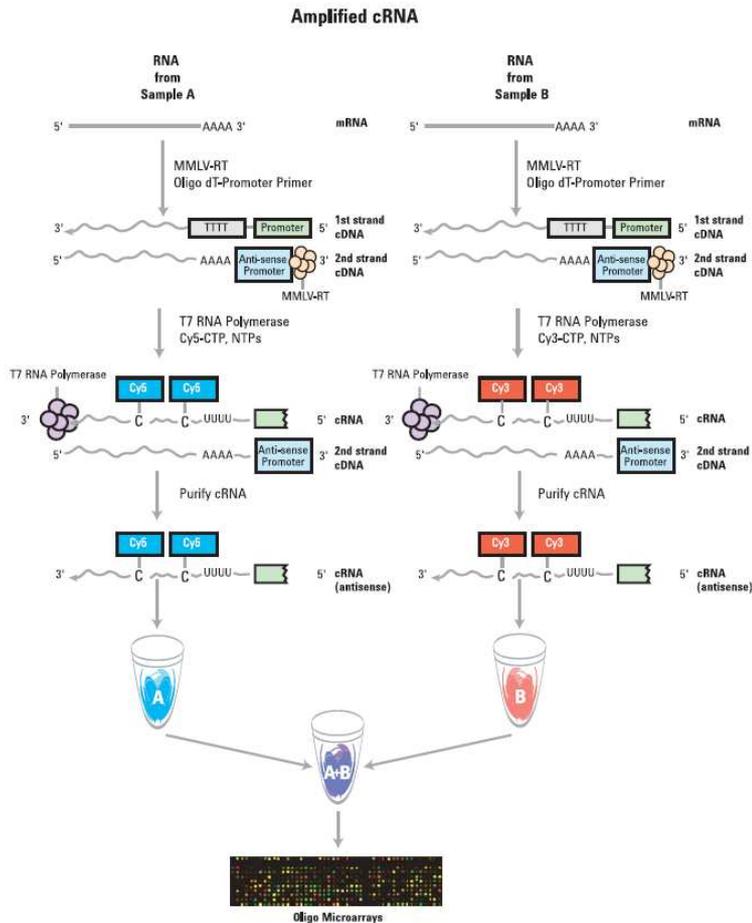


Abb. 7: Ablauf eines Mikroarray-Experiments (Agilent)

### 2.2.2.11.1 Statistische Grundlagen zur Auswertung des Mikroarrays

Um Gene mit unterschiedlicher Expression in Wildtyp und Mutante aufzufinden, ist es wichtig eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Aussage zu haben, dass die Gene signifikant unterschiedlich exprimiert sind. Mikroarray-Studien umfassen tausende von Genen, weshalb es möglich ist, dass die cRNA Moleküle zwar bevorzugt, aber nicht ausschließlich mit dem Gen hybridisieren, aus dem sie transkribiert wurden und zudem die Messung der Intensitäten nicht exakt ausgeführt werden kann. Die Genexpression ist daher mit einem zufälligen Fehler behaftet und die Wahrscheinlichkeit falscher Schlussfolgerungen steigt. Normalerweise wird ein Signifikanzniveau von 0,05 angenommen. Im Fall der Analyse von Embryonen war die verwendete RNA Menge stark begrenzt und bei der Einteilung in Wildtyp und Mutante könnte die Fehlerrate größer gewesen sein als z. B. bei der Analyse von Blattmaterial adulter Pflanzen. Daher wurde das Signifikanzniveau auf 0,15 angehoben.

### 2.2.2.11.2 Gesamt-RNA Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus Embryonen von *A. thaliana* mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.2.2.11.3 Bestimmung der RNA-Quantität

Die Quantität der gesamt-RNA erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer (Thermo) nach Angaben des Herstellers.

- NanoDrop Software starten und *Microarray Measurement* auswählen.
- NanoDrop mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> säubern.
- Zur Initialisierung 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf die dafür vorgesehene Vertiefung pipettieren und auf *OK* klicken.
- *RNA-40* als *Sample Type* auswählen.
- Zur Referenz 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf die Vertiefung pipettieren und auf *blank* drücken.
- NanoDrop säubern und 1,5 µl RNA-Probe auf die Vertiefung pipettieren, auf *measure* klicken.
- Daten notieren:  
Cy3 oder Cy5 Konzentration (pmol/µl)  
Verhältnis der Absorption der RNA (260 nm/280 nm)  
Konzentration der cRNA (ng/µl)

Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde der Agilent Bioanalyzer (mit RNA Nano Chip Kit) verwendet, der gleichzeitig auch eine Quantifizierung ermöglicht. Die RIN (RNA integrity number) gibt einen Wert an, mit dem sich die Integrität der RNA abschätzen lässt. Für den Mikroarray wurden nur RNA-Proben verwendet, deren RIN mindestens eine Höhe von 8 hat. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

- 550 µl RNA6000 Nano Gel Matrix in ein Zentrifugationsgefäß mit Filter pipettieren.
- Zentrifugation bei 1500 g für 10 min bei RT.
- Je 65 µl des filtrierte Gels in 0,5 ml Gefäße aliquotieren und bei 4°C für max. 1 Monat lagern.
- Zugabe von 1 µl RNA 6000 Nano dye, vortexen.
- Zentrifugation bei 13000 g für 10 min bei RT.
- Chip Priming Station mit RNA 6000 Nano chip beladen.
- 9 µl des gel-dye Mix in die Vertiefung, die mit „G“ markiert ist, pipettieren.
- Kolben der Spritze auf 1 ml einstellen und die Chip Priming Station schließen.
- Kolben nach unten drücken, bis er einrastet.
- 30 sec warten, Kolben lösen.
- 5 sec warten, Kolben langsam zurück in die 1 ml Position bringen.
- Chip Priming Station öffnen und 9 µl des gel-dye Mix in die mit „G“ markierten Vertiefungen pipettieren.
- Je 5 µl RNA 6000 Marker in die Vertiefungen für die Proben und für die Leiter pipettieren.
- 1 µl Leiter in die markierte Vertiefung geben.
- Je 1 µl Probe in jede der 12 Probenvertiefungen pipettieren.
- Chip für 1 min bei 2400 rpm vortexen.
- Chip im Agilent 2100 Bioanalyzer innerhalb von 5 min starten.

**Tag 1: cDNA-Synthese** (Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit)

In diesem Schritt wird die gesamt-RNA revers in cDNA transkribiert.

- Schüttler auf 80°C einstellen.
- Vorbereiten der spike-in Verdünnungen (Agilent RNA Spik-In Kit):  
Für eine gesamt RNA-Menge von 500 ng, spike-in A bzw. B schrittweise in 0,5 ml Gefäße 1:20, 1:40 und 1:4 verdünnen. Dabei Spike A Mix immer mit Cy3 und Spike B Mix mit Cy5 markieren.  
Verdünnung 1: 38 µl Dilution Buffer + 2 µl spike-in Mix A bzw. B  
Verdünnung 2: 78 µl Dilution Buffer + 2 µl Verdünnung 1  
Verdünnung 3: 9 µl Dilution Buffer + 3 µl Verdünnung 2  
Die erste Verdünnung kann bis zu 1 Monat bei -70°C gelagert werden. Die zweite und dritte Verdünnung müssen nach gebrauch verworfen werden.
- 8,3 µl gesamt-RNA mit 2 µl Spike A oder B (3. Verdünnung) und 1,2 µl T7 Promotor Primer mischen.
- Inkubation bei 65°C für 10 min im Cyclor (Denaturierung der Primer und des Templates).
- Inkubation bei 4°C für 5 min im Cyclor.
- 5x First Strand Buffer bei 80°C im Schüttler für 7 min erwärmen.
- Master Mix mit folgenden Komponenten herstellen:

| Komponente             | Volumen (µl)<br>pro Reaktion |
|------------------------|------------------------------|
| 5x First Strand Buffer | 4                            |
| 0,1 M DTT              | 2                            |
| 10 mM dNTP Mix         | 1                            |
| MMLV-RT                | 1                            |
| RnaseOut               | 0,5                          |
| Gesamtvolumen          | 8,5                          |

Tab. 16: cDNA Master Mix

Tip: 5x First Strand Buffer, 0,1 M DTT und 10 mM dNTP Mix können während der Inkubation der Proben gemischt werden, MMLV-RT und RNaseOut erst nach der Inkubation zugeben

- Zugabe von je 8,5 µl des cDNA Master Mix zu jeder RNA-Probe und vorsichtig mischen.
- Schüttler auf 40°C einstellen.
- Inkubation bei 40°C für 2 h im Cyclor.
- Inkubation bei 65°C für 15 min im Cyclor.
- Inkubation bei 4°C für 5 min im Cyclor.
- Kurz zentrifugieren und bis zum Gebrauch auf Eis lagern.

**Tag 1: cRNA Synthese** (Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit)

Die cDNA wird in diesem Schritt in cRNA transkribiert und gleichzeitig mit Cy3 oder Cy5 markiert und amplifiziert.

- 50 % PEG bei 40°C für 1 min im Schüttler inkubieren und bis zum Gebrauch bei RT lagern.
- Master Mix mit folgenden Komponenten herstellen:

| Komponente                       | Volumen (µl)<br>pro Reaktion |
|----------------------------------|------------------------------|
| Nuclease-freies Wasser           | 15,3                         |
| 4x Transkription Buffer          | 20                           |
| 0,1 M DTT                        | 6                            |
| NTP Mix                          | 8                            |
| 50 % PEG                         | 6,4                          |
| RNaseOUT                         | 0,5                          |
| Inorganic pyrophosphatase        | 0,6                          |
| T7 RNA Polymerase                | 0,8                          |
| Cyanine 3-CTP oder cyanine 5-CTP | 2,4                          |
| Gesamtvolumen                    | 60                           |

Tab. 17: Transkription Master Mix

- Zugabe von je 60 µl des Transkription Master Mix zu jedem cDNA-Synthese Reaktionsgefäß und vorsichtig mischen.
- Inkubation bei 40°C für 2 h im Cycler.

**Tag 1: Reinigung der markierten amplifizierten cRNA**

In diesem Schritt wurden die Säulen des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die gereinigte cRNA wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen. Das Eluat sollte farblich sein und kann bis zu 1 Woche bei -70°C gelagert werden.

**Tag 1: Quantifizierung der cRNA**

Die gereinigte cRNA wurde mit dem NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer quantifiziert.

Bestimmung des Gehalts der cRNA (µg):

$$\frac{(\text{Konzentration der cRNA}) \cdot 30 \mu\text{l (Volumen der cRNA)}}{1000} = \mu\text{g der cRNA}$$

Bestimmung der Aktivität (pmol/µg):

$$\frac{(\text{Konzentration von Cy3 oder Cy5})}{(\text{Konzentration der cRNA})} \cdot 1000 = \text{pmol Cy3 oder Cy5 pro } \mu\text{g cRNA}$$

Der Versuch kann nur fortgeführt werden, wenn der Gehalt >825 ng und die Aktivität > 8 ist.

**Tag 2: Hybridisierung** (Gene Expression Hybridization Kit)

- Hybridisierungssofen auf 65°C einstellen.
- Für jeden Mikroarray folgenden Master Mix herstellen:

| Komponente                           | Volumen pro Array                   |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Cy3-labeled, linearly amplified cRNA | 825 ng                              |
| Cy5-labeled, linearly amplified cRNA | 825 ng                              |
| 10x Blocking Agent                   | 11 µl                               |
| Nuclease-freies Wasser               | auf ein Volumen von 52,8 µl bringen |
| 25x Fragmentation Buffer             | 10 µl                               |
| Gesamtvolumen                        | 55 µl                               |

Tab. 18: Fragmentation Mix für 4x44K Mikroarray

- Inkubation bei 60°C für max. 30 min im Cycler zur Fragmentierung der RNA.
- Zugabe von 55 µl 2x Hybridization Buffer zum Beenden der Fragmentierung.
- Vorsichtig mischen, es sollten sich keine Luftblasen bilden.
- Agilent SureHyb Kammer mit neuem gasket slide beladen. Die mit Agilent markierte Seite muss dabei oben liegen.
- Proben kurz zentrifugieren und umgehend verwenden.
- Jede gasket Vertiefung mit je 100 µl der Proben beladen.

Tip: Pipette auf 90 µl einstellen, mit der Spitze in das Gefäß tauchen und aufziehen. Pipettenspitze in dieser Position belassen und Pipette auf 100 µl einstellen. Beim Beladen die Flüssigkeit in Schleifen auf dem gasket verteilen, dabei das Gasket nicht berühren.

- Den Mikroarray mit der aktiven, mit Agilent markierten, Seite nach unten, mit einer Pinzette auf das gasket gleiten lassen.
- Abdeckung der SureHyb Kammer auf die slides geben und die Vorrichtung verschließen.
- Kammer vertikal rotieren, um das gasket zu befeuchten und um die Beweglichkeit der Luftblasen sicher zu stellen.
- Kammer im Rotor den Hybridisierungssofens befestigen.
- Hybridisierung bei 65°C für 17 h bei 10 rpm.

**Tag 2: Vorbereitungen für Tag 3**

- 5 Glasboxen mit Deckel, 2 Recks und 4 Magnetührstäbchen mehrmals mit VE-Wasser und Mili-Q Wasser waschen.
- Sterile 250 ml Flasche mit Gene Expression Wash Buffer 2 befüllen und im Wasserbad bei 37°C üN erwärmen.

**Tag 3: Waschen**

- 2 Glasboxen mit GE Buffer 1 befüllen.
- Slide-Paar in GE Buffer 1 voneinander trennen, Mikroarray in ein Reck stellen.
- Reck in eine mit GE Buffer 1 befüllte Glasbox mit Magnetührstäbchen legen.
- 1 min mit einem Magnetührer mischen.

- Glasbox mit GE Buffer 2 befüllen, Magnetrührstäbchen zugeben.
- Reck in die vorbereitete Glasbox überführen und 1 min mit einem Magnetrührer mischen.
- Glasbox mit Acetonitril befüllen, Magnetrührstäbchen zugeben.
- Reck in die vorbereitete Glasbox überführen und 1 min mit einem Magnetrührer mischen.
- Glasbox mit Stabilization Buffer befüllen, Magnetrührstäbchen zugeben.
- Reck in die vorbereitete Glasbox überführen und 1 min mit einem Magnetrührer mischen.
- Reck auf ein Papiertuch geben und Slide im Dunkeln trocknen.
- Glasboxen zuerst mit Acetonitril, dann mit VE-Wasser und Mili-Q Wasser waschen.

## Scan

### Einstellungen Agilent Scanner:

|                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| Scan region     | 61 x 21,6 nm                |
| Scan resolution | 5 µm                        |
| Dye channel     | Red & Green                 |
| Green PMT       | XDR Hi 100 %<br>XDR Lo 10 % |
| Red PMT         | XDR Hi 100 %<br>XDR Lo 10 % |

### 2.2.2.12 Inhibitorexperimente

Um die Reaktion transgener Embryonen auf verschiedene Inhibitoren und Toxine zu testen, wurden pro Versuch 20-30 Ovulen mit *Arabidopsis* Embryonen zwischen Globular- und Torpedostadium aus den Schoten isoliert und in 1 ml Lösung mit dem jeweiligen Inhibitor oder mit der gleichen Menge an Puffer (Kontrollen) überführt. Alle Experimente wurden an transgenen *p35S:EGFP::ENP1-4* und *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen durchgeführt. Bei der Behandlung mit Wortmannin wurde zusätzlich die transgene Linie *pAtSNX1:AtSNX1::GFP* eingesetzt. Stammlösungen, Solvent und Lagerung sind unter 2.1.9 „Lösungen für pharmazeutische Tests“ zu finden. Die Arbeitslösungen wurden für jeden Versuch frisch hergestellt. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen sowie die jeweiligen Inkubationszeiten sind in dem jeweiligen Experiment aufgeführt. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Ovulen auf einen OT mit einem Tropfen Wasser überführt, die Embryonen durch Aufschneiden der Ovulen mit einem Skalpell isoliert und mittels LSCM (vgl. 2.2.2.14) analysiert.

### 2.2.2.13 Versuche zur Entstehung von Bilateralsymmetrie

Um die PIN1-Polarität dreidimensional darzustellen, wurden pro Testreihe 10-20 *pPIN1:PIN1::GFP Arabidopsis* Embryonen zwischen Oktant- und Triangularstadium aus ihren Ovulen isoliert und wie unter 2.2.2.14 beschrieben mittels XYZ-Scan am LSCM untersucht. Um eine 3D-Ansicht des Embryos zu erhalten wurden die einzelnen Schnitte mittels Imaris Software (Version 3.0 von Bitplane) zusammengesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.14 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei der Untersuchung von ganzen Zellen oder Geweben mit Hilfe eines Standard-Fluoreszenzmikroskops (Auflichtprinzip) überlagern sich die Fluoreszenzbilder, da auch von Molekülen oder Proteinen (wie z. B. DAPI oder GFP) ober- und unterhalb der Brennebene Licht emittiert wird. Im Gegensatz dazu visualisiert ein konfokales Laser Scanning Mikroskop nur die Fluoreszenz der Brennebene, wodurch ein weit präziseres Bild entsteht.

Um die subzelluläre Lokalisation von GFP, YFP, CFP und Cy3 in transgenen *Arabidopsis thaliana* Embryonen zu bestimmen wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop (LSM FV1000) von Olympus und die zugehörige FluoView™ Software verwendet.

- Embryonen in einen Wassertropfen auf einem Objektträger überführen und mit einem Deckglas versehen.
- Deckglas mit schnell trocknendem Nagellack auf dem Objektträger fixieren und den Nagellack aushärten lassen, um das Austrocknen des Präparats zu vermeiden.

Die nachfolgend beschriebenen Einstellungen des LSM FV1000 eignen sich um GFP, CFP, YFP und Cy3 in den Zellen transgener *A. thaliana* Embryonen zu dokumentieren.

- UPLSAPO 60x W (NA: 1,2) als Objektiv auswählen.
- GFP: Laser 488, Wellenlänge 500-550 nm, YFP: Laser 488, Wellenlänge 500-550 nm, CFP: Laser 458, Wellenlänge 465-565 nm, Cy3: Laser 561 , Wellenlänge 570-630 nm.
- Laserintensität auf 12-15 % einstellen, um zu schnelles Bleichen des FPs zu vermeiden.
- Für eine gute Auflösung eine Bildgröße von 1024x1024 Pixel mit 12 Bits/Pixel wählen.
- Monodirektionalen XYZ-Scan (1-2 µm Schritte; Kalman-Filter; 4 Wiederholungen pro gescannter Linie) durchführen, um aufeinander folgende, optische Schnitte zu erhalten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Bedeutung von *ENP*

#### 3.1.1 Die zelluläre Lokalisation der *ENP*-Proteine

Der *laterne* Phänotyp zeichnet sich durch den vollständigen Verlust der Keimblätter aus und wird durch eine gleichzeitige Mutation zweier Gene, *PINOID* (*PID*) und *ENHANCER OF PINOID* (*ENP*) verursacht (Treml et al., 2005). Durch *in situ* Hybridisierungen konnte bereits gezeigt werden, dass *ENP* mindestens ab dem 8-Zell-Stadium in wildtypischen Embryonen transkribiert wird. Die Expression konzentriert sich dann zunehmend in den epidermalen Vorläuferzellen und schließlich an den Keimblatträndern, und -spitzen sowie dem SAM (Treml, 2007). In voll entwickelten Embryonen wird nur noch wenig *ENP*-mRNA detektiert.

Um die subzelluläre Lokalisation von *ENP* feststellen zu können, wurden transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Der dem Fusionsprotein vorgeschaltete 35S-Promotor ist ein konstitutiver Promotor, der in fast jedem Zelltyp aktiv ist (Odell et al., 1985) und in Dikotyledonen in der Regel zu einem hohen Expressionslevel des Zielgens führt. Im *Arabidopsis* Embryo jedoch ist die Situation anders, da eine eindeutige Expression in der frühen Embryonalentwicklung nicht nachgewiesen werden kann, was auf die späte Aktivität des 35S-Promotors zurückzuführen ist. Im Globular- und frühen Herzstadium ist neben einer Hintergrundfluoreszenz keine Lokalisation von *ENP* sichtbar ( $n > 20$ ; Abb. 8 a, b). Erst ab dem mittleren Herzstadium ist überhaupt eine Expression von *EGFP::ENP* in der Epidermis der Keimblätter zu erkennen ( $n > 70$ , Abb. 8 c-f). *EGFP::ENP* akkumuliert dabei an der apikalen Seite der Membran und ist entlang beider Keimblattränder auf eine einzelne terminale Zelle hin ausgerichtet (Abb. 8 d). Im Mesophyll der Keimblattprimordien ist das GFP-Signal relativ gleichmäßig verteilt (Abb. 8 e). In immunohistochemischen Färbungen mit einem gegen das *ENP*-Protein gerichteten Antikörper konnte in *Arabidopsis* Embryonen ebenso die polare Lokalisation in den Keimblattprimordien, aber auch schwach im Hypokotyl und in der Wurzelregion, nachgewiesen werden (Abb. 9).

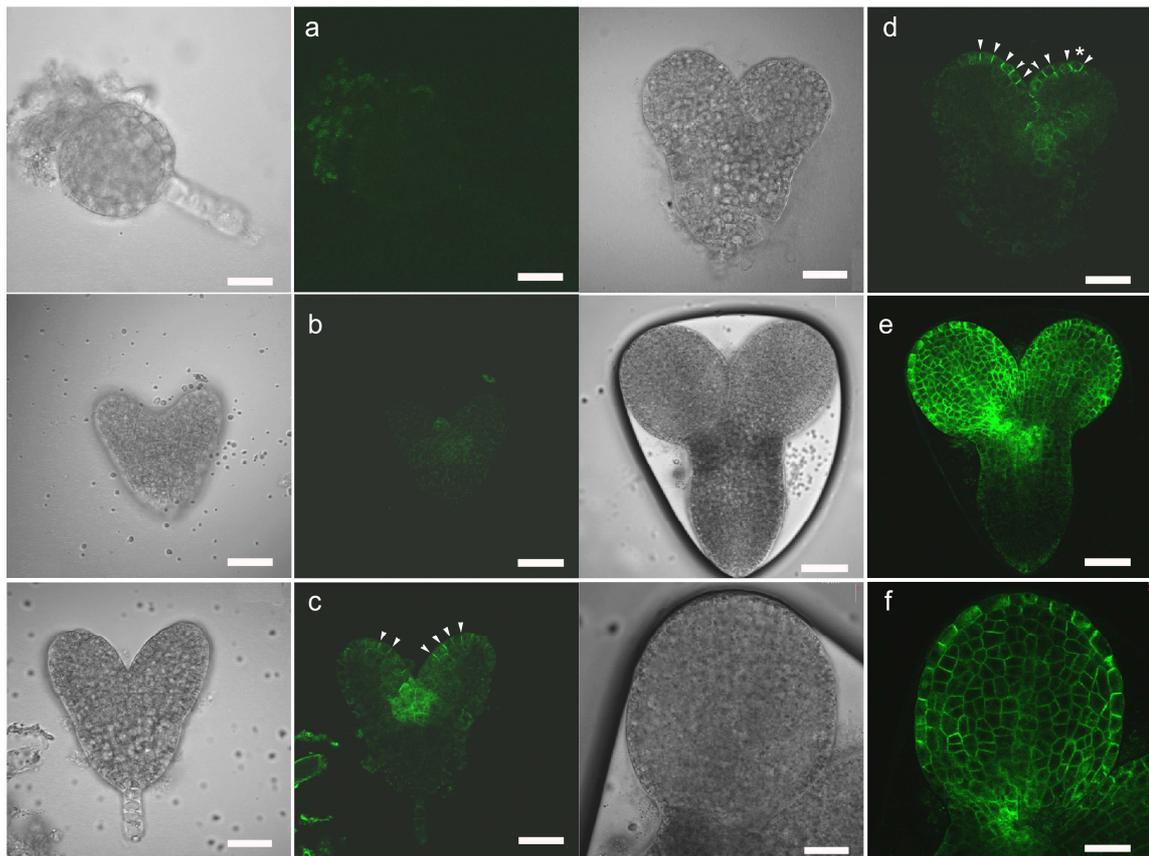


Abb. 8: Lokalisation von *p35S::EGFP::ENP* in *Arabidopsis thaliana* Embryonen. Zu sehen sind unterschiedliche Embryonalstadien im Phasenkontrast und als Fluoreszenzaufnahmen. (a, b) Embryonen im Globular- bzw. frühen Herzstadium ohne spezifisches GFP-Signal. (c) Mittleres Herzstadium mit membranständiger *EGFP::ENP* Expression in einigen epidermalen Zellen. (d) Transgener *p35S::EGFP::ENP* Embryo im späten Herzstadium mit in Richtung einer terminalen Epidermiszelle orientiertem GFP-Signal. (e) Embryo im frühen Torpedostadium mit einer apikalen Lokalisation von *EGFP::ENP* in den Epidermiszellen und z. T. einheitlicher Verteilung in den Mesophyllzellen. (f) Keimblatt eines Embryos im frühen Torpedostadium mit apikaler Lokalisation von *EGFP::ENP*. Die Pfeile geben die Polarität des membranständigen *EGFP::ENP* Signals an. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

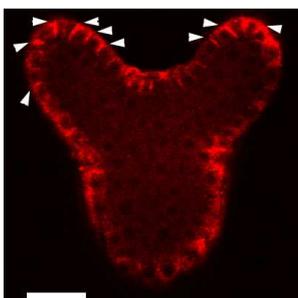


Abb. 9: Polare Lokalisation von ENP im Wildtyp-Embryo. Immunohistochemische Färbung durch ENP-Antikörper in Keimblattprimordien, Hypokotyl und Wurzel. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.1.2 Kolokalisation von ENP und PIN1 in der Epidermis der Kotyledonen

Der Auxin Efflux-Carrier PIN1 ist direkt am gerichteten Auxintransport beteiligt. Seine polare Lokalisation wird durch die Serin/Threonin-Kinase PID reguliert (Friml et al., 2004; Kaplinsky und Barton, 2004), die durch die Phosphorylierung von PIN1 den polaren Auxintransport indirekt beeinflusst (Michniewicz et al., 2007). In PID Überexpressionsmutanten wurde eine weitgehende Reorientierung der PIN1-Proteine von basal nach apikal nachgewiesen. In den Keimblattprimordien homozygoter *pid-15* Embryonen ist der Carrier vorrangig apikal, z. T. aber auch basal lokalisiert (Tremel et al., 2005). Erst eine simultane Mutation von *ENP* und *PIN1* verursacht eine weitgehend vollständige Reversion der PIN1-Verteilung von apikal nach basal in den protodermalen Zellen des Embryoapex, was zum Verlust der Kotyledonen führt (Abb. 10, Tremel et al., 2005). Auf welche Weise PIN1 jedoch von ENP beeinflusst wird, ist unklar, da Yeast Two-Hybrid Experimente keine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen aufdecken konnten. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass ENP möglicherweise durch die Bildung von Multiproteinkomplexen indirekt an PIN1 bindet. Zudem besitzt ENP nur eine cytosolische und keine erkennbare Transmembrandomäne und auch keine erkennbaren Verankerungssignale (z. B. Myristoilierung). Eine mögliche Lösung wäre daher ein Yeast Two-Hybrid Experiment, in dem eine Interaktion von ENP direkt mit der cytosolischen Domäne von PIN1 getestet wird.

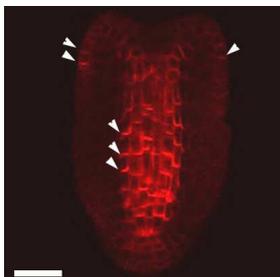


Abb. 10: Basale Lokalisation von PIN1 im *enp pid* doppelmutanten Embryo (*laterne*) in Stele und Epidermis. Immunohistochemische Färbung durch PIN1-Antikörper. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Lokalisation von ENP in der Epidermis der Keimblattprimordien ähnelt stark der Lokalisation von PIN1. Um die Vermutung einer Kolokalisation zu bestätigen wurden transgene *p35S:EGFP::ENP* Embryonen immunohistochemisch mit einem gegen das PIN1-Protein gerichteten Antikörper analysiert. *EGFP::ENP* wird in den epidermalen Zellen der Keimblattprimordien an der apikalen Seite der Plasmamembran exprimiert, wobei das GFP-Signal auf eine einzelne terminale Zelle hin ausgerichtet ist (Abb. 11 a; Tremel, 2007). Der Auxin Efflux-Carrier PIN1 ist ebenso in der Epidermis aller Primordien apikal, in Richtung Primordiumspitzen, orientiert. (Abb. 4 b; Steinmann et al., 1999; Benkova et al., 2003). Eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale GFP und Cy3 zeigt eine nahezu eindeutige Kolokalisation der beiden Proteine ( $n > 80$ ; Abb. 4 c). Eine Expression von *EGFP::ENP* konnte trotz Fusion mit dem konstitutiven 35S-Promotor, der prinzipiell in allen Zellen transgener Embryonen aktiv ist, in den tieferen Zellschichten in jungen Embryonen nicht gezeigt werden. Da sich in diesen Ebenen jedoch die vaskulären Elemente befinden, war zunächst unklar, ob die Vermutung einer Kolokalisation von PIN1 und ENP auch für diese Zellschichten zutrifft.

Allerdings war nach Analyse älterer Embryostadien klar, dass der 35S-Promotor zeitlich und räumlich von jungen zu älteren bzw. von apikal nach basal seine Wirkung zunehmend steigert (Abb. 8). In älteren Torpedostadien von *pid enp* doppelmutanten Embryonen konnte gezeigt werden, dass ENP in den vaskulären Elementen basal lokalisiert ist (Abb. 21 c).

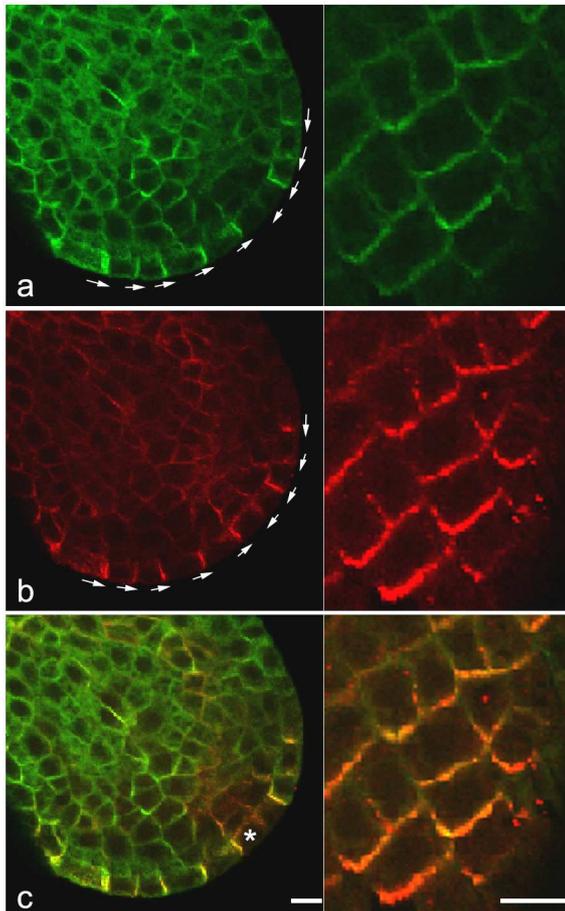


Abb. 11: Vergleich der Lokalisation von ENP und PIN1 in mit PIN1-Antikörper gefärbten transgenen *p35S::EGFP::ENP* Embryonen. (a) EGFP::ENP Expression in der Epidermis der Keimblätter. (b) PIN1 Lokalisation (c) Überlagerung von (a) und (b). Die Pfeile zeigen den Auxintransport in der Epidermis der Keimblätter in Richtung einer terminalen Zelle (Stern). Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

### 3.2 Die zelluläre Lokalisation von *At2g23050*

ENP und NPH3 gehören der gleichen Untergruppe des phylogenetischen Stammbaums, der NPH3-Proteinfamilie, mit insgesamt 33 Mitgliedern an (Furutani et al., 2007). Es zeigte sich jedoch, dass vier Proteine (*At5g67440*, *At4g37590*, *At2g14820*, *At2g23050*) eine besonders große Ähnlichkeit zu ENP aufweisen. *At2g23050* (*NPY4*) ist Teil der *NPY*-Genfamilie (*NAKED PINS IN YUC MUTANTS*), welche die Auxin-vermittelte Organentwicklung in *Arabidopsis* regulieren (Cheng et al., 2008). *NPY4* wird während der gesamten Embryogenese in den provaskulären und vaskulären Elementen, insbesondere im Hypokotyl aber auch schwach in den Infloreszenzen exprimiert. Eine Mutation in *NPY4* hat keine Auswirkungen auf den adulten Phänotyp (Cheng et al., 2008). In einem Yeast Two-Hybrid Experiment konnte eine direkte Interaktion von *At2g23050* mit ENP nachgewiesen werden (Zusammenarbeit mit Dr. J. Uhrig, Universität Köln). Ein Vergleich ihrer

Proteinsequenzen zeigte außerdem ähnliche Motive, wie z. B. die BTB/POZ- oder die NPH3-Domäne (vgl. 3.3). Die Ähnlichkeit von ENP und *At2G23050* und die Yeast Two-Hybrid Interaktion ließen es interessant erscheinen, *At2g23050* in der Epidermis zu testen, da das Gen sonst in der Stele exprimiert wird (Cheng et al., 2008).

Um das Verhalten von *At2g23050* testen zu können, wurde die annotierte CDS (*At2g23050* ORF 1-4) mittels Gateway-Technik in die pEarlyGate-Expressionsvektoren 101 (CFP) und 102 (YFP) *in frame* vor CFP- bzw. YFP-Gene kloniert (Abb. 12). Diese pEarlyGate-Vektoren sind Plasmidvektoren für die Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation, welche die konstitutive Expression der Fusionsproteine und ihre Detektion bei einer Anregungswellenlänge von 465-565 nm (CFP) bzw. 500-550 nm (YFP) ermöglicht.

Insgesamt wurden für das YFP-Konstrukt je 4 Col-0 (N1092) und Ler (NW20) Pflanzen transformiert, für das CFP-Konstrukt je 3 Col-0 (N1092) und Ler (NW20). Deren Nachkommen wurden unter Verwendung von phosphinothricinhaltigem Medium auf Basta-Resistenz selektiert und in Erde weiter gezogen, um die Embryonalstadien der Folgegeneration mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop analysieren zu können. Da die Intensität der FP-Signale in Abhängigkeit von der jeweiligen transgenen Elternpflanze differierte, wurden für die Untersuchung nur diejenigen Pflanzen ausgewählt, die stark fluoreszierende Embryonen hervorbrachten. Letztendlich wurde die Lokalisation von pEG23050::CFP und pEG23050::YFP in den Nachkommen von insgesamt 12 (von den vier oben genannten Col-0 Pflanzen abstammend) bzw. 10 (von drei oben genannten Col-0 Pflanzen stammend) der T1-Pflanzen ausgewertet. Den Fusionsproteinen ist wie bei den EGFP::ENP und EGFP::ENP 3-4 Konstrukten, der konstitutive 35S-Promotor vorgeschaltet (Odell et al., 1985). Wie unter 3.1 bereits demonstriert, konnte aufgrund der späten Aktivität des Promotors die Expression von pEG23050::CFP und pEG23050::YFP zu Beginn der Embryogenese nicht nachgewiesen werden. Die Analyse beschränkt sich deshalb weitgehend auf Embryonen im Torpedostadium. Zwischen den Vertretern der verschiedenen Ökotypen Col-0 (N1092) und Ler (NW20) traten bei keinem der beiden Konstrukte während der Embryogenese erkennbare Unterschiede auf.

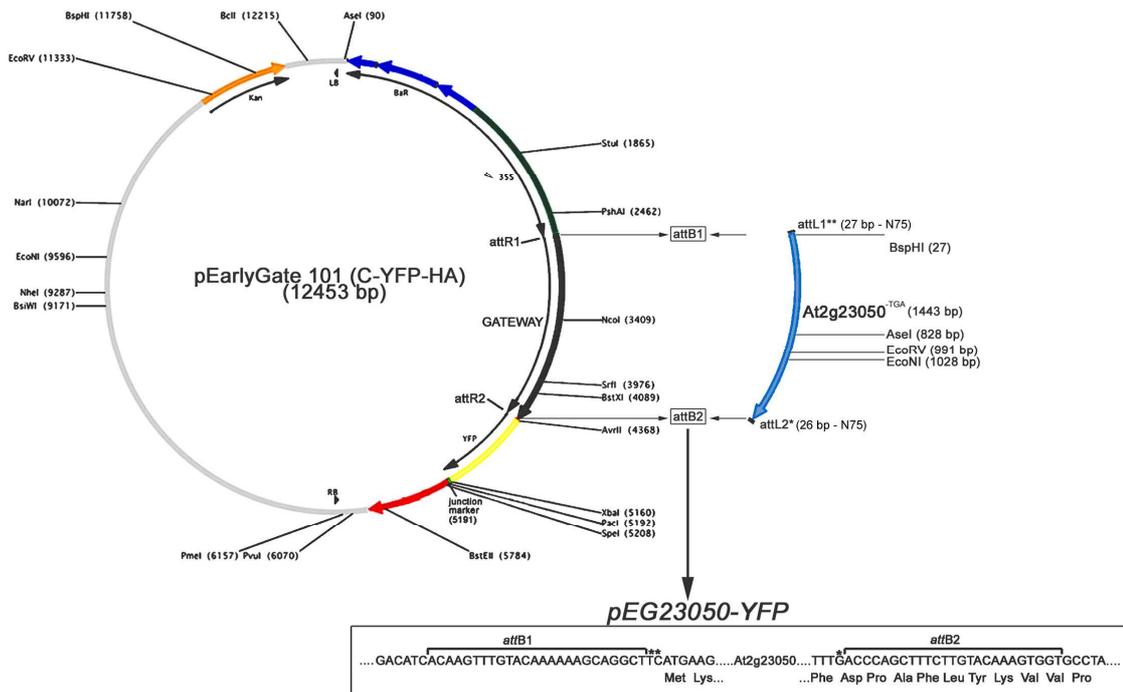


Abb. 12: Klonierung von *At2g23050* in den Plasmidvektor pEarlyGate 101. Die Klonierung in den pEarlyGate 102 entspricht der in pEarlyGate 101. Die Inserts wurden mit speziellen Gateway-Primern amplifiziert und mittels Rekombination zuerst in einen Donor-Vektor und dann *in frame* hinter den 35S-Promotor in den pEarlyGate Vektor kloniert.

Im Fall von pEG23050::CFP konnte eine apikale Lokalisation von *At2g23050* nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 13). In der Epidermis der Kotyledonen von pEG23050::YFP Embryonen akkumuliert 23050::YFP jedoch eindeutig an den apikalen Membranen, was der Verteilung der PIN1 Efflux Carrier und ENP entspricht (vgl. Abb. 13 und Abb. 11). Auch hier scheint sich dessen Polarität an einer einzelnen terminalen Zelle zu orientieren. Die ektopische Expression von *At2g23050* zeigt folglich dieselbe polare Lokalisation in der Epidermis wie ENP, obwohl das Gen eine andere Expressionsdomäne wie ENP aufweist. Das Konstrukt rettet zudem nicht, wie *p35S::EGFP::ENP*, den Blütenphänotyp und kann ENP im Wildtyp nicht ersetzen (vgl. 3.4.1; Tab.19, Abb.17).

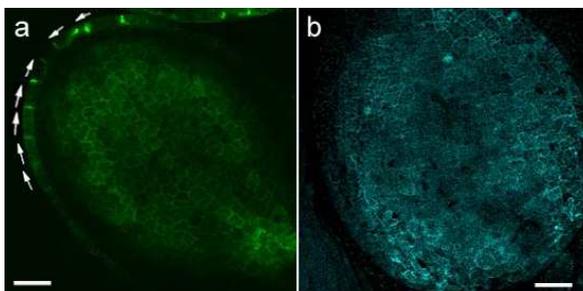


Abb 13: Lokalisation von pEG23050::YFP (a) und pEG23050::CFP (b) in transgenen *Arabidopsis* Embryonen im Torpedostadium. Die Pfeile in A geben die Polarität des 23050::YFP Signals an. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Um eine Interaktion von ENP mit anderen Proteinen *in vivo* mittels Fluoreszenz, z. B. durch FRET, nachweisen zu können, wurden weitere Fluoreszenzfusions-Konstrukte mit ENP hergestellt. Die annotierte CDS von *ENP* (*ENP* ORF 1-4) wurde auf die gleiche Weise wie *At2g23050* mittels Gateway-Technik in die pEarlyGate-Expressionsvektoren 101 und 102 kloniert (Abb. 14). Hier wurden für das YFP-Konstrukt 8 Col-0 (N1092) und 10 Ler (NW20) Pflanzen transformiert, für das CFP-Konstrukt je 4 Col-0 (N1092) und Ler (NW20) und die Embryonen von insgesamt 13 (CFP; von vier Col-0 Pflanzen abstammend) und 18 (YFP; von acht Col-0 Pflanzen abstammend) T1-Pflanzen untersucht.

Die Analyse der CFP- bzw. YFP-Konstrukte ergab wie bei transgenen *p35S:EGFP::ENP* eine apikale Lokalisation in der Plasmamembran (Abb. 15), jedoch sollten für ein eindeutigeres Ergebnis die Embryonen nachfolgender Generationen analysiert werden.

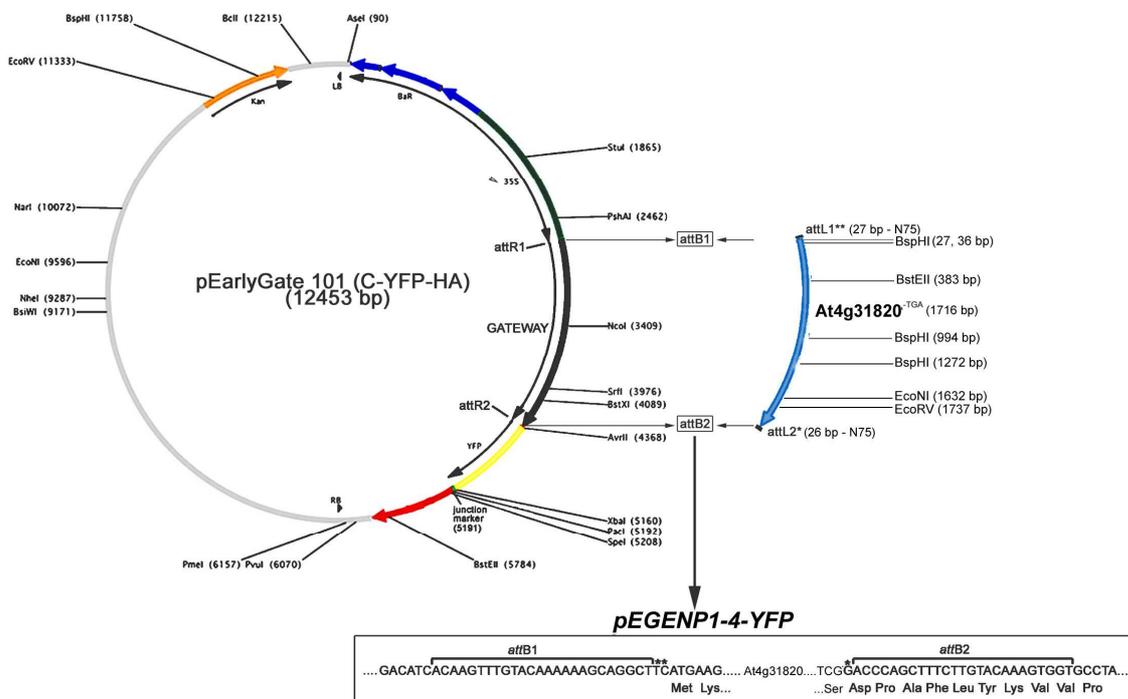


Abb. 14: Klonierung von *ENP* in den Plasmidvektor pEarlyGate 101. Die Klonierung in den pEarlyGate 102 entspricht der in pEarlyGate 101. Die Inserts wurden mit speziellen Gateway-Primern amplifiziert und mittels Rekombination zuerst in einen Donor-Vektor und dann *in frame* hinter den 35S-Promotor in den pEarlyGate Vektor kloniert.

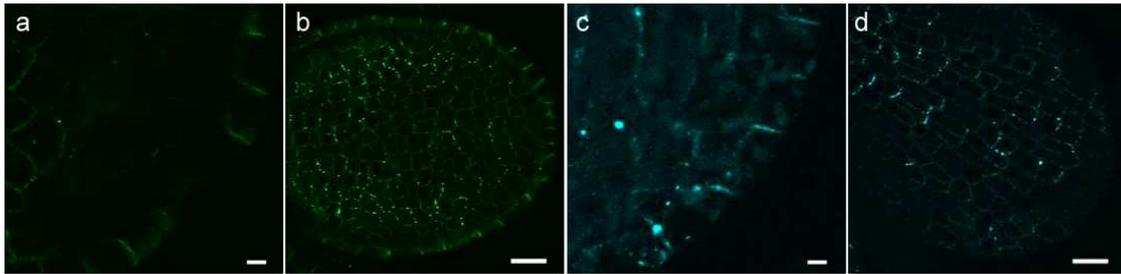


Abb. 15: Apikale Lokalisation von *p35S:ENP::YFP* und *p35S:ENP::CFP* in transgenen *Arabidopsis* Embryonen im Torpedostadium. (a, b) *p35S:ENP::YFP*; (c, d) *p35S:ENP::CFP*. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m in a und c; 20  $\mu$ m in b und d.

### 3.3 Struktur von At2g23050

*At2g23050* kodiert für ein 481 bp langes Protein und weist, ebenso wie ENP, eine BTB-POZ-Domäne am N-Terminus sowie eine NPH3-Domäne in der Mitte einschließlich der typischen Tyrosin-Phosphorylierungsstelle in der konservierten Region DIV auf, die im Fall von ENP die Deletion der drei Aminosäurereste Gly (G), Leu (L) und Tyr (Y) des *mab4-1* Allels enthält. (Abb. 16). Eine Coiled-Coil Domäne ist nicht vorhanden. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von *At2g23050* und ENP zeigt im Bereich der BTB/POZ-Domäne eine Kernsequenz von 10 Aminosäuren, die zwischen beiden Proteinen absolut identisch ist. Hier finden sich auch Aminosäurereste, von denen bekannt ist, dass sie an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. So sind in *At2g23050* und ENP die Aminosäuren F, Y/H, L, H für Kontaktstellen zur Tetramerisierung bekannt und mit Ausnahme des Tyrosins bzw. Histidins in den untersuchten BTB-Domänen der verschiedenen NPH3-Proteine immer fest vorhanden (Stogios et al., 2005). Auch die nachfolgende Sequenz bis einschließlich Prolin, das an einer Tetramerisierung beteiligt ist, und die ebenfalls konservierten Aminosäuren L, S, K ermöglichen eine Dimerisierung. In dem sog. „core“ BTB-fold, der drei Beta-Faltblätter und fünf Alpha-Helices einschließt, befinden sich noch weitere Aminosäuren, die in *At2g23050* und ENP identisch sind. Dazu zählen die gesamte B3-Struktur sowie die meisten Aminosäuren der dritten Alpha-Helix. Lediglich drei Aminosäuren werden durch ähnliche ersetzt. Das Leucin in A1 ist in den unterschiedlichen BTB-Strukturen fest verankert, ist allerdings nicht für eine Interaktion bekannt. Ein Überblick zeigt, dass die zwischen allen BTB-Domänen hoch konservierten Aminosäurereste hydrophob sind und bei den BTB-NPH3-Proteinen hauptsächlich in B1, B2 und A3 liegen. Innerhalb aller untersuchten BTB-Domänen unterschiedlicher Organismen finden sich diese Aminosäuren vortrefflich zwischen B1 und A3 (Stogios et al., 2005). Die NPH3-Domäne im mittleren Bereich von ENP und *At2g23050* sowie die BTB/POZ-Domäne in der N-terminalen Region besitzen einen hohen Grad an konservierten Sequenzen während die C-terminalen Bereiche weniger konserviert sind. Teilweise wurden in *At2g23050* und ENP ähnliche Aminosäuren ausgetauscht oder durch komplett unterschiedliche ersetzt. Diese Bereiche befinden sich jedoch meistens außerhalb der BTB/POZ-Domänen und sind nicht für eine Protein-Protein Interaktion bekannt. Da außerdem die Tertiärstruktur der BTB/POZ-Domäne für seine Funktionalität entscheidend ist und nicht die Primär- und Sekundärstruktur, wird eine polare Lokalisation von *At2g23050* in der Epidermis der Keimblattprimordien, wie bei *ENP*, vermutlich durch dieses Motiv ermöglicht.



Um die Funktionalität der Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4*, *p35S:EGFP::ENP3-4* bzw. *p35S:23050::YFP* zu bestimmen, wurden Pflanzen, die jeweils eines der Transgene enthalten, mit „spirrigen“ *enp pid/enp* + Pflanzen gekreuzt. Adulte *enp pid/enp* + Pflanzen weisen einen auffälligen Blütenphänotyp auf. Die Sepalen sind regelmäßig zu einem Ring fusioniert, der die anderen Blütenorgane einschnürt, wodurch die Stamina vom Stigma getrennt werden. Die Pflanzen sind insofern semisteril, da eine Selbstbestäubung nur begrenzt möglich ist (Tremel et al., 2005). Im Vergleich zu ihnen enden die Sprossapices adulter *laterne*-Pflanzen zu 100 % blind, was immer zur Sterilität führt (Tab. 19). Die Adulten bilden außerdem zwar Rosettenblätter, aber keine Infloreszenzen (Abb. 17, Tremel et al., 2005).

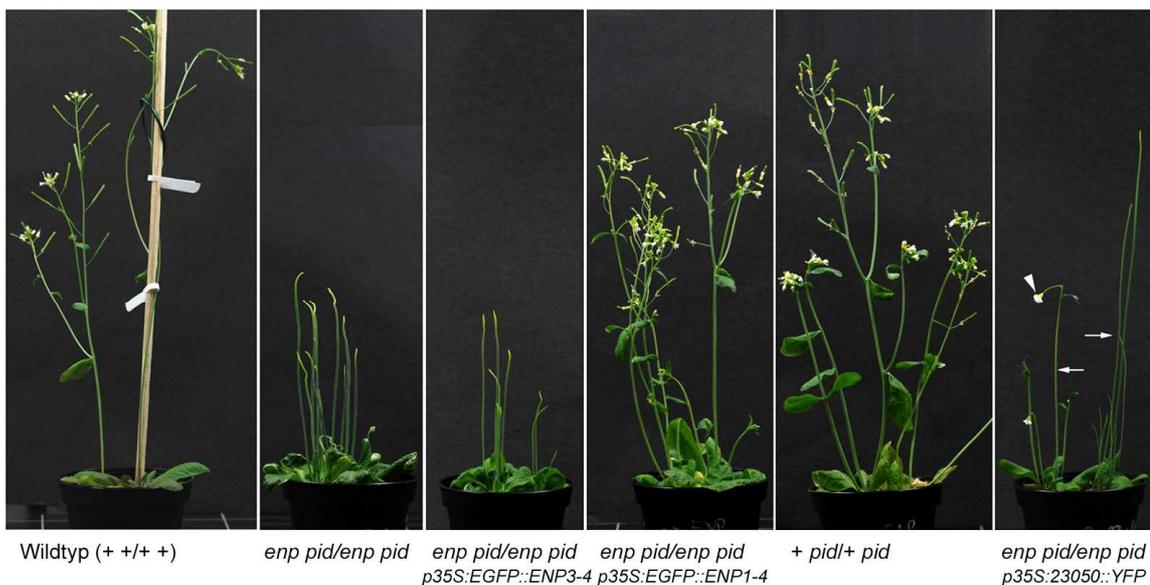


Abb. 17: Transgene Pflanzen mit *EGFP::ENP*- und *At2g23050::YFP*-Fusionskonstrukt. Von links nach rechts: Wildtyp Pflanze, *enp pid* doppelmutante Pflanze, *enp pid* Doppelmutante mit verkürztem *EGFP::ENP3-4* Transgen, *enp pid* Doppelmutante mit *EGFP::ENP1-4* Transgen, *pid* Einzelmutante, zwei *enp pid* doppelmutante Pflanzen (Pfeile) mit *23050::YFP* Transgen (Pfeilköpfe weisen auf blütenähnliche Strukturen hin). Alle Konstrukte stehen unter der Kontrolle des 35SCaMV Promotors.

Im Fall von transgenen homozygoten *pid enp* Pflanzen aus den zuvor genannten Kreuzungen, wurde eine mögliche Rettung des Phänotyps durch die jeweiligen Transgene mittels Phänotypisierung adulter F2-Pflanzen bestimmt. Die untersuchten Pflanzen zeichneten sich als Keimling durch den vollständigen Verlust von Keimblättern aus. Die F1-Generation segregierte jedoch noch drei weitere Klassen von Keimlingen: WT, trikotyle und monokotyle Pflanzen. Mittels Pyrosequenzierung wurden (unter Verwendung des PSQ<sup>TM</sup>96MA Systems von Biotage) 31 der aufgezogenen F2- bzw. F3-Keimlinge bzgl. *pid*, *enp* oder *pid enp* genotypisiert (Tab. 19). Repräsentative Pyrogramme bzgl. des ENP-SNPs sind in Abb. 18 zu sehen.

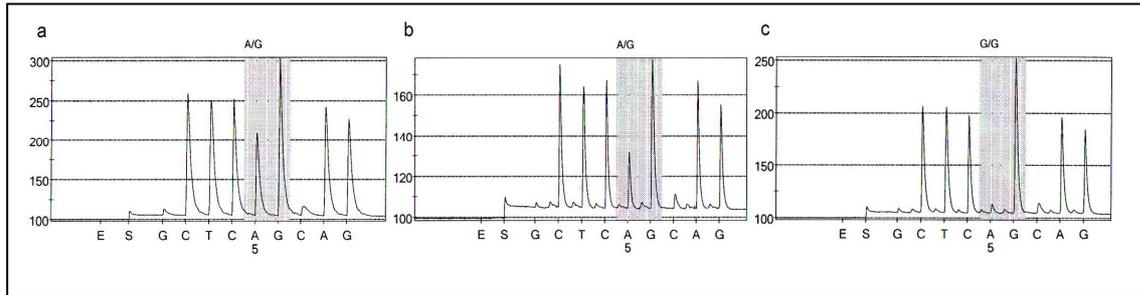


Abb. 18: Repräsentative Pyrogramme als Ergebnis der Pyrosequenzierung des ENP-SNPs aus der Kreuzung *p35S:EGFP::ENP1-4* X *enp pid/enp* +  
 (a) Homozygot *enp/enp*, (b) Heterozygot *enp/+*, (c) Wildtypisch *+/+*

Das mutierte *ENP*-Allel besitzt an Position 1824 ein Thymin statt dem wildtypischen Cytosin. Aufgrund der Sequenzierung des kodierenden Strangs des Gens, ist das wildtypische Allel Guanin und das mutierte Adenin. Die sequenzierte DNA-Sequenz lautet: CTC(G/A)GGAG. Das Verhältnis zwischen A-Peak und den anderen Peaks gibt an, ob *ENP* mutiert ist oder nicht. Eine Peak-Höhe des Adenosin im Bereich des SNPs von ca. 200 wurde als homozygot *enp/enp* bewertet. Das Verhältnis liegt hier bei ca. 3:2. Es kann jedoch nur schwer eine Aussage darüber getroffen werden, wie häufig das *ENP*-Transgen im Genom vorliegt. Dies erklärt, warum im Fall einer homozygoten *ENP*-Mutation trotzdem die Empfehlung des Pyrosequenzers für Heterozygotie zu sehen ist. Im Fall von *enp/+* ist das Verhältnis der Peakhöhen zu A ca. 3:1. Eine Bewertung der Pyrogramme, in denen der *PID*-SNP untersucht wurde, war zu jeder Zeit eindeutig.

Alle der 13 in beiden Loci untersuchten *laterne*-Phänotypen waren in *enp* und *pid* homozygot mutant. 7 weitere keimblattlose Individuen, die nur auf jeweils ein Gen getestet wurden, zeigten entweder *enp/enp* (2/2) oder *pid/pid* (5/5). Die beiden wildtypartigen Pflanzen waren *pid pid/enp* +. Die beiden trikotylen Pflanzen, in denen beide Loci analysiert wurden, waren entweder homozygot *pid* mutant oder zusätzlich heterozygot für *enp*, eine trikotyle Pflanze war wildtypisch für *enp*, sie wurde nicht auf *pid* getestet. Alle analysierten Monokotyle zeigten in beiden Genen eine homozygote Mutation (6/6).

Da zur Bestimmung der Funktionalität der Transgene nur Pflanzen mit homozygotem *enp pid* Hintergrund verwendet werden, ist die Phänotypisierung der Pflanzen als Keimlinge ein sicheres Verfahren um sicherzustellen, dass die analysierten adulten F2-Pflanzen tatsächlich in diesen beiden Loci mutiert sind.

Zur Quanti- und Qualifizierung des „Rescue“ durch die Transgene wurden folgende Kriterien angewendet: Eine Rettung des Phänotyps besteht im Falle von *pid enp* Doppelmutanten bereits, wenn die Stämme adulter Pflanzen zwar noch blind enden, jedoch gelegentlich Blütenstrukturen entwickeln, die jedoch nicht zur Fertilität führen. Eine verbesserte Rettung zeichnet sich durch einen *pid*-Phänotyp aus, wobei die Pflanzen durch die Bildung von abnormen Blüten mehr oder weniger fertil sind. Eine vollständige Rettung des Phänotyps durch das Transgen wäre nur dann gegeben, wenn die Pflanze wildtypartig und eine Selbstbestäubung ohne Einschränkung möglich ist.

Die Analyse dreier Linien ergab eine Rettung des Blütendefekts von mehr als 90 % *pid enp* Doppelmutanten durch das Transgen *p35S:EGFP::ENP1-4*. Die Stämme der Mutanten endeten nicht blind, sondern entwickelten Blütenstrukturen. Es ergab sich sogar eine Rettung, die über den *enp* Defekt hinaus geht. Ein Vergleich von *pid enp p35S:EGFP::ENP1-4* mit *pid* homozygoten Mutanten gab manchmal den Eindruck eines verbesserten Blüten- bzw. Blütenstandphänotyps wieder. Dies muss aber genauer analysiert werden, da z. B. in Abb. 17 kein Unterschied zu sehen ist. Im Vergleich zu dem ENP-Konstrukt, das die vollständige ENP-CDS enthält, war das verkürzte Konstrukt (*p35S:EGFP::ENP3-4*), dem ein Teil der BTB/POZ-Domäne fehlt, nicht in der Lage die *pid enp* Defekte zu retten. 100 % der phänotypisierten Pflanzen waren unfruchtbar, die Stämme blind endend (Tab. 19, Abb. 17). Pflanzen mit *p35S:23050::YFP* und *pid enp* Hintergrund entwickelten gelegentlich (bis zu 9 % der analysierten F1-Generation) sterile, blütenähnliche Strukturen (Tab. 19, Abb. 17). Dieser Effekt könnte, wie schon früher vermutet, durch einen Modifier verursacht werden, da diese Pflanzen ein gemischtes Col-0/Ler Genom besitzen (Treml et al., 2005).

| Genotyp  | Linie<br>(Anzahl<br>der<br>Pflanzen) | Adulte: <i>lat</i><br>blind<br>endende<br>Stämme;<br>steril<br><b>lat</b> | Rettung →   |  |   |
|--|--------------------------------------|---|---|--|---|
|  |                                      |   | Adult: <i>lat</i><br>blind endende<br>Stämme; steril;<br>gelegentliche<br>Blütenstrukturen<br><b>lat+</b> | Adult: <i>pid</i><br>abnorme<br>Blüten;<br>geringe<br>Fertilität<br><b>pid</b> | Adult <i>pid</i><br>abnorme<br>Blüten;<br>mäßige<br>Fertilität<br><b>pid+</b> |
| <i>pid enp/pid enp</i>                             | etabliert<br>(> 100)                 | 100%  | 0%  | 0%   | 0%  |
| <i>pid enp/pid enp</i><br><i>p35S:EGFP::ENP1-4</i> | 10-1<br>(n = 32)                     | 0%  | 6.25%   | 43.75%   | 50.00%  |
|  | 10-2<br>(n = 34)                     | 9%  | 0%  | 85.30%   | 6.00%   |
|  | 10-3<br>(n = 32)                     | 6.25%   | 18.75%  | 37.50%   | 37.50%  |
| <i>pid enp/pid enp</i><br><i>p35S:EGFP::ENP3-4</i> | 1-2<br>(n = 24)                      | 100%  | 0%  | 0%   | 0%  |
|  | 1-4<br>(n = 9)                       | 100%  | 0%  | 0%   | 0%  |
| <i>pid enp/pid enp</i><br><i>p35S:23050::YFP</i>   | Sp23-Y1<br>(n = 23)                  | 91.30%  | 8.70%   | 0%   | 0%  |
|  | Sp23-Y3<br>(n = 21)                  | 95.20%  | 4.80%   | 0%   | 0%  |
|  | Sp23-Y4<br>(n = 19)                  | 94.70%  | 5.30%   | 0%   | 0%  |

Tab 19. Rettung von *enp pid* Doppelmutanten durch ENP- und 23050-Konstrukte

### 3.4.2 Zelluläre und phänotypische Analyse der *p35S:EGFP::ENP* Wirkung in Folgegenerationen

Um die Funktionalität des ENP1-4 Transgens auch auf zellulärer Ebene bewerten zu können, wurden die F2- bzw. F3-Generationen der bereits im „Rescue“-Experiment verwendeten Linien analysiert. In der F2-Generation fanden sich, wie bereits unter 3.4.1 beschrieben, neben wildtypartigen und trikotylen Keimlingen auch Pflanzen, die sich als Keimling zwar durch eine vollständige Deletion der Kotyledonen auszeichneten, aber dennoch fertil sind. Dies ist normalerweise nicht möglich aufgrund der Sterilität der blütenlosen *pid enp/pid enp* Doppelmутanten. Diese fertilen *laterne*-Pflanzen produzieren zu 100 % Samen mit einem *laterne*-Phänotyp. Seltene Ausnahmen von Linien (z. B. 10-1-41), die zusätzlich noch wenige wildtypartige Samen segregieren, sind wahrscheinlich auf die unregelmäßige Aktivität des 35S-Promotors zurückzuführen. Um die subzelluläre Lokalisation von ENP und PIN1 in den folgenden Generationen der geretteten Pflanzen zu untersuchen, wurden Embryonen der F2-Pflanzen immunohistochemisch mit einem gegen PIN1 gerichteten Antikörper gefärbt und anschließend am LSCM analysiert (Abb. 19 **(A)**).

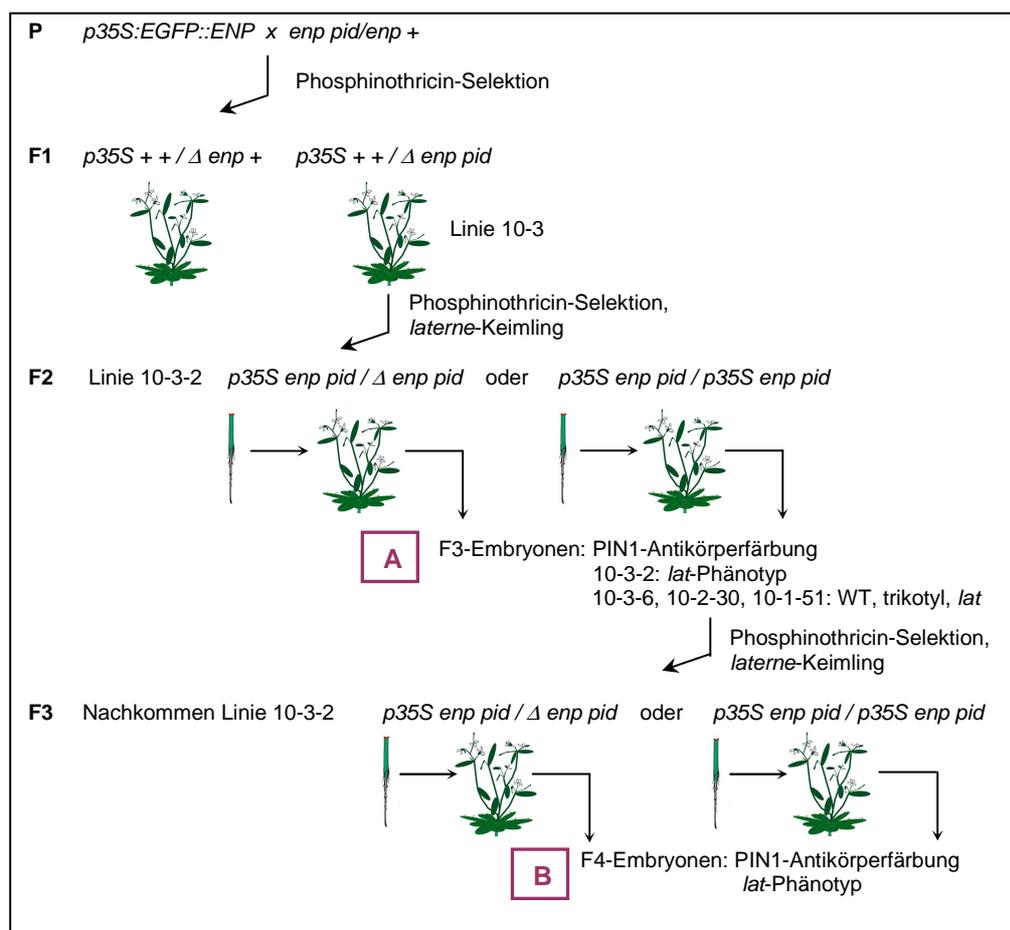


Abb. 19: Kreuzungsschema zur subzellulären Analyse der Wirkung von *p35S:EGFP::ENP* am Beispiel der Linie 10-3-2. Die Linien 10-3-6, 10-2-30, 10-1-51 segregierten *lat*-, wt-, trikotyle- Embryonen, Linie 10-3-2 nur *lat*-Embryonen, Es wurde auf Phosphinothricin und nach Generation F1 auch auf *laterne*-Phänotypen selektiert. Untersucht wurden F3-Embryonen mit *lat*-, wt-, trikotylem-Phänotyp **(A)** und F4-Embryonen mit *lat*-Phänotyp **(B)**

In wildtypartigen Embryonen akkumuliert EGFP::ENP in den Keimblättern an den apikalen Membranen der Epidermis, wie bereits die zelluläre Lokalisation der ENP-Proteine in *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen zeigte ( $n > 20$ , Abb. 20 a). PIN1 wird in der Epidermis der Keimblattprimordien und den vaskulären Vorläuferzellen exprimiert. In letzteren markiert PIN1 die basale Plasmamembran. In den epidermalen Zellen ist es wie erwartet in der apikalen PM lokalisiert ( $n > 20$ , Abb. 20 b; Steinmann et al., 1999; Benkova et al., 2003). Gleiches trifft auch für trikotyle Embryonen zu ( $n > 10$ , Abb. 20 d), wobei in seltenen Fällen die PIN1-Proteine unregelmäßiger verteilt sind und zwischen apikaler und basaler Membran wechseln ( $n = 2$ ). Dies ist schlüssig, da diese Embryonen drei Keimblätter besitzen und daher homozygot *pid*-mutant sind (Trembl et al., 2005). Abnormalitäten, welche die Anzahl der Keimblätter betreffen wurden bei Mutation in diesem Gen bereits dokumentiert (Bennett et al., 1995). In trikotylen Embryonen wird ENP an der apikalen PM der Epidermis lokalisiert, was einer wildtypischen Verteilung entspricht ( $n > 10$ , Abb. 20 c).

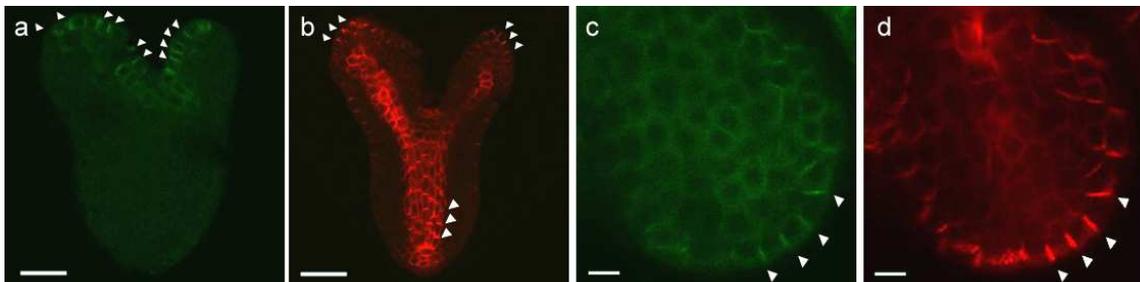


Abb. 20: Lokalisation von ENP bzw. PIN1 in transgenen *p35S:EGFP::ENP* F3-Embryonen aus der „Rescue“-Kreuzung (vgl. 3.4.1). (a, b) Wildtyp Embryo (c, d) Trikotyler Embryo. (a, c) Apikale ENP-Lokalisation in der PM, (b) Polare PIN1-Lokalisation in den epidermalen Zellen (apikal) und den vaskulären Elementen (basal) (d) Apikale PIN1-Lokalisation in der PM der Epidermis. Die Pfeilköpfe geben die polare Lokalisation von ENP bzw. PIN1 an. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m in a und b, 5  $\mu$ m in c und d.

In Embryonen mit *pid enp* homozygotem Phänotyp akkumuliert EGFP::ENP bis zum späten Herzstadium ebenso wie in trikotylen und wildtypartigen Keimlingen in der Epidermis der Kotyledonen an den apikalen Membranen ( $n = 20$ ; Abb. 21 a). Dies trifft teilweise auch für die Lokalisation von PIN1 zu, wobei eine eindeutige Zuordnung zur apikalen bzw. basalen PM schwer ist (Abb. 21 b). Eine Verteilung von PIN1 an der basalen PM der vaskulären Vorläuferzellen ist jedoch eindeutig ( $n > 50$ ; Abb. 21 b). Das ENP-Signal ist in den zentralen Zellen des Korpus (L3) am stärksten, wobei die ENP-Proteine diffus verteilt sind und eine eindeutige Zuordnung zu einer Seite der PM nicht möglich ist ( $n = 30$ ; Abb. 21 a). Die Expressionsdomäne ist über mehrere Zellen ausgedehnt und befindet sich in direkter Nähe zu den vaskulären Vorläuferzellen. Eine Lokalisation in den Zellen der späteren Leitelemente ist bis zum Herzstadium nur von PIN1 zu sehen und zwar an der basalen PM. Sie stimmt folglich mit der Domäne in wildtypartigen Embryonen überein (Abb. 21 b).

*pid enp/pid enp*-Embryonen im jungen Torpedostadium zeigen neben der apikalen Lokalisation von ENP in den epidermalen Zellen der Kotyledonen ( $n = 10$ ) zusätzlich ein schwaches GFP-Signal in den vaskulären Elementen ( $n = 10$ ; Abb. 21 c), was einer wildtypischen Verteilung des PIN1 Efflux-Carriers entspricht (Abb. 21 d).

Die Positionierung des PIN1-Signals in Torpedostadien unterscheidet sich nicht von den jüngeren Embryonalstadien. Die Lokalisation von PIN1 in der Epidermis war in allen untersuchten Stadien nicht eindeutig der basalen oder apikalen Seite der PM zuzuordnen ( $n > 50$ ; Abb. 21 d).

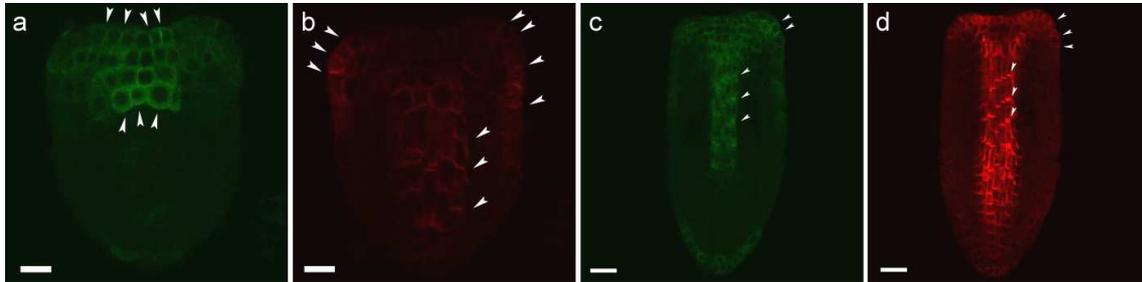


Abb. 21: Lokalisation von ENP bzw. PIN1 in transgenen *p35S:EGFP::ENP F3-laterne*-Embryonen aus der „Rescue“-Kreuzung. (a) Embryo im späten Herzstadium mit diffuser ENP-Lokalisation in der L3-Schicht und apikaler in den epidermalen Zellen, (b) Embryo im späten Herzstadium mit PIN1-Lokalisation in epidermalen und vaskulären Zellen, (c) Embryo im Torpedostadium mit polarer ENP-Lokalisation in epidermalen und vaskulären Zellen, (d) Embryo im Torpedostadium mit polarer PIN1-Lokalisation in epidermalen und vaskulären Zellen. Die Pfeilköpfe markieren die ENP- bzw. PIN1-Lokalisation. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m in A und B, 20  $\mu$ m in C und D

Um die Wirkung des ENP1-4 Transgens auch auf die nächste Generation zu prüfen, wurden die Nachkommen von 4 Linien der F2-Generation (Linien 10-3-2, 10-3-6, 10-2-30, 10-1-51) aufgezogen und die Verteilung von ENP und PIN1 im Embryo analysiert (Abb. 19 (B)). Dabei stellte sich heraus, dass eine dieser Linien zu 100 % *laterne*-Keimlinge produziert (10-3-2), die teilweise fertil sind. Die übrigen Linien segregierten bis zu 4 Klassen von Keimlingsphänotypen (WT, *laterne*, Monokotyl und Trikotyl). Alle 4 analysierten F3-Pflanzen, die sich als Keimling durch eine Deletion ihrer Keimblätter auszeichneten, segregierten ausschließlich *laterne*-Embryonen.

In manchen Fällen konnte bereits eine sehr frühe Lokalisation von EGFP::ENP ab dem beginnenden Herzstadium beobachtet werden ( $n = 10$ ; Abb. 22 a). Die ENP Proteine sind hier und auch in älteren Stadien wie in den F3-Embryonen im Zentrum der L3-Schicht diffus verteilt ( $n = 35$ ; Abb. 22 d). Teilweise kann eine stärkere Positionierung zu einer Seite beobachtet werden ( $n = 10$ ; Abb. 22 a), die dann auch mit PIN1 kolokalisiert (Abb. 22 a). Eine exakte Zuordnung des GFP-Signals zur apikalen bzw. basalen Seite der PM in der Epidermis ist nicht möglich ( $n > 20$ ; Abb. 22 c). Der Auxin Efflux-Carrier akkumuliert in den vaskulären Zellen basal und entspricht damit dem wildtypischen Verteilungsmuster ( $n > 50$ ; Abb. 22 e; Steinmann et al., 1999, Benkova et al., 2003). Während der fortschreitenden Embryogenese ist ab dem Torpedostadium ein EGFP::ENP-Signal ebenso in den späteren Leitelementen an der basalen Seite der PM zu erkennen ( $n = 20$ ; Abb. 22 c). Eine eindeutige Lokalisation der PIN1-Proteine in den epidermalen Zellen der Keimblattprimordien war jedoch nicht möglich ( $n > 50$ ; Abb. 22 e). In manchen Fällen ist EGFP::ENP in diesen Zellen an der apikalen Seite der PM zu erkennen ( $n = 10$ ; Abb. 22 f), ansonsten ist die Ausrichtung des Signals auch hier nicht klar einer Seite zuzuordnen ( $n > 20$ ).

Ein zusammenfassender Überblick zeigt, dass weder in den F3- noch in den F4-Embryonen ein eindeutiges Muster zur Lokalisation von ENP-Proteinen zu erkennen ist. Es wurde jedoch der Eindruck gewonnen, dass die basale ENP-Lokalisation in den vaskulären Elementen in nachfolgenden Generationen häufiger zu erkennen ist. Eine konstante zelluläre Positionierung von EGFP::ENP ist ebenso wenig zu identifizieren wie eine Rettung des embryonalen Phänotyps. Dies kann auf die irreguläre Aktivität des 35S-Promotors zurückgeführt werden, die sich weder auf ein bestimmtes Alter noch auf bestimmte Zellen zuordnen lässt. Da PIN1 von ENP beeinflusst wird, lässt sich durch die unregelmäßige Lokalisation von EGFP::ENP in den epidermalen Zellen auch die von PIN1 erklären.

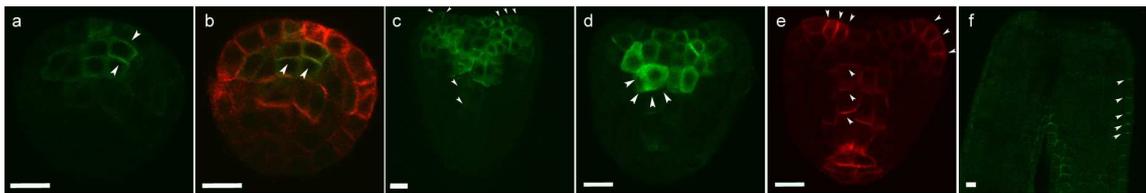


Abb. 22: Lokalisation von ENP bzw. PIN1 in transgenen *p35S:EGFP::ENP F4-laterne*-Embryonen aus der „Rescue“-Kreuzung. (a) Embryo im frühen Herzstadium mit polarer Lokalisation von ENP in der L3-Schicht (b) Embryo im frühen Herzstadium mit Überlagerung des GFP- und Cy3-Signals. (c) Embryo im späten Herzstadium mit polarer ENP-Lokalisation in epidermalen und vaskulären Zellen. (d) Embryo im Herzstadium mit diffuser ENP-Verteilung in der L3-Schicht. (e) Embryo im Herzstadium mit polarer PIN1-Lokalisation in epidermalen und vaskulären Zellen (f) Embryo im späten Torpedostadium mit apikaler ENP-Lokalisation. Die Pfeilköpfe markieren die ENP- bzw. PIN1-Lokalisation. Maßstabsbalken: 10 µm.

### 3.5 Inhibitorstudien zur Analyse von ENP

Die Lokalisation von ENP und PIN1 zeigen eine deutliche Überlappung in der Epidermis von *Arabidopsis* Embryonen (Abb. 11). Trotzdem konnte in keinem Yeast Two-Hybrid Experiment eine direkte Interaktion von PIN1 und ENP nachgewiesen werden (Furutani et al., 2007). Diese Tatsache könnte auf ein weiteres Protein hinweisen, dass die Bindung von ENP an den Auxin Efflux-Carrier vermittelt. Um die Kolo-kalisation von ENP und PIN1 näher zu charakterisieren, wurde ihr Verhalten auf Toxine vergleichend analysiert. Insgesamt wurden dabei mehr als 2000 Embryonen analysiert. Für jeden Versuch wurden als Negativkontrolle die transgenen Embryonen in dem Solvent des Toxins gelöst. Gleichzeitig beinhalten alle Experimente einen parallel laufenden Test mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen, sowie mit *pAtSNX1:AtSNX1::GFP* Embryonen bei Wortmannin.

Inhibitoren, die den polaren Auxin Transport stören, sind wichtig, um die Rolle des polaren Auxintransports während der Pflanzenentwicklung untersuchen zu können. Ihre genaue Wirkungsweise bleibt jedoch unklar. Auxin wird durch die ungleiche Verteilung von Efflux-Carriern, z. B. PIN1, in der Plasmamembran transportiert. Es stellte sich die Frage, ob auch durch den Einfluss eines pharmakologischen Agens der Transport von ENP und seine Lokalisation in der Epidermis im *Arabidopsis* Embryo gestört werden.

Zunächst wurde der Effekt von Cycloheximid auf die Lokalisation von ENP untersucht. Dieses von Streptomyceten produzierte Antibiotikum unterbindet durch die Hemmung der Translation die Proteinbiosynthese. Eine Inkubation transgener *p35S:EGFP::ENP* Embryonen für 3,5 h mit 50  $\mu$ M CHX (n = 56) zeigte im Vergleich zur ENP-Negativkontrolle (n = 50) keinen Unterschied in der Positionierung von ENP an der Plasmamembran (vgl. Abb. 23 a, b mit c, d). Dieses Ergebnis ist dem von PIN1 sehr ähnlich und lässt erkennen, dass ENP nur sehr langsam umgesetzt wird (Geldner et al., 2001). PIN1 zeigte im Vergleich zur Pufferkontrolle (n = 40) keine Reaktion auf eine Inkubation von 50  $\mu$ M CHX für 2 h (n = 50) (vgl. Abb. 23 e, f mit g, h).

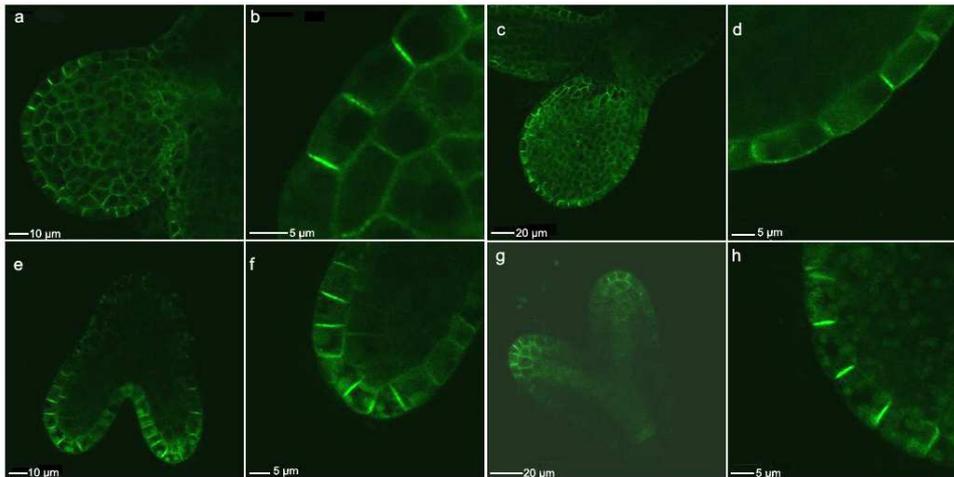


Abb. 23: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit Cycloheximid.

(a, b) Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 50  $\mu$ M CHX für 3,5 h (n = 56).  
(c, d) Parallele Kontrolle mit transgenen *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 50). (e, f) *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 50  $\mu$ M CHX für 2 h (n = 50).  
(g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 2 h bzw. 3 h (n = 40).

Um den Einfluss des Zytoskeletts auf die ENP Lokalisation zu bestimmen, wurden *Arabidopsis* Embryonen mit dem Mikrotubuli-spaltenden Agens Oryzalin und mit Cytochalasin D, das Aktinfilamente depolymerisiert, behandelt. Das Zytoskelett legt nicht nur die Zellmorphologie fest, sondern ermöglicht auch den gezielten Vesikeltransport in allen eukaryotischen Zellen. In tierischen Zellen wurde gezeigt, dass Mikrotubuli hauptsächlich am perinuclearen Vesikeltransport beteiligt sind (Goode et al., 2000). Aber auch in Pflanzenzellen tragen Mikrotubuli zum polaren Vesikeltransport bei. Die genaue Aufgabe des Mikrotubuli Zytoskeletts bleibt im Großen und Ganzen jedoch unklar (Boutté et al., 2005), da es schwierig ist die direkte Wirkung der Mikrotubuli von den Folgen ihrer Depolymerisierung zu unterscheiden. In *Arabidopsis* spielen Mikrotubuli bei der Aufrechterhaltung der Polarität von PIN1 keine Rolle (Boutte et al, 2006). Diese Aussage wird durch die Inkubation von transgenen *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen (n = 80) mit dem Mikrotubuli depolymerisierenden Toxin Oryzalin bestätigt (vgl. Abb. 24 e, f mit g, h). Allerdings konnte in Studien mit *Arabidopsis* Wurzeln ein Effekt durch Oryzalin auf die PIN1-Polarität bei sich teilenden Zellen beobachtet werden (Geldner et al., 2001). ENP-Embryonen (n = 117) zeigen im Vergleich zu PIN1 sowie zur internen Negativkontrolle (n = 100) ebenso keine Reaktion auf Oryzalin (vgl. Abb 24 a, b mit c, d). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass intakte Mikrotubuli für die Aufrechterhaltung der ENP-Polarität nicht notwendig sind.

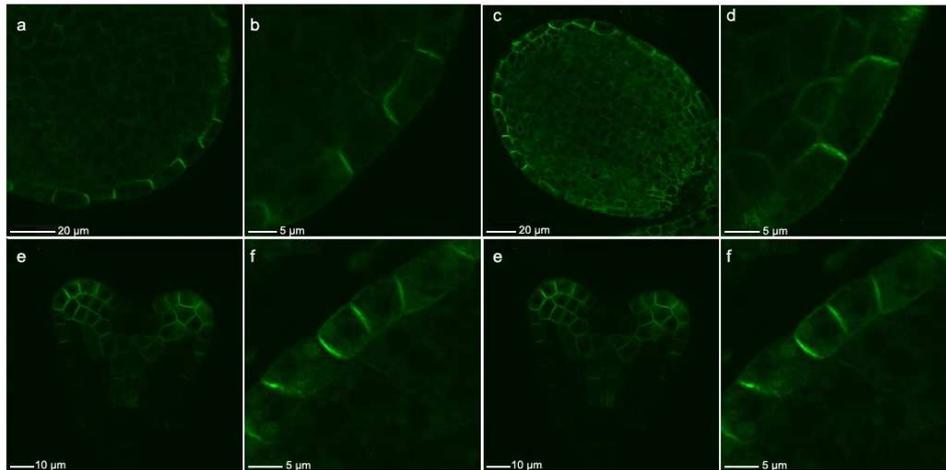


Abb. 24: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit Oryzalin.

(a, b) Transgene *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in 40 μM Oryzalin für 5 h (n = 117). (c, d) Parallele Kontrolle mit transgenen *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 5 h bzw. 2 h (n = 100). (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in 40 μM Oryzalin für 5 h bzw. 4,5 h (n = 80). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 4 h bzw. 4,5 h (n = 70).

Das Aktinzytoskelett ermöglicht in Pflanzenzellen einen gezielten Vesikeltransport während der Interphase und ist sowohl für den Auxin Transport als auch für die Wiedergewinnung von PIN1 durch Endozytose unerlässlich (Dhonukshe et al., 2008; Geldner et al., 2001). Cytochalasin D bindet Aktinfilamente und blockiert auf diese Weise die Polymerisation und Elongation von Aktin. Mögliche Folgen der Inhibierung können eine Veränderung der Zellmorphologie, eine Blockierung zellulärer Vorgänge, z. B. Mitose, oder sogar die Aktivierung p53-abhängige Signalübertragungswege sein, die den programmierten Zelltod auslösen. Doch eine Inkubation 47 transgener Embryonen mit 20 μM dieses Toxins veränderte die Lokalisation von ENP nicht (vgl. Abb. 25 a, b mit c, d). Auch PIN1 zeigt keinen direkten Effekt durch Cytochalasin D (n = 25) (vgl. Abb. 25 c, d mit e, f).

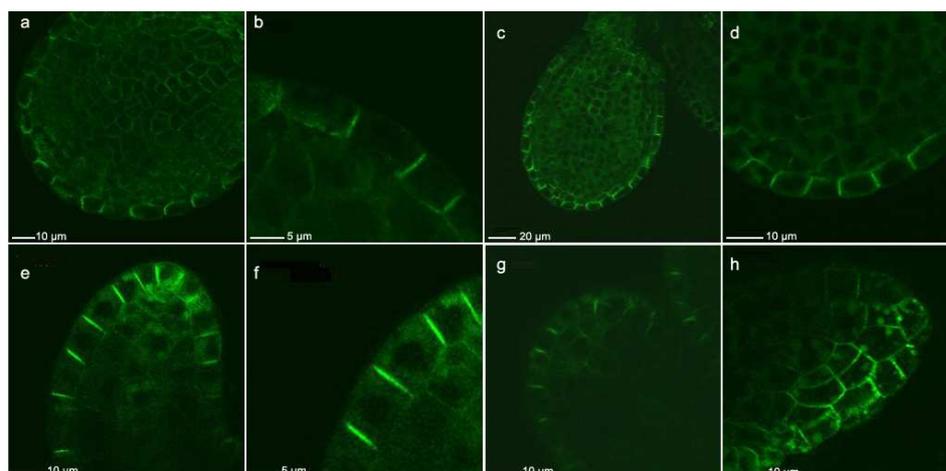


Abb. 25: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit Cytochalasin.

(a, b) *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen; 5 h bzw. 1,5 h 20 μM Cytochalasin (n = 47). (c, d) Parallele Kontrolle mit *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen, 7 h Puffer (n = 30). (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen; 2,5 h 20 μM Cytochalasin (n = 25). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen; 2,5 h bzw. 3 h Puffer (n = 25).

Die Sensitivität der Polarität von ENP wurde mit Wortmannin auch auf die Endozytose von Vesikeln getestet. Dieses Toxin beeinflusst das Recycling, indem es die PI3Ks (Phosphoinositid-3-Kinasen) inhibiert, die an Membrantransportprozessen in Endosomen beteiligt sind. PIN1 ist gegenüber Wortmannin insensitiv (Jallais et al., 2006). Doch *AtSNX1*, das den Auxin-Transportweg beeinflusst, führt bei der Inkubation von *Arabidopsis* Wurzeln zu ein bis zwei vergrößerten Vesikeln pro Zelle mit vakuolen Kompartimenten, die *AtSNX1* enthalten (Jaillais et al., 2006). Während bei der Lokalisation von PIN1-GFP nach der Inkubation mit Wortmannin keine Reaktion beobachtet wurde (n = 20), waren in *pAtSNX1:AtSNX1::GFP* Embryonen bereits nach einer Inkubation von 1 h Vesikel mit vergrößerten Vakuolen pro Zelle sichtbar (n = 32) (vgl. Abb. 26 e, f mit i, k). Die Negativkontrolle zeigte außer unspezifischer GFP-Signale keine Reaktion (n = 25) (Abb. 26 l, m). Auch die Positionierung von ENP in der Epidermis nach einer Behandlung mit Wortmannin (n = 42) war nicht von den Kontrollembryonen (n = 24) zu unterscheiden (vgl. Abb. 26 a, b mit c, d).

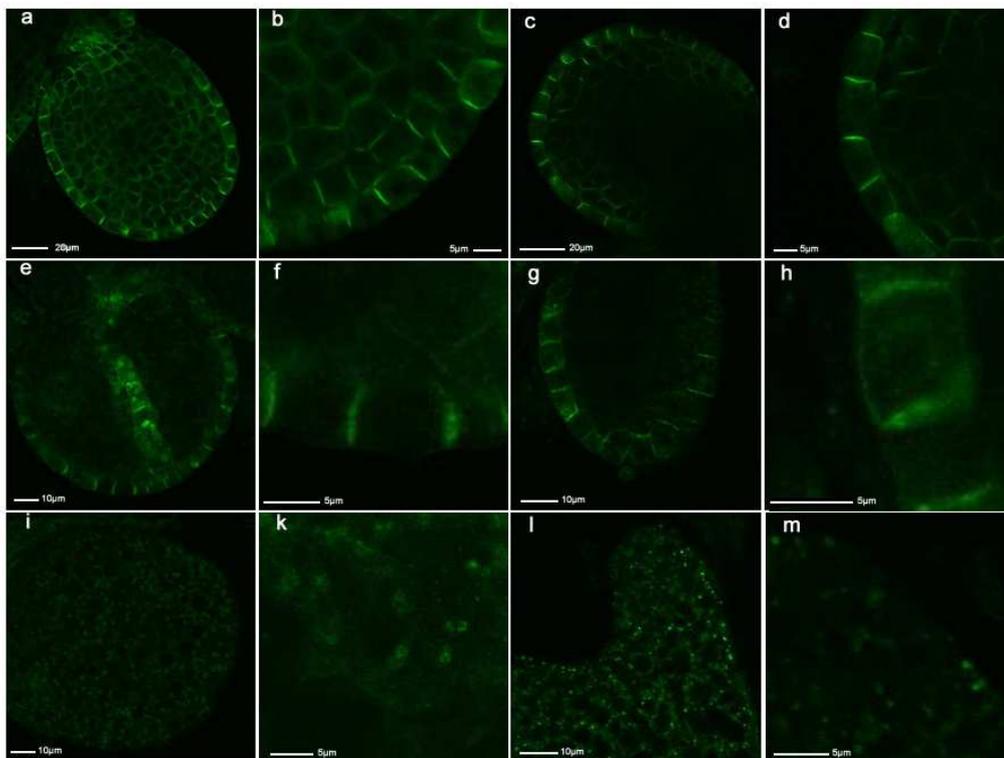


Abb. 26: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit Wortmannin.

(a, b) Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 33  $\mu$ M Wortmannin für 1 h (n = 42). (c, d) Parallele Kontrolle mit *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 24). (e, f) *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 33  $\mu$ M Wortmannin für 1 h (n = 20). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 2,5 h (n = 11). (i, k) *pAtSNX1:AtSNX1::GFP* Embryonen in 33  $\mu$ M Wortmannin für 1 h. (l, m) Parallele Kontrolle mit *pAtSNX1:AtSNX1::GFP* Embryonen in Puffer für 2,5 h (n = 25).

Als nächstes wurde der Effekt von Auxin Efflux Inhibitoren auf ENP getestet. NPA inhibiert das Wachstum von *Arabidopsis* Wurzeln durch eine Begrenzung der Zellproduktionsrate. PIN1 wird dadurch jedoch nicht fehlerhaft lokalisiert (Rahmann et al., 2007). Auch in *Arabidopsis* Embryonen wurde keine Veränderung in der Positionierung der PIN1-Proteine nach Applikation mit NPA beobachtet (n = 78, 50 µM NPA) (Abb. 27 e-h). ENP-GFP zeigte in transgenen *Arabidopsis* Embryonen ebenso keine Reaktion auf die Inkubation mit dem Inhibitor (n = 82) (Abb. 27 a-d).

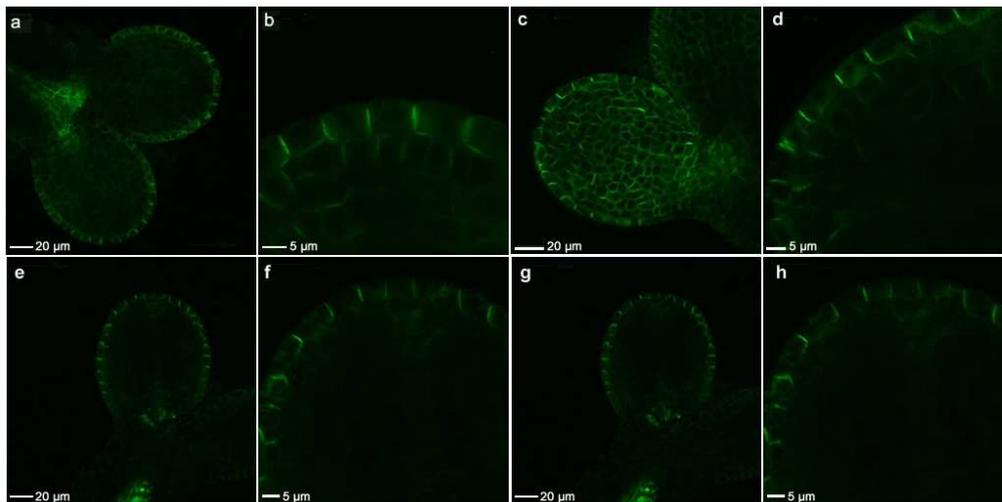


Abb. 27: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit NPA.

(a, b) Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 50 µM NPA für 5 h bzw. 3 h (n = 82). (c, d) Parallele Kontrolle mit transgenen *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h bzw. 4 h (n = 55). (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in 50 µM NPA für 3 h bzw. 4,5 h (n = 78). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 46).

Der Auxin Efflux Inhibitor TIBA hemmt die aktinabhängige Rückgewinnung von Proteinen und das Zyklieren des Auxin Efflux-Carriers PIN1 zwischen den Membranen. In *Arabidopsis* inhibiert TIBA, ebenso wie NAA, das Wachstum von Primärwurzeln (Rahmann et al., 2007). Der Effekt des Toxins auf die PIN1 Lokalisation ist jedoch nur gering (Geldner et al., 2001). Eine Inkubation von transgenen *Arabidopsis* Embryonen mit TIBA zeigte sogar bei hohen Konzentrationen (100 µM, 3 h) keine Reaktion auf PIN1 (n = 30) und ENP (n = 44) (Abb 28. a-d und e-h).

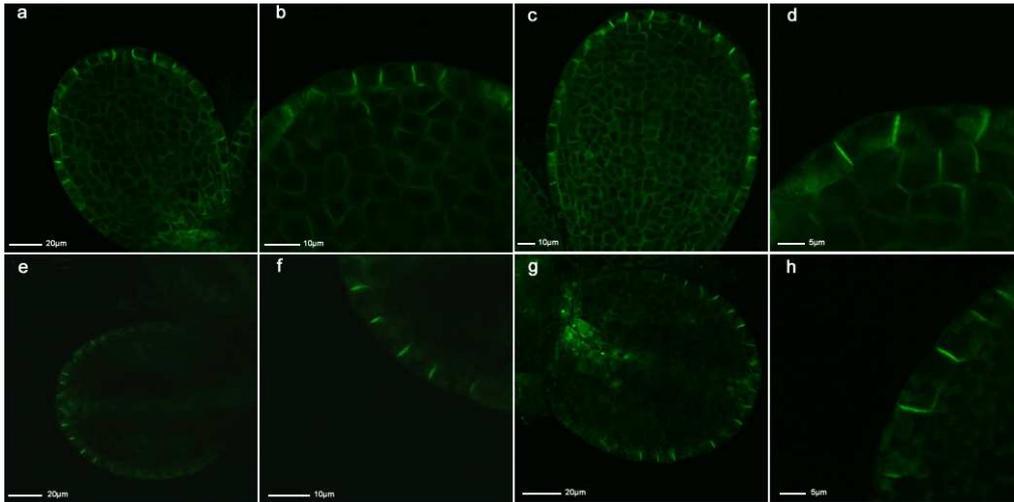


Abb. 28: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit TIBA.

(a, b) *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 100  $\mu\text{M}$  TIBA für 3 h (n = 44).  
 (c, d) Parallele Kontrolle mit transgenen *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 32). (e, f) *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 100  $\mu\text{M}$  TIBA für 3 h (n = 30).  
 (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 25).

Der Auxin Influx Inhibitor NOA könnte die Positionierung von ENP in der Epidermis verändern. Die Inhibierung des Influx durch eine Inkubation mit dem Toxin beeinflusste jedoch bei einer Konzentrationen von 130  $\mu\text{M}$  für 3 h die polare PM oder intrazelluläre Lokalisation von PIN1 in Übereinstimmung mit früheren Analysen von *Arabidopsis* Wurzeln (Kleine-Vehn et al., 2006) nicht. Auch ENP zeigte keine Wirkung (Abb. 29 a-d bzw. e-h).

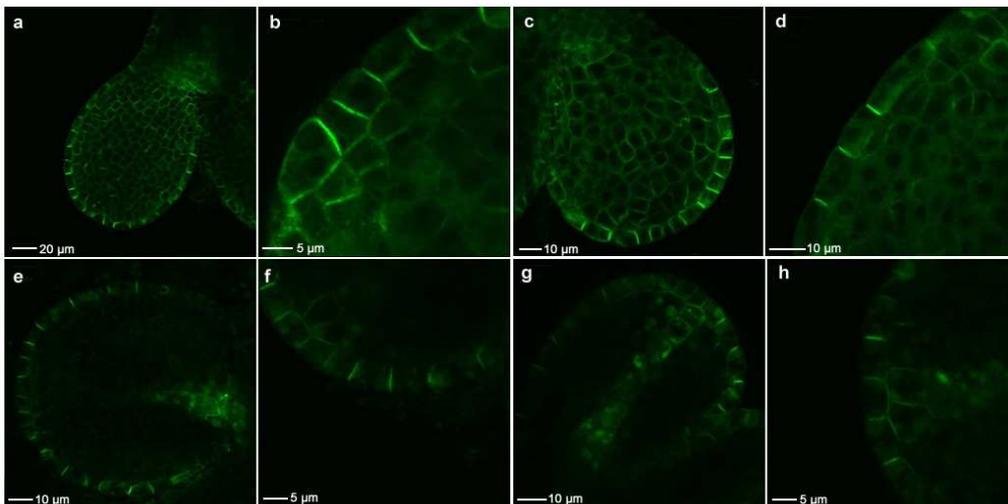


Abb. 29: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit NOA.

(a, b) *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 130  $\mu\text{M}$  NOA für 3 h (n = 58).  
 (c, d) Parallele Kontrolle mit transgenen *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 45). (e, f) *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 130  $\mu\text{M}$  NOA für 3 h (n = 41).  
 (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 38).

Das synthetische Auxin NAA diffundiert in die Pflanzenzelle carrier unabhängig und begrenzt unter anderem das Wurzelwachstum in *Arabidopsis* durch die Länge der Wachstumszone (Rahmann et al., 2007). Hier soll getestet werden, ob ENP durch eine erhöhte intrazelluläre Auxinmenge beeinflusst wird. Von den 75 transgenen ENP-Embryonen zeigte keiner eine Reaktion auf eine Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  NAA für 3 h (Abb. 30 a-d). Auch die Lokalisation von PIN1 wurde bei Behandlung mit NAA nicht verändert (Abb. 30 e-h).

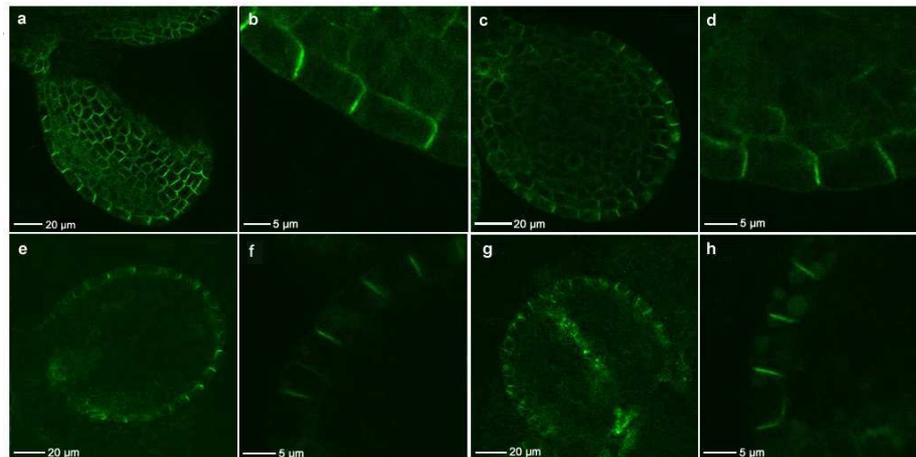


Abb. 30: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit NAA. (a, b) *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in 10  $\mu\text{M}$  NAA für 3 h (n = 75). (c, d) Parallele Kontrolle mit *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 40). (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen; 1,25 h bzw. 4,5 h 10  $\mu\text{M}$  NAA (n = 60). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen; 1 h bzw. 4,5 h in Puffer (n = 42).

Im Gegensatz zu NAA wird das synthetische Auxin 2,4-D mittels carrier in die Pflanzenzelle transportiert und blockiert das Wurzelwachstum über eine Reduktion der Zellproduktionsrate. Eine Inkubation transgener Embryonen mit 2,4-D beeinflusste weder die Lokalisation von PIN1 noch von ENP (Abb. 31 a-d bzw. e-h).

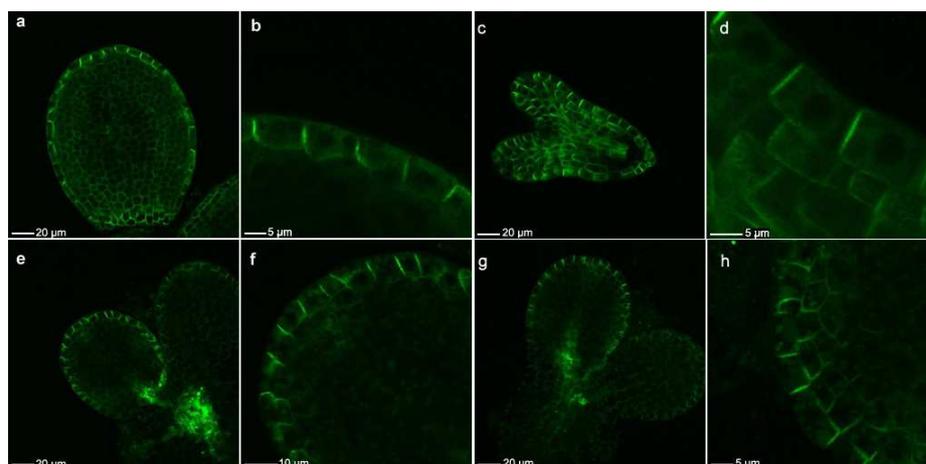


Abb. 31: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit 2,4-D. (a, b) *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen; 3,5 bzw. 2 h 0,6  $\mu\text{M}$  2,4-D (n = 124). (c, d) Parallele Kontrolle mit *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 2 h (n = 70). (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in 0,8  $\mu\text{M}$  2,4-D für 2,5 h (n = 50). (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 2,5 h (n = 50).

Sterole sind lipophile Bestandteile von Membranen und für eine Vielzahl zellulärer Prozesse notwendig. Ihre Funktion wurde durch pharmakologische und genetische Manipulation der Sterolbiosynthese analysiert. Die genauen Mechanismen wie Sterole zelluläre Vorgänge beeinflussen bleiben allerdings weiter unklar. Während der Endozytose und bei der polaren Ausrichtung von Proteinen übernehmen Sterole in Pflanzen eine wichtige Aufgabe (Boutté et al., 2009). Das Toxin Filipin bindet Sterole (Grebe et al., 2002) und blockiert die Endozytose von Plasmamembranproteinen, wobei die Wirkung auf die Lokalisation von PIN1 nur gering ist (Kleine-Vehn et al., 2006). Insgesamt wurden 29 Embryonen auf ihre Reaktion bzgl. ENP nach Behandlung mit 100  $\mu$ M Filipin untersucht, wobei in keinem Fall ein Unterschied zur Negativkontrolle (n = 20) beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 32 a, b mit c, d). Der in der Literatur angegebene Effekt von Filipin auf PIN1 war in keinem der 25 Embryonen zu sehen (Abb. 32 e-h).

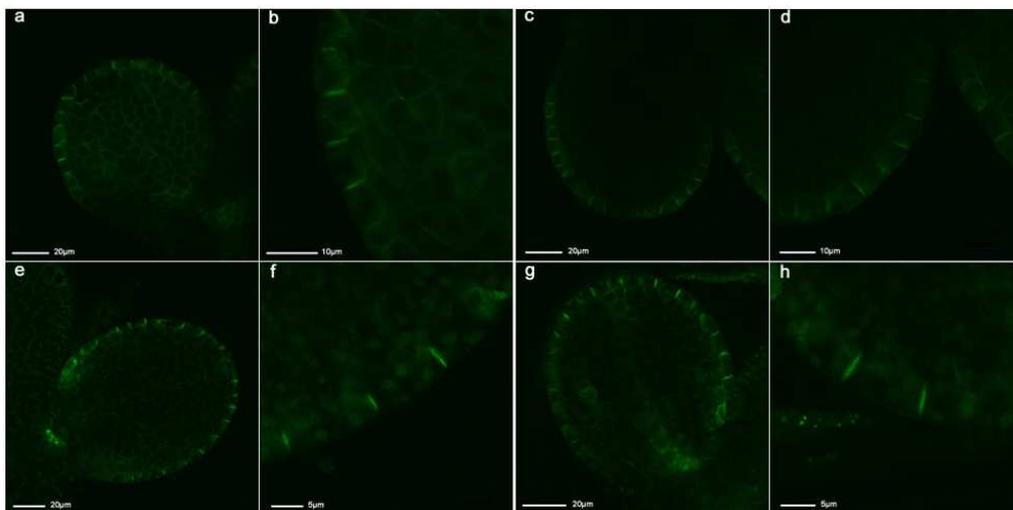


Abb. 32: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit Filipin.

- (a, b) Transgene *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in 100  $\mu$ M Filipin für 3 h (n = 29).
- (c, d) Parallele Kontrolle mit *p35S::EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 20).
- (e, f) *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in 100  $\mu$ M Filipin für 3 h (n = 25).
- (g, h) Parallele Kontrolle mit *pPIN1::PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 15).

Der endozytotische Vesikeltransport ist für die Regulierung der Aktivität und die Lokalisation von PM-Proteinen unerlässlich. Das Membranprotein PIN1 ist in Pflanzenzellen polar lokalisiert und fördert den zellulären Efflux von Auxin. PIN1 wird fortwährend von der Plasmamembran aufgenommen (Endozytose) und in Abhängigkeit von GNOM ARF-GEF, einem BFA-sensitiven GDP/GTP Austauschfaktor, wieder gewonnen (Exozytose). ENP wurde daher auf die Sensitivität von BFA getestet. BFA inhibiert die Exozytose und beeinflusst den Proteintransport ausgehend vom Golgi-Apparat bis zum Endoplasmatischen Retikulum, was zu einer Anhäufung von Proteinen innerhalb des ERs führt. Das Toxin inhibiert dadurch den zellulären Auxin Efflux, hebt die polare Lokalisation von PIN1 an der PM auf (Delbarre et al., 1998) und induziert die Anhäufung von PIN1 in der Zelle in sogenannte BFA-Kompartimente (Steinmann et al., 1999). Dieser Effekt ist vollständig reversibel und verdeutlicht, dass PIN1 konstitutiv zwischen PM und Endosomen zirkuliert (Geldner et al., 2001). Eine Inkubation transgener *pPIN1::PIN1::GFP Arabidopsis* Embryonen mit 50  $\mu$ M BFA

bestätigt diese Aussage (n = 50). Nach 2 h sind deutlich zwei große intrazelluläre Kompartimente zu sehen, die PIN1-Proteine enthalten. Das GFP-Signal an der PM blieb jedoch erhalten (Abb. 33 c). In der Negativkontrolle waren keine BFA-Kompartimente zu erkennen (n = 30) (Abb. 33 d). Ein Waschschriff von 2 h nach einer Inkubation mit BFA belegte die Aussage, dass der Effekt des Toxins auf PIN1 reversibel ist (n = 10) (Abb. 33 e). Im Gegensatz zu PIN1 wird ENP nicht über BFA-sensitive Vesikel transportiert. Dies zeigt die Reaktion von *Arabidopsis* Embryonen bei einer Inkubation mit 50 µM BFA. Sogar nach einer verlängerten Inkubation von 3 h waren keine Kompartimente, die ENP enthalten, zu beobachten (n = 74) (Abb. 33 a). Die polare Lokalisation an der PM blieb ebenso erhalten. Dieses Ergebnis lässt erkennen, dass der Transport von PIN1 und ENP voneinander getrennt werden kann, da die Beförderung von ENP im Gegensatz zu PIN1 BFA-insensitiv ist.

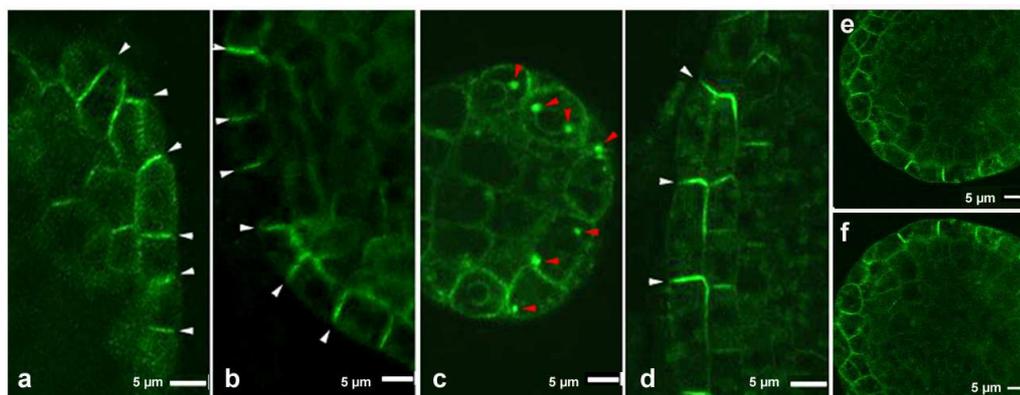


Abb. 33: Behandlung von transgenen *A. thaliana* Embryonen mit BFA.

(a) Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 50 µM BFA für 3 h (n = 74). (b) Parallele Kontrolle mit *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in Puffer für 3 h (n = 50). (c) *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 50 µM BFA für 1,5 h (n = 50). (d) Parallele Kontrolle mit *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in Puffer für 2 h (n = 30). (e) Transgene *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen in 50 µM BFA für 3 h sowie 2 h H<sub>2</sub>O (n = 10). (f) Transgene *p35S:EGFP::ENP1-4* Embryonen in 50 µM BFA für 3 h sowie 2 h H<sub>2</sub>O. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von ENP bzw. PIN1. Rote Pfeile markieren die Akkumulation von PIN1 in endogene Kompartimente nach der Behandlung mit BFA.

Ein zusammenfassender Überblick der pharmakologischen Tests zeigt, dass ENP in ähnlicher Weise auf Toxine und Auxin-Analoga reagiert wie PIN1 und sich auch in seiner Sensitivität gegenüber der getesteten Pharmazeutika kaum unterscheidet.

### 3.6 Entstehung von Bilateralsymmetrie

Während der Embryogenese von *Arabidopsis thaliana* wird durch Zelldifferenzierungsprozesse entlang der apikal-basalen und radiären Axe der primäre Körperbauplan festgelegt. Im Transitionsstadium entwickeln sich die Keimblattprimordien und wandeln die äußerliche radiäre in eine Bilateralsymmetrie um. Die dahinterstehenden molekularen Mechanismen zur Bildung der Bilateralsymmetrie sind nicht bekannt. Es lassen sich jedoch bereits ab dem Transitionsstadium lokale Auxinmaxima an zwei gegenüberliegenden Stellen des Embryoapex nachweisen

(Benkova et al., 2003). Der Auxin Efflux-Carrier PIN1 ist in den apikalen Membranen der epidermalen Vorläuferzellen lokalisiert und vermittelt vermutlich bereits zu diesem Zeitpunkt die Akkumulation des Hormons in den Spitzen der entstehenden Keimblattprimordien, wodurch die Bilateralsymmetrie des Embryos erkennbar wird. Eine Schicksalskartierung im Bereich des SAM zeigte bei *Arabidopsis* Embryonen, dass sich die Keimblätter asymmetrisch zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese entwickeln (Woodrick et al., 1999).

Es bleibt jedoch zu klären, wie Bilateralssymmetrie entsteht. Eine dreidimensionale Analyse transgener *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen kann Aufschluss über eine mögliche asymmetrische Verteilung von PIN1 im Bereich des Embryoapex geben und damit den Ursprung von Bilateralsymmetrie durch den apikalen Auxintransport beweisen. Da im Transitionsstadium bzw. frühen Herzstadium die Keimblattprimordien bereits zu erkennen sind, müssen für diesen Versuch Embryonen vor diesem Stadium untersucht werden.

Insgesamt wurden 115 *pPIN1:PIN1::GFP* Embryonen zwischen dem 8-Zellstadium und dem Transitionsstadium auf die Lokalisation von PIN1::GFP analysiert. 14 Embryonen wurden nicht ausgewertet. Folgende Kriterien wurden angewendet: Stadium; Vollständigkeit; Feinbestimmung des Signals in lateral, zentral, lateral; apikale/basale Signale in „upper tier“ (u.t.) und „lower tier“ (l.t.). Da sich aus dem u.t. später neben dem SAM auch die Keimblätter entwickeln, wurde auf die Signalverteilung in diesem Bereich des Embryos besonderen Wert gelegt (Tab. 20). Embryonen, die in der 3D-Rekonstruktion eine Vollständigkeit von weniger als 50 % zeigten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. So konnte sicher gestellt werden, dass durch Drehen des kugelförmigen Embryos die laterale Seite nicht zum Zentrum des Embryoapex wird und dadurch die Ergebnisse verfälschen würden.

Abb. 34 veranschaulicht die in Tabelle 20 zusammengefassten Ergebnisse, indem ein radiärsymmetrischer Embryo gezeigt wird, der die unterschiedlichen GFP-Signale im u.t. wiedergibt und Voraussetzung für die Einteilung in die vier verschiedenen Kategorien zur Verteilung von PIN1 ist.

| Entwicklungsstadium |                     | Gleiche Intensität bei lateral und zentral |     | Starke Intensität bei zentral |      | Starke Intensität nur bei einer lateralen Seite (Asymmetrie) |      | Gleich Intensität bei beiden lateralen Seiten |      | Anzahl |
|---------------------|---------------------|--|-----|-------------------------------|------|--|------|---|------|--------|
|                     |                     | absolut                                    | %   | absolut                       | %    | absolut  | %    | absolut                                       | %    |        |
| Zellen              | Stadium             |  |     |                               |      |  |      |   |      |        |
| < 20                | bis frühes Globular | 20   | 59  | 2                             | 6    | 12   | 35   | 0   | 0    | 34     |
| 20-80               | bis spätes Globular | 5  | 9,3 | 20                            | 37   | 16   | 29,6 | 13  | 24,1 | 54     |
| >80                 | ab Transitions      | 0  | 0   | 5                             | 38,5 | 2  | 15,4 | 6   | 46,1 | 13     |

Tab. 20: Verteilung von PIN1 im „upper tier“ zu verschiedenen Zeiten der Embryogenese in transgenen *pPIN1:PIN1::GFP Arabidopsis* Embryonen. Insgesamt wurden 101 Embryonen zwischen Oktant- und Transitionsstadium analysiert.

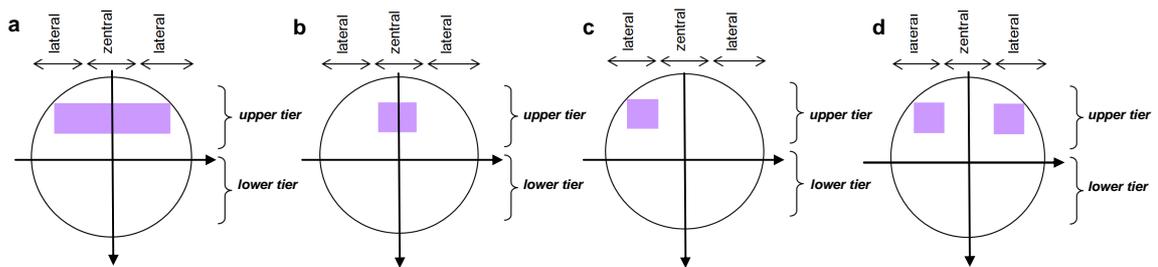


Abb. 34: Schema zur Verteilung von PIN1 im radiärsymmetrischen Embryo. Der Embryoapex ist jeweils in zwei laterale und einen zentralen Bereich eingeteilt. (a) Gleiche Intensität bei lateral und zentral. (b) Starke Intensität bei zentral. (c) Starke Intensität nur bei einer lateralen Seite (Asymmetrie). (d) Gleiche Intensität bei beiden lateralen Seiten.

Zu Beginn der Embryogenese mit Embryonen bis zum frühen Globularstadium und bis zu 20 Zellen war der Auxin Efflux-Carrier PIN1 in mehr als der Hälfte aller untersuchter Embryonen in diesem Alter gleichmäßig im Embryoapex verteilt (Tab. 20, Abb. 34 a, Abb. 35 a). Dies würde einen Hinweis darauf geben, dass zu diesem Zeitpunkt eine asymmetrische Verteilung von PIN1 und damit eine mögliche Voraussetzung für die Bilateralsymmetrie noch nicht erfolgt sind. Dagegen ließ sich bei 12 von 34 analysierten Embryonen bereits eine Asymmetrie bzgl. PIN1 nachweisen (Tab. 20, Abb. 34 c, Abb. 35 b). Hier war im u.t. des Embryoapex das GFP-Signal an einem der beiden gegenüberliegenden Seiten besonders stark. Diese ungleiche Verteilung könnte die Bilateralsymmetrie im späteren Embryo belegen. In manchen Fällen lässt sich jedoch die geringere PIN1 Verteilung an einer Seite des Apex dadurch erklären, dass das GFP-Signal an dieser Seite den Embryo nicht vollständig durchdringt. Dies ist daran zu erkennen, dass im l.t. der gleichen Seite im Gegensatz zur gegenüberliegenden ebenfalls kein GFP-Signal sichtbar ist. In seltenen Fällen (2/34) zeigen Embryonen bis zum frühen Globularstadium im u.t. eine starke PIN1 Verteilung im Zentrum des Embryoapex (Tab. 20, Abb. 34 b, Abb. 35 c), aber zu keiner Zeit ein gleich intensives GFP-Signal an den lateralen Seiten (Abb. 34 d). Ersteres würde darauf hindeuten, dass im frühen Globularstadium noch keine Auxinmaxima in den späteren Keimblättern zu finden sind, sondern Auxin möglicherweise erst im Zentrum der Apices akkumuliert bevor es mit Hilfe des Auxin Efflux-Carriers verstärkt zu den Primordien transportiert wird.

In der fortlaufenden Entwicklung des Embryos zeigt sich bis zum späten Globularstadium (20-80 Zellen) in vielen Embryonen (20/54) ein besonders starkes GFP-Signal im Zentrum des u.t. (Tab. 20, Abb. 34 b, Abb. 35 d). Die zweitgrößte Gruppe der Embryonen (16/54) in diesem Stadium zeigt bereits eine asymmetrische Verteilung von PIN1 im u.t. (Tab. 20, Abb. 34 c, Abb. 35 e). Eine Grundlage für die Bildung der Bilateralsymmetrie könnte damit geschaffen sein. In einigen Fällen (13/54) ist bis zum späten Globularstadium der Auxin Efflux-Carrier in gleicher Intensität an den gegenüberliegenden Seiten des u.t. wahrzunehmen (Tab. 20, Abb. 34 d, Abb. 35 f). Dies wäre schlüssig, da erst in der fortwährenden Embryogenese die Keimblattprimordien angelegt werden. Nur sehr selten (5/54) sind Embryonen gefunden worden, bei denen das GFP-Signal gleichmäßig über den gesamten Apex verteilt ist (Tab. 20, Abb. 34 a, Abb. 35 g). Dies würde erklären, dass in diesem Stadium bereits eine Konzentrierung von PIN1 und damit eine Vorbereitung zur Bilateralsymmetrie stattgefunden hat.

In fast der Hälfte aller Embryonen (6/13) ab dem Transitionsstadium, die jetzt aus über 80 Zellen bestehen, war im u.t. in beiden lateralen Bereichen, d.h. den im Embryoapex gegenüberliegenden Seiten, das GFP-Signal im Kontrast dem Zentrum deutlich verstärkt (Tab. 20, Abb. 34 d, Abb. 35 h). Ein Vergleich der Signalintensität in den lateralen Regionen zeigte keinen Unterschied, was darauf hindeuten könnte, dass zu dieser Zeit der Embryogenese die Umwandlung von Radiär- in Bilateralsymmetrie bereits stattgefunden hat und nicht mehr bewiesen werden kann, ob und zu welchem Entwicklungszeitpunkt PIN1 im Apex asymmetrisch verteilt war. In fast genauso vielen Embryonen (5/13) konnte im Gegensatz zu den lateralen Bereichen im Zentrum des u.t. das stärkste GFP-Signal wahrgenommen werden (Tab. 20, Abb. 34 b, Abb. 35 i). Dies würde die Theorie unterstützen, dass diese Stufe der Verteilung von PIN1 vor der Bildung lokaler Auxinmaxima in den Keimblattprimordien stattfindet. Die eben genannte Vermutung lässt sich dadurch untermauern, dass nur in seltenen Fällen (2/13) PIN1-Proteine an einer Seite des Embryos besonders häufig zu beobachten sind (Tab. 20, Abb. 34 c, Abb. 35 k) bzw. nie gleichmäßig über den Embryoapex verteilt sind (Abb. 34 a).

In allen analysierten Stadien lässt sich die Polarität von PIN1 in der Plasmamembran nicht eindeutig der apikalen-basalen bzw. lateralen Seite zuordnen.

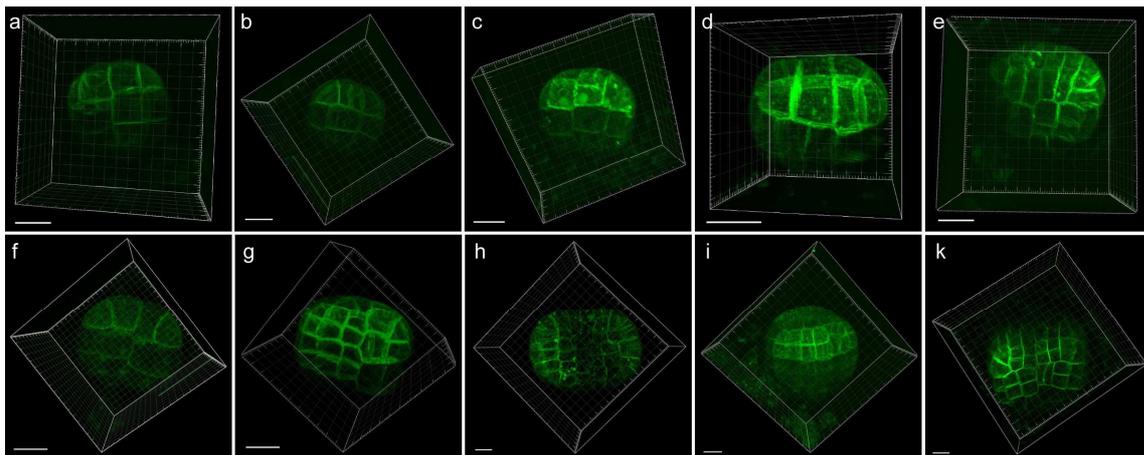


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der Lokalisation von PIN1::GFP in transgenen *Arabidopsis* Embryonen in 3D-Ansicht. (a, b, c) Embryonen bis zum frühen Globularstadium; (d, e, f, g) Embryonen bis zum späten Globularstadium; (h, i, k) Embryonen ab dem Transitionsstadium. (a, g) Gleichmäßige Verteilung von PIN1::GFP im *upper tier*, (b, e, k) Asymmetrische Verteilung von PIN1::GFP im *upper tier*, (c, d, i) Starke Intensität von PIN1::GFP im Zentrum des *upper tier*, (f, h) Starke Intensität an den lateralen Seiten des *upper tier*. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m

### 3.7 Differentielle Transkriptomanalyse keimblattloser und Wildtyp-Embryonen

Mikroarray-Experimente ermöglichen eine gleichzeitige Analyse mehrerer tausend Gene, wodurch spezifische Expressionsmuster und damit Kandidatengene für nähere Untersuchungen identifiziert werden können, die bestimmten zellphysiologischen Prozessen zu Grunde liegen. So können Vorgänge untersucht werden, die nach der Initiation des Keimblatts für dessen Aufbau als Speicher entscheidend sind. Dazu wurden Mikroarray-Analysen von keimblattlosen (*enp pid/enp pid*) Embryonen

gegenüber Wildtyp-Embryonen im Torpedostadium durchgeführt, wobei für jeden der insgesamt vier Arrays Mutante und Wildtyp aus folgenden Kreuzungen miteinander verglichen wurden:

1. *enp x pid-15*: wt und *lat*
2. *enp x pid-9*: wt und *lat*
3. *enp x pid-8*: wt und *enp x pid-9 lat*
4. *enp x pid-8*: wt und *lat*

Aus diesen Embryonen zwischen Herz- und Torpedostadium wurde die RNA isoliert und nach mehreren Schritten die mit Fluoreszenz markierte und amplifizierte cRNA auf den mit mehr als 40000 features, die 28500 *Arabidopsis*-Gene aus der TIGR-Datenbank repräsentieren, bestückten 44K Array hybridisiert. Dieser wurde anschließend gewaschen und auf Fluoreszenz abgetastet, wodurch die relativen Genexpressionsniveaus von Wildtyp und Mutante direkt verglichen werden können. Die Datenmengen solcher Experimente sind jedoch so groß, dass sich eine manuelle Bearbeitung als sehr schwierig erweist. Aus diesem Grund ist die Zuhilfenahme von rechnergestützten, bioinformatischen Methoden eine Notwendigkeit, die eine effiziente Analyse und Visualisierung der Datenmengen ermöglicht. Diese statistische Auswertung wurde von Dr. Georg Haberer am Institut für Bioinformatik und Systembiologie am Helmholtz-Zentrum München, deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, übernommen.

Das Ziel der Mikroarray-Auswertung ist es, Gene zu finden, die im Wildtyp und der Mutante differentiell exprimiert sind. Die statistische Analyse erfolgte dabei nach dem Loess-Holm-Verfahren. Bei der Datenerhebung wird eine Hypothese aufgestellt, die überprüft werden soll. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) gibt an, dass die Gene gleich exprimiert werden, die Alternativhypothese ( $H_1$ ) ist folglich die differentielle Genexpression in Wildtyp und Mutante. Mit dem Signifikanzniveau wird festgelegt, wann die Nullhypothese abzulehnen ist. Im Fall der Arrays, in welchen *laterne*-Embryonen gegen Wildtyp-Embryonen gestellt werden, wurde ein Signifikanzniveau von 0,15 bestimmt. Der p-Wert steht dabei in enger Beziehung zum Signifikanzniveau und ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die Daten wie beobachtet realisieren, falls in Wirklichkeit  $H_0$  zutrifft. Wenn diese Wahrscheinlichkeit klein ist so spricht dieses Ergebnis gegen die Nullhypothese und es ist Evidenz für die Richtigkeit der Alternativhypothese vorhanden. Da bei dieser Mikroarray-Studie Gene gesucht werden, die in Wildtyp und Mutante unterschiedlich exprimiert sind, also  $H_1$  belegt werden soll, werden die p-Werte verwendet, die kleiner als 0,15 sind.  $H_0$  wird abgelehnt und  $H_1$  angenommen. In anderen Worten ist es wahrscheinlich, dass die Gene differentiell exprimiert sind, deren p-Werte kleiner als das Signifikanzniveau sind. Für die weitere Auswertung der Mikroarrays wird außerdem der „Fold Change“, der den Wert angibt, wie stark sich die Expression der Gene in Wildtyp und Mutante unterscheidet, verwendet, sowie die „Odds“-Verhältnisse, die eine Bewertung für das Verhältnis zwischen zwei binären Variablen wiedergeben und eine Wahrscheinlichkeit repräsentieren, um damit Aussagen über die Stärke von Zusammenhängen zu machen. Für unsere Studie bedeutet dies, dass je größer das „Odds“- Verhältnis ist desto weiter oben sind die Gene in der Grafik zu finden. Die Expression dieser Gene unterscheidet sich damit in Wildtyp und Mutante stark, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist sehr klein.

Die Mikroarray-Analyse aus vier differentiellen Arrays von keimblattlosen gegenüber Wildtyp-Embryonen stellt sich grafisch als Volcano-Plot dar (Abb. 36).

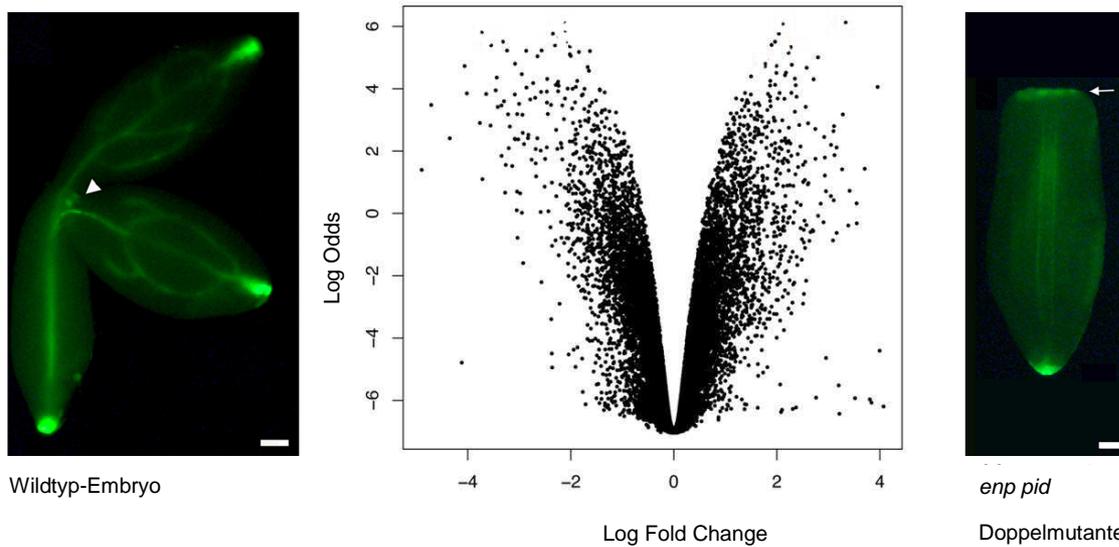


Abb. 36: Differentielle Transkriptomanalyse zur Aufdeckung von Prozessen nach der Keimblattinitiation in *Arabidopsis thaliana*. Links: Wildtyp-Embryo, Mitte: Volcano-Plot, Rechts: *pid enp* Doppelmutante (*laterne*).

Bei der bildlichen Darstellung der Ergebnisse ist es interessant, die Veränderung der Genexpression mit dem statistischen Signifikanzniveau zu vergleichen. Der Volcano-Plot ordnet die Gene entlang der Größe biologischer und statistischer Signifikanz. Die horizontale Achse gibt den „Fold Change“ zwischen Mutante und Wildtyp wieder und damit den biologischen Einfluss, d. h. welche Auswirkung eine Unter- bzw. Überexprimierung der Gene auf physiologische Prozesse und den Phänotyp hat. Die vertikale Achse repräsentiert das „Odds“-Verhältnis der beiden Proben, also die statistische Verlässlichkeit der differentiellen Expression. Dadurch können sehr leicht per Auge viel versprechende Kandidatengene für nähere Studien, z. B. qRT-PCR oder andere Methoden, ausgewählt werden. Die statistische Auswertung der Mikroarrays nach dem Loess-Holm substracted-Verfahren ergab, dass der p-Wert bei 25 Genen kleiner als 0,15 ist und diese Gene demnach signifikant differentiell exprimiert sind (Alternativhypothese) (Tab. 21, 22). Bei mehr als 25000 *Arabidopsis thaliana* Genen ist es verblüffend, dass weniger als 0,1 % der Gene dafür verantwortlich sind, dass Keimblätter gebildet werden oder nicht. Diese Gene positionieren sich im Volcano-Plot links bzw. rechts oben und sind im Wildtyp überexprimiert und unterexprimiert bzw. in der Mutante unter- und überexprimiert. Die Gene, die im Wildtyp im Keimblatt eine starke Expression aufweisen, befinden sich auf der linken Seite der Grafik. Dazu zählen insbesondere Transkriptionsfaktoren, die gleichzeitig im *enp pid* doppelmutanten Embryo in der Expression abfallen. Der hier untersuchte Prozess findet nach der Initiation der Keimblattbildung statt. Dagegen werden die Gene, die im Wildtyp eine vorzeitige Inhibition von ABA- und wahrscheinlich anderer Signale wie Reifung und Keimung verhindern und daher unterexprimiert sind, in keimblattlosen Mutanten überexprimiert. Es handelt sich vorrangig um Proteine mit enzymatischer Aktivität.

| Gen       | Beschreibung  | aktives Entwicklungsstadium   | loess holm_sub adj. P-value | loess holm_sub logFC |
|-----------|---|---|-----------------------------|----------------------|
| AT2G30420 | MYB TF, DNA-Bindung, Trichom-Bildung  | -   | 0.02642                     | -2.12818             |
| AT1G30210 | TCP24 TF, Zelldifferenzierung, Blattmorphogenese und -entwicklung                               | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.03975                     | -2.11019             |
| AT4G18390 | TCP2 TF   | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.0421                      | -3.72794             |
| AT2G46870 | TF, Blatt- und Blütenentwicklung  | reifer Embryo, Keimblattbildung, Differentiation der Petalen            | 0.04461                     | -2.35973             |
| AT1G75410 | BLH3 TF, Transition von vegetativer zu reproduktiver Phase                                      | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.06039                     | -2.08461             |
| AT3G61490 | Glycosidhydrolase, Polygalacturonase-Aktivität, metabolische Prozesse                           | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.06206                     | -3.31786             |
| AT4G01500 | TF, Blatt- und Blütenentwicklung  | reifer Embryo, Keimblattbildung, Differentiation der Petalen            | 0.07271                     | -2.30574             |
| AT5G44680 | Methyladeninglycosylase, DNA-Reparatur  | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.07388                     | -3.54573             |
| AT4G11140 | TF, Ethylen-Respons-Faktor, Blatt- und Blütenentwicklung, DNA-Bindung                           | reifer Embryo, Keimblattbildung, Differentiation der Petalen            | 0.07524                     | -2.02218             |
| AT3G15030 | TCP4 TF, Zelldifferenzierung, Blattmorphogenese und -entwicklung                                | reifer Embryo, Keimblattbildung, Differentiation der Petalen            | 0.09003                     | -2.56648             |
| AT3G58070 | putativer TF, Reaktion auf Gibberellin, Trichom-Bildung, Bindung an Nukleinsäuren und Zinkionen | Seneszenz   | 0.09032                     | -3.23795             |
| AT5G50130 | SDR, metabolische Prozesse, Oxidoreductase Aktivität  | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.09106                     | -2.86572             |

| Gen       | Beschreibung   | aktives Entwicklungsstadium   | loess holm_sub adj. P-value | loess holm_sub logFC |
|-----------|--|---|-----------------------------|----------------------|
| AT5G54630 | TF   | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz                              | 0.09225                     | -1.62838             |
| AT5G21940 | unbekanntes Protein  | -   | 0.0958                      | -1.84174             |
| AT5G53210 | TF, DNA-Bindung, Stomata Entwicklung                             | reifer Embryo, Keimblattbildung   | 0.10488                     | -2.01853             |
| AT5G05965 | unbekanntes Protein  | -   | 0.11193                     | -2.00051             |
| AT3G55710 | UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase, metabolische Prozesse | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz, Differentiation der Petalen | 0.11361                     | -2.64616             |

Tab. 21: Mikroarray-Ergebnisse *laterne* versus Wildtyp-Embryonen geordnet nach loess-holm subtracted adj. p-Value der in Wildtypen überexprimierten Gene.

| Gen       | Beschreibung   | aktives Entwicklungsstadium                   | loess holm_sub adj. P-value | loess holm_sub logFC |
|-----------|--|---|-----------------------------|----------------------|
| AT2G29380 | Serin/Threonin-Phosphatase; AS-Dephosphorylierung, ABA induziert | -   | 0.02635                     | 3.3295               |
| AT5G22460 | Esterase/Lipase/Thioesterase                                     | reifer Embryo, Keimblattbildung, Seneszenz    | 0.02893                     | 2.10868              |
| AT4G30250 | ATP-Bindung/ATPase, Nukleosid-Triphosphatase                     | -   | 0.04356                     | 2.04379              |
| AT5G15725 | unbekanntes Protein  | -   | 0.06226                     | 1.96642              |
| AT4G00770 | unbekanntes Protein  | Differentiation der Petalen                   | 0.07149                     | 1.89537              |
| AT2G23510 | Acetyltransferase  | Differentiation der Petalen                   | 0.07871                     | 2.26269              |
| AT1G50580 | Glycosyltransferase, metabolische Prozesse                       | -   | 0.09887                     | 2.22626              |
| AT5G10040 | unbekanntes Protein  | Differentiation der Petalen, Keimblattbildung | 0.11857                     | 2.79947              |

Tab. 22: Mikroarray-Ergebnisse *laterne* versus Wildtyp-Embryonen geordnet nach loess-holm subtracted adj. p-Value der in *laterne* Mutanten überexprimierten Gene.

Bei der Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde die Aktivität mit Hilfe des RTSF (Research Technology Support Facility) Mikroarray Viewers der Michigan State University bewertet, der die Mikroarray-Daten des AtGenExpress Konsortiums darstellt. Das Ziel dieses multinationalen Zusammenschlusses ist es, das Transkriptom von *Arabidopsis thaliana* durch die Verknüpfung der verschiedenen Expressionsmuster vollständig aufzudecken. Untersucht wurde jeweils die Genexpression in Keimblatt, Hypokotyl, Wurzel, Apex, Keimling, Rosetten, Blatt, Stamm, Blüte, Schote und Samen. Grundlage dieser Analysen ist der Affymetrix GeneChip, der im Gegensatz zum Agilent Chip mit 28500 Genloci nur 20290 *Arabidopsis*-Gene repräsentiert. Ein weiterer Unterschied liegt in der Oligonukleotidlänge. Affymetrix verwendet ein 25-mer, bei Agilent haben die Oligos eine Länge von 60 bp.

Da die Mikroarray-Studie zur Aufklärung der Prozesse, die nach der Initiation des Keimblatts entscheidend sind, gemacht wurden, ist die Regulation der im Wildtyp-Embryo stark abgelesenen Gene in den Keimblättern besonders interessant. Eine hohe Aktivität in diesem Gewebe zeigt sich bei den Genen *At1g30210*, *At5g54630*, *At1g75410*, *At4g18390*, *At5g44680* und *At2g46870*. Darunter kodieren drei für TCP Transkriptionsfaktoren, die an der Bildung des SAM und der Entwicklung lateraler Sprossorgane beteiligt sind (Koyama et al., 2007). Eine hohe Expression ist auch im Hypokotyl zu erkennen (*At2g30420*, *At4g01500*, *At5g54630*, *At5g50130*) (Abb. 37 a). Besonders hervorzuheben ist hier die Dehydrogenase/Reduktase *At5g50130*, deren Expression im Hypokotyl sogar die in den Keimblättern übertrifft und auch gegenüber den anderen Geweben hier sehr aktiv ist. Im Fall von *At4g01500* ist die Aktivität relativ gleichmäßig verteilt (Abb. 37 b). Obwohl bei den in den Wildtyp-Embryonen hoch exprimierten Genen generell eine starke Aktivität in den Keimblättern zu sehen ist, gibt es eine geringe Anzahl an Genen, die besonders im Samen bzw. den Schoten abgelesen werden (*At4g11140*, *At3g58070*). Da *At4g11140* ein Ethylen-Response-Faktor ist, ist die Aktivität des Gens besonders während der Seneszenz der Pflanzen erhöht (Abb. 37 c). Die auffallend hohe Regulation der Methyladenin-Glycosylase *At5g44680* in Blüten, Blättern, Rosetten und Keimblättern, könnte auf die Induktion des Gens durch die Hormone Gibberelinsäure und Brassinosteroid, die bekanntlich die Keimung und Entwicklung der Pflanzen fördern, zurückgeführt werden (Abb. 37 d).

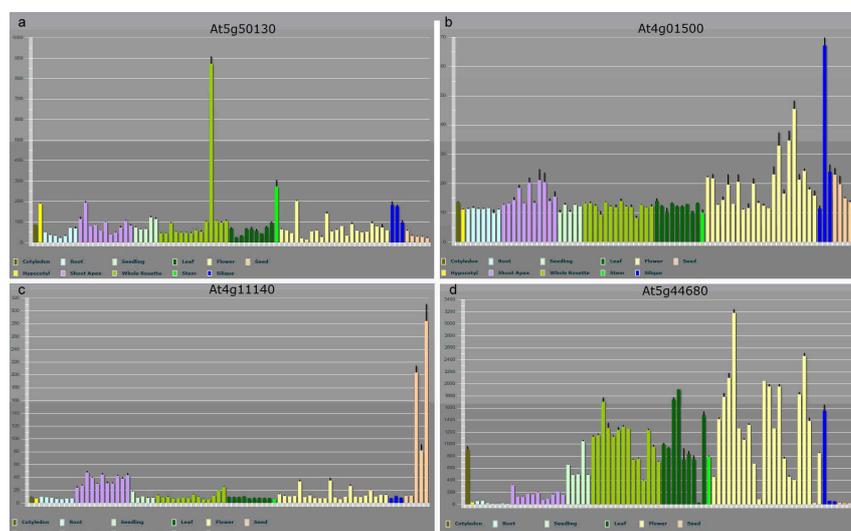


Abb. 37: Expression der Gene *At5g50130* (a), *At4g01500* (b), *At4g11140* (c), *At5g44680* (d) in verschiedenen Geweben (Quelle: RTSF MicroarrayViewer)

Auffallend bei der Analyse der Gene, die gegenüber Wildtyp-Embryonen in der *laterne* Mutante stärker exprimiert sind, ist nicht, dass sie besonders in den Keimblättern aktiv sind, sondern vielmehr im Samen bzw. den Schoten. Besonders deutlich wird dieser Unterschied bei *At2g29380* und *At2g23510* (Abb. 38 a, b). Auch die gleichmäßige Expression der Gene *At5g10040* (Abb. 38 c) und *At4g00770* in allen analysierten Geweben ist ebenso überraschend wie die erhöhte Aktivität von *At5g15725* in der Wurzel (Abb. 38 d).

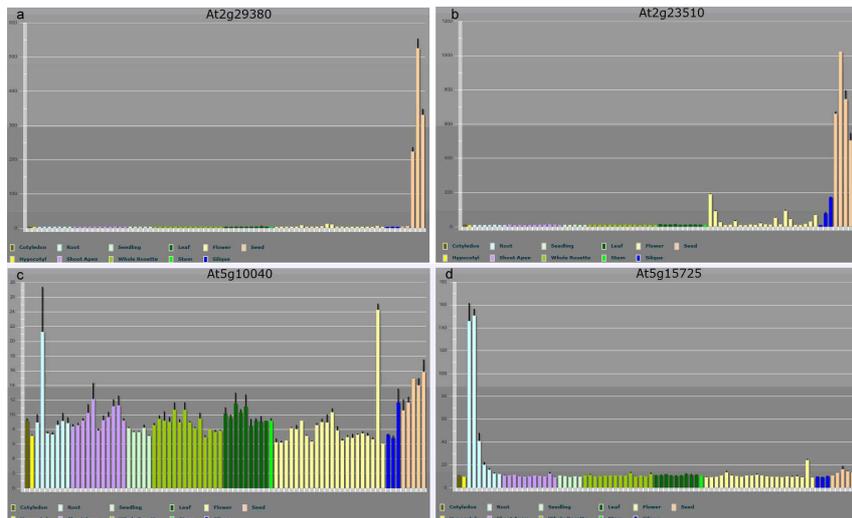


Abb. 38: Expression der Gene *At2g29380* (a), *At2g23510* (b), *At5g10040* (c), *At5g15725* (d) in verschiedenen Geweben (Quelle: RTSF MicroarrayViewer)

Drei der insgesamt 25 differentiell exprimierten Gene konnten aufgrund nicht vorhandener Angaben zur Genregulation nicht analysiert werden. Ursache hierfür sind die fehlenden Daten im RTSF Microarray-Viewer, dessen Basis der Affymetrix GeneChip und nicht der für diese Studie verwendete Agilent Chip ist, dem sämtliche *Arabidopsis* Gene zu Grunde liegen. Zwei dieser Gene kodieren für unbekannte Proteine, d. h. die generell fehlenden Informationen über diese Gene könnten hier für die nicht vorhandenen Daten verantwortlich sein.

### 3.8 Molekulare Kartierung von *ABANICO*

Neben der Keimblattmutante *Laterne*, die zum spezifischen Verlust der Keimblätter führt (Tremel et al., 2005), gibt es ein weiteres Gen, das an der Kontrolle der Keimblattzahl beteiligt ist. Deshalb sollte dieser Locus (*ABANICO*) molekular eingegrenzt werden. *abanico* ist eine rezessive Keimblattmutante, die im Ökotyp Columbia durch Beschuss mit schnellen Neutronen induziert wurde (Torres Ruiz, unveröffentlicht). 12 % der Nachkommen besitzen nur ein einziges vergrößertes Keimblatt. Um die Struktur und molekulare Wechselwirkung mit anderen Komponenten der Keimblattentwicklung aufzuklären muss dieses Gen kloniert werden. Der *ABANICO*-Locus konnte auf eine Region zwischen SNP26993030 auf BAC T26J14 (Position 38204) und MASC00516 auf BAC F2OP5 (Position 57244) auf Chromosom 1 eingeschränkt werden. Es ist möglich, dass *aco* ein spezifisches Allel von einem Gen ist, das sich in diesem Bereich befindet. Dabei bietet sich das Gen *PERIANTHIA* (*PAN*)

als Kandidat an, das für ein bZIP Protein kodiert und bei der Festlegung der Anzahl der Blütenorgane eine Rolle spielt. Ist *PAN* jedoch mutiert, so entwickeln sich größtenteils 5-zählige Blüten mit je fünf Sepalen, Petalen und Stamina. Eine wildtypische Blüte setzt sich dagegen aus je vier Sepalen und Petalen und sechs Stamina zusammen. Ein Keimlingsphänotyp ist für *pan* bis jetzt noch nicht bekannt (Chuang et al., 1999). *Crabs Claw (CRC)*, ein weiteres Kandidatengen, reguliert in *Arabidopsis thaliana* die Entwicklung der Fruchtblätter und Nektarien. Es kodiert für einen putativen Transkriptionsfaktor mit Zinkfinger- und Helix-loop-Helix Domäne. Ist *CRC* mutiert, so resultiert daraus die Bildung eines Fruchtknotens, dessen Karpelle am Apex nicht fusioniert sind, und das Fehlen der Nektarien (Bowman und Smyth, 1999). Möglicherweise ist die Entwicklung von Keimblättern eng mit der Bildung von Infloreszenzorganen verbunden. Deswegen und aufgrund der Lokalisation von *aco* sind *PAN* und *CRC* Kandidatengene für *aco*. Eine Deletionsanalyse mittels Metaphoragarosegelelektrophorese sowie ein Komplementationstest mit *pan* und *crc* erbrachten keinen Beweis dafür, dass *aco* ein besonderes Allel dieser beiden Kandidatengene ist. Dies ist jedoch z. B. durch eine Mutation in der Promotorregion, die eine Komplementation erklären würde, trotzdem möglich. Deswegen wurde die Sequenz von *PAN* bzw. *CRC* in Columbia mit der in *aco* verglichen. Dazu wurde die *PAN* bzw. *CRC* Sequenz mit sich überlappenden Primerpaaren amplifiziert. Als Template dienten Columbia-DNA sowie DNA aus Pflanzen mit homozygotem *aco* Hintergrund (FN9-3-DNA). Ein Vergleich der Sequenzen von Columbia und *aco* zeigten jedoch weder bzgl. *PAN* noch *CRC* einen Unterschied. Die beiden Kandidatengene sind damit nicht mit *aco* allelisch.

## 4 Diskussion

### 4.1 ENP und PIN1 kolokalisieren in der Epidermis der Kotyledonen

Mutationen des *Arabidopsis* Gens *ENHANCER OF PINOID* (*ENP*) führen im *pinoid* mutanten Hintergrund im Verlauf der Embryogenese zu einer vollständigen Deletion der Keimblätter. Hypokotyl und Wurzel entwickeln sich dagegen normal (Trembl et al., 2005). Dieser mutante Phänotyp wurde *laterne* genannt und hat den Genotyp *enp pid/enp pid*. Im *Ler*-Hintergrund bilden adulte *enp pid/enp pid* Pflanzen keine Blütenstände aus und ihre Sprossapices enden blind. Diese Beobachtungen zeigen einen synergistischen Effekt beider Gene sowohl während der frühen als auch der späten Entwicklung der Pflanzen. Durch die Spezifität dieser *laterne*-Keimblattmutante konnte ein wichtiger Schritt der Keimblattentwicklung aufgeklärt werden. Die simultane Mutation von *PID* und *ENP*, die zu einer fehlenden Entwicklung von Keimblättern und Blüten führt, reflektiert die essentielle Funktion beider Gene in der frühen und späten Entwicklung von *Arabidopsis*. Auch die Signifikanz der apikalen Positionierung des PIN1 Efflux-Carriers in der epidermalen PM für die Bildung von Keimblättern wird durch diese Gene eindeutig (Trembl et al., 2005).

ENP akkumuliert in der Epidermis der Kotyledonen an den apikalen Membranen. Das GFP-Signal ist dabei auf eine einzelne terminale Zelle hin ausgerichtet, in der die Auxinkonzentration möglicherweise ihr Maximum erreicht. Bei der Analyse von *p35S::EGFP::ENP* Embryonen konnte eine zeitliche Abhängigkeit in der Funktionalität des ENP-Proteins beobachtet werden. Es ist bekannt, dass die Überexpression durch den 35S-Promoter in *Arabidopsis* Embryonen signifikant verzögert ist (Odell et al., 1985). Dies trifft auch auf das EGFP::ENP Fusionsprotein zu, dem der 35S-Promoter, der prinzipiell in jedem Zelltyp aktiv ist, vorgeschaltet ist. Eine Expression von ENP tritt erst im späten Herzstadium auf und ist besonders stark im späten Embryo und in postembryonalen Stadien. Vermutlich wird ENP schon in früheren Phasen der Embryogenese exprimiert, die Konzentration des Proteins liegt zu diesem Zeitpunkt jedoch unter dem nachweisbaren Schwellenwert. Bei der Analyse der subzellulären Verteilung des ENP-Proteins durch die Färbung von *Arabidopsis* Embryonen mit einem ENP-Antikörper wurde eine schwache polare Positionierung auch in der Epidermisregion des Hypokotyls aufgedeckt, die mit dem Expressionsmuster des Gens übereinstimmt. In *laterne*-Embryonen ist die Polarität des Auxin-Transporters PIN1 in epidermalen Zellen vollständig revertiert. Es ist anzunehmen, dass Auxin deshalb in Richtung Wurzelspitze transportiert wird und eine Etablierung von Auxinmaxima an den mutmaßlichen Keimblattprimordien nicht möglich ist. Dies führt zu einem keimblattlosen Phänotyp. Sehr ähnliche Phänotypen werden durch Mutationen in PINOID-like Genen oder in Flavin Monooxygenasen, die die Auxin-Biosynthese kontrollieren, verursacht (Cheng et al., 2007; Cheng et al., 2008). Ein Vergleich der Phänotypen der Einzel- und Doppelmutanten zeigt deutlich, dass ENP, neben PID und PIN1, direkt oder indirekt in den polaren Auxintransport zur Keimblatt- und Blütenbildung involviert ist. Die PIN1 Polarität wird somit in den Keimblattprimordien durch die Serin/Threonin Kinase PID, ihrem Antagonisten PP2A (Michniewicz et al., 2007) und ENP kontrolliert. Obwohl beide Proteine unabhängig voneinander agieren,

wird durch ihre zeitgleiche Aktivität PIN1 präzise und vollständig an der PM lokalisiert. Die Phosphorylierung von PID modifiziert PIN1 in der Weise, dass es hauptsächlich an der apikalen Seite der Zellen lokalisiert. Durch eine Mutation in PID wird PIN1 teilweise an die basalen Enden der Zellen verlagert, das somit die Bildung einer ungleichmäßigen Anzahl an Keimblättern verursachen kann (Trembl et al., 2005). Immunohistochemische Arbeiten mit einem gegen das PIN1 Protein gerichteten Antikörper haben in transgenen *p35S:EGFP::ENP* Embryonen gezeigt, dass ENP exakt mit PIN1 in der apikalen Plasmamembran kolokalisiert. In den tieferen Zellschichten, in denen sich die vaskulären Vorläuferzellen befinden, konnte eine Expression von EGFP::ENP zunächst nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich wird die polare Lokalisation von ENP durch spezifische Faktoren in der Epidermis bedingt und ist nicht nur mit seiner Expressionsdomäne verknüpft. Abb. 39 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen PIN1, ENP und PID in einer epidermalen Embryozelle. Die molekulare Interaktion von PID, ENP und PIN1 ist dabei unklar. In Yeast Two-Hybrid Experimenten konnte keine direkte Interaktion von ENP und PID bzw. ENP und PIN1 nachgewiesen werden, obwohl ENP mit PID kooperieren muss, um die polare Lokalisation von PIN1 steuern zu können (M. Furutani und M. Tasaka, unveröffentlicht; J. Uhrig, unveröffentlicht). Es gibt Erfahrungen, die zeigen, dass bei Yeast Two-Hybrid Verfahren durch ungekürzte Bait-Proteine, die homo- bzw. heterodimere Interaktionen eingehen, Interaktion mit Proteinen, die nicht über die Dimerisierung erfolgen, nicht nachgewiesen werden können (J. Uhrig, persönliche Mitteilung). Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Bindepartnern von ENP ist damit ein Y2H-Experiment, in dem die gekürzte Version von ENP (ENP3-4) als „Köder“ verwendet wird. Dadurch könnten Interakteure von ENP gefunden werden, die vorher nicht detektiert werden konnten. Da ENP im Gegensatz zu PIN1 keine erkennbare Transmembrandomäne oder Myristoylierungsdomäne besitzt, könnte ein Yeast Two-Hybrid Verfahren eine Protein-Protein-Interaktion zwischen ENP und der cytosolischen Domäne von PIN1 aufdecken. Möglicherweise treten diese Proteine auch indirekt, nicht miteinander, in Verbindung. Es könnte ein Adaptorprotein geben, das PID mit ENP verknüpft und so die Komplexbildung unterstützt (Abb. 39). Eine direkte Interaktion zwischen Transmembran- und löslichen Proteinen ist schwer nachzuweisen und ein Yeast Two-Hybrid Experiment in diesem Fall ungeeignet. Auf welche Weise ENP den Auxin Efflux-Carrier beeinflusst bleibt zu klären. ENP reguliert die Lokalisation der PIN1-Proteine. Diese Aussage kann durch folgende Studien begründet werden. Die Kolokalisation von PIN1 und ENP deutet darauf hin, dass ENP auf die Polarität von PIN1 an der PM selbst entweder direkt oder indirekt positiv einwirkt. Bekräftigt wird diese Vermutung durch Inhibitorexperimente, die aufdeckten, dass die epidermale Polarität von ENP fast die gleichen Charakteristika wie PIN1 aufweist. Ein entscheidender Unterschied ist, dass ENP sein Ziel auf einem BFA-insensitiven Pathway erreicht. Im Fall von PIN1 kommt es zum Verlust der polaren Lokalisation an der PM und zur Bildung von BFA-Kompartimenten. Im Einklang dazu stehen die Ergebnisse von Furutani et al. (2007). In kultivierten *Arabidopsis* Zellen ist ENP in einer Subpopulation von Endosomen und nicht identifizierten intrazellulären Kompartimenten positioniert, die jedoch nicht mit PIN1 kolokalisieren. ENP und PIN1 werden damit in unterschiedlichen Vesikeln transportiert. Auch das Bleichen von PIN1-YFP in wildtyp Zellen bekräftigt die Vermutung, dass die Lokalisation von PIN1 an der PM durch ein anderes Protein unterstützt wird. Dabei wird neu synthetisiertes PIN1 zunächst ungleichmäßig in der

PM verteilt bevor es stetig polar lokalisiert wird (Dhonukshe et al., 2008). Nicht zuletzt bleibt die apikale Positionierung des Auxin Efflux-Carriers zwar in *enp*-Embryonen erhalten, allerdings akkumulieren weniger PIN1 Proteine an der PM (Furutani et al., 2007). In *enp pid/enp pid* Embryonen ist die PIN1-Polarität vollständig revertiert (Tremli et al., 2005).

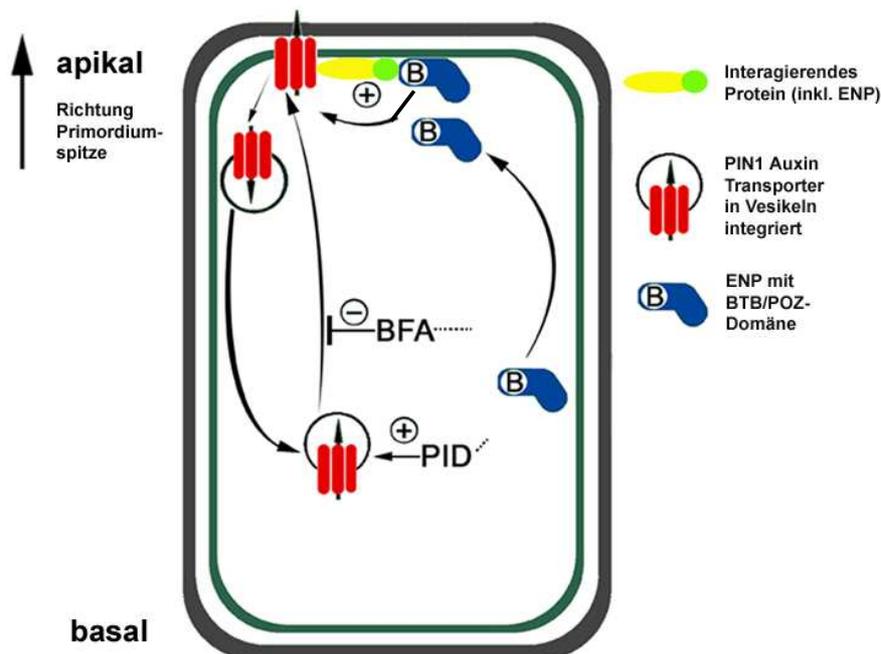


Abb. 39: Epidermale Zelle eines *Arabidopsis* Embryos. Der (+)-Pfeil von ENP nach PIN1 stellt die (direkte oder indirekte) unterstützende Wirkung von ENP auf die polare Lokalisation von PIN1 dar. Das Schema zeigt die Transportwege von PIN1 bzw. ENP soweit sie bekannt (PIN1) oder aufgrund früherer Daten wahrscheinlich sind (ENP). Die Orientierung der Zelle ist auf der linken Seite der Zelle zu sehen. BFA beeinflusst die Wiedergewinnung von PIN1 negativ während PID und ENP die PIN1 Polarität unterstützen. Gepunktete Linien zeigen, dass BFA und PID die ENP Lokalisation nicht beeinflussen. Dieses Schema zeigt das mögliche Zusammenspiel von PIN1, ENP und PID, das auf Untersuchungen an Embryonen basiert.

## 4.2 ENP und PIN1 werden in verschiedenen Vesikeln transportiert

Der polare Transport des Phytohormons Auxin beeinflusst unterschiedliche Prozesse im Wachstum und in der Entwicklung der Pflanzen. Diese Tatsachen basieren vornehmlich auf die Effekte polarer Auxin-Transportinhibitoren. Die genaue Wirkungsweise der pharmakologischen Störung des Auxin Efflux ist jedoch unbekannt. Der polare Auxin Flux wird vermutlich durch die asymmetrische Verteilung von Efflux-Carriern, die an der PM lokalisiert sind, verursacht. Dieses Modell wird durch die polare Positionierung von PIN1 und möglicherweise auch durch ENP unterstützt. Auxin Influx-Carrier sind unpolar in der PM verteilt und vermutlich nur indirekt am Auxintransport beteiligt. Im provaskulären und vaskulären Gewebe der Blätter von *aux1*-Mutanten

nimmt die Konzentration von Auxin ab. AUX1 unterstützt damit die Diffusion von Auxin in das umgebende Gewebe nicht (Marchant et al., 2002; Reinhardt et al., 2003; Kramer, 2004). Der direkte bzw. indirekte Einfluss von ENP auf die Polarität von PIN1 ist eindeutig und wird durch Inhibitorstudien erhärtet. Dazu wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in welcher die Sensitivität von intrazellulärem ENP gegenüber bekannten Toxinen bzw. Inhibitoren mit der Sensitivität von PIN1 verglichen wurde. Die Polarität des NPH3-Proteins ist insensitiv gegenüber verschiedener Pharmazeutika, die in den Aufbau des Cytoskeletts eingreifen, die Proteinsynthese stören, den Vesikel- oder den Auxintransport beeinflussen. Die epidermale Lokalisation von ENP weist mit einer wichtigen Ausnahme nahezu identische Charakteristika wie PIN1 auf. PIN1 zyklisiert zwischen der PM und den endosomalen Kompartimenten und wird in Abhängigkeit von GNOM-kontrollierten BFA sensitiven Vesikeln polar an den Zellen lokalisiert (Geldner et al., 2003, Geldner et al., 2004). Eine Applikation von BFA führt in *Arabidopsis* Wurzeln (Geldner et al., 2001) und Embryonen zu einer intrazellulären Akkumulation des Auxin Efflux-Carriers in zwei sogenannte BFA-Kompartimente. Die Anhäufung der PIN-Proteine kann durch die Wiedergewinnung von PIN an der PM verursacht worden sein (aktinabhängig), durch die Neuverteilung von Proteinen aus dem Golgi-Apparat (teilweise aktinabhängig) oder durch eine BFA induzierte Inhibierung der PIN-Proteine auf dem Weg zur PM (aktinabhängig) (Boutte et al., 2006). Ein Auswaschen von BFA und eine Applikation von CHX hemmte die PIN1 Polarität nicht. Besonders bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zu PIN1 der Einsatz von BFA nicht zu einer ähnlichen Reaktion bei ENP führt und ENP damit kein Frachtprotein BFA sensitiver Vesikel ist. Zusammen mit den Ergebnissen von Trembl et al. (2005) könnte das darauf hin deuten, dass ENP die Lokalisation von PIN1 vermutlich direkt an der Membran stabilisiert und sein Ziel auf einem anderen, BFA insensitiven, zellulären Transportweg erreicht. Die Trennung von ENP und PIN1 mit BFA an der apikalen PM in der Epidermis durch das Clustern von PIN1-Proteinen, deutet darauf hin, dass die polare Lokalisation bzw. die Aufrechterhaltung von ENP an der Membran durch einen oder mehrere Faktoren bedingt wird, jedoch nicht durch PIN1 (Abb. 39). Das bakterielle Toxin Wortmannin, das ebenso wie BFA in den Vesikeltransport eingreift, hemmt die Lipidsignalübertragung und endozytotische Prozesse. Das *Arabidopsis thaliana* SORTING NEXIN 1 (AtSNX1) ist am Auxin Transportweg beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase, wie Wortmannin, die Lokalisation von SNX beeinflussen. Pro Zelle erscheinen ein oder zwei vergrößerte vakuolisierte AtSNX1-Kompartimente, welche die Morphologie von GNOM-Endosomen aber nicht verändert (Jaillais et al., 2006). Im Fall von PIN1 und ENP wird die Polarität durch Wortmannin aber nicht gestört (Jaillais et al., 2006; diese Arbeit). Daraus lässt sich schließen, dass Endosomen, die GNOM, AtSNX1, PIN1 und ENP enthalten, physikalisch unterschiedlich sind. Obwohl GNOM, AtSNX1 und PIN1 eine Reaktion auf BFA zeigen, sind ausschließlich AtSNX1-Endosomen sensitiv gegenüber Wortmannin. Sie stellen ein neues endosomales Kompartiment dar, das in den Auxin Carrier Verkehr involviert ist (Geldner et al., 2006). Möglicherweise gibt es jedoch noch einen weiteren endosomalen Carrier für die Wiedergewinnung oder den intrazellulären Verkehr von Auxin Transportkomponenten: ein Pfad beinhaltet GNOM-Endosome (verwendet unter anderem von PIN1), ein zweiter Weg führt über AtSNX1-Endosome (nicht von PIN1, aber z. B. von PIN2 oder AUX1 verwendet) und möglicherweise gibt es noch einen

dritten zellulären, noch nicht identifizierten endosomale Pathway, der ENP-Proteine und evtl. andere Proteine transportiert und insensitiv sowohl gegenüber BFA als auch Wortmannin ist. Die Pharmazeutika Oryzalin und Cytochalasin, die sich auf das Zytoskelett auswirken, CHX und Filipin, die die Protein- bzw. Sterolynthese stören, sowie NPA, NOA, NAA, 2,4-D und TIBA, die den Auxintransport beeinflussen, konnten die Polarität des NPH3-Proteins in den epidermalen Zellen von *Arabidopsis* Embryonen nicht stören. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass ENP entlang der Mikrotubuli oder Mikrofilamente transportiert wird, da dies möglicherweise nur nach einer intrazellulären Akkumulation gezeigt werden kann, ebenso wie die Reaktion von PIN1 auf Cytochalasin D nach einer Vorbehandlung mit BFA (Geldner et al., 2001). PIN1 reagiert zwar nicht direkt auf eine Applikation von Cytochalasin D, da die Aufrechterhaltung der Polarität nicht gestört wurde. Die Inhibierung der BFA-induzierten intrazellulären Akkumulation von PIN1 beweist jedoch, dass PIN1 in Abhängigkeit von Aktin transportiert wird. Die Reaktion von PIN1 auf die Depolymerisation von Mikrotubuli durch Oryzalin allein in sich teilenden Wurzelzellen hat gezeigt, dass PIN1 entlang zweier unterschiedlicher Wege in Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus wandert: ein Aktin-abhängiger Interphasen Pathway zur PM und von der PM weg und ein Mikrotubuli-abhängiger Cytokinese Pathway zur Zellplatte (Geldner et al., 2001). Durch die fehlende Wirkung von Oryzalin auf die Polarität von ENP kann nur eine Aussage über die Aufrechterhaltung getroffen werden. Möglicherweise könnte bei sich teilenden Zellen ein Effekt auf das Toxin beobachtet werden, ähnlich wie bei PIN1. Dort verursacht Oryzalin in manchen Wurzelzellen irreguläre Anhäufungen des Proteins, die mit dem cytokinespezifischen Syntaxin KNOLLE kolokalisieren (Geldner et al., 2001). Der Effekt von Oryzalin auf die Lokalisation ist damit vom Status des Zellzyklus abhängig. Treten bei Applikation des Toxins auf ENP-Embryonen ebenso unregelmäßige GFP-Flecken während der Zellteilung auf, die mit der Lokalisation von KNOLLE übereinstimmen, würde dies einen Hinweis darauf geben, dass der Transport von ENP-Proteinen während der Cytokinese von Mikrotubuli abhängig ist, die Aufrechterhaltung der Polarität jedoch nicht. Der Auxin Efflux Inhibitor NPA verhindert nach Induktion von BFA-Kompartimenten die Relokalisation der PIN1-Proteine an die PM, womit die Internalisierung von PIN1 aufrechterhalten bleibt (Geldner et al., 2001). Nach einer Studie von Rahmann et al. (2007) verursacht NPA eine Depolymerisation von Aktin und verlangsamt den cytoplasmatischen Fluss, doch die Lokalisation der PIN1-Proteine wird davon nicht beeinflusst. Dagegen zeigen Analysen von Kleine-Vehn et al. (2006), dass NPA die polare Positionierung von PIN1 in *Arabidopsis* Wurzelzellen weitgehend aufhebt. Aufgrund der ähnlichen Verhaltensweisen von PIN1 und ENP wäre auch im Fall von NPA eine Reaktion von ENP nach Applikation eines wirksamen Toxins möglich. Die Reaktion von NPA auf das Aktin-Zytoskelett scheint jedoch nicht einen ähnlich starken Effekt wie der Auxintransportinhibitor TIBA, der die Aktinfilamente durch Bündelung stabilisiert, zu haben (Dhonukshe et al., 2008). Allerdings kann dieser Effekt in nachfolgenden Studien nicht reproduziert werden (Shibasaki et al., 2009). In Übereinstimmung mit früheren Analysen in *Arabidopsis* Wurzeln (Geldner et al., 2001) ist in Embryonen ebenso keine Wirkung von TIBA auf PIN1 aber auch nicht auf ENP zu beobachten. Die Stabilisierung von Aktin durch die Auxintransportinhibitoren blockiert die subzelluläre Dynamik von PIN1 ohne die Polarität von PIN1 zu beeinflussen (Geldner et al., 2001, Rahmann et al., 2007). In früheren Analysen war zu beobachten,

dass PIN1 keine Reaktion auf den Auxin Influx Inhibitor NOA zeigt (Kleine-Vehn et al., 2006). Dies gilt auch für ENP. Obwohl die Lokalisation von PIN1 nach Applikation der synthetischen Auxine NAA und 2,4-D auf *Arabidopsis* Wurzeln zunächst unberührt scheint, wird die Polarität zu einer Seite der PM nach und nach aufgehoben (Geldner et al., 2003). Diese Beobachtung konnte jedoch im Fall von Embryonen nicht gemacht werden. Dass Sterole für die Ausrichtung von Proteinen notwendig sind, konnte durch die zerstörte PIN1 Polarität in *orc* Mutanten, denen die Funktion der STEROL METHYLTRANSFERASE1 fehlt (Willemssen et al., 2003), bewiesen werden. Die Positionierung von PIN1 ist durch die Applikation des sterolbindenden Toxins Filipin zwar betroffen, der Effekt ist jedoch gering und konnte in Embryonen auch nicht reproduziert werden (Kleine-Vehn et al., 2006). Studien deckten auf, dass PIN1 in *Arabidopsis* Wurzeln (Geldner et al., 2001) und Embryonen (diese Arbeit) auf den Translationshemmer CHX nicht reagiert. Die Inhibitorstudien verdeutlichen, dass sich PIN1 ähnlich wie ENP verhält und die Lokalisation beider Proteine gleichermaßen robust ist.

Neben den getesteten Pharmazeutika gibt es noch eine Vielzahl weiterer Inhibitoren, die in den Auxintransport interferieren. Beispiele hierfür sind der Auxin Efflux Inhibitor PBA (1-pyrenoylbenzoic acid), Latrunculin, das Aktinfilamente depolymerisiert, der Mitose-Hemmstoff Colchizin, der an freie Mikrotubuli-Untereinheiten bindet oder PCIB ( $\alpha$ -(p-chlorophenoxy) isobutyric acid), das die Wirkung von Auxin hemmt. Es ist möglich, dass die bereits applizierten Toxine ENP beeinflussen, dies allerdings durch den langsamen Umsatz von ENP, der durch den fehlenden Effekt von CHX gezeigt wurde, nicht beobachtet werden kann, da sie sich nicht auf die Aufrechterhaltung der Polarisierung auswirken. Sie könnten jedoch trotzdem einen Effekt auf den Transport von ENP zeigen, der jedoch durch die an der PM lokalisierten ENP-Proteine überlagert wird. Ist erst ein Toxin gefunden, das in die Positionierung von ENP, z. B. durch intrazelluläre Akkumulation der Proteine, eingreift, können basierend auf diesem Inhibitor weitere oder bereits getestete Pharmazeutika appliziert werden, die sich dann möglicherweise auf den Transport oder ebenso auf die Positionierung des NPH3-Proteins auswirken. Dies würde ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktionalität von ENP sein.

### 4.3 Die Bedeutung der BTB/POZ-Domäne für die polare Lokalisation

ENP kodiert für ein NPH3-ähnliches Protein und reguliert durch seinen Einfluss auf den PAT die Entwicklung von Kotyledonen (Trembl et al., 2005). Als Homologon des phototropischen Faktors NPH3 weist es die Charakteristika eines löslichen, hydrophilen Proteins auf. Eine C-terminale Coiled-Coil-Domäne ist für viele der NPH3-artigen Proteine charakteristisch, in ENP aber nicht vorhanden. Ungeachtet der Zugehörigkeit zur NPH3-Proteinfamilie fehlen in ENP eine erkennbare Transmembrandomäne oder andere Motive, die eine Verankerung an der Membran ermöglichen. Die C-terminalen Domänen des ENP-Proteins unterstützen vermutlich die Polarisierung von PIN1 bzw. den PAT. ENP besitzt wie die meisten Mitglieder der NPH3-Familie eine N-terminale BTB/POZ-Interaktionsdomäne. Da das *Arabidopsis*

Genom für insgesamt 21 BTB-NPH3 Proteine kodiert und diese in keinem anderen Genom nachgewiesen werden konnten, repräsentiert diese Domäne eine pflanzenspezifische Anpassung des BTB-Moduls. Dort beeinflussen sie den Phototropismus und fungieren als Adapterproteine, die Komponenten des Signaltransduktionsweges, die durch die lichtinduzierte Serin/Threonin-Kinase NPH1 aktiviert werden, zusammenbringen (Motchoulski und Liscum, 1999; Sakai et al., 2000). Die konservierte Tertiärstruktur der BTB/POZ-Domäne wurde in einem breiten Spektrum an Proteinen nachgewiesen („core BTB-fold“) und enthält drei Beta-Faltblätter (B1-B3) sowie fünf Alpha-Helices (A1-A5) (Stogios et al., 2005). Mit Ausnahme einiger scheinbar essentiellen Aminosäuren, speziell in B1, B2 und A1, sind die Primär- und Sekundärsequenzen dieses Motivs weniger stark konserviert. In Tieren fungieren diese Regionen bzw. bestimmte Aminosäuren in diesen Bereichen als Kontaktstellen für Di- bzw. Tetramerisierung (Stogios et al., 2005). Die Funktionalität des BTB/POZ-Interaktionsmoduls ist für die subzelluläre Lokalisation von ENP essentiell, da in transgenen Embryonen mit teilweiser deletierter BTB/POZ-Domäne eine polare Verteilung der ENP-Proteine nicht nachgewiesen werden konnte. Das GFP-Signal ist gleichmäßig im Zytoplasma, dem Mesophyll der Keimblattprimordien und den Plasmamembranen verteilt (Tremel, 2007). Die entscheidende Sequenz muss daher in den B1 oder B2 Beta-Faltblättern oder in einem Teil der A1 Alpha-Helix liegen. Möglicherweise dienen diese Regionen als Anker für weitere Proteine, die eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen ENP und PIN1 oder einem anderen Transmembranprotein vermitteln (Abb. 39). Es ist jedoch auch vorstellbar, dass die Integrität der gesamten BTB/POZ-Domäne gewahrt sein muss. Die Signifikanz dieser Domäne für eine polare Lokalisation wird durch eine weitere Beobachtung hervorgehoben, die sich auf *At2g23050* (auch *NPY4* genannt), ein mit ENP eng verwandtes Gen innerhalb der phylogenetischen Gruppe der NPH3-Familie, bezieht, das dieselbe polare Lokalisation in der Epidermis wie ENP zeigt. Ein Vergleich ihrer Proteinsequenzen verdeutlicht, dass dieses Protein ebenso wie ENP neben der zentralen NPH3-Domäne, mit vier konservierten Sequenzbereichen (DI-DIV; Motchoulski und Liscum, 1999) und einer Tyrosin-Phosphorylierungsstelle auch über ein BTB/POZ-Motiv am N-Terminus verfügt. Die begründete Vermutung ist, dass lediglich die Tertiärstruktur des Moduls konserviert ist und trotz geringer Unterschiede in der Primärstruktur seine Funktionalität gewährleistet ist und damit eine polare Positionierung des Proteins möglich ist. In ENP und *At2g23050* befinden sich hoch konservierte Aminosäurereste, die teilweise für eine Kontaktstelle mit anderen Proteinen bekannt sind (Stogios et al., 2005). Beide Proteine besitzen jedoch ungleich vieler NPH3-Proteine keine C-terminale Coiled-Coil-Domäne, die neben des BTB/POZ-Motivs eine weitere potentielle Protein-Protein Interaktionsdomäne darstellt (Motchoulski und Liscum, 1999; Sakai et al., 2000; Haga et al., 2005). Da die genauen molekularen Mechanismen, die für die Polarität und die Funktion von ENP nötig sind, noch unbekannt sind, müssen Interaktionen mit anderen zellulären Elementen entschlüsselt werden. Diese Analysen würden einen wichtigen Einblick in den molekularen Mechanismus des PAT geben.

## 4.4 Parallelen zwischen ENP und At2g23050

Innerhalb der inneren phylogenetischen Gruppe von ENP befinden sich vier Gene (*At5g67440*, *At4g37590*, *At2g14820*, *At2g23050*), die eine hohe Ähnlichkeit zu ENP aufweisen. In Zusammenarbeit mit Dr. J. Uhrig (Universität Köln) deckten Yeast Two-Hybrid Screens eine Interaktion zwischen ENP und *At2g23050* (*NPY4*) auf, das an der Auxin-vermittelten Organogenese beteiligt ist (Cheng et al., 2008). Nähere Analysen von *NPY4* zeigten eine teilweise zu ENP unterschiedliche Expression. Die Expression beider Proteine tritt bereits sehr früh während der Embryogenese auf. Sowohl *ENP* als auch *NPY4* werden einheitlich spätestens ab dem 8-Zell-Stadium transkribiert (Furutani et al., 2007; Cheng et al., 2008). Im späten Globularstadium zeichnet sich eine differentielle Aktivität ab: während ENP eher an den Rändern, den protodermalen Zellen, und weniger in den inneren embryonalen Zellen exprimiert wird (Trembl et al., 2005; Furutani et al., 2007), konzentriert sich die Expression von *NPY4* mehr auf das provaskuläre System (Cheng et al., 2008; Abb. 40). Die unterschiedliche Lokalisation der mRNAs wird mit Entwicklung der Keimblattprimordien besonders deutlich. Stufenweise zieht sich das ENP Transkript in den protodermalen Zellen an die Spitze der Keimblattprimordien zurück und wird ab dem späten Herzstadium im späteren SAM detektiert. Die Expressionsdomäne von *NPY4* konzentriert sich ab dem Herzstadium auf die Steleregion im Hypokotyl (Abb. 40; Cheng et al., 2008). Ektopisch exprimiertes *NPY4* scheint in der Epidermis polar so lokalisiert zu sein wie ENP (Abb. 40). Dies kann durch die hoch konservierten Aminosäuren in der BTB/POZ-Domäne von ENP und *NPY4* erklärt werden. In den jeweiligen Überexpressionsmutanten werden die Proteine apikal in der Epidermis der Keimblätter transgener *Arabidopsis* Embryonen positioniert. Ektopisch exprimiertes ENP wird in der Stele basal lokalisiert, was durch eine Analyse mit gegen PIN1 gerichtete Antikörper verdeutlicht wird (Abb. 41). Der Auxin Carrier ist in den vaskulären Elementen ebenso basal positioniert. Dies würde darauf hindeuten, dass PIN1 ENP lokalisiert. Zuvor wurden Gründe aufgeführt, warum ENP PIN1 in seiner Lokalisation unterstützt. Allerdings wurden diese Beobachtungen in embryonalen Epidermiszellen gemacht. Stele und Epidermis lassen sich jedoch nicht miteinander vergleichen. Vermutlich gibt es in beiden Fällen ein spezifisches Programm zur Positionierung des PIN1-Auxintransporters. Die polare Lokalisation der ektopisch exprimierten ENP- und *NPY4*-Proteine findet also in der jeweiligen Domäne des anderen Proteins statt.

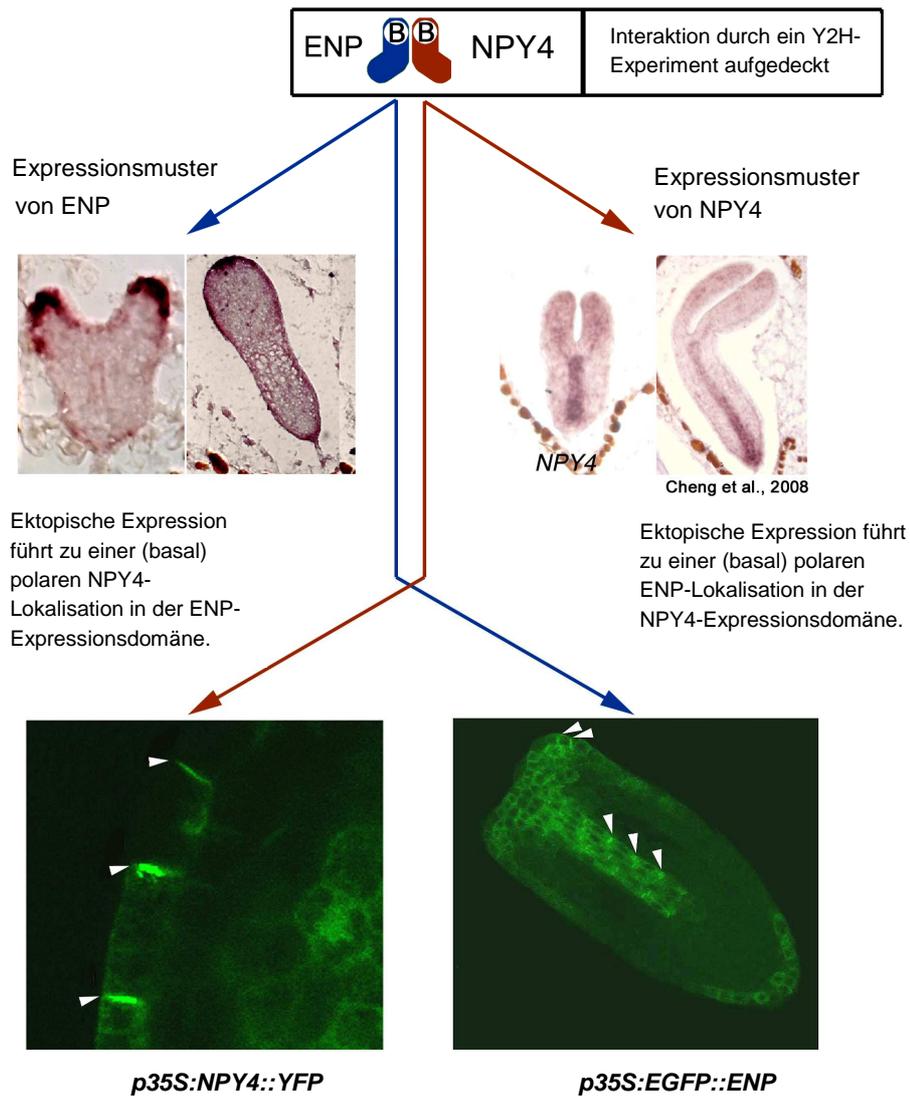


Abb. 40: Ektopische Expression von ENP und NPY4 und polare Proteinlokalisierung in der Expressionsdomäne des jeweils anderen Gens. Die Lokalisation der NPY4::YFP-Fusion ist in der Epidermis eines Wildtyp-Embryos, die der EGFP::ENP-Fusion in einer keimblattlosen *pid enp*-Doppelmutante gezeigt. Pfeilköpfe weisen jeweils auf die Polarität in der Stele bzw. Epidermis hin.

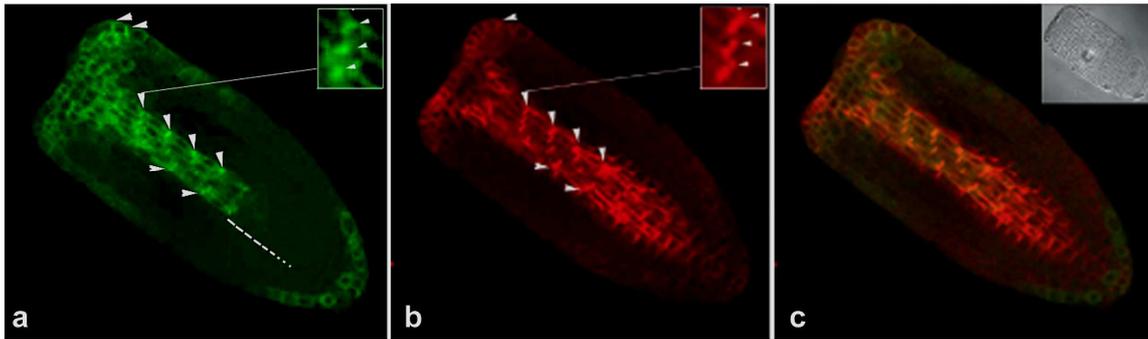


Abb. 41: Vergleich der Lokalisation von ENP und PIN1. (a-c) Keimblattloser *pid enp/pid enp* Embryo im Torpedo-Stadium. (a) *p35S::EGFP::ENP*. Das Inset zeigt eine Ausschnittsvergrößerung mit EGFP::ENP aus dem Bereich der Stele. (b) PIN1 Lokalisation (primärer PIN1 und sekundärer fluoreszierender Antikörper). Das Inset zeigt eine Vergrößerung der gleichen Region wie in (a). (c) Überlagerung von (a) und (b). Pfeilköpfe weisen auf polare Lokalisation der jeweiligen Proteine hin (in der Stele basal; einige Zellen in der Epidermis zeigen apikale Lokalisation). Die gestrichelte Linie in (a) zeigt, dass die p35S-getriebene Expression von ENP den basalen Bereich des Embryos noch nicht erfasst hat. Dies gilt nicht für Columella Zellen. In jüngeren Stadien erfasst diese Expression nur die apikale Region (siehe auch Abb. 40). Zu beachten ist, dass deswegen die Überlagerung von (ektopischen) ENP und PIN1 in (c) nur dort in der Stele zu Orangefärbung führt, wo ENP exprimiert und mit PIN1 kolokalisiert ist.

Das Yeast Two-Hybrid Experiment deutet darauf hin, dass NPY4 und ENP einen heterodimeren Proteinkomplex bilden. Im frühen Stadium der Embryogenese (z. B. Oktantstadium), wenn sich die Expression beider Proteine noch überlagert, wäre dies denkbar, doch in der späteren embryonalen Entwicklung ist die Bildung eines heterodimeren Komplexes aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsdomänen unwahrscheinlich. Vermutlich würde eine Interaktion über die in beiden Proteinen vorhandene BTB/POZ-Domäne erfolgen, deren 5'-Ende für eine polare Lokalisation notwendig zu sein scheint (Trembl, 2007). Andererseits ist eine homodimere Bindung von ENP bzw. NPY4 genauso möglich. Da sich im fortgeschrittenen Stadium die Expressionsmuster der Proteine deutlich unterscheiden, bilden beide Proteine hier vermutlich einen homodimeren Komplex. Durch noch nicht identifizierte Prozesse kann jedoch eine Heterodimerisierung nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnte hier ein Mechanismus aufgedeckt worden sein, bei dem NPY4 die polar basale Lokalisation von PIN1 in der Stele beeinflusst. Da PID in diesem Bereich nicht aktiv ist und die ektopische Expression der Kinase in der Stele eine apikale Lokalisation von PIN1 verursacht (Friml et al., 2004), spielt PID bei diesem Verfahren vermutlich keine Rolle. Die basale Lokalisation von ENP in den vaskulären Elementen konnte erst sehr spät in alten *laterne*-Embryonen (*enp pid/enp pid*) beobachtet werden. Die Ursache liegt im 35S-Promotor, der dem Fusionsprotein vorgeschaltet ist. Er ist erst ab dem späten Herzstadium besonders aktiv und wird im Embryo räumlich erst im Verlauf der Embryogenese von den Keimblättern in Richtung Wurzelspitze aktiv. Zudem ist es mit der fortschreitenden embryonalen Entwicklung immer schwieriger GFP-Fusionsproteine nachzuweisen.

## 4.5 Entstehung von Bilateralsymmetrie aus Asymmetrie

Die Entwicklung pflanzlicher Organe steht in Abhängigkeit regionaler Auxinmaxima. Die polare Lokalisation von PIN1 wird durch die PINOID Kinase kontrolliert. PIN1 ist für den apikalen und zur Spitze orientierten Auxintransport in der Epidermis verantwortlich. Die Voraussetzung zur Bildung von Keimblättern ist dadurch gegeben. Wie jedoch der Auxin Efflux-Carrier während der frühen Embryogenese verteilt ist, damit Keimblattprimordien initiiert werden können, ist nicht gezeigt. Woodrick et al. (2000) konnte bereits eine zeitversetzte Festlegung des Zellschicksals der gegenüberliegenden Keimblattprimordien zeigen. Die Kotyledonen dienen dann als Referenzpunkte für die Anlage der postembryonalen Blätter (Woodrick et al., 2000; Berleth und Chatfield, 2002). Durch sogenannte „Developmental Landmarks“, die bei der Schicksalskartierung von Zellen als Referenzpunkte dienen, kann das phyllotaktische Muster und damit die Reihenfolge der Entstehung der Kotyledonen bzw. Blätter festgelegt werden. Die asymmetrische Akkumulation von STM-mRNA im frühen Embryo (Long und Barton, 1998) steht dabei in enger Korrelation mit der Bildung von Keimblättern zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese, da die Spezifikation der meristematischen Identität der beiden Keimblätter ebenso zeitlich versetzt ist (Woodrick et al., 2000). Bei der Hervorwölbung der Keimblattanlagen lässt sich ihre adaxial-abaxiale Polarität festlegen. In *phabulosa* Mutanten wurde gezeigt, dass die adaxiale Blattoberfläche unabhängig vom SAM die Expression von STM induzieren kann (McConnell und Barton, 1998). In wildtypischen Embryonen ist die linke Region der ersten Keimblattanlage scheinbar das erste Organschicksal, das im Embryo induziert wird (Woodrick et al., 2000). Dadurch wird wahrscheinlich ein negativer Einfluss auf das benachbarte Gewebe ausgeübt und das zweite Primordium kann gebildet werden. Es wird vermutet, dass anschließend das Zellschicksal des rechten Teils des ersten Keimblatts verwirklicht wird (Woodrick et al., 2000). Mit der Festlegung des adaxialen Schicksals wird STM exprimiert.

In dieser Arbeit wurde versucht, den Zusammenhang zwischen der asymmetrischen Initiation der Keimblattprimordien und dem Verteilungsmuster des PIN1 Auxin Efflux-Carriers durch 3D-Rekonstruktionen mit transgenen *Arabidopsis* Embryonen aufzuklären. PIN1 wird bis zum 16-Zell-Stadium unpolar exprimiert. Erst ab dem 32-Zell-Stadium wird PIN1 polar an den basalen Membranen der provaskulären Zellen lokalisiert und transportiert Auxin zur Hypophyse. Der Efflux-Carrier wird im Transitionsstadium polar an den gegenüberliegenden Flanken der apikalen Embryodomäne lokalisiert, was vermutlich zur Bildung von Auxinmaxima an diesen Stellen führt (Möller und Weijers, 2009). Eine exakte Zuordnung des PIN1 Auxin-Transporters zur basal-apikalen bzw. lateralen PM war jedoch anhand der 3D-Rekonstruktionen nicht möglich. Im Verlauf der Embryogenese zeigten sich im „upper tier“ deutliche Unterschiede in der Lokalisation von PIN1. Demnach ist Auxin bis zum frühen Globularstadium durch die einheitliche Verteilung von PIN1 im gesamten Embryoapex gleichmäßig vorhanden. Anzeichen einer Bilateralsymmetrie gibt es in diesem Stadium nicht, allerdings konzentriert sich Auxin in manchen Embryonen bereits im Zentrum oder asymmetrisch an einer Seite des Apex. Diese Beobachtung erhärtet sich in der fortschreitenden Entwicklung bis zum späten Globularstadium. Erst ab dem Transitionsstadium ist PIN1 gleichmäßig an den lateralen Seiten des

Embryoapex zu sehen. Mittels *DR5rev::GFP* würden in diesen Regionen vermutlich gleich starke Auxinmaxima nachgewiesen werden können. Die 3D-Analyse dieser Embryonen lässt folgende Vermutung zu: Zunächst ist Auxin gleichmäßig im „upper tier“ des Embryos verstreut bevor es sich im Zentrum sammelt. Anschließend konzentriert sich das Phytohormon aus den eingenommenen Positionen heraus zunehmend asymmetrisch auf eine Seite des Embryos, wobei das Zellschicksal in dieser Region die Bildung des ersten Keimblattprimordiums bedingt. Im direkten Anschluss wird auch auf der gegenüberliegenden Seite des Apex ein Auxinmaxima gebildet, das die zeitversetzte Initiation des zweiten Keimblatts ermöglicht. Die zunächst gleichmäßige Verteilung von Auxin im Apex und die Akkumulation an beiden Seiten des Apex in der späteren Embryogenese scheinen eindeutig. Unklar wäre demnach, ob Auxin zuerst asymmetrisch oder zentral im Apex verteilt ist. Dass Bilateralsymmetrie aus einer asymmetrischen Verteilung des Auxin Efflux-Carriers entsteht wird durch die Kanalisierungshypothese unterstützt (Reinhardt et al., 2003). Demnach leitet eine Akkumulation von Auxin im Apex die Entstehung eines Blattprimordiums ein. Dies würde die verstärkte Expression von PIN1 und damit eine hohe Konzentration an Auxin im zentralen Bereich des Apex erklären. Umliegende epidermale Zellen transportieren dann Auxin zur Primordiumspitze, was zur Ausbildung eines Maximums führt. Auch diese Tatsache kann durch die asymmetrische Verteilung von PIN1 erklärt werden. Da Auxin nach und nach von der Umgebung des ersten Primordiums absorbiert wird, kann erst in einiger Entfernung ein neues Keimblatt entstehen. Dieses Modell deutet darauf hin, dass PIN1 und damit auch Auxin zunächst zentral lokalisiert ist und sich dann zeitlich versetzt auf die Seiten des Apex konzentriert. Mit Erreichen eines bestimmten Auxin-Grenzwertes durch seinen polaren PIN1-vermittelten Transport, wird ein entwicklungs-genetisches Programm gestartet, das in diesem Fall das Schicksal der Zellen zur Bildung von Keimblattprimordien verwirklicht. Eine falsche bzw. unpolare Lokalisation von PIN1 verursacht z. B. durch einen Defekt in der Endozytose, könnte zu einer ektopischen Expression von Auxin am Syntheseort in den Keimblättern führen. Diese verstärkte Auxinaktivität löst die Expression von Auxin-induzierten Regulatoren zur Wurzelbildung (*PLETHORA*-Gene) und damit ein wurzelspezifisches Programm aus, wodurch das Schicksal der Keimblattzellen zu Wurzelzellen transformiert wird (Dhonukshe et al., 2008).

## 4.6 Störungen lokaler Auxinmaxima verändern die Keimblattentwicklung

Dass die Bildung von Auxinmaxima für die Keimblattinitiation essentiell ist zeigt eine Mutante, die nicht speziell von der Initiation betroffen ist, sondern von der Anzahl der Kotyledonen. Embryonen, die in *aco* homozygot mutant sind bilden einen Spezialfall zur Entstehung von Bilateralsymmetrie, da diese nur ein Keimblatt besitzen und sie damit im asymmetrischen Entwicklungsstadium verweilen. Es ist möglich, dass der Auxin Efflux-Carrier in dieser Mutante zu keiner Zeit in gleicher Intensität an den lateralen Seiten des Embryoapex exprimiert, sondern nach dem zuvor aufgestellten Modell zur Entstehung von Bilateralsymmetrie (vgl. 4.5) die Endstufe in der asymmetrischen Verteilung von PIN1 erreicht ist. Durch den polaren Transport von

Auxin zum späteren Primordium verursacht das dort entstandene Maximum die Initiation des Keimblatts. Da Auxin nach der Kanalisierungshypothese erst in einiger Entfernung zum ersten Primordium akkumuliert, besteht die Möglichkeit, dass in *aco*-Embryonen Auxinmaxima durch den PIN1-Transporter zwar gebildet werden, ihre räumliche Entfernung zueinander jedoch zu gering ist, dass ein neues Keimblatt entstehen kann. Andererseits könnte das zweite Maximum unter dem Grenzwert liegen, um ein zell- und entwicklungsspezifisches Programm zur Bildung des zweiten Keimblatts zu induzieren. Dies wurde bereits in *laterne*-Embryonen gezeigt. Die Auxinmaxima des SAM sind hier entlang des apikalen Pols verteilt oder sehr schwach, wodurch kein „echtes“ Maximum entstehen kann (Trembl et al., 2005); es könnte sich dabei jedoch auch um die Maxima der Folgeblätter handeln. Diese Verteilung von Auxin ist auch bei *aco*-Embryonen denkbar. Der Einfluss der zeitlichen und räumlichen Verteilung des Auxin Efflux-Carriers auf die Entwicklung von Keimblättern könnte durch die Keimblattmutanten *laterne* und *aco* näher analysiert werden. So könnte man mit Hilfe einer Linie, die zu 100 % *laterne*-Embryonen segregiert, das Expressionsmuster an Hand von 3D-Rekonstruktionen von der frühen Embryogenese an verfolgen und mit der wildtypischen Verteilung vergleichen. Gleiches trifft auf die Analyse einkeimblättriger *Arabidopsis* Embryonen zu, wobei in diesem Fall zu berücksichtigen wäre, dass bei *aco/aco* keine vollständige Penetranz vorliegt. Das *DR5rev::GFP* Konstrukt könnte Auxinmaxima in jungen wildtyp-, *laterne*- und *aco*-Embryonen nachweisen, ob jedoch die Auxinkonzentrationen in den frühen embryonalen Stadien über der detektierbaren Grenze liegen, muss getestet werden.

Ein Problem, das dieses Experiment mit sich bringt, ist die 3D-Analyse an sich und die Schwierigkeit, ein komplettes, dreidimensionales Abbild des Embryos zu erstellen. Mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnte zu diesem Zeitpunkt nur ein zu 60 %, in seltenen Fällen ein zu 80 % vollständiges Bild eines jungen *Arabidopsis* Embryos erzeugt werden. Eine Lösung wäre einerseits die Verwendung eines 2-Photonen-Mikroskops. Die Funktionsweise ist dem eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops sehr ähnlich, hat jedoch zwei entscheidende Vorteile: zum einen ist die Eindringtiefe im Gegensatz zu 50-80  $\mu\text{M}$  mit 200-1000  $\mu\text{M}$  wesentlich höher (Wang et al., 2009), zum anderen wird dadurch, dass nur im Fokuspunkt eine ausreichende Photonendichte herrscht, ein Ausbleichen des Präparats auf einen kleinen Bereich um den Fokuspunkt beschränkt. Die zweite Möglichkeit baut auf die erste auf und erinnert an die adaptive Optik. Biologische Materialien bestehen aus inhomogenem dickem Gewebe, was eine ungewollte Lichtbrechung und damit optische Aberrationen zur Folge hat. Herkömmliche konfokale Laser Scanning Mikroskope können die Brechung der Linse nicht optimal ausnutzen, da der Laserstrahl starr auf dieselbe Stelle der Linse trifft. Liegt das Präparat in einem ungünstigen Winkel, so kann kein vollständiges Bild erstellt werden. Variiert jedoch entweder die Position der Linse oder des Lasers, so verändert sich auch der Eintrittswinkel der Strahlen und die Linsenbrechung kann in vollem Umfang ausgenutzt werden. Das gebündelte Licht trifft dann nicht mehr zentral sondern seitlich auf das Objekt (Heintzmann, 2010). Der Eintrittswinkel kann demnach so optimiert werden, dass optische Abweichungen korrigiert werden und das Präparat nahezu vollständig abgetastet werden kann. Ein 2-Photonen-Mikroskop, in dem die verschiedenen Lichtbrechungen in der Linse verwendet werden können, würden vermutlich ein komplettes Abbild des *Arabidopsis* Embryos wiedergeben.

## 4.7 Ektopische Expression von ENP in *laterne*-Mutanten

ENP und PID üben einen synergistischen Effekt auf die Polarität des Auxin Efflux-Carrieres aus und ermöglichen so eine korrekte Organogenese im Embryo und die Entwicklung von Blüten. Die direkte oder indirekte Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von PIN1 durch ENP alleine konnte mit Hilfe des *p35S:EGFP::ENP* Konstrukts beobachtet werden. Aufgrund der späten Aktivität des 35S-Promoters in *Arabidopsis* Embryonen kann das *p35S:EGFP::ENP* Konstrukt in der Regel zu keiner Zeit die Bildung von Kotyledonen induzieren. Dies erlaubt anhand ihres keimblattlosen Phänotyps die unzweifelhafte Selektion von *pid enp* Doppelmутanten. Die postembryonale Expression von ENP wandelte den *pid enp* Phänotyp in einen *pid* Phänotyp um und führte zur Entwicklung von Pflanzen, die zu 100 % *pid enp* doppelmutante Keimlinge bilden. Normalerweise bedingt eine *pid enp/pid enp* Mutation eine vollständige Sterilität aufgrund der blind endenden Sprosse. Die Rettung von *enp* wird durch das ENP-Transgen in manchen Fällen sogar übertroffen. Weder Konstrukte mit einem verkürztem ENP noch mit *At2g23050* konnten die Funktion von ENP und PID retten. Das *p35S:EGFP::ENP* Konstrukt kreierte eine neue Pflanzenlinie, die mit vollständiger Penetranz keimblattlose Nachkommen segregiert und damit nicht nur die Analyse keimblattloser Embryonen enorm erleichtert sondern auch die Forschung zur Aufklärung eines keimblattspezifischen, genetischen Programms. In diesen geretteten *laterne*-Embryonen wurde eine apikale Lokalisation von ENP in den epidermalen Zellen detektiert, doch die Positionierung von PIN1 in diesem Gewebe ist unklar. Somit kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob eine künstliche, 35S-getriebene Expression von ENP in der Epidermis in keimblattlosen Embryonen eine Umkehrung der PIN1-Polarität von basal nach apikal nach sich zieht, die dann wiederum einer wildtypischen Lokalisation entsprechen würde. In diesen Embryonen konnte jedoch überraschenderweise eine basale ENP-Lokalisation in den vaskulären Elementen detektiert werden, die jedoch abhängig von p35S eine zeitliche und räumliche Abhängigkeit aufweist. Eine ektopische Expression ist nur in späten Torpedostadien oder älteren *laterne*-Embryonen zu beobachten, wobei die Intensität des GFP-Signals zur Wurzelspitze hin abnimmt. In jungen *laterne*-Embryonen zeichnete sich durch eine zunächst diffuse, dann polare Positionierung des ENP-Proteins in den zentralen Korpuszellen eine basale Lokalisation in den Leitelementen ab. Damit kolokalisieren der PIN1 Auxin Efflux-Carrier und ENP nicht nur in den epidermalen Zellen, sondern auch im vaskulären System. Da sich Epidermiszellen und Zellen in den Leitelementen nicht miteinander vergleichen lassen, ist es möglich, dass durch spezifische Programme ENP in der Stele durch PIN1 beeinflusst wird, in der Epidermis jedoch ENP PIN1 unterstützt.

Folgende Beobachtungen deuten darauf hin, dass ENP ein neuer und essentieller Regulator der PIN1 Polarität ist: der mutante *enp pid* Phänotyp, die vollständige Umkehrung der PIN1 Polarität in *enp pid* (Tremel et al., 2005), die zelluläre PIN1 Verteilung nach der Neusynthese (Dhonukshe et al., 2008), der Transport von ENP und PIN1 in unterschiedlichen Vesikeln über einen BFA-insensitiven (ENP) bzw. BFA-sensitiven (PIN1) Pathway sowie die Kolokalisation von PIN1 und ENP.

## 4.8 Transkriptomanalysen decken differentiell exprimierte Gene in *laterne*- und Wildtyp-Embryonen auf

Um neben ENP weitere Gene zu identifizieren, die an einem keimblattspezifischen Programm beteiligt sind, wurde die Genexpression aller *Arabidopsis*-Gene in Embryonen ohne Keimblätter und in Wildtyp-Embryonen verglichen. 25 der über 25000 Gene werden differentiell exprimiert. Die im Wildtyp hoch regulierten Gene kodieren hauptsächlich für Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen z. B. die TCP-Transkriptionsfaktoren 2, 4 und 24, deren Familie nach ihren ersten charakterisierten Mitgliedern in dieser Familie (TB1, CYC und PCFs) benannt wurden (Cubas et al., 1999). Die hohe Aktivität erklärt sich dadurch, dass sie an der Bildung des SAM und der Entwicklung lateraler Sprossorgane beteiligt sind und auch die Blattentwicklung kontrollieren (Koyama et al., 2007; Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003). Die Promotoren dieser drei TF sind in den Kotyledonen und speziell in den vaskulären Regionen aktiv (Koyama et al., 2007). In keimblattlosen Embryonen werden diese Gene weniger transkribiert. Wird die Expression der *CUC* Gene durch die TCPs nicht mehr unterdrückt, führt die ektopische Expression der *CUC* Gene zu einer Inhibierung des Wachstums von Organen und weiteren Defekten in der Organogenese (Koyama et al., 2007). Die Auswirkungen einer Repression dieser TF spiegeln sich unter anderem in der *laterne*-Mutante wieder. Hier konnte eine Expression des *CUC2*-Gens, das normalerweise nach dem Herzstadium nur im Grenzbereich zwischen Meristem und Organprimordium aktiv ist, auch im fortgeschrittenen Stadium der Embryogenese in der Region des späteren SAM detektiert werden (Trembl et al., 2005). Diese veränderte *CUC2*-Domäne, die durch eine verminderte Aktivität von TCP2, TCP4 und/oder TCP24 verursacht worden sein könnte, hat möglicherweise eine Deletion der Keimblätter zur Folge. Allerdings ist zu bemerken, dass die Expressionsdomäne von STM in *laterne*-Mutanten ebenfalls verändert ist und mit der von *CUC* überlappt (Trembl et al., 2005). In ähnlicher Weise wird die teilweise Unterdrückung von Keimblättern in *pid pin1* Doppelmutanten auf die Ausbreitung der Expressionsdomäne von *CUC*-Genen zurückgeführt (Furutani et al., 2004). Die Folgen einer TCP-Mutation könnte auch den monokotylen Phänotyp der rezessiven *aco*-Mutante erklären. *TCP1* liegt in einem Bereich auf Chromosom 1, der für eine Lokalisation des *ABANICO*-Gens in Frage kommt. So besteht die Möglichkeit, dass *TCP1* zu *aco* allelisch ist und die durch Beschuss mit FN induzierte Deletion in dem *TCP1*-Gen liegt. Die TCP-abhängige Regulation der *CUC*-Expression ist daher für die Entwicklung der Pflanzen wichtig und erklärt die differentielle Expression der *TCP*-Gene im keimblattlosem gegenüber dem Wildtyp-Embryo. Auch die in Wildtyp-Embryonen verstärkte Aktivität der für TF-kodierenden Gene *At2g30420* und *At3g58070*, die beide an der Bildung von Trichomen beteiligt sind (Kirik et al., 2004; Gan et al., 2006), ist aufgrund ihrer Funktionen schlüssig. Eine Analyse der Gewebespezifität der Gene zeigt im Gegensatz zu den Genen, die im Wildtyp unterexprimiert sind, eine eindeutige Tendenz zu einer hohen Expression in den Keimblättern. In *laterne*-Embryonen sind dagegen die besonders stark exprimierten Gene vor allem im Samen und den Schoten aktiv und verhindern im Wildtyp die vorzeitige Inhibition von Signalen zur Reifung und Keimung. Diese Gene kodieren hauptsächlich für Proteine mit enzymatischer Aktivität. *At2g29380* wird z. B.

durch ABA induziert und besitzt eine Serin/Threonin Phosphatase-Aktivität. Abscisinsäure ist ein Wachstumsinhibitor und kann unter anderem die Induktion und Aufrechterhaltung der Samen- und Knospenruhe bewirken. Die im Gegensatz dazu hohe Aktivität des Gens *At4g11140* im Wildtyp, das auf das wachstumsfördernde Phytohormon Ethylen reagiert (Rashotte et al., 2010), steht daher im Einklang mit der in keimblattlosen Embryonen hohen Expression von Genen, die eine Inhibierung des Wachstums bewirken. Stoffe, die das Wachstum in Pflanzen fördern bzw. hemmen, regulieren gemeinsam Alterungsvorgänge, Blütenbildung, Fruchtreife und andere pflanzliche Entwicklungsprozesse.

Unter den differentiell exprimierten Genen befinden sich fünf, die für nicht bekannte Proteine kodieren. Durch Mikroarray-Studien lassen sich unter Umständen Informationen über den Einfluss bzw. die Funktion eines Gens ableiten, wenn man andere Gene identifiziert, die sein Expressionsmuster teilen. Mit Hilfe der sog. „Cluster“-Analyse kann man Gen-Sets identifizieren, deren Regulation aufeinander abgestimmt ist. Gene, die unter den verschiedensten Umständen gemeinsam ein- oder abgeschaltet werden, arbeiten möglicherweise auch in der Zelle zusammen. Durch Zuordnung zu bekannten Genen, die sein Transkriptionsverhalten teilen, kann die Funktion eines unbekanntes Gens charakterisiert werden. Diese Clusteranalyse kann eingesetzt werden, um z. B. die Genexpressionsprofile biologischer Prozesse, die nach der Initiation des Keimblatts für dessen Aufbau als Speicher entscheidend sind, zu untersuchen. Ein nächster Schritt wäre die Anwendung dieses Verfahrens für die Gene *At5g15725*, *At4g00770*, *At5g21940*, *At5g5965* und *At5g10040*, die laut Mikroarray-Analyse „laterne-Mutanten gegen Wildtyp-Embryonen“ differentiell exprimiert werden und deren Proteinfunktion unbekannt ist.

## 4.9 AGC-Kinasen und ihr Einfluss auf den gerichteten Auxintransport

PID, ENP und PIN1 sind gemeinschaftlich am polaren Auxintransport beteiligt, doch seine Regulation durch Signalproteine ist weitgehend unerforscht. Neue Studien haben gezeigt, dass die Mitglieder einer zu den AGC Proteinkinasen homologen Genfamilie (D6 Protein-Kinase, D6PK) für einen effizienten Transport des Phytohormons erforderlich sind (Zourelidou et al., 2009). Die pflanzenspezifischen AGC-Kinasen wurden nach ihrer Homologie zu der tierischen cAMP-abhängige Proteinkinase A, cGMP-abhängige Proteinkinase G und Phospholipid-abhängige Proteinkinase C benannt (Bögge et al., 2003). In *Arabidopsis* zählen neben PINOID 37 weitere Kinasen zu der AGC-Kinasefamilie. Der verminderte Auxintransport in den Wurzelspitzen von *d6pk* Mutanten zeigt, dass D6PK für einen effizienten Transport des Phytohormons erforderlich ist (Zourelidou et al., 2009). D6PK ist an der basalen Membran verschiedener *Arabidopsis* Wurzelzellen lokalisiert, besonders in der Stele, den Cortezellen und in der Epidermis. Die Lokalisation in der Stele erinnert dabei an die Polarität des PIN1 Auxin Efflux-Carriers. Immunohistochemische Färbungen konnten eine identische Positionierung der Kinase nachweisen. Experimente in *pin1* Mutanten lassen vermuten, dass PIN1 für die PM-assoziierte Lokalisation von D6PK verantwortlich ist, da in diesen Mutanten D6PK weiterhin an der PM positioniert ist

(Zourelidou et al., 2009). D6PK und PIN1 interagieren nicht nur genetisch miteinander sondern die Kinase phosphoryliert die PIN-Proteine *in vitro* und *in vivo* auch. Obwohl PID und D6PK derselben AGC-Unterklasse angehören, sind ihre Funktionen nicht redundant und sie kontrollieren die Entwicklung der Pflanzen auf unterschiedliche Weise, da im Gegensatz zu PID Funktionsverlust- bzw. Überexpressionsmutanten *d6pk* Mutationen die Polarität des PIN1 Efflux-Carriers nicht verändern. Obwohl *d6pk* Einzelmutanten keinen sichtbaren Phänotyp aufweisen, sind in Mehrfachmutanten (*d6pk d6pk11 d6pk12 d6pk13*) mit 10%iger Penetranz die Morphologie und Anzahl der Keimblätter verändert (Zourelidou et al., 2009). Da die Kinase auch in Keimblättern exprimiert wird, steht sie möglicherweise auch in Verbindung mit der Keimblattentwicklung. Eine Analyse der Lokalisation von D6PK im Embryo könnte Aufschluss über eine Kolo-kalisation in den epidermalen und vaskulären Zellen mit PIN1 und ENP geben und gleichzeitig ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion der Proteine sein. Experimente mit unterschiedlichen Kombinationen der Mutationen in *D6PK*, *ENP* und *PID* könnten vielleicht einen möglichen Einfluss der Kinase auf die Initiation der Keimblätter zeigen. Ein Beispiel wäre die Analyse der Lokalisation von PIN1 in *d6pk enp* oder *d6pk npy4* Doppelmutanten.

Der Einfluss der AGC-Kinasen auf die Auxin-assoziierte Organogenese wurde bereits an Hand des keimblattlosen Phänotyps von *PID PID2 WAG1 WAG2* Mutanten gezeigt (Cheng et al., 2008). Auch die Interaktion von PID mit ENP stellt die Bildung von Keimblättern und die lokale Positionierung von PIN1 sicher (Tremel et al., 2005). Analog zu dieser Verbindung interagiert NPH3 mit der PID-homologen AGC-Kinase PHOT1 und lokalisiert auch hier die PIN-Proteine, um auf phototrope und geotrope Stimuli durch den lateralen Transport von Auxin antworten zu können (Pedmale et al., 2007; Christie et al., 1998). In beiden Fällen entsteht die asymmetrische Akkumulation von Auxin nach einem entwicklungsspezifischen oder externen physikalischen Stimulus. In der vegetativen Entwicklung beruht die Positionierung von PIN1 in der Pflanze allein auf die Funktion von PID, was jedoch während der Blütenbildung vermutlich erneut geändert wird, da Doppelmutationen in *pid* und *enp* einen starken Phänotyp aufweisen (Tremel et al., 2005). Warum dieses Sicherungssystem während der vegetativen Phase bei der Initiation von Rosettenblättern ausfällt, ist unbekannt. NPH3 interagiert physikalisch mit PHOT1 (Motchoulski und Liscum 1999; Pedmale und Liscum 2007). Wie die meisten AGC-Proteine in *Arabidopsis* wird PID durch PDK1 aktiviert (Bögre et al., 2003; Zegzouti et al., 2006), die Autophosphorylierung von PHOT1 wird jedoch durch Blaulicht ausgelöst (Christie et al., 1998). Im Gegensatz zu PHOT1 verfügen PID und seine Homologen WAG1 und WAG2 nicht über eine Photorezeptordomäne, weshalb wahrscheinlich zusätzliche Adapterproteine am PID/ENP Pathway beteiligt sind. Die molekularen Mechanismen, wie ENP PIN1 die Organogenese und damit den PAT beeinflusst, bleibt zu klären. Dabei muss die Dynamik des Transports von ENP und seine Aufrechterhaltung der Polarität an der PM sowie die Signifikanz funktionaler Domänen in Zusammenhang mit der Lokalisation von ENP und PIN1 analysiert und mit ENP interagierende Proteine identifiziert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die dynamische, differentielle Verteilung des Phytohormons Auxin innerhalb des Pflanzengewebes kontrolliert eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen. Die Bildung von Keimblattprimordien ist dabei von lokalen Auxinmaxima abhängig. Die polare Lokalisation des PIN1 Auxintransporters, der durch die Kinase PID kontrolliert wird, ist für den apikalen Transport des Phytohormons in der Epidermis verantwortlich und wird durch *ENP* unterstützt. Eine simultane Mutation der Gene *PID* und *ENP* führt zu einem Verlust von Keimblättern und Blüten. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Entwicklung von Keimblättern muss die Funktion von *ENP*, die Regulierung seiner eigenen Polarität und seine Interaktion mit anderen zellulären Elementen aufgedeckt werden. Eine vorangegangene Arbeit hatte gezeigt, dass das NPH3-ähnliche Protein *ENP* in der PM der Epidermis von *Arabidopsis* Embryonen apikal lokalisiert ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die spezifische Positionierung von *ENP* genauer zu analysieren. Aus den vorgelegten Untersuchungen resultiert:

1. Die Polarität von *ENP* ist von der Integrität des BTB/POZ-Motivs abhängig.
2. Seine Lokalisation zeigt auch eine räumliche und zeitliche Abhängigkeit.
3. Die Koloalisation von *ENP* und PIN1 in der Epidermis deutet auf einen direkten oder indirekten stabilisierenden Einfluss von *ENP* auf die PIN1-Polarität hin.
4. Die Lokalisation von *ENP* ist insensitiv gegenüber verschiedenen Pharmazeutika und weist, mit einer Ausnahme, identische Charakteristika wie PIN1 auf. Die Polarität von *ENP* ist aber im Gegensatz zu PIN1 nicht von BFA-sensitiven Vesikeln abhängig. *ENP* erreicht sein Ziel auf einem anderen, noch unbekanntem, zellulären Transportweg.
5. *ENP* und das *ENP*-ähnliche At2g23050 sind in frühen Globularstadien potentielle Interakteure. Die im Hefesystem aufgefundene Interaktion weist aber möglicherweise auf Homodimerisierung dieser Proteine in ihren jeweiligen Expressionsdomänen hin. Das erklärt, dass ektopisch exprimiertes At2g23050 in der Epidermis wie *ENP* polarisiert ist und umgekehrt ektopisch exprimiertes *ENP* in der Stele basal lokalisiert ist. Ursache ist vermutlich eine Interaktion durch eine ähnliche, aber nicht identische, BTB/POZ-Domäne zwischen dem jeweils endogen exprimierten und dem ektopisch exprimierten Protein.
6. „Rescue“-Experimente zeigen, dass die postembryonale Expression von *ENP* den *pid enp* Phänotyp in einen *pid* Phänotyp umwandelt. Die dabei entstehenden Pflanzen segregieren zu 100 % *pid enp* (= *laterne*) Keimlinge. Man findet in einigen Zellen später *laterne*-Embryonen das EGFP::*ENP*-Fusionsprotein apikal lokalisiert vor. Die Positionierung der PIN1-Proteine in diesem Gewebe ist jedoch unklar.

In dieser Arbeit wurden 3D-Rekonstruktionen von *Arabidopsis* Embryonen erstellt. Diese weisen auf eine asymmetrische Verteilung von PIN1 in Stadien vor der Entstehung der Keimblätter hin. Die daraus resultierende asymmetrische Auxindistribution im Apex scheint der Entstehung von Bilateralsymmetrie voran zu gehen.

Schließlich wurden durch genomweite Transkriptomanalysen zwischen keimblattlosen *laterne*- und Wildtyp-Embryonen 25 differentiell exprimierte Gene aufgedeckt. Diese geben Ansatzpunkte, um die nächsten Schritte der Keimblattentwicklung nach der Initiation zu untersuchen.

Diese Arbeit verdeutlicht ein komplexes Zusammenspiel von *ENP*, *PID*, *PIN1* und möglicherweise ENP-ähnlichen Proteinen und liefert neue Erkenntnisse für das weitere Verständnis, in welcher Weise Auxin die Organogenese in Pflanzen reguliert.

## Summary

The phytohormone auxin is known to control a remarkable variety of developmental processes within plant tissues by its dynamic and differential distribution. The PIN1 auxin transporter establishes local auxin maxima and in turn new leaf primordia. Its polar localization is necessary for the apical auxin transport in the epidermis and is controlled by the PID kinase and by the NPH3 protein ENP respectively. Simultaneous mutation of *PID* and *ENP* results in failure to develop cotyledons and flowers. To elucidate the molecular basis of cotyledon formation, the function of ENP must be analyzed. This includes the analysis of the regulation of its own polarity and its interaction with other cellular elements. Former studies showed an apical localization of the NPH3-like protein ENP at the PM in the embryo epidermis.

A major aim of this work was the detailed analysis of the specific localization of ENP. The results of the presented study are:

1. The polar apical specificity of ENP depends on the integrity of its BTB/POZ domain.
2. ENP localization depends on spatial and temporal cues respectively.
3. The co-localization of ENP and PIN1 suggests that ENP supports PIN1 polarity either directly or indirectly.
4. ENP polarity is insensitive to different pharmaceutical products and exhibits almost the same characteristics as PIN1 with one exception. In contrast to PIN1, ENP is not transported by BFA-sensitive vesicles. ENP reaches its destination on an unknown, cellular (vesicle) transport route.
5. The BTB/POZ domains of ENP and the ENP-like At2g23050 are similar and capable to interact. Thus in early globular stages, ENP and the ENP-like gene At2g23050 are putative interactors. The interaction detected by Y2H also suggests a homodimerisation of these proteins in their own expression domains in late embryo stages. This explains that in the epidermis ENP and ectopically expressed At2g23050 show the same polarisation. In reverse, ectopically expressed ENP is basally localized in the stele, the expression domain of At2g23050.
6. "Rescue"-Experiments showed that postembryonal expression of ENP transforms the *pid enp* phenotype into a *pid* phenotype. The generated plants segregate 100 % *pid enp* (= *laterne*) seedlings. In some cells of late *laterne*-embryos the EGFP::ENP-fusion protein is detected at the apical side. The localization of PIN1-proteins in this tissue is unclear.

In this work 3D-reconstructions of *Arabidopsis* embryos were performed. The results indicate an asymmetrical distribution of PIN1 in stages preceding cotyledon formation. Consequently, in the apex auxin is distributed asymmetrically and seems to be a prerequisite for the formation of bilateral symmetry.

At least genome wide transcriptional analysis between cotyledon-less *laterne*- and wildtype-embryos revealed 25 differentially expressed genes. They provide a starting-point to analyze the next steps of cotyledon formation after initiation.

This work points up the complex interplay of *ENP*, *PID*, *PIN1* and possibly ENP-like proteins and provides new insights for the further understanding of how auxin regulates plant organogenesis.

## 6 Literatur

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y. S., Amasino, R., Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119, 109-120
- Baldino, F., Chesselet, M F. und Michael, E. L. (1989). High-resolution *in situ* hybridization histochemistry. *Methods in Enzymology* 168, 761-777.
- Barton, M. K. und 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.
- Bellec, Y., Harrar, Y, Butaeye, C, Darnet, S, Bellini, C, Faure, J. D. (2002). Pasticcino2 is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 32, 713-722
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jürgens, G. und Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Bennett, S.R.M., Alvarez, J., Bossinger, G. und Smyth, D.R. (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8, 505-520.
- Berleth, T. und Chatfield, S. (2002). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book*.
- Berleth, T. and Jürgens, G. (1993). The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118, 575-587.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44
- Bögre, L., Okresz, L., Henriques, R. und Anthony, R.G. (2003). Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci* 8, 424-431.
- Boutte, Y., Crosnier, M. T., Carraro, N., Traas, J., Satiat-Jeunemaitre, B. (2006). The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *Journal of Cell Science* 119, 1255-1265.
- Boutte, Y., Grebe, M. (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 705-713
- Bowman, J. und Smyth, D. R. (1999). *Crabs Claw*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126, 2387-2396.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists).

Capron A., Chatfield S., Provart N., Berleth T. (2009). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. The Arabidopsis Book.

Chaudhury, A. M., Letham, S., Craig, S. und Dennis, E. S. (1993): *amp1* - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant Journal* 4, 907-916.

Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2430-2439.

Cheng, Y., Qin, G., Dai, X., Zhao, Y. (2008). NPY genes and AGC kinases define two key Steps in auxin-mediated organogenesis in Arabidopsis. *PNAS* 105, 21017-21022

Chin-Atkins, A. N., Craig, S., Hocart, C. H., Dennis, E. S., und Chaudhury, A.M. (1996). Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* 198, 549–556.

Christensen, S. K., Dagenais, N., Chory, J. und Weigel, D. (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* 100, 469-478.

Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. und Briggs, W. R. (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282, 1698-1701.

Chuang, C. F., Running, M. P., Williams, R. W., Meyerowitz, E. M. (1999). The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 13, 334-344

Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z. and Meyerowitz, E.M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567-1575.

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

Clouse, S. D. (2000). Plant development: A role for sterols in embryogenesis. *Current Biology* 10, 601-604

Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., Coen, E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant Journal* 18, 215-222

Delbarre, A., Muller, P., Guern, J. (1998). Short-Lived and Phosphorylated Proteins Contribute to Carrier-Mediated Efflux, but Not to Influx, of Auxin in Suspension-Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* 116, 833-844

Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D. G., Mravec, J., Stierhof, Y. D. und Friml, J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17, 520-527.

- Dhonukshe P., Tanaka H., Goh T., Ebine K., Mähönen A.P., Prasad K., Blilou I., Geldner N., Xu J., Uemura T., Chory J., Ueda T., Nakano A., Scheres B., Friml J. (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456, 962-967.
- Dhonukshe, P., Grigoriev, I., Fischer R., Tominaga, M., Robinson, D.G., Hasek, J., Paciorek, T., Petrásek, J., Seifertová, D., Tejos, R., Meisel, L.A., Zazimalová, E., Gadella, T.W. Jr., Stierhof, Y.D., Ueda, T., Oiwa, K., Akhmanova, A., Brock, R., Spang, A., Friml, J. (2008). Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *PNAS* 105, 4489-4494
- Faure, J. D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraissier, V., Prinsen, E., Barlier, I., Van Onckelen, H., Caboche, M. und Bellini, C. (1998). The *PASTICCINO* genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* 125, 909-918.
- Feraru E. und Friml J. (2008). PIN Polar Targeting. *Plant Physiology* 147, 1553-1559
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806-809.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., *et al.* (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306, 862-865.
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M. und Aida, M. (2004). PINFORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development* 131, 5021-5030.
- Furutani, M., Kajiwara, T., Kato, T., Trembl, B.S., Stockum, C., Torres-Ruiz, R.A. und Tasaka, M. (2007). The gene MACCHI-BOU 4/ENHANCER OF PINOID encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. *Development* 134, 3849-3859.
- Gan, Y., Kumimoto, R., Liu, C., Ratcliffe, O., Yu, H., Broun, P. (2006). *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS* Modulates the Regulation by Gibberellins of Epidermal Differentiation and Shoot Maturation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1383-1395.
- Gälweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226-2230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. und Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. und Jürgens, G. (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112, 219-230.
- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R. A., Mayer, U., Jürgens, G. (2003). Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* 131, 389-400

- Geldner, N. und Jürgens, G. (2006). Endocytosis in signalling and development. *Current Opinion in Plant Development* 6, 589-594.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053-1057.
- Gillmor, C. S., Poindexter, P., Lorieau, J., Palcic, M. M., Somerville, C. (2002). Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Cell Biology* 156, 1003-1013.
- Goode, B. L., Drubin, D. G. und Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 63-71.
- Grebe, M., Friml, J., Swarup, R., Ljung, K., Sandberg, G., Terlou, M., Palme, K., Bennett, M. J., Scheres, B. (2002). Cell Polarity Signaling in *Arabidopsis* Involves a BFA-Sensitive Auxin Influx Pathway *Current Biology* 19, 329-334
- Haberer, G., Erschadi, S. und Torres-Ruiz, R.A. (2002). The Arabidopsis gene PEPINO/PASTICCINO2 is required for proliferation control of meristematic and nonmeristematic cells and encodes a putative anti-phosphatase. *Dev Genes Evol* 212, 542-550.
- Haga, K., Takano, M., Neumann, R. und Iino, M. (2005). The Rice *COLEOPTILE PHOTOTROPISM1* gene encoding an ortholog of *Arabidopsis* NPH3 is required for phototropism of coleoptiles and lateral translocation of auxin. *Plant Cell* 17, 103-115.
- Hardtke, C. S. und Berleth, T. (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* 17, 1405-1411.
- Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C. and Faure, J. D. (2003). Hormonal control of cell proliferation requires *PASTICCINO* genes. *Plant Physiol* 132, 1217-1227.
- Heintzmann, R. (2010) Correcting distorted optics: back to the basics. *Nature Methods* 2, 108-110.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J.A. und Meyerowitz, E. M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* 15, 1899-1911.
- Helliwell, C. A., Chin-Atkins, A. N., Wilson, I. W., Chapple, R., Dennis, E. S., Chaudhury, A. (2001): The *Arabidopsis* *AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* 13, 2115-2125.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. und Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120-2123.
- Irish V. und Sussex I.M. (1992). A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meristem. *Development* 115, 745-753.

- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Rollin, C., Gaude, T. (2006). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature* **443**, 106-109
- Jönsson, H., Heisler, M. G., Shapiro, B. E., Meyerowitz, E.M. und Mjolsness, E. (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 1633-1638.
- Jürgens, G., Mayer, U., Torres Ruiz, R. A., Berleth, T. und Miséra, S. (1991): Genetic analysis of pattern formation in the *Arabidopsis* embryo. *Development Suppl* **1**, 27-38.
- Jürgens, G. and Mayer, U. (1994). *Arabidopsis*. In: EMBRYOS. Colour Atlas of Development. (London, Wolfe Publishing).
- Kaplan, D. R. und Cooke, T. J. (1997). Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. *Plant Cell* **9**, 1903-1919.
- Kaplinsky, N.J. and Barton, M.K. (2004). Plant biology. Plant acupuncture: sticking PINs in the right places. *Science* **306**, 822-823.
- Kirik, V., Simon, M., Wester, K., Schiefelbein, J., Hulskamp, M. (2004). *ENHANCER* of *TRY* and *CPC 2 (ETC2)* reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biology* **55**, 389-398.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M., Friml, J. (2006). Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **11**, 3171-3181.
- Kleine-Vehn, J., Langowski L., Wisniewska J., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. (2008). Cellular and Molecular Requirements for Polar PIN Targeting and Transcytosis in Plants. *Molecular Plant* **1**, 1056-1066.
- Kleine-Vehn, J., Huang F., Naramoto S., Zhang J., Michniewicz M., Offringa R., Friml J. (2009). PIN Auxin Efflux Carrier Polarity Is Regulated by PINOID Kinase-Mediated Recruitment into GNOM-Independent Trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3839-3849
- Koyama, T., Furutani M., Tasaka M., Ohme-Takagi M. (2007). TCP Transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 473-484.
- Kramer, E. M. (2004). PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends Plant Sci* **9**, 578-582.
- Long, J. A. und Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-3035.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P. J., Bennett, M. und Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **14**, 589-597.

- Meinhardt, H. (1982). Models of biological pattern formation. Academic Press, London
- Mayer, U., Torres Ruiz, R. A., Berleth, T., Miséra, S. und Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 402-407.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. und Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.
- McConnell, J. R. und Barton, M. K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125, 2935-2942.
- Michniewicz M., Brewer P.B., Friml J. (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book*.
- Michniewicz, M., Zago, M.K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M.G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Luschnig, C., Offringa, R. und Friml, J. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130, 1044-1056.
- Möller, M. und Cronk, Q. C. B. (2001). Evolution of morphological novelty: A phylogenetic analysis of growth patterns in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *Evolution* 55, 918-929.
- Möller, B. und Weijers D. (2009). Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, 1-13.
- Motchoulski, A. und Liscum, E. (1999). *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286, 961-964.
- Nabors, M. W. (2007). Botanik: Studium der Biologie. (Pearson Verlag)
- Nath, U., Crawford, B. C., Carpenter, R. und Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. *Science* 299, 1404-1407
- Nishii, K., Kuwabara, A., Nagata, T. (2004). Characterization of anisocotylous leaf formation in *Streptocarpus wendlandii* (Gesneriaceae): Significance of plant growth regulators. *Annals of Botany* 94, 457-467
- Nogué, F., Hocart, C., Letham, D. S., Dennis, E. S., und Chaudhury, A.M. (2000). Cytokinin biosynthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regul.* 32, 267–273.
- Odell, J. T., Nagy, F. und Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C.J. und Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677-684.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C, Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263

- Pedmale, U. V. und Liscum, E. (2007). Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem*, 282, 19992-20001.
- Peyroche, A., Antony, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J., Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Molecular Cell* 3, 275-285.
- Przemeck, G. K., Mattsson, J., Hardtke, C. S., Sung, Z. R., Berleth, T. (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200, 229-237.
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P, Blancaflor, E. B., Baskin, T. I. (2007). Auxin, actin und growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal* 50, 514-528.
- Rashotte, A. M. und Gortzen, L. R. (2010). The CRF domain defines Cytokinin Response Factor proteins in plants. *BMC Plant Biology* 26
- Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (2006). *Biologie der Pflanzen*, 4. Auflage (Berlin, New York, Walter de Gruyter).
- Reinhardt, D., Mandel, T. und Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12, 507-518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426, 255-260.
- Rolland-Lagan, A.G. und Prusinkiewicz, P. (2005). Reviewing models of auxin canalization in the context of leaf vein pattern formation in *Arabidopsis*. *Plant J* 44, 854-865.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. und Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acids Res* 18, 6409-6412.
- Sachs, T. (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development Suppl.* 91, 83-93.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. und Okada, K. (2001). *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6969-6974.
- Santner, A. A., Watson, J C. (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 45, 752-764
- Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J. und Berleth, T. (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev* 20, 1015-1027.
- Scheres, B. and Xu, J. (2006). Polar auxin transport and patterning: grow with the flow. *Genes Dev* 20, 922-926.

- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jürgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100, 635-644.
- Schrick, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J., Jürgens, G. (2000). FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes and Development* 14, 1471-1484.
- Shibasaki, K., Uemura, M., Tsurumi, S., Rahman, A. (2009). Auxin Response in *Arabidopsis* under Cold Stress: Underlying Molecular Mechanisms. *Plant Cell* 12, 3823-3838.
- Smith, R. S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C. and Prusinkiewicz, P. (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1301-1306.
- Smith, Z. R. und Long J.A. (2010). Control of *Arabidopsis* apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature* 464, 423-426.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S. J., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia, C. S., Offringa R., Friml, J., Yanofsky, M. F., Østergaard, L. (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 459, 583-586.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. und Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.
- Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K. und Prive, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6, R82.
- Tillich, H. J. (1992): Bauprinzipien und Evolutionslinien bei monocotylen Keimpflanzen. *Bot. Jahrb. Syst.* 114, 91 – 132.
- Torres Ruiz, R. A., Fischer, T. und Haberer, G. (1996): Genes involved in the elaboration of apical pattern and form in *Arabidopsis thaliana*; genetic and molecular analysis, in *Embryogenesis: The generation of a plant*. (Hrsg. E. Cumming and T. Wang). Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 15-34.
- Torres Ruiz, R. A. (2000). Molekulare Entwicklungsbiologie des *Arabidopsis* Embryos. *BIOSpektrum* 4, 267-270.
- Treml, B. S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischnig, E. und Ruiz, R.A. (2005). The gene ENHANCER OF PINOID controls cotyledon development in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 132, 4063-4074.
- Treml, B. S. (2007). Die Rolle des Gens ENHANCER OF PINOID in der Keimblattentwicklung und dem gerichteten Auxintransport in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation (Lehrstuhl für Genetik, TUM).
- Vanneste, S., Friml J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136, 1005-1016.

Wang, B.G., König, K., Halhuber, K.J. (2009) Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *Journal of Microscopy* 238, 1-20

Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van der Toorn, A., Palme, K. und Scheres., B. (2003). Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* 15, 612-625.

Woodrick, R., Martin, P. R., Birman, I., Pickett, F. B. (2000). The *Arabidopsis* embryonic shoot fate map. *Development* 127, 813-820.

Zegzouti, H., Anthony, R. G., Jahchan, N., Bögre, L. und Christensen, S.K. (2006). Phosphorylation activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6404-6409.

Zhang, J., Nodzynski, T., Pencík, A., Rolcík, J., Friml, J. (2010). PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *PNAS* 107, 918-922

Zhao, Y. (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Plant Biology* 11, 16-22.

Zourelidou M., Müller I., Willige B.C., Nill C., Jikumaru Y., Li H., Schwechheimer C. (2009) The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 136, 627-636.

Internet:

Bericht zur weltweiten kommerziellen Nutzung gentechnisch veränderter Pflanzen: Brief 41: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009 ([www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/default.asp](http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/default.asp))

## Danksagung

Ohne eine Vielzahl von Menschen wäre diese Arbeit nicht entstanden. Eine Dissertation ist ein Abenteuer, dessen Gelingen von wissenschaftlicher, emotionaler und finanzieller Unterstützung abhängig ist.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Alfons Gierl dafür bedanken, dass er es mir ermöglichte, dieses interessante Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ramon A. Torres Ruiz für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefasst war, mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen, und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und Anregungen.

Die Doktorarbeit wäre ohne Förderung durch die Bayerische Eliteförderung der Universität Bayern e.V. und die DFG nicht möglich gewesen. Ich danke Dr. Georg Haberer für die statistische Auswertung der Mikroarrays sowie unseren Kooperationspartnern Dr. Masahiko Furutani und Prof. Dr. Masao Tasaka in Japan.

Ich bedanke mich bei den Arbeitsgruppenleitern Dr. Monika Frey, PD Dr. Erich Glawischnig und Dr. Lilla Römisch-Margl sowie den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern für die gute Arbeitsatmosphäre. Bei Peter Dobos, Nicole Haggemiller, Martina Hitzenbichler, Regina Hüttl, Dr. Rafał Jończyk und Zheng Yu sowie der „neuen“ Doktorandengeneration Manisha, Linlin und vor allem Stefan, der in den letzten Wochen neuen Schwung in den Lehrstuhl und die Forschung brachte. Den „Bacheloranden“ und Praktikanten Kathrin Bermann, Andrä Brunner, Björn Peters und Katharina Sewart danke ich für ihre Mitarbeit an meinem Projekt. Unendlichen Dank schulde ich Otilie Peis für ihre beispiellose und ausgezeichnete Unterstützung bei der Laborarbeit und für ihr stets offenes Ohr. Ohne sie wäre die Analyse der gigantischen Mengen von Pflanzenmaterial unmöglich gewesen. Sie ist eine Freundin geworden, die ich ganz besonders vermissen werde.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Regina Dick, Andreas Fießelmann, Dr. Thomas Rauhut und Dr. Birgit Treml für die netten Abende mit Kinobesuchen, Cocktailtrinken, Sushi - und Schnitzeessen. Wir hatten wirklich immer was zu Lachen.

Für ihre Unterstützung in allen bürokratischen Dingen und die täglichen Leckereien danke ich der Sekretariatsbesetzung Carolin Ziegler und Petra Wick.

Nicht versäumen will ich, mich bei Herrn Dr. Günther Schweizer und seiner Arbeitsgruppe Genomanalysen und Genquellen der LFL zu bedanken. Sie hatten für mich schon während meiner Diplomarbeit immer ein Plätzchen am Pyrosequenzer frei.

Prof. Gerd Jürgens und Dr. Ulrike Mayer am ZMPB in Tübingen danke ich dafür, dass ich in ihrer Arbeitsgruppe die immunohistochemischen Färbungen erlernen durfte und für die Bereitstellung des PIN1-Antikörpers. Großer Dank gebührt dabei Ulrike Hiller für ihre perfekte Anleitung und ihre humorvolle Art.

Mehr als jeder andere Mensch begleitete mich mein Mann Johann, der nicht nur meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden hat, sondern mich auch stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe. Ich möchte mich für seine unendliche Liebe ganz besonders bei ihm bedanken. Ihm widme ich diese Arbeit.

Ein Dank geht nicht zuletzt auch an meine Eltern Gabriele und Hermann, meine Oma, meine Geschwister Beatrice, Anita und Barbara und meinem Schwager Michael, die ich in letzter Zeit häufig vernachlässigt habe, für ihre Geduld und ihr Verständnis. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Schwiegereltern Lydia und Eduard, die mich schon während meines Studiums begleitet haben. Ich danke euch allen für das ständige Interesse an meiner Arbeit, dem ich nie gerecht werden konnte. Aber wenn ihr bis jetzt aufmerksam gelesen habt, wisst ihr was ich die letzten Jahre gemacht habe.

## Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Molekularbiologische Analyse relevanter Keimblattgene der Pflanze

*Arabidopsis thaliana*

Am Lehrstuhl für Genetik unter der Anleitung und Betreuung durch

apl. Prof. Dr. Ramon A. Torres Ruiz

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad **noch nicht** erworben und bin **nicht** in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 19.5.2010

.....



## **LEBENS LAUF**

Miriam Zweigardt  
Thalhauser Fußweg 28  
85354 Freising  
Telefon: +49 (8161) 204517  
E-Mail: miriam.zweigardt@gmx.de

---

### **Zur Person**

|                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| Geburtsdatum/-ort | 18.04.1981 in Augsburg |
| Nationalität      | Deutsch                |
| Familienstand     | Verheiratet            |

---

### **Ausbildung**

|                   |   |
|-------------------|---|
| 06/2007 – 05/2010 | Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Genetik der TU München unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. Torres Ruiz |
| 05/2008 – 04/2010 | Stipendiatin der Bayerischen Eliteförderung, Universität Bayern e.V.  |
| 10/2001 – 04/2007 | Studium der Biologie an der TU München<br>Fachrichtung: Biologie<br>Schwerpunkte: Genetik, Humanbiologie, Med. Virologie<br>04/2007 Abschluss als Dipl.-Biol. Univ.                 |
| 09/1992 – 06/2001 | Maria – Theresia – Gymnasium Augsburg<br>06/2001 Allgemeine Hochschulreife  |
| 09/1987 – 06/1992 | Volksschule Diedorf   |

---