

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genetik

**Die Rolle des Gens *ENHANCER OF PINOID*  
in der Keimblattentwicklung und dem gerichteten Auxintransport  
in *Arabidopsis thaliana***

**Birgit S. Tremel**

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. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ramon A. Torres Ruiz
2. Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Die Dissertation wurde am 05.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.06.2008 angenommen.



**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Treml, B. S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischnig, E. and Torres-Ruiz, R. A. (2005) The gene *ENHANCER OF PINOID* controls cotyledon development in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 132: 4063-4074

Furutani, M., Kajiwara, T., Kato, T., Treml, B. S., Stockum, K., Torres-Ruiz, R. A. and Tasaka, M. (2007) The gene *MACCHI-BOU/ENHANCER OF PINOID* encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. *Development* 134: 3849-3859



## Abkürzungen

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

A	Adenin
<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
ANT	<i>AINTEGUMENTA</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AuxRE	Auxin-responsives Element
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Basta	Phosphinothricin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci = 2.22 x 10 <sup>12</sup> Zerfälle/Minute)
CLV	<i>CLAVATA</i>
cM	Centimorgan
Col (C)	Columbia (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CUC	<i>CUP-SHAPED COTYLEDON</i>
DAPI	4'-Diamide-2-Phenylindole-Dihydrochloride
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dd	bidestilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EMS	Ethylmethansulfonat
ENP	<i>ENHANCER OF PINOID</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	ecetera
EtOH	Ethanol
G	Guanin

---

GUS	β-Glucuronidase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
i.d.R	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LacZ	β-Galactosidase
<i>lat</i>	<i>laterne</i>
Ler (L)	Landsberg <i>erecta</i> (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )
Lsg.	Lösung
M	molare Masse, $M = m \text{ (g)}/n \text{ (mol)}$
MCS	<i>multible 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
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS-Salze	Murashige & Skoog-Salze
n	Anzahl
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NBSB	<i>northern blot sample buffer</i>
Nd (N)	Niederzenz (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )
OD	optische Dichte
Os	<i>Oryza sativa</i> (Reis)
OT	Objektträger
pBS KS(+)/SK(+)	Plasmid <i>Bluescript</i> mit KS(+)/SK(+) Polylinker
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
<i>PID</i>	<i>PINOID</i>
<i>PIN</i>	<i>PIN-FORMED</i>
POM	Polyoxymethylen (thermoplastischer Kunststoff)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
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
RT	Raumtemperatur (18°C bis 24°C)
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i> (Bierhefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)

---

SSLP	<i>short sequence length polymorphisms</i>
STM	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Ressource</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TIGR	<i>The Institute vor Genomic Research</i>
TNM-50	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Puffer
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
v/v	Volumen zu Volumen
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
WB	Wasserbad
Ws	Wassilewskija (Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> )
WT, wt	Wildtyp
WUS	<i>WUSCHEL</i>
xg	Zentrifugalbeschleunigung (wird in Vielfachen der Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ angegeben)
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Zm	<i>Zea mays</i> (Mais)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Mono- versus Dikotyledonen .....	1
1.2	Die Embryogenese von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	1
1.3	Keimblätter - embryonale Speicherorgane der Dikotyledonen .....	3
1.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten mit Keimblattdefekten .....	3
1.5	Die vom SAM unabhängige Entwicklung der Kotyledonen.....	5
1.6	Die Bedeutung von Auxin für Organentwicklung und Phyllotaxis .....	5
1.7	Molekularen Mechanismen des gerichteten Auxintransports .....	6
1.8	Spezifische Deletion der Keimblätter in <i>laterne</i> -Mutanten.....	8
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Phänotypische und genetische Charakterisierung von <i>enp</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Der Keimlingsphänotyp von <i>laterne</i> -Doppelmutanten .....	11
2.1.2	Mutationen in <i>ENP</i> führen zur Verstärkung des <i>pinoid</i> -Phänotyps.....	13
2.1.3	Die Bedeutung von <i>ENP</i> für die Blütenentwicklung von <i>A. thaliana</i> .....	13
2.1.4	Molekulare Kartierung und Klonierung von <i>ENP</i> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Genexpressionsanalyse von homozygoten <i>pid-15 enp</i>-Pflanzen.....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Der <i>PID</i> -Genlocus wird in <i>laterne</i> -Keimlingen transkribiert .....	19
2.2.2	Expressionsdomänen von Genen im Apex der <i>laterne</i> -Embryonen.....	19
2.2.3	Homozygote <i>pid-15 enp stm-5</i> Tripelmutanten mit <i>laterne</i> -Phänotyp .....	24
<b>2.3</b>	<b>Expressionsanalyse von <i>ENHANCER OF PINOID</i> .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Struktur von <i>ENP</i> .....	25
2.3.2	Nachweis alternativer Transkriptionsstartpunkte .....	27
2.3.3	Die Expressionsmuster von <i>ENP</i> in unterschiedlichen Geweben .....	30
2.3.4	Analyse der Expression von <i>ENP</i> in <i>pinoid</i> - und <i>laterne</i> -Embryonen.....	32
<b>2.4</b>	<b>Die Bedeutung von <i>ENP</i> für den gerichteten Auxintransport und die Auxin-abhängige Organentwicklung .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Auxinmaxima in WT-, <i>pinoid</i> - und <i>laterne</i> -Embryonen .....	34
2.4.2	Analyse des polaren Auxintransports in <i>laterne</i> -Embryonen.....	35
2.4.3	Die zelluläre Lokalisation der <i>ENP</i> -Proteine.....	37
<b>2.5</b>	<b>Expression des <i>ENP</i>-Orthologs <i>ZmENP</i> in Mais-Embryonen .....</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
3.1	Der synergistische Effekt einer simultanen Mutation von <i>ENP</i> und <i>PID</i> auf die Keimblatt- und Blütenentwicklung von <i>A. thaliana</i> .....	44
3.2	Die differentielle Regulation von <i>ENP</i> .....	45
3.3	<i>ENP</i> beeinflusst die Lokalisation des Auxin Efflux-Carriers PIN1.....	46
3.4	Analogien zwischen Organogenese und Phototropismus .....	50
3.5.	Parallelen zwischen der Organogenese von <i>A. thaliana</i> und <i>Z. mays</i> .....	52
3.6	<i>ENP</i> und PIN1 kolokalisieren in der Epidermis der Kotyledonen .....	53
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>

---

<b>5.</b>	<b>Material</b> .....	<b>57</b>
5.1	Chemikalien und molekularbiologische Verbrauchsmittel.....	57
5.2	Antibiotika .....	57
5.3	Längenstandards.....	57
5.3.1	DNA-Längenstandards .....	57
5.3.2	RNA-Längenstandards .....	58
5.4	Primer .....	58
5.5	Klone.....	60
5.5.1	cDNA-Klone zur Herstellung der <i>in situ</i> Hybridisierungs Sonden .....	60
5.5.2	ENP cDNA-Klone.....	60
5.5.3	BAC ENP-Klone.....	60
5.6	Vektoren .....	60
5.7	Bakterienstämme.....	61
5.8	<i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzenmaterial (Ursprungslinien) .....	61
5.8.1	WT-Linien .....	61
5.8.2	Mutante Linien .....	61
5.8.3	Transgene Linien .....	62
5.9	Lösungen.....	63
5.10	Medien .....	73
<b>6.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>75</b>
6.1	Pflanzenzucht.....	75
6.1.1	Aufzucht auf Erde .....	75
6.1.2	Anzucht unter sterilen Bedingungen.....	75
6.1.3	Intraspezifische Kreuzung .....	75
6.2	Molekularbiologische Methoden .....	76
6.2.1	Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren.....	76
6.2.2	Reinigung von Nukleinsäuren.....	77
6.2.3	Restriktionsverdau von DNA.....	77
6.2.4	Gele zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren .....	78
6.2.5	PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren .....	81
6.2.6	Sequenzierung.....	86
6.2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	86
6.2.8	Methoden für die Präparation von Nukleinsäuren .....	88
6.2.9	Nachweismethoden für mRNA .....	91
6.2.10	Yeast Two-Hybrid .....	101
6.2.11	Pflanzentransformation mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	101
6.2.12	Mikroskopische Analysemethoden .....	102
<b>7.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>105</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Mono- versus Dikotyledonen

Die bedecktsamigen Blütenpflanzen (Angiospermen) sind die größte aller Pflanzengruppen und umfassen ca. 250 000 Arten. Sie unterteilen sich in drei Unterklassen, die Magnoliidae, die Monokotyledonen (Liliidae, Einkeimblättrige) und die (Eu-) Dikotyledonen (Rosidae, Zweikeimblättrige). Die Magnoliidae sind eine aus mehreren zweikeimblättrigen Familien zusammengefasste, paraphyletische Gruppe und stehen an der Basis des Stammbaums der Angiospermen. Zu ihnen gehören nur etwa 4% aller heute lebenden Angiospermenarten. Früher wurden sie den übrigen Zweikeimblättrigen zugeordnet, zu denen man ungefähr 74% der Angiospermen zählt. Die Monokotyledonen umfassen die verbleibenden ca. 22%. Damit sind die Dikotyledonen die artenreichste Unterklasse der Angiospermen (Raven et al., 2000; Strasburger, 2002). Zu ihnen zählt auch eines der am stärksten beforschten Modellsysteme der grünen Genetik, die Brassicaceae *Arabidopsis thaliana*.

Durch die enge Verwandtschaft der Arten innerhalb der Unterabteilung der bedecktsamigen Blütenpflanzen ähneln sie sich stark in ihrem morphologischen Aufbau. Dies spiegelt sich in den grundlegenden Körperbauplänen der Keimlinge wieder, die artübergreifend auffallend uniform sind, auch wenn dikotyle und monokotyle Keimlinge unterschiedliche morphologische Typen vertreten (Jürgens und Mayer, 1994). Der dikotyle Keimling wird dabei als die primitivere Form betrachtet (Jürgens et al., 1994). Seine zwei Keimblätter sind bilateral entlang der Körperachse aus Epikotyl, Hypokotyl und embryonaler Wurzel (Radicula) angeordnet. Das apikale Spross- und das basale Wurzelmeristem ermöglichen später die Differenzierung zur adulten Pflanze. Der monokotyle Keimling stellt eine abgewandelte Form des bilateralsymmetrischen Bauplans dar (Jürgens et al., 1994), die sich äußerlich unter anderem durch das Fehlen eines zweiten Keimblattes unterscheidet. Auch seine apikal-basale Achse ist aus Epikotyl, Hypokotyl und Radicula aufgebaut, aber die Primärwurzel wird später durch eine sprossbürtige Wurzel, die aus dem unteren Ende des Hypokotyls entsteht, ersetzt.

## 1.2 Die Embryogenese von *Arabidopsis thaliana*

Während der Embryogenese wird in einer ersten Phase der primäre Körperbauplan, aus dem sich der Keimling entwickelt, festgelegt. Danach kommt es zu einem schnellen Wachstum der angelegten Primordien durch Zellteilung und der Differenzierung von Zellen. In einer weiteren, abschließenden Phase dominieren physiologische Reifeprozesse, die den Embryo auf die Samenruhe vorbereiten.

Im Fall von *Arabidopsis thaliana* lassen sich die aufeinander folgenden Entwicklungsstadien der Embryogenese leicht auf Grund der vorwiegend übersichtlichen und stereotypen Zellteilungen des Embryos verfolgen (Jürgens und Mayer, 1994; Torres Ruiz, 2000; Berleth und Chatfield, 2002; Abb. 1). Nach der Befruchtung der Zygote verlängert sie sich etwa um ein Dreifaches und teilt sich anschließend asymmetrisch in eine kleinere apikale und eine größere basale Zelle. Letztere ist stark vakuolisiert und durchläuft im Verlauf der Embryogenese bis zu neun horizontale Teilungen. Dabei entsteht eine filamentöse Struktur,

der Suspensor, der den wachsenden Embryo mit Nährstoffen versorgt. Die apikale, plasmareiche Zelle teilt sich zweimal vertikal und einmal horizontal (Oktantstadium), wodurch zwei Zellschichten, eine Obere und eine Untere, gebildet werden. Aus ihnen entwickelt sich später die apikale Hälfte des Embryos bzw. ein großer Teil der basalen Hälfte (Berleth und Chatfield, 2002). Durch eine einzelne Runde tangentialer Teilungen werden acht epidermale Vorläuferzellen (das Protoderm) von den acht inneren Zellen getrennt und damit das frühe Globularstadium erreicht. Das Protoderm teilt sich fortan vorrangig antiklin und kann deshalb auch weiterhin histologisch von den inneren Zellen unterschieden werden. Im Verlauf des Globularstadiums entstehen die Vorläuferzellen des zentralen vaskulären und des umgebenden Grundgewebes, entweder parallel oder im rechten Winkel zur apikal-basalen Achse, in der unteren Hälfte des Embryos. Die Zellen in der oberen Hälfte sind weniger strikt orientiert und haben eine nahezu isodiametrische Form. Infolge ihrer fortwährenden Teilung beginnen sich an zwei gegenüberliegenden, apikalen Positionen die Primordien der Kotyledonen zu entwickeln. Damit geht der Embryo in das bilateral-symmetrische Transitions- bzw. frühe Herzstadium über. Die oberste, an das embryonale Gewebe angrenzende, Zelle des Suspensors (Hypophyse) hat sich in der Zwischenzeit mehrfach geteilt. Aus ihren Tochterzellen entstehen später Bereiche der Primärwurzel, das *Ruhende Zentrum* (Quiescent Center) und die Initialen der zentralen Wurzelhaube. Im frühen Herzstadium sind die Primordien der wichtigsten Organe des Keimlings (Keimblätter, Hypokotyl und Primärwurzel) bereits festgelegt und die erste Phase der Embryogenese ist beendet. Danach wird der Embryo durch Zellteilung- und Zellstreckungsprozesse hauptsächlich vergrößert (Torres Ruiz, 2000). Dabei durchläuft er das Herz- und Torpedostadium. Ab dem frühen Torpedostadium sind bereits die drei Zellschichten des Sprossapikalmeristems (SAM) erkennbar und die Keimblattprimordien beginnen sich in Richtung der Wurzelanlage zu krümmen. Der ausgewachsene Embryo füllt die Ovule schließlich fast komplett aus, wobei die Kotyledonen etwa zwei Drittel des embryonalen Gewebes ausmachen. Das den *Arabidopsis*-Embryo umgebende Nährgewebe (Endosperm) ist zu diesem Zeitpunkt größtenteils aufgebraucht.

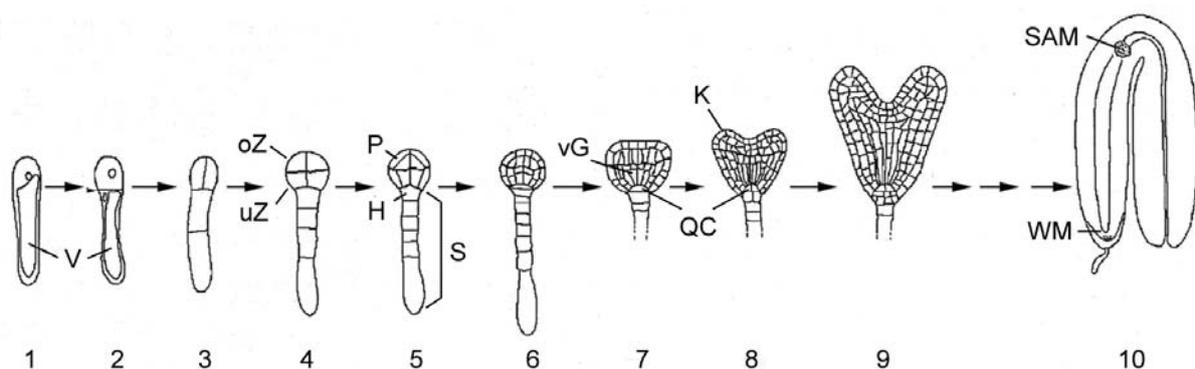


Abb. 1: Stadien der Embryonalentwicklung von *Arabidopsis thaliana* (verändert nach Torres Ruiz, 2000). (1) Zygote, (2) asymmetrische Teilung der Zygote, (3) Quadrant-, (4) Oktant-, (5) 16-Zell-, (6) Globular-, (7) Transitions-, (8) frühes Herz-, (9) spätes Herz-, (10) spätes Torpedostadium. H, Hypophyse; 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.

### 1.3 Keimblätter - embryonale Speicherorgane der Dikotyledonen

Als die grundlegende Funktion des Endosperms der Dikotyledonen vermutet man die Synthese und Akkumulation von Speicherprodukten zur Unterstützung des sich entwickelnden Embryos, während die Speicherung der Reservestoffe für die Keimung ausschließlich von den Keimblättern übernommen wird (Olsen, 2004). Im Verlauf der Embryogenese reichern sie Lipide, Stärke und Proteine an, die sie aus dem Endosperm absorbieren. Die gespeicherten Nährstoffe werden dann in der Keimungsphase durch biochemische Prozesse mobilisiert und stehen der jungen Pflanze für ihre primäre Wachstumsperiode zur Verfügung. Die Kotyledonen, die ersten Blätter des Keimlings, werden dabei verbraucht und fallen ab oder gehen zugrunde (Buchanan et al., 2000).

Bei der Mehrzahl der Angiospermen (u.a. den Dikotyledonen) dienen Lipide und Proteine, die primär im Endosperm gebildet werden, als Speicherstoffe, wohingegen die Stärkesynthese auf eine kleinere Anzahl taxonomischer Gruppen, wie z.B. die Monokotyledonen, beschränkt ist. In ihrem Fall macht das stärkehaltige Endosperm auch nach der Embryogenese den Großteil des Speichergewebes aus. Das Scutellum, eine Schild-artige Struktur, repräsentiert das verbleibende Keimblatt der Monokotyledonen und übernimmt die Versorgung des embryonalen Gewebes (vor und nach der Keimung) mit Nährstoffen aus dem Endosperm. Die Rohstoffreserven in den Samen der Dikotyledonen dagegen sind, wie bereits erwähnt, vorrangig in den Keimblättern enthalten (Costa et al., 2004). Daraus ergibt sich eine inverse Korrelation zwischen der Größe des Endosperm-Speichergewebes und der des Embryos von Mono- und Dikotyledonen.

Das Endosperm der Monokotyledonen, zu denen die Getreidearten Mais, Reis, Gerste und Weizen gehören, stellt seit jeher eine der wichtigsten Quellen an Nahrung (vor allem an Kohlenhydraten) und erneuerbaren industriellen Rohmaterialien des Menschen dar. Im Gegenzug machen die Kotyledonen einen Großteil der 250 Mio. Tonnen an Samen aus, die jährlich, weltweit, ökonomisch genutzt werden (*Food and Agriculture Organization (FAO)*, 2004). In den letzten Jahren hat die wirtschaftliche Relevanz von Endosperm und Keimblättern als Speichergewebe noch einmal stark zugenommen. Durch die wachsende Nachfrage nach Biokraftstoffen kommt es zu grundlegenden Verschiebungen an den Weltagarmärkten (*Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* und *FAO*, 2007). Der Anbau von Getreide und Ölsaaten, wie z.B. *Brassica napus* (Raps) und *Brassica rapa* (Rübsaat), für die Produktion von Ethanol und Biodiesel, gewinnt zunehmend an Bedeutung.

### 1.4 *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Keimblattdefekten

Die Entwicklung des morphologischen Bauplans von *Arabidopsis thaliana* während der Embryogenese ist relativ gut dokumentiert, aber im Gegensatz zu dem breiten klassischen Wissen war lange Zeit wenig über die dahinterstehenden molekularen Mechanismen bekannt. Aufgrund dessen wurden innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte umfassende Mutanten-Screens durchgeführt, die zur Identifizierung etlicher, beteiligter Gene geführt haben.

Viele der heute bekannten Mutanten weisen Defekte im Apikalbereich des Embryos, in Form einer gestörten Ausbildung der Keimblattprimordien und/oder des Sprossapikalmeristems

(SAM), auf. Die Etablierung eines komplexen, molekularen Modells für die Musterbildung im Embryoapex wurde jedoch bislang durch das Fehlen keimblattspezifischer Gene behindert (Berleth und Chatfield, 2002). Die meisten Mutationen, die die Entwicklung der Kotyledonen beeinträchtigen führen gleichzeitig zu weiteren, pleiotropen Effekten.

*LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* und *FUSCA3 (FUS3)* kodieren z.B. für Transkriptionsfaktoren, die Reifungsprozesse im *Arabidopsis*-Samen einschließlich der Akkumulation von Samenspeicherproteinen (SSP) kontrollieren (Kagaya et al., 2005). Gleichzeitig werden sie aber auch für die Spezifizierung der Keimblattidentität in einem späten Stadium der Embryogenese benötigt. Die Kotyledonen von *leafy cotyledon (lec)* und *fusca3 (fus3)* Mutanten weisen Merkmale postembryonaler Blätter auf (Meinke, 1992; Lotan et al., 1998; Keith et al., 1994). Sie besitzen Trichome und ihre Ultrastruktur gleicht der von Blattprimordien.

Im Fall von *gurke (gk)*, *pepinol/pasticcino2 (pep/pas2)* und *pasticcino1 (pas1)* ist die Zellproliferation vorrangig im SAM und den Keimblättern, z.T. aber auch im Hypokotyl und der Wurzel, gestört (Torres-Ruiz et al., 1996; Haberer et al., 2002; Vittorioso et al., 1998). Dabei kommt es u.a. zu einer veränderten Form, der Reduktion oder dem gänzlichen Verlust der Kotyledonen. Ursprünglich wurden insgesamt acht verschiedene *pasticcino*-Allele in einem Screen von EMS und T-DNA induzierten Mutanten, die eine signifikante Hypertrophie ihrer apikalen Bereiche nach dem Zusatz von Cytokinin aufwiesen, identifiziert (Faure et al., 1998; Vittorioso et al., 1998). Sie gehören drei Komplementations-Gruppen (*pas1*, *pas2* und *pas3*) an und es konnte inzwischen gezeigt werden, dass *gurke* allelisch mit *pas3* ist (Baud et al., 2004). Alles weist darauf hin, dass *GK*, *PEP* und *PAS1* die Zellproliferation in *Arabidopsis* negativ regulieren, indem sie die Cytokininantwort unterdrücken (Haberer et al., 2002; Harrar et al., 2003).

Mutationen in einer Reihe von Genen, die Auxintransport oder -Perzeption betreffen, wirken sich auf die Anzahl an Keimblättern, die gebildet werden aus, oder verursachen ihre Fusionierung. Unterschiedlich stark verwachsene Keimblätter treten beispielsweise bei den Auxin-Signaltransduktionsmutanten *monopteros (mp)* und *bodenlos (bdl)* auf (Berleth und Jurgens, 1993; Hardtke und Berleth, 1998; Hamann et al., 1999). Die beiden Gene sind an der Ausbildung der apikal-basalen Achse während der Embryogenese beteiligt. *MP* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der ARF Familie (ARF5) der mit BDL, dem zugehörigen transkriptionalen Repressor IAA12, interagiert (Hamann et al., 2002). Abnormalitäten die Anzahl, Größe und Form der Keimblätter betreffend, wurden bei Mutationen in den Genen *PIN-FORMED1 (PIN1)* und *PINOID (PID)* dokumentiert. Besonders auffällig ist in beiden Fällen das häufige Auftreten von Keimlingen mit drei anstelle von zwei Kotyledonen (Gälweiler et al., 1998; Bennett et al., 1995). *PIN1* kodiert für ein putatives Auxin Efflux-Carrier Protein und ist somit direkt am gerichteten Auxintransport beteiligt. Die Serin/Threonin-Kinase PINOID reguliert den polaren Auxintransport dagegen indirekt, indem sie die Lokalisation der PIN Proteine in den Zellmembranen von *A. thaliana* beeinflusst (Friml et al., 2004; Kaplinsky und Barton, 2004). Der Keimblattphänotyp von *pin1* und *pid* wird zusätzlich verstärkt, wenn Mutationen in beiden Genen kombiniert werden. Bei etwa 50% der Doppelmutanten werden im Transitions- bzw. frühen Herzstadium keine Keimblattprimordien angelegt und der Embryo bleibt radiärsymmetrisch (Furutani et al., 2004).

## 1.5 Die vom SAM unabhängige Entwicklung der Kotyledonen

Die Bildung der Kotyledonen ist, wie auch die bereits erwähnten, pleiotropen Mutanten belegen, extrem sensitiv gegenüber Störungen in diversen biologischen Prozessen. Es fällt jedoch auf, dass Mutationen in *PIN1* und *PID* zu relativ spezifischen Defekten in der Keimblatt- und Blütenentwicklung führen, während der restliche Embryo sowie der Spross und die Blätter der adulten Pflanze nur geringfügige Veränderungen zeigen (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995). Kotyledonen und Blätter werden aufgrund evolutionärer und genetischer Aspekte als homologe Strukturen betrachtet (Esau, 1977; Kaplan und Cooke, 1997; Strasburger, 2002; Tsukaya, 2002), die sich wie z.B. im Fall von *lec1*, *fus3* und *extra cotyledon1* und *2* (Meinke, 1992; Lotan et al., 1998; Keith et al., 1994; Conway und Poethig, 1997) zumindest teilweise ineinander umwandeln lassen. Trotzdem sind die Faktoren, die ausschlaggebend für ihre Entwicklung sind, offensichtlich partiell unabhängig voneinander, da sogar die keimblattlosen *pin1 pid* Doppelmutanten noch Rosettenblätter erzeugen (Furutani et al., 2004). Darüber hinaus werden die Kotyledonen, anders als ursprünglich angenommen (Kaplan und Cooke, 1997), nicht vom embryonalen SAM gebildet. Die Expressionsmuster von Genen die an der Organisation des Embryoapex beteiligt sind implizieren eine simultane aber dennoch getrennte Initiation der Keimblattanlagen und des SAM (Laux et al., 2004). Fakt ist außerdem, dass sich Mutationen in den Genen *WUSCHEL* (*WUS*), *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), *ZWILLE* (*ZLL*) die sich phänotypisch durch den Verlust des embryonalen SAM auszeichnen, kaum auf die Entwicklung der Kotyledonen auswirken (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998; Barton und Poethig, 1993; Long et al., 1996; Woodrick et al., 2000; Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999).

## 1.6 Die Bedeutung von Auxin für Organentwicklung und Phyllotaxis

Seit geraumer Zeit wird die Bedeutung des Phytohormons Auxin (IAA, Indol-3-Essigsäure) für die Organogenese und die regelmäßige Anordnung seitlicher Sprossorgane (Phyllotaxis) von *A. thaliana* diskutiert. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Phyllotaxis auf der lateralen Inhibierung neuer Primordien durch die bereits existierenden basiert (Berleth und Chatfield, 2002). Einem Modell von Reinhardt et al. (2003) zufolge, wird Auxin akropetal in Richtung Meristem transportiert, wo es dann von Primordien, die als Auxin-„sink“ fungieren, absorbiert wird. Als Konsequenz daraus wird Auxin in der Umgebung von Primordien aufgebraucht, weshalb weitere Organe nur in einem bestimmten Abstand angelegt werden können. Die ersten Blattorgane der Pflanze, die Kotyledonen, scheinen dabei als grundlegende Referenz für die Bildung postembryonaler Blätter zu dienen, da sich eine abnorme Positionierung der Keimblätter auf die vegetative Phyllotaxis auswirkt (Berleth und Chatfield, 2002). Basierend auf der Theorie von Reinhardt et al. (2003) wurden erweiterte, mathematische Simulationsmodelle entworfen (Jönsson et al., 2006; Smith et al., 2006), die in der Lage sind, komplexe, phyllotaktische Muster zu generieren. Neben der grundlegenden Annahme eines polaren, (*PIN1*-abhängigen) Auxintransports in den epidermalen Zellen des Apex, schließen die Modelle eine Positionierung von *PIN* Proteinen in Richtung benachbarter Zellen mit höheren Auxin-Konzentrationen (Jönsson et al., 2006; Smith et al., 2006) und Auxin-abhängige *PIN1* Level in ihre Kalkulationen mit ein (Smith et al., 2006).

Versuche mit dem Auxintransport-Inhibitor NPA (N-1-Naphthylphthalaminsäure) und IAA Mikroapplikationstests u.a. an *pin1*- und *pid*-Einzel- bzw. *pin1 pid*-Doppelmutanten implizieren, dass dynamische, Efflux-abhängige Auxin-Gradienten, die zu einer lokalen Konzentrierung des Phytohormons führen, an der Entwicklung aller Organe (insbesondere der Blätter) von *A. thaliana* und Tomate beteiligt sind (Reinhardt et al., 2000; Reinhardt et al., 2003; Benkova et al., 2003). Ab dem Transitionsstadium der Embryogenese lassen sich lokale Auxinmaxima an zwei gegenüberliegenden Stellen des Embryoapex nachweisen. Der putative 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. Im Verlauf der Entwicklung der Kotyledonen etabliert sich nach und nach eine basale Lokalisation von PIN1 in den Vorstadien der vaskulären Elemente und der Auxintransport wird teilweise reorganisiert (Benkova et al., 2003). Gemäß der „Kanalierungshypothese“ führt die positive Rückkopplung zwischen Auxin-Fluss durch eine Zelle und der Fähigkeit dieser Zelle Auxin zu transportieren zu bevorzugten Kanälen, die sich zu den Leitelementen der Blätter differenzieren (Scheres und Xu, 2006; Rolland-Lagan und Prusinkiewicz, 2005; Mattsson et al., 2003). Neuerliche Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Thomas Berleth (Scarpella et al., 2006) stützen sich auf die Entdeckung, dass PIN1 zukünftige, vaskuläre Zellen früher als andere pre-prokambiale Marker kennzeichnet, und untermauern die Hypothese zusätzlich. Keimblätter haben eine relativ hohe IAA Synthesekapazität (Ljung et al., 2001) und könnten durch die Kanalisierung des Auxintransports in ihren Leitelementen die Phyllotaxis der ersten postembryonalen Blätter bedingen und als eine wichtige Auxin-Quelle für deren Bildung fungieren. Inzwischen sind bereits einige Faktoren bekannt, die den PIN1-abhängigen Auxintransport auf molekularer Ebene regulieren.

## 1.7 Molekularen Mechanismen des gerichteten Auxintransports

Auxine sind schwache Säuren. Im extrazellulären Raum (Apoplast) liegt IAA aufgrund des relativ niedrigen pH-Werts (~5,6) zum Teil in protonierter, lipophiler Form vor und kann durch die Zellmembran diffundieren (Lomax et al., 1995). Eine Mutation oder Überexpression der H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase AVP1 wirkt sich zugleich auf den pH-Wert im Apoplasten und den gerichteten Auxintransport aus. In beiden Fällen konnte eine Änderungen der P-Typ H<sup>+</sup>-ATPase- und PIN1-Konzentration in den Plasmamembranen festgestellt werden (Li et al., 2005; Grebe, 2005). Obwohl das protonierte Auxin selbstständig in die Zellen diffundieren kann, geht man davon aus, dass die IAA-Aufnahme in einigen Geweben zusätzlich durch Auxin Influx-Carrier erhöht wird. Die Auxin-Permease AUXIN RESISTANT1 (AUX1; Marchant et al., 1999; Swarup et al., 2001) und PIN1 werden in der abaxialen Epidermis der Blattprimordien und in der äußersten Zellschicht (L1) des SAM von vegetativen *Arabidopsis* Apizes coexprimiert, was auf eine gemeinsame Funktion im Auxintransport dieser Zellen hinweisen könnte (Reinhardt et al., 2003). AUX1 scheint jedoch ungleich der PIN Proteine nur indirekt am polaren IAA-Transport beteiligt zu sein, da dieser nicht durch die Influx-Carrier Inhibitoren 1-NOA (1-Naphthoxyessigsäure) und CHPAA (3) blockiert wird (Parry et al., 2001). Die teils unpolare Lokalisation von AUX1 in der Plasmalemma, die Abnahme der IAA-Konzentration im provaskulären und vaskulären Gewebe der Blätter von *aux1* Mutanten und eine Reihe weiterer Beobachtungen, lassen vielmehr darauf schließen, dass AUX1 der

Diffusion von Auxin in umgebende Zellschichten entgegenwirkt (Marchant et al., 2002; Reinhardt et al., 2003; Kramer, 2004).

Der pH-Wert des Zytosols ist höher als im Apoplasten. IAA liegt dort demzufolge in seiner ionisierten, hydrophileren Form vor und kann die Zelle somit nicht mehr durch Diffusion verlassen. Der Efflux von Auxin ist ein aktiver, Carrier-abhängiger Prozess, an dem meistens polar in der Plasmamembran lokalisierte Mitglieder der PIN-Proteinfamilie ausschlaggebend beteiligt sind (Leyser, 2005). PIN1 konnte anhand von Immunopräzipitationstests und Yeast Two-Hybrid Versuchen eine Interaktion mit PHOSPHOGLYCOPROTEIN19 (PGP19) nachgewiesen werden (Blakeslee et al., 2007). PGP19 ist ein Mitglied der P-Glycoprotein Familie von Transportproteinen, die auch am Transport von Auxin beteiligt sind. Im Sprossapex von *A. thaliana* überlappen die Expressionsmuster von PIN1 und PGP19 und ihre Coexpression in heterologen Systemen führt zu einer Zunahme der IAA-Transportaktivität und einer deutlich erhöhten Substratspezifität. Trotzdem ist PGP19 für die Funktion von PIN1 nicht zwingend erforderlich (Petrasek et al., 2006). Das Ergebnis der Analyse von Expression, Lokalisation und mutanten Phänotypen lässt auf PIN- und PGP-Proteine als Komponenten koordinierter aber unabhängiger Auxintransportmechanismen schließen, die in spezifischen Geweben auch interaktiv agieren können. Für den gerichteten Auxintransport, der die Organentwicklung und Phyllotaxis bedingt, sind jedoch primär die PIN Efflux-Carrier von Bedeutung (Blakeslee et al., 2007).

*PIN1* wird in der äußersten Zellschicht aller Primordien (darunter Keimblatt-, Blatt- und Blütenprimordien), dem SAM und den vaskulären Elementen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert (Gälweiler et al., 1998; Reinhardt et al., 2003; Benkova et al., 2003). In letzteren ist PIN1 basal in der Plasmamembran lokalisiert, während es in den epidermalen Zellen entgegengesetzt, also in Richtung der Primordienspitzen orientiert ist. Mittels PINOID Überexpressions- und Funktionsverlust-Mutanten konnte eine direkte Beteiligung der Serin/Threonin-Kinase an der Regulation der subzellulären Lokalisation von PIN-Proteinen nachgewiesen werden. In Zellen, in denen die Kinase nicht exprimiert wird, oder die PID-Konzentration unter einem Schwellenwert bleibt, werden die putativen Auxin Efflux-Carrier in den basalen Zellmembranen detektiert. Hohe PID Aktivitätslevel führen dagegen zu einer apikalen PIN Lokalisation (Friml et al., 2004; Kaplinsky und Barton, 2004).

Erst kürzlich wurde eine Verlagerung der PIN-Polarität von basal nach apikal, identisch zu den Polaritätsänderungen im Fall einer *PID*-Überexpression, auch in den Wurzeln von Proteinphosphatase 2A (PP2A) Funktionsverlust-Mutanten beobachtet. Die aus genetischen Analysen und Phosphorylierungsstudien erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass PINOID und PP2A antagonistisch auf den Phosphorylierungszustand des zentralen, hydrophilen Loops der PIN-Proteine einwirken, was wiederum die apikale bzw. basale Verteilung der Auxin Efflux-Carrier bedingt (Michniewicz et al., 2007).

Die Phosphorylierung eines exogenen Substrats durch die Serin/Threonin-Kinase setzt ihre intramolekulare Autophosphorylierung voraus. PINOID zählt zu den 23 Mitgliedern der AGC Kinase-Subfamilie VIII, deren Mehrheit eine C-terminale, hydrophobe Domäne (PIF-Domäne) aufweist, die die Interaktion der Proteine mit der Phospholipid-assoziierten Kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) vermittelt (Bögge et al., 2003; Zegzouti et al., 2006). Einem Modell von Zegzouti et al. (2006) zufolge bindet PDK1 mit seiner Pleckstrin Homologie (PH) Domäne an lokal produzierte Phosphoinositid-Liganden. PID wird durch die Interaktion der PIF-Domäne mit PDK1 an die Membran rekrutiert und die von PDK1 katalysierte Transphosphorylierung des Serins 290 im Aktivierungsloop von PINOID stimuliert die Autophosphorylierung die Serin/Threonin Kinase. Die aktivierte Form

der PID Kinase ist *in vitro* und *in vivo* in der Lage PIN-Proteine zu phosphorylieren (Michniewicz et al., 2007). Vermutlich ist der Phosphorylierungsstatus von entscheidender Relevanz für die polare Lokalisation der Auxin Efflux-Carrier in der apikalen oder basalen Membran der jeweiligen Zelle.

PIN1 zyklert zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten in Abhängigkeit vom Aktinzytoskelett (Geldner et al., 2001), was auf eine Mitwirkung des gerichteten Vesikeltransports an der Etablierung der PIN1-Polarität hinweist. In *gnom* (*gn*) Mutanten kommt es, ebenso wie nach einer Brefeldin A (BFA) Behandlung, zur Störung des Auxintransports aufgrund einer Fehllokalisierung des Efflux-Carriers PIN1. *GNOM* kodiert für einen Membran-assoziierten GDP/GTP Austauschfaktor (Guanine Nukleotide Exchange Factor; GEF) für kleine G-Proteine der ARF (ADP-Ribosylation Factor)-Klasse, welche für die selektive Aufnahme von Frachtproteinen und das Abschnüren der Membranvesikel von Bedeutung sind (Steinmann et al., 1999). Der Hemmstoff BFA bindet an den ARF-GEF Komplex und inhibiert damit die Aktivierung der ARF-Proteine, was in einer intrazellulären Akkumulation von PIN1 resultiert (Peyroche et al., 1999; Geldner et al., 2001). In transgenen *Arabidopsis* Keimlingen, die BFA-resistentes, funktionales *GNOM* Protein exprimieren, sind PIN1-Lokalisation und Auxintransport nicht mehr BFA-sensitiv, während das Recycling anderer Plasmamembran-Proteine weiterhin von der Droge beeinflusst wird. Doppelmarkierungs-Experimenten mit *GNOM* und unterschiedlichen subzellulären Markern zufolge ist *GNOM* an Endosomen lokalisiert und nicht in den sekretorischen Transportweg involviert (Geldner et al., 2003). Die schnelle Neuverteilung von PIN-Proteinen auf unterschiedliche polare Domänen in der Membran wird vielmehr der konstitutiven, Clathrin-abhängigen Endozytose und dem Recycling der Auxin Efflux-Carrier zugeschrieben, wobei die Phosphorylierung der PIN-Proteine durch die Serin/Threonin Kinase PINOID für deren apikale Lokalisation möglicherweise eine ausschlaggebende Rolle spielt (Dhonukshe et al., 2007; Michniewicz et al., 2007).

## 1.8 Spezifische Deletion der Keimblätter in *laterne*-Mutanten

Keimblätter sind die einzigen embryospezifischen Organe. Bei den Dikotyledonen haben sie eine Speicherfunktion übernommen und unterstützen die junge Pflanze während der Keimung und in der ersten Phase ihres Wachstums. Trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahren im Bereich der Molekulargenetik der Pflanzen, gemacht werden konnten, sind die grundlegenden Mechanismen, die zur Anlage und Entwicklung der Kotyledonen führen bisher weitgehend unerforscht. Diese Tatsache ist vor allem auf das Fehlen Keimblatt-spezifischer Mutanten zurückzuführen. In den meisten Fällen, in denen die Keimblattbildung gestört ist, treten, häufig bereits während der Embryogenese, eine Vielzahl pleiotroper Effekte auf (siehe 1.4).

Im Rahmen eines Ethylmethansulfonat (EMS) Mutagenese Screens für Gene, die an der apikalen Musterbildung von *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind (Mayer et al., 1991; Torres-Ruiz et al., 1996), wurde die vielversprechende Keimblattmutante *laterne* (*lat*) identifiziert. Der *laterne*-Keimling zeichnete sich durch den Verlust der Kotyledonen aus, während sich Hypokotyl und Wurzel augenscheinlich normal entwickelten (Abb. 2B). Bis dato war noch keine derartige Mutante bekannt. Die Sprossapices adulter *laterne*-Pflanzen endeten blind und erinnerten damit an den Blütenphänotyp von *pin*- bzw. *pid*-Mutanten (Okada et al., 1991;

Bennett et al., 1995), die bereits mit dem gerichteten Auxintransports in Zusammenhang gebracht worden waren.

Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnte durch die morphologische und molekularbiologische Untersuchung von *laterne* erstmals ein keimblattspezifisches, genetisches Programm aufgedeckt und Einblick in die, der Auxin-abhängigen Organogenese zugrunde liegenden, regulatorischen Prozesse gewonnen werden.

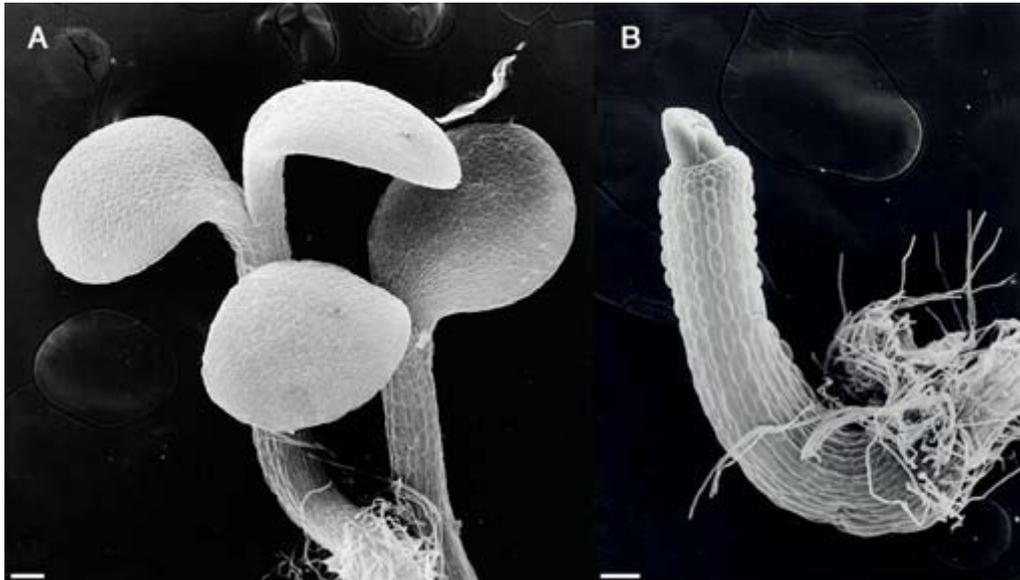


Abb. 2: Wildtyp- (WT-) und *laterne*-Keimlinge im Vergleich. Raster-Elektronenmikroskopie (REM)- Aufnahmen (A) zweier dikotyler WT-Keimlinge und (B) einer *laterne*-Mutante mit ersten Blattprimordien. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

## 2. Ergebnisse

Im Rahmen eines Screens zur Identifizierung von Genen, die an der apikalen Musterbildung von *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind, wurde die Mutante *laterne* (*lat*) isoliert, die durch das vollständige Fehlen der Keimblätter charakterisiert ist (Abb 3). Die *laterne* segregierende Linie wurde ursprünglich durch EMS-Behandlung im Landsberg *erecta* (*Ler*) Hintergrund induziert und durch wiederholtes Selbsten isogenisiert (Jürgens et al., 1994; Torres-Ruiz et al., 1996).



Abb. 3: Aufnahme eines *laterne*-Keimlings ohne Kotyledonen mit dem Raster-Elektronenmikroskop (REM). Hypokotyl und Wurzel (mit Wurzelhaaren) sind von der Mutation nicht betroffen. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

Der *laterne*-Phänotyp wird durch die simultane Mutation zweier Gene, *PINOID* (*PID*) und *ENHANCER OF PINOID* (*ENP*), verursacht. Die Beteiligung von *ENP*, eines bis dato unbekanntes Gens, und der Serin/Threonin-Kinase *PID* wurde durch das Auskreuzen von Pflanzen der *laterne*-Ursprungslinie in *Ler* und andere Ökotypen aufgedeckt (Trembl et al., 2005)). Die aus den Kreuzungen resultierenden Linien segregierten WT, *laterne*- und/oder dreikeimblättrige Keimlinge. Letztere entwickelten sich zu semi-sterilen, adulten Pflanzen mit abnormen Blüten und zum Teil blind endenden Sprossachsen, die an *pin-formed1* (*pin1*) und *pid* Mutanten erinnerten (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995). Anhand von Komplementations-Analysen wurde *PID* als das von der EMS-Mutagenese betroffene Gen identifiziert. Da die Mutation im zweiten Genlocus für sich genommen keine starken morphologischen Veränderungen hervorrief, jedoch in einem homozygoten *pinoid*-Hintergrund den Keimblatt- und Blütenphänotyp extrem verstärkte, wurde sie *ENHANCER OF PINOID* genannt (Trembl et al., 2005).

## 2.1 Phänotypische und genetische Charakterisierung von *enp*

### 2.1.1 Der Keimlingsphänotyp von *laterne*-Doppelmutanten

Der Apex wildtypischer *Arabidopsis*-Keimlinge ist einfach strukturiert. Die beiden Keimblätter der dikotyledonen Pflanze sind bilateralsymmetrisch auf gegenüberliegenden Seiten des Sprossapikalmeristems (SAM) angeordnet (Abb. 2A), welches leicht konvex gewölbt ist. In *laterne*-Doppelmutanten sind die Kotyledonen immer vollständig deletiert (Abb. 2B, 3). Hypokotyl und Wurzel werden dagegen normal gebildet. Ihr äußerer Aufbau weist keine Anomalien auf und auch die histologische Organisation der verschiedenen Gewebe, bezogen auf Form und Anordnung der Einzelzellen, weicht im Wesentlichen nicht von der der Wildtypen ab. In Semidünnschnittpräparaten junger *laterne*-Keimlinge sind einzelne Zellen und Zellwände, wie z.B. die der voll entwickelten, vaskulären Leitelemente der Hypokotyle, deutlich zu erkennen (Abb. 4A-G).

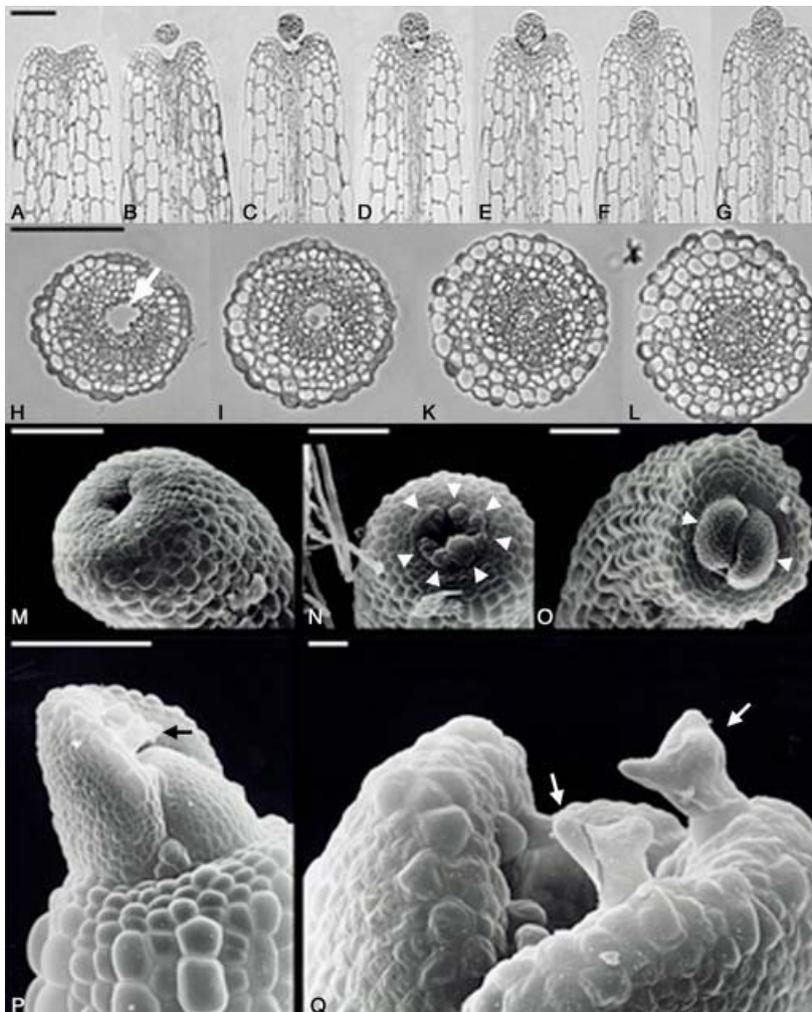


Abb. 4: Semidünnschnitte und REM-Aufnahmen von *laterne*-Keimlingen. (A-G) Längsschnitte durch Hypokotyl und Apex eines *laterne*-Keimlings mit einem einzelnen Blattprimordium. (H-L) Querschnitte durch einen *laterne*-Apex mit der für die Mutanten typischen zentralen Vertiefung aus kleinen, stark gefärbten Zellen. (M-Q) REM Aufnahmen von *laterne*-Keimlingen mit einer variierenden Anzahl an Primärblattprimordien (markiert durch Pfeilspitzen in N und O). (P,Q) Die jungen Trichome auf den Blattprimordien sind durch weiße bzw. schwarze Pfeile gekennzeichnet. Maßstabebalken: 100  $\mu$ m in A-P; 10  $\mu$ m in Q. Aus Treml et al., 2005.

Die Klärung von Ovulen (Abb. 5; vgl. 6.2.12.1) aus *Arabidopsis*-Schoten unterschiedlichen Alters ermöglicht es schon während der Embryogenese einen direkten Vergleich zwischen WT und *laterne* zu ziehen. Erste erkennbare Abweichungen vom Wildtyp treten bei der Doppelmutante ab dem frühen Herzstadium der Embryonalentwicklung auf. Zu diesem Zeitpunkt geht der ursprünglich radiärsymmetrische Embryo, durch das beginnende

Wachstum der Keimblattprimordien, normalerweise in die bilateralsymmetrische Phase seiner Entwicklung über (Abb. 5A-E). Im Fall von *laterne* werden jedoch keine Kotyledonen gebildet (Abb. 5F,G,K), was eventuell auf das grundsätzliche Fehlen von Keimblattanlagen zurückzuführen ist. Trotz dieser schwerwiegenden Veränderung des Sprosspols ist die Morphologie von Hypokotyl und Wurzel nicht von der Mutation betroffen. Folglich entsprechen optische Längsschnitte durch *laterne* hinsichtlich des basalen Aufbaus des Embryos medianen Schnitten durch einen WT im gleichen Entwicklungsstadium (vergleiche Abb. 5G und C). Wenn die Samenreife erreicht ist, sind die Kotyledonen im Normalfall in Richtung der Wurzelanlage gekrümmt und der Samen ist leicht oval. Eine Deletion der Keimblätter, wie bei *laterne*, verleiht ihm hingegen eine zylindrische Form und die betroffenen Samen können leicht identifiziert und gegebenenfalls selektiert werden.

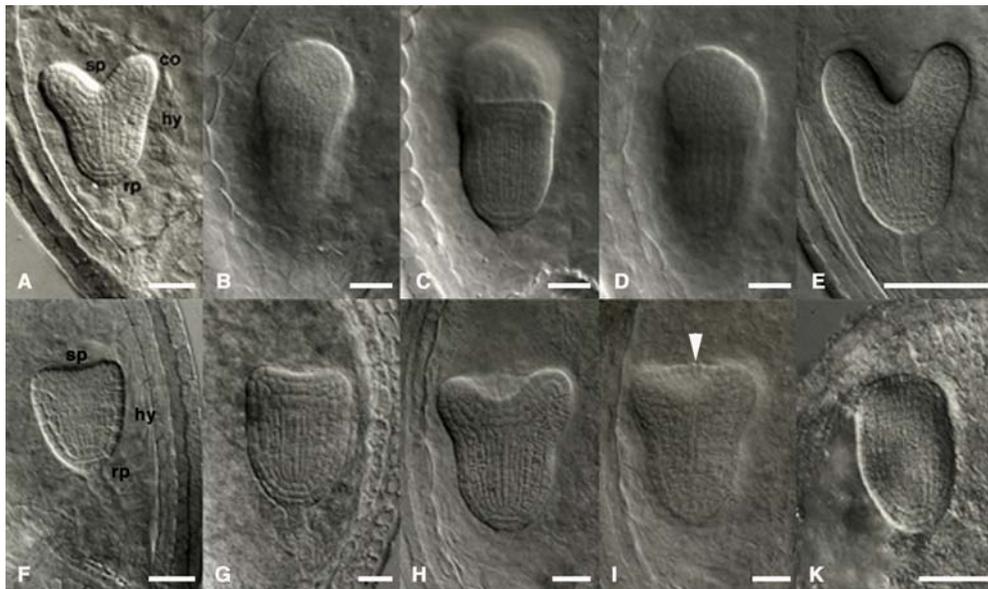


Abb. 5: Herz-Stadien der Embryogenese von *laterne* und *pinoid* im Vergleich zum WT. (A) WT-Embryo im frühen Herzstadium. Die Keimblattprimordien sind bereits deutlich erkennbar. (B-C) Aufeinanderfolgende, optische Schnitte seitlich durch einen WT-Embryo. In Bild C liegt das SAM des Embryos in der Fokussierebene. (E) Frontalansicht eines WT-Embryos im späten Herzstadium. (F,G,K) Frühes, mittleres und spätes Herzstadium der Embryogenese von *laterne*-Doppelmutanten (*pid-15 enp*). (H,I) Optische Schnitte durch einen *pid-15* Embryo mit drei Kotyledonen (der Pfeilkopf markiert das dritte Keimblattprimordium). co, Kotyledon; hy, Hypokotyl; rp, Wurzelpol; sp, Sprosspol. Nomarski-Optik. Maßstabsbalken: 25 µm. Aus Treml et al., 2005.

Eine weitere Anomalie der *laterne*-Mutanten ist bei jungen Keimlingen vor der Ausbildung der Primärblätter besonders gut zu erkennen (Abb. 4M), manifestiert sich aber bereits während der Embryogenese. Ungleich dem Wildtyp (Abb. 5C) beginnt sich der *laterne*-Apex ab dem Herzstadium nach innen zu wölben (Abb. 5G) bis im späten Torpedostadium eine markante, konkave Vertiefung entstanden ist. Die Zellen der Tunica (L1 und L2) und des Korpus (L3) in der zentralen Einbuchtung sind klein und plasmareich (Abb. 4H-L). Sie haben meristematischen Charakter und sind an der Bildung von einem bis vielen Blattprimordien beteiligt (Abb. 4N,O; Abb. 6A-C), die z.T. in unregelmäßigen Abständen zueinander angelegt werden. Nach der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (vgl. 6.2.12.2), der in die DNA der Zellkerne interkaliert, fluoreszieren die teilungsaktiven Zellen des SAM und der Primordien bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm stärker als das umgebende Gewebe (Abb. 6A-C). Die Phyllotaxis der *laterne*-Keimlinge ist häufig gestört, aber die Blätter

entwickeln sich weitgehend normal. Sie unterscheiden sich äußerlich unter anderem durch das Auftreten von Trichomen (Abb. 4P,Q) und einer differenzierteren Strukturierung der Blattnervatur von den Kotyledonen.

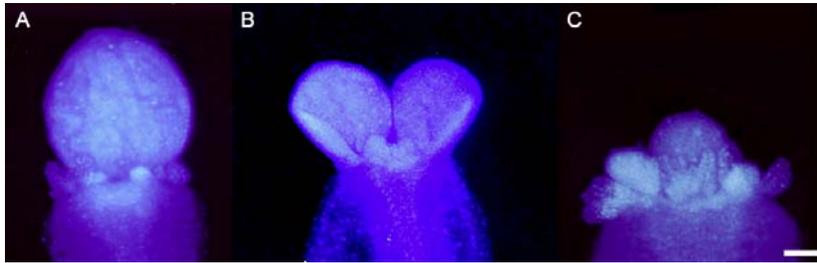


Abb. 6: DAPI-Färbung von *laterne*-Keimlingen. (A-C) Verschiedene *laterne*-Apizes mit einer scheinbar willkürlichen Anzahl und Verteilung der Blattprimordien. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

### 2.1.2 Mutationen in *ENP* führen zur Verstärkung des *pinoid*-Phänotyps

Der *laterne*-Phänotyp wird durch die gleichzeitige Mutation von *ENHANCER OF PINOID* und *PINOID* verursacht und wurde ursprünglich in einem *Ler*-Hintergrund durch EMS Mutagenese induziert (s.o.). Die Sequenzierung (vgl. 5.4 und 6.2.6) des *PID* Genlocus im Rahmen der Doktorarbeit ergab eine Transition von G nach A, die zum Austausch einer konservierten Aminosäure in Position 380 (Gly $\rightarrow$ Glu) der Serin/Threonin-Kinase führt. Die Mutation stellt ein neues, rezessives Allel von *PINOID* dar (*pid-15*) und resultiert in einem intermediären *pid*-Phänotyp mit semisterilen Blüten. Im Gegensatz zu *pid-15* zeigen homozygote *enp*-Pflanzen, die durch Auskreuzung aus der *laterne*-Ursprungslinie gewonnen werden konnten, nur einen extrem schwachen Phänotyp in Form gelegentlich verwachsener Kelch- oder Staubblätter (siehe 2.1.3).

In einem mutanten *pid*-Hintergrund verstärkt *enp*, unabhängig davon mit welchem *pid*-Allel es kombiniert wird (*pid-x enp/pid-x enp* mit *x* gleich 2, 8, 9 oder 15), den Keimblatt- und Blütenphänotyp von *pinoid*. Die Kotyledonen der Doppelmutanten fehlen ganz, anstelle überzählig zu sein und die (meisten) Sprosse enden blind. Pflanzen mit den Genotypen *pid-x enp/+ enp* oder *pid-x enp/+ +* segregieren *laterne*-Keimlinge (*pid-x enp/pid-x enp*) nach den Mendelschen Regeln im Verhältnis 1:3 bzw. 1:15. *Enp* verhält sich folglich bezogen auf die Bildung von Kotyledonen in einem homozygoten *pinoid*-Hintergrund wie eine rezessive Mutante mit voller Penetranz. Das Einkreuzen von *enp/enp*-Pflanzen in andere mutante Linien, wie z.B. *pin1*, führte in keinem Fall zur Segregation von *laterne*-Samen in der F<sub>2</sub>-Folgegeneration (Tremel et al., 2005), was darauf schließen lässt, dass sich *enp* während der Embryogenese gezielt auf den *pinoid*-Phänotyp auswirkt.

### 2.1.3 Die Bedeutung von *ENP* für die Blütenentwicklung von *A. thaliana*

Die Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* erreicht mit der Anlage der primären Infloreszenz die generative Phase ihrer Entwicklung, in der sie sich durch Selbstbestäubung fortpflanzt. Der Grundbauplan einer typischen, hermaphroditischen Einzelblüte besteht aus vier Sepalen, vier Petalen, sechs Stamina und zwei miteinander verwachsenen Fruchtblättern, die den Fruchtknoten bilden (Abb. 7), obgleich die Anzahl der Staubblätter beim Landsberg *erecta* Ökotyp geringfügig divergieren kann (Abb. 8).

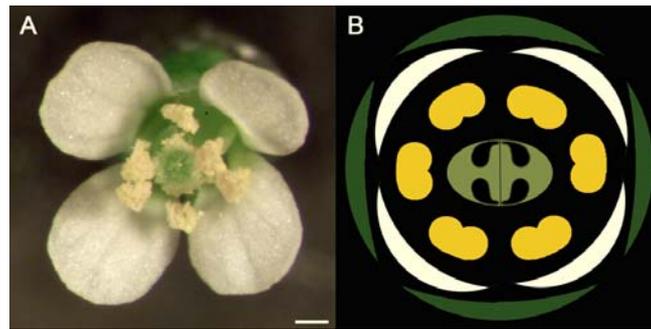


Abb. 7: Wildtypische *Arabidopsis thaliana* Blüte. (A) Photographie. (B) Blütendiagramm. Die einzelnen Blütenorgane sind mit verschiedenen Farben markiert. Dunkelgrün, Kelchblätter (Sepalen); Weiß, Kronblätter (Petalen); Gelb, Staubblätter (Stamina); Hellgrün, Fruchtblätter (Carpelle). Maßstabsbalken: 200 µm.

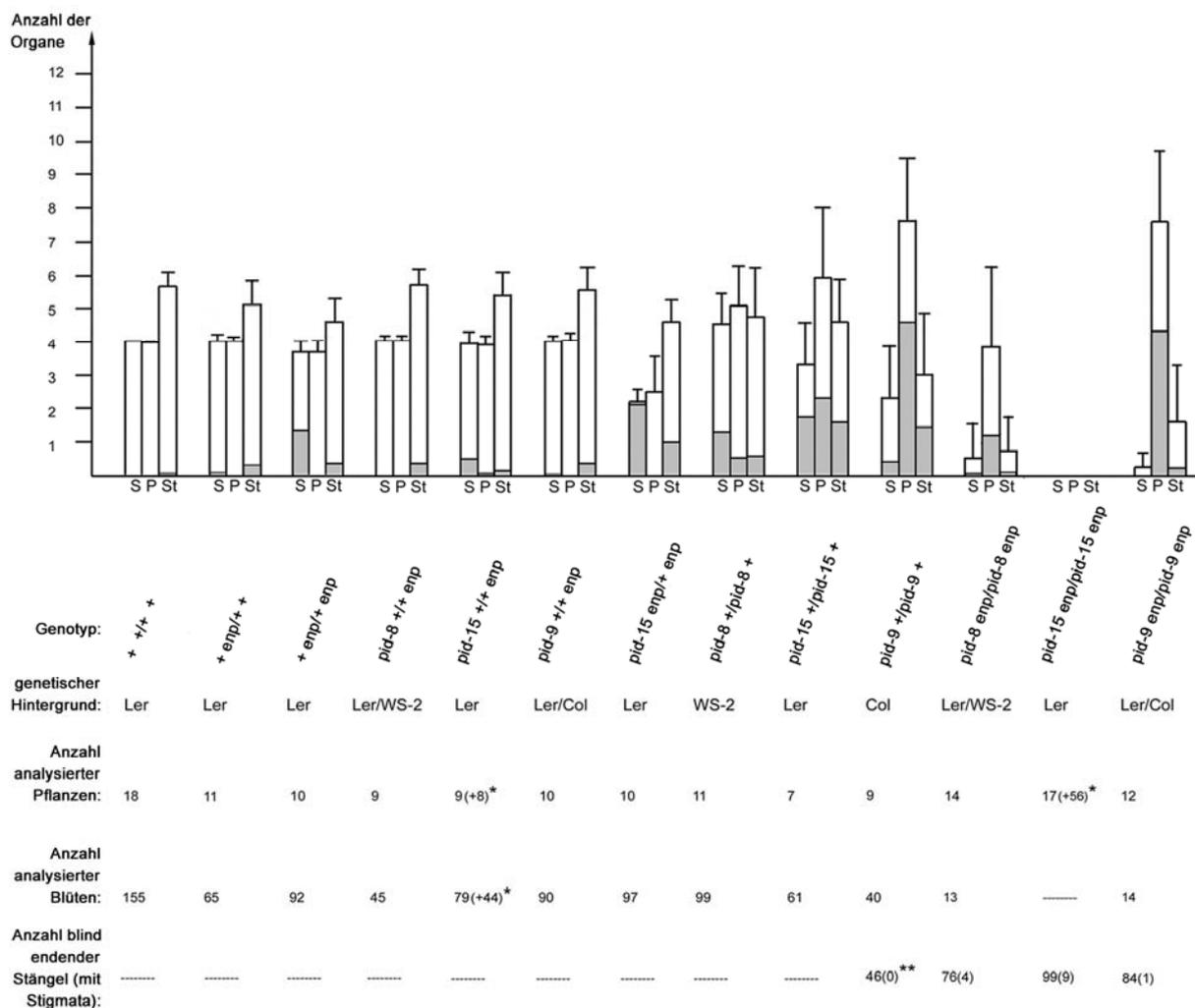


Abb. 8: Blütenentwicklung bei Pflanzen mit unterschiedlichen *PID/pid-x* und *ENP/enp* Allel-Kombinationen (verändert nach Tremli et al., 2005). Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen für die Anzahl an Sepalen (S), Petalen (P) und Stamina (St) der einzelnen Genotypen. Die schattierten Bereiche stehen für den Prozentsatz an verwachsenen Blütenorganen, wobei die vollständigen Balken jeweils 100% entsprechen. Homozygote *pid*-Pflanzen entwickelten unterschiedlich reproduktive Gynoeceen. Falls bei *pid enp/pid enp* Doppelmutanten Blüten gebildet wurden, waren diese dagegen immer steril. Bei *pid-15 enp/+ + pid-15* Genotypen wirkten sich die stark verwachsenen Sepalen negativ auf die Fertilität der Pflanzen aus, während alle heterozygoten Kombinationen von *enp* und *pid*, sowie *+ enp/+ enp* Einzelmantanten immer uneingeschränkt fertil waren. \*\* Zweite Charge analysierter Pflanzen/Blüten. \* Zwei der Sprosse entwickelten terminale Blüten.

Adulte Pflanzen mit unterschiedlichen *PID/pid-x* und *ENP/enp* Allel-Kombinationen wurden analysiert, um ihren Blütenphänotyp genauer zu bestimmen. Hetero- und homozygote *enp*-Einzelmutanten zeigen, ebenso wie heterozygote *pid-x +/+ enp* Doppelmutanten, schwache Blütendefekte in Form verwachsener Kelch- bzw. Staubblätter und einer leicht variierenden Zahl an Organen pro Wirtel (Abb. 8, 9). Die Veränderungen haben jedoch keine Auswirkung auf die Fertilität der betroffenen Pflanzen. Bei *pid-15 enp/+ enp* Genotypen hingegen verstärkt sich der Blütenphänotyp (Abb. 8). Die Sepalen sind regelmäßig zu einem Ring verwachsen, der die Petalen und Stamina einschnürt und dadurch von der Narbe (Stigma) des Stempels (Pistill) trennt (Abb. 9). Eine Selbstbestäubung ist somit nur bedingt möglich und die Pflanzen sind semisteril. Ungeachtet dessen stellen die „spirrigen“ Blüten ein gutes Selektionsmerkmal für Elterpflanzen mit einer Mutation in beiden Loci dar, die zu etwa 25% *laterne*-Nachkommen hervorbringen. Im Vergleich zu ihnen bekommen adulte *pid-15 enp/pid-15 +* Pflanzen weit weniger Blüten. Die meisten davon sind zudem infertil oder produzieren eine kleinere Menge an *laterne*-Samen ( $\leq 5\%$ ) als erwartet. Im Fall von *laterne* sind *ENP* und *PID* homozygot mutiert (*pid-x enp/pid-x enp*), was immer zur Sterilität der Pflanzen führt. Sie entwickeln Rosettenblätter, aber keine Infloreszenzen. Die Stängel von *pid-15 enp* und *pid-2 enp* Genotypen (*Ler*-Hintergrund) haben überwiegend blinde, spitz zulaufende Enden (Abb. 8, 9). Vereinzelt kommt es zur Bildung von stigmatischem Gewebe, aber andere Blütenstrukturen fehlen ihnen ganz. Wenn *enp* mit *pid*-Allelen aus einem anderen genetischen Hintergrund, wie z.B. *pid-8* (*Wassilewskija*, *Ws*) und *pid-9* (*Columbia*, *Col*) kombiniert wird, treten an den Apizes der Sprosse vermehrt terminale, unfruchtbare Blüten mit einer signifikanten Reduktion der Sepalen und des Gynoeceums auf (Abb. 8, 9). Die gleiche Beobachtung wurde bei den *laterne*-Nachkommen (F2-Generation) einer Kreuzung von Pflanzen der *pid-15 enp* Ursprungslinie mit *Col*- bzw. *Niederzenz* (*Nd*)-Ökotypen gemacht (Stockum, 2004; Trembl et al., 2005). Offensichtlich spielen für die grundsätzliche Anlage von Blütenorganen neben *enp* und *pid* noch weitere Faktoren eine Rolle, weshalb sich verschiedene, genetische Hintergründe unterschiedlich auf die Stärke der Blütendefekte auswirken.



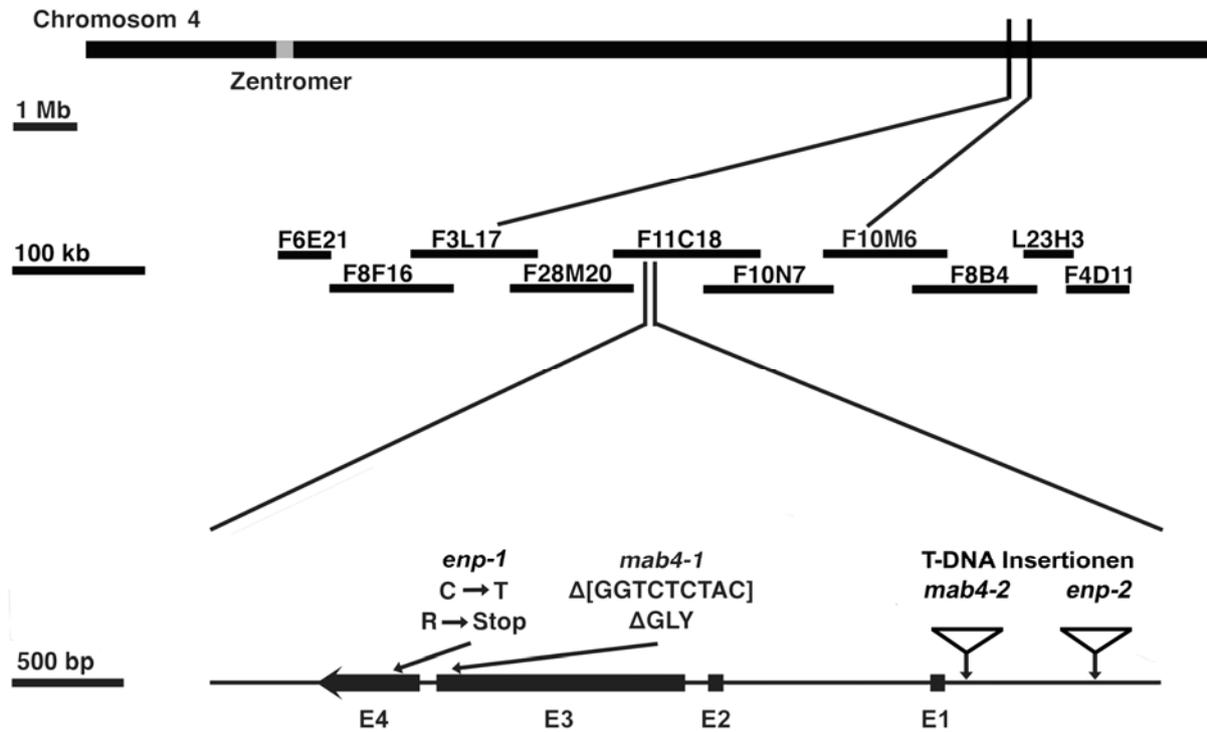
Abb. 9: Blütenphänotypen adulter *Arabidopsis*-Pflanzen mit unterschiedlichen *PID/pid-x* und *ENP/enp* Allel-Kombinationen. Der Genotyp ist immer unter der jeweiligen adulten Pflanze (oberste Bilderreihe) angegeben. Die zugehörigen Blüten und blind endenden Sprosse sind in der zweiten (Aufsicht) und dritten Reihe (Seitenansicht) abgebildet. Ausnahme: die blinden Enden in der untersten Bildserie gehören zu Pflanzen des benachbarten Genotyps (durch weiße Pfeile angedeutet). Der schwarze Pfeil markiert den blütenlosen, blind endenden Stängel einer homozygoten *pid-9 enp/pid-9 enp* Einzelmutante. Indessen treten bei *pid-9 enp/pid-9 enp* Pflanzen stellenweise terminale Blütenstrukturen an den Sprossspitzen auf (schwarzer Pfeilkopf). Die weißen Pfeilköpfe weisen auf fusionierte Sepalen hin. Maßstabsbalken: 1 cm (oberste Reihe); 1 mm (mittlere und untere Reihe).

### 2.1.4 Molekulare Kartierung und Klonierung von *ENP*

Die Kartierung von *ENP* wurde anfänglich mit CAPS- (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) und SSPL- (*Short Sequence Length Polymorphism*) Markern, wie bereits bei Lukowitz et al. (2000) und Haberer et al. (2002) beschrieben, unter Verwendung von *laterne*-Pflanzen der F2 Generation durchgeführt. Diese resultierten aus der Kreuzung von *pid-15 enp/+ enp* Mutanten mit den polymorphen Ökotypen Col-0 und Nd-0. Mit Hilfe der molekularen Marker konnte festgestellt werden, dass *ENP* auf dem unteren Arm von Chromosom 4 lokalisiert ist und eine enge Kopplung mit dem SSLP-Marker *ciw7* (~9,9 cM) besteht (Treml, 2003; Stockum, 2004; diese Arbeit). Parallel dazu wurde von der Arbeitsgruppe von Masao Tasaka nach mutanten Loci gescreent, die in einem homozygoten *pinoid*-Hintergrund schwere Keimblattdefekte verursachen (Furutani et al., 2007). Dabei wurde eine Mutante aus der M2 Nachkommenschaft einer mit schnellen Neutronen mutagenisierten Col-Population isoliert und *macchi-bou4 (mab4)* genannt, die den Phänotyp von *pid* drastisch verstärkte. Die Doppelmutanten zeichnen sich ebenso wie *laterne*-Pflanzen durch das Fehlen der Kotyledonen und blind endende Sprosse ohne Blütenorgane im adulten Stadium ihrer Entwicklung aus, während die *mab4-1* Einzelmutanten nur geringfügige Keimblatt- und Blütenanomalien aufweisen.

Aufgrund der Kartierungsergebnisse konnte der Genlocus von *MAB4* zunächst auf eine 315 kb Region zwischen den BAC-Klonen F3L17 und F10M6 und schließlich auf den BAC-Klon F11C18 auf Chromosom 4 eingegrenzt werden. Bei der Sequenzierung der für diesen Genomabschnitt vorhergesagten *Open Reading Frames* (ORFs) wurde in der genomischen DNA von *mab4-1* Mutanten eine 9 bp große Deletion detektiert. Sie betrifft die codierende Sequenz von AT4G31820 und führt zum Verlust von drei Aminosäuren (Gly, Leu und Tyr; Furutani et al., 2007; Abb. 10). Anschließende Komplementationsanalysen, Kreuzungsexperimente und die Sequenzierung des AT4G31820 Locus (vgl. 5.4 und 6.2.6) ausgehend von genomischer *laterne*-DNA ergaben, dass *ENP* allelisch mit *MAB4* ist. Bei den *pid-15 enp/pid-15 enp* Mutanten wurde eine Transition von C nach T im vierten Exon von AT4G31820 nachgewiesen, die anstelle eines Arginin-Codons (CGA) das Stopcodon Opal (UGA) in Position 468 erzeugt. Laut der Annotation von MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*), TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) und TIGR (*The Institute for Genomic Research*) besteht der AT4G31820-Genlocus aus einer außergewöhnlich langen 5'UTR-Region, vier Exons, drei Introns und einer kurzen 3'UTR-Region (Abb. 10A,B). Weitere *enp/mab4*-Allele mit T-DNA Insertionen in der 5'UTR (SALK\_101855 und SALK\_104491) und in Exon 3 (SALK\_108408) von AT4G31820 wurden daraufhin vom *Arabidopsis Biological Resource Center* bezogen. Nach der Kreuzung der SALK-Linien mit homozygoten *pid +/pid +* Pflanzen wurden die Phänotypen der F2-Folgegeneration analysiert. Im Fall der Allele *enp-2* (SALK\_101855) und SALK\_104491 konnten *laterne*-Keimlinge, die als adulte Pflanzen keine Infloreszenzen bilden, aus der Nachkommenschaft selektiert werden. Vergleichbare Kreuzungsexperimente, die das Ergebnis bestätigen, wurden mit SALK\_104491 (*mab4-2*) auch von der japanischen Arbeitsgruppe durchgeführt (Furutani et al., 2007). Dagegen resultiert die T-DNA Insertion in Exon 3 (SALK\_108408) in einem mutanten *pid*-Hintergrund nicht in *laterne*-Keimlingen (R. A. Torres Ruiz, persönliche Mitteilung). Die betroffenen Pflanzen entwickeln weiterhin Kotyledonen und eine Unterscheidung zwischen WT und Doppelmutante anhand des Keimlingsphänotyps ist ausgeschlossen.

A



B

AT4G31820		
Genmerkmale	Koordinaten (5'-3')	Größe (bp)
ORF	804-3643	
5'UTR	1-803	803
Exon 1	1-865	865
Intron 1	866-1800	935
Exon 2	1801-1870	70
Intron 2	1871-1978	108
Exon 3	1979-3097	1119
Intron 3	3098-3178	81
Exon 4	3179-3781	603
3'UTR	3644-3781	138
genom. Sequenz		3781
cDNA		2657
CDS		1716

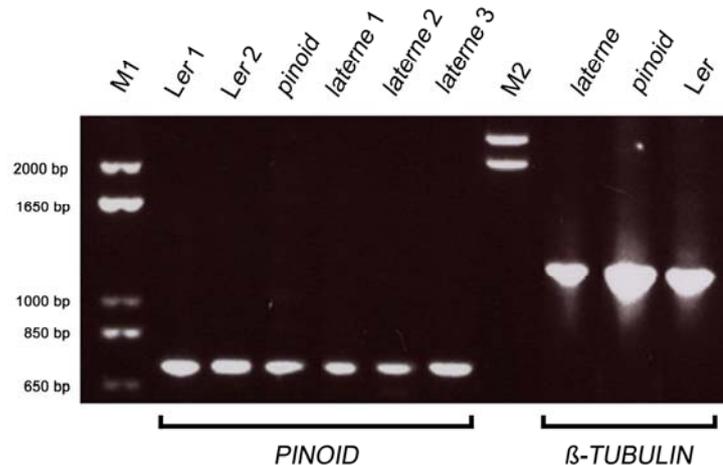
Abb. 10: Klonierung von *ENP* (*MAB4*). (A) Genlocus von *ENP* (*MAB4*) auf dem unteren Arm von Chromosom 4. Der BAC-Klon F11C18 enthält die gesamte Promotorregion und die genomische Sequenz von AT4G31820 in reverser Orientierung. E, Exon (CDS); *mab4-2*, SALK\_104491; *enp-2*, SALK\_101855. Abgeändert nach Furutani et al., 2007. (B) *ENP*-Annotation von MIPS, TAIR und TIGR.

## 2.2 Genexpressionsanalyse von homozygoten *pid-15 enp*-Pflanzen

### 2.2.1 Der *PID*-Genlocus wird in *laterne*-Keimlingen transkribiert

Der synergistische Effekt von *pid*- und *enp*-Mutationen auf die Ausbildung der Keimblätter weist auf eine genetische Interaktion der beiden Gene hin. Die Möglichkeit einer Regulation der Kinase durch ENP auf der Ebene der Transkription kann jedoch ausgeschlossen werden. Im Rahmen einer RT-PCR Analyse (vgl. 6.2.5.2) wurden WT-, *laterne*- und dreikeimblättrige *pid*-Keimlinge unter gleich bleibenden Wachstumsbedingungen (18°C, Dauerlicht) herangezogen und sieben Tage nach ihrer Keimung einzeln zur RNA-Isolierung eingesetzt. In allen getesteten Pflanzen konnte die Expression des *pid-15* Allels nachgewiesen werden (Abb. 11). Folglich wird *PINOID* in homozygoten *pid-15 enp/pid15 enp* Doppelmutanten noch transkribiert und der mutante *ENP*-Locus hat darauf keinen Einfluss.

Abb. 11: Nachweis von *PINOID*-Transkripten in *laterne*-Keimlingen. Das Gelbild zeigt die 717 bp *pid-15* cDNA Banden von exemplarischen *laterne*- (*pid-15 enp/pid15 enp*) im Vergleich zu *Ler*- (WT) und *pinoid*- (*pid-15 +/ pid-15 +*) Pflanzen. Die Punktmutation im *pid-15* Allel führt zum Austausch einer konservierten Aminosäure der Serin/Threonin-Kinase und beeinflusst die Transkription des Genlocus nicht. Als Positivkontrolle wurde die  $\beta 2/\beta 3$ -Kette des *TUBULIN* Transkripts amplifiziert (1212 bp). Größenstandards: 1 kb- (M1) und  $\lambda$ HindIII-Marker (M2); *PINOID*-Primer: *PIDIIF* und *PIDIIR* (vgl. 5.4);  $\beta$ -*TUBULIN*-Primer: 5'-GAGATTCTTCACATCCAGGG-3' und 5'-CATCTCGTCCATTCCCTCAC-3'.



### 2.2.2 Expressionsdomänen von Genen im Apex der *laterne*-Embryonen

Die Separation der Keimblattanlagen und des SAM etabliert sich normalerweise bereits in einem frühen Stadium der Embryogenese durch die Unterteilung des Embryoapex in Transkriptionsdomänen. Bei *laterne* ist die Musterbildung gestört. Die ersten morphologischen Anomalien treten ab dem Übergang vom Transitions- zum Herzstadium auf, indem keine Kotyledonen angelegt werden (vgl. 2.1.1; Abb. 5). Um in *laterne*-Embryonen mögliche Abweichungen, die Expression von Genen betreffend, welche an der Organisation des Embryoapex beteiligt sind, nachweisen zu können, wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt (siehe 5.5.1 und 6.2.9.2). Da adulte *laterne*-Doppelmutanten steril sind, wurden für die Untersuchungen Schoten „spirriger“ *pid-15 enp/+ enp* Elternpflanzen verwendet, die zu 25% *laterne*-Embryonen hervorbringen. Dabei ermöglichte der charakteristische Phänotyp der *pid-15 enp/pid-15 enp* Doppelmutanten ihre eindeutige Unterscheidung von den anderen Nachkommen mit einem (*pid-15 enp/+ enp*) oder keinem *pid-15* Allel (*+ enp/+ enp*).



Abb. 12: *In situ* Hybridisierungen. Expressionsdomänen von *STM* (A-H), *ANT* (I-P) und *CUC2* (Q-X) in WT- (A,B,D,G,I,K,M,O,Q,R,T,U,W) und *laterne*- (C,E,F,H,L,N,P,S,V,X) Embryonen. (A,B,C) Querschnittserien (Aufsicht) durch einen WT-Embryo im Globular- (A) und Herzstadium (B), mit *STM*-Expression in einem medianen Streifen zwischen den Keimblattanlagen (durch Pfeilspitzen markiert), und einen *laterne*-Embryo im Herzstadium (C). (D,E) Seitenansicht von WT (D) und *laterne* (E) Herz-Stadien. (F) Tangentiale Schnitte durch einen *laterne*- Embryo im frühen Torpedostadium (Pfeilspitzen kennzeichnen Bereiche mit höherer Signalintensität). (G) Seitenansicht von einem WT-Embryo im Torpedostadium mit der klar definierten *STM*-Domäne des SAM. (H) Vergleichbare Abbildung eines *laterne*-Embryos, mit einem stark vergrößerten *STM*-Expressionsbereich. (I,K) Längsschnittserien die das ringförmige *ANT*-Signal in der apikalen Hälfte des globularen Embryos (I) und die gefärbten Keimblattprimordien im Herzstadium (K) der Embryogenese wildtypischer Pflanzen zeigen. Die Pfeilköpfe in I und K weisen auf das Zentrum des Apex hin, in dem *ANT* nicht transkribiert wird. (L) Längsschnitte eines *laterne* Herzstadiums. Die beginnende Akkumulation von *ANT*-mRNA in den vaskulären Vorläuferzellen des Hypokotyls ist durch Pfeile markiert. (M,N) Querschnittserie durch einen WT- (M) und einen *laterne*- (N) Embryo im Herzstadium. Im Gegensatz zum WT konzentriert sich die *ANT*-Expression bei *laterne* nicht auf die Vorläuferzellen der Xylem/Phloem-Elemente. (O) Längsschnitt leicht außerhalb der medianen Ebene durch einen WT-Embryo im Torpedostadium mit *ANT*-Transkript in den vaskulären Vorläuferzellen von Hypokotyl (Pfeile) und Kotyledonen (Keimblattquerschnitt in der rechten Ecke). (P) Längsschnitt eines vergleichbaren *laterne*-Stadiums mit ringförmiger *ANT*-Expression (tangentialer Schnitt in der rechten Ecke). Die Pfeilköpfe in L, N und P kennzeichnen die zentrale Vertiefung ohne *ANT*-Signal des jeweiligen Entwicklungsstadiums der *laterne*-Mutanten. (Q,R) Globular- (Q) und frühes Herzstadium (R) mit wildtypischer *CUC2*-Expression. (S) Längsschnitte durch einen *laterne*-Embryo mit ungleichmäßiger Verteilung von *ANT*-Signal (Pfeilköpfe). (T) Seitenansicht eines WT-Embryos im späten Herzstadium. (U,V) Querschnittserien durch WT (U) und *laterne* (V) im Herzstadium. *CUC2* wird beim WT in einem Streifen zwischen den Keimblattanlagen transkribiert. Bei *laterne* erstreckt sich die *CUC2*-Domäne fleckig über den apikalen Pol. Die Pfeilspitzen weisen auf Expressionsmaxima in der Peripherie und im Zentrum hin. (W) Längsschnitt eines WT-Embryos im späten Torpedostadium mit *CUC2*-Expression im Grenzbereich zwischen SAM und Kotyledonen (Pfeile; Vergrößerter

Ausschnitt in der rechten Ecke). (X) Schnittserie durch eine *laterne*-Mutante im Torpedostadium. *CUC2*-Transkript wird im Zentrum und der Peripherie des Embryoapex detektiert (Pfeilkopf). Co, Kotyledon; hy, Hypokotyl; SAM, Sprossapikalmeristem; vSAM, variables SAM. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Peripherie des Embryoapex, in der beim WT die Primordien gebildet werden, ist durch die Expression von Genen wie *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* und *AINTEGUMENTA (ANT)* gekennzeichnet. Die Transkriptionsfaktoren sind an der Ausbildung der ad/abaxialen Polarität lateraler Organe beteiligt. Sie fungieren als Regulatoren der Organogenese und der Transkription von Genen, die die Identität und Polarität von Organen bestimmen (Byrne et al., 2000; Iwakawa et al., 2002; Xu et al., 2003; Garcia et al., 2006; Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999; Nole-Wilson und Krizek, 2006). Die Expression von *ANT* gilt als einer der ersten Marker der Gründerzellen von Organen in der peripheren Zone des Embryoapex. Sie ist anfänglich in einem Ring um die apikale Domäne des globularen Embryos lokalisiert (Abb. 12I), beschränkt sich dann aber ab dem Transitionsstadium auf die Keimblattanlagen (Abb. 12K). Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird *ANT* vor allem in den vaskulären Vorläuferzellen der Kotyledonen transkribiert (Abb. 12M,O; Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996; Long und Barton, 1998). In jungen *laterne*-Embryonen dehnt sich die *ANT*-Domäne über den gesamten apikalen Pol aus (Abb. 12L,N). Die Intensität der Expression kann in der Peripherie stellenweise leicht variieren, nur in der zentralen Vertiefung wird *ANT* während der gesamten Embryogenese nicht transkribiert (Abb. 12L,N,P), was erklären könnte, warum die Mutanten später keine Blätter in diesem Sektor produzieren.

Das embryonale Sprossmeristem wird von der Grenze zwischen den Keimblattprimordien aus initiiert, woran die drei funktional (größtenteils) redundanten *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* Gene maßgeblich beteiligt sind (Hibara et al., 2006). Sie werden zuerst in Zellen der apikalen Hälfte des globularen Embryos exprimiert, bevor sich die Domäne bis zum Herzstadium zu einem Streifen zwischen den Kotyledonen verbreitert. Später beschränkt sich ihre Expression auf den Grenzbereich zwischen Meristem und Organprimordien. Das Meristem selbst wird ausgespart (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003). Zum Vergleich von WT und *laterne* wurde *CUC2* als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Im Kontrast zu wildtypischen Embryonen (Abb. 12Q,R,T,U und W) konnte *CUC2*-Transkript bei *laterne*-Mutanten verstärkt in der Peripherie des Embryoapex nachgewiesen werden (Abb. 12S,V,X). Ähnlich wie bei *ANT* verteilt sich die *CUC2*-mRNA ungleichmäßig über den gesamten apikalen Pol (Abb. 12V), wird zudem aber auch in der zentralen Einbuchtung des Sprossmeristems von *laterne*-Phänotypen exprimiert (Abb. 12S,V,X). Die *CUC*-Gene kodieren für Homologe des Transkriptionsfaktors *NO APICAL MERISTEM (NAM)* aus *Petunia* und sind nachweislich für die Trennung neu entstehender Organe und die Bildung des Sprossmeristems mitverantwortlich. Wenn mindestens zwei der drei Genloci gleichzeitig von einer Mutation betroffen sind, kommt es zum ektopischen Wachstum von Zellen, die im Normalfall die gegenüberliegenden Keimblattprimordien voneinander separieren würden, was zu tassenförmig verwachsenen Kotyledonen und dem Verlust des SAM führt (Souer et al., 1996; Aida et al., 1997; Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2003). *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* mRNA, die normalerweise die meristematischen Zellen der zentralen Zone kennzeichnet, ist in *cuc1 cuc2*-Doppelmutanten nicht detektierbar, wogegen *stm*-Mutanten die *CUC*-Gene weiterhin exprimieren. Im Wildtyp überlappen die Expressionsdomänen anfänglich (vergl. Abb.

12A,B,D und Q,R,T,U) und verlagern sich dann ab dem frühen Torpedostadium. *CUC* wird infolgedessen an der Grenz zu den Keimblattprimordien exprimiert und umrandet dabei die *STM*-Domäne im Zentrum des Embryoapex (siehe Abb. 12G und W; Long et al., 1996; Long und Barton, 1998; Aida et al., 1999; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003). Bei *laterne*-Mutanten wird *CUC2* auch noch in den fortgeschrittenen Stadien der Embryonalentwicklung in der mutmaßlichen SAM-Region transkribiert (Abb. 12X) und die Expressionsmuster von *STM* und *CUC2* überlagern sich.

*STM* und *WUSCHEL* (*WUS*) werden für die Initiation des embryonalen SAM und dessen Aufrechterhaltung während der späteren Entwicklung benötigt und haben die Funktion von permanenten, positiven Regulatoren der Stammzellidentität im Apikalmeristem (Long et al., 1996; Endrizzi et al., 1996; Mayer et al., 1998; Schoof et al., 2000). *STM* kodiert für einen Homeoboxdomäne-Transkriptionsfaktor, der mit dem *KNOTTED1*-Gen aus Mais verwandt ist und ab dem späten Globularstadium zwischen den Keimblattanlagen exprimiert wird (Abb. 12A,B,D,G), wo er das Wachstum der Primordien unterdrückt. Abweichungen vom WT im Bezug auf die *STM*-Domäne zeigen sich bei *laterne*-Mutanten vom Transitions- bzw. frühen Herzstadium an. In dieser Phase der Embryogenese wird *STM* für gewöhnlich noch in einem medianen Streifen, der sich quer über den Apex erstreckt und die Anlagen des zukünftigen SAM markiert, exprimiert (Abb. 12A,B). Später beschränkt sich das *STM*-Signal beim WT auf die zentrale Region zwischen den Keimblattprimordien (Abb. 12G). In den abnormen *laterne*-Embryonen umfasst der Bereich, in dem *STM* transkribiert wird, den gesamten apikalen Pol und ist damit weit größer als im WT (Abb. 12E,F,H). Schnittserien durch die *laterne*-Apizes belegen, dass das Expressionsmuster in unterschiedlichen Embryonen variieren kann. Die Intensität des *STM*-Signals ist oft uneinheitlich, was auf eine stärkere Akkumulation von *STM*-Transkript in einzelnen Zellgruppen schließen lässt (Abb. 12C,F). In manchen Fällen wird die zentrale Domäne sogar ausgespart und *STM*-mRNA kann nur in der Peripherie des Embryoapex detektiert werden (Abb. 12C).

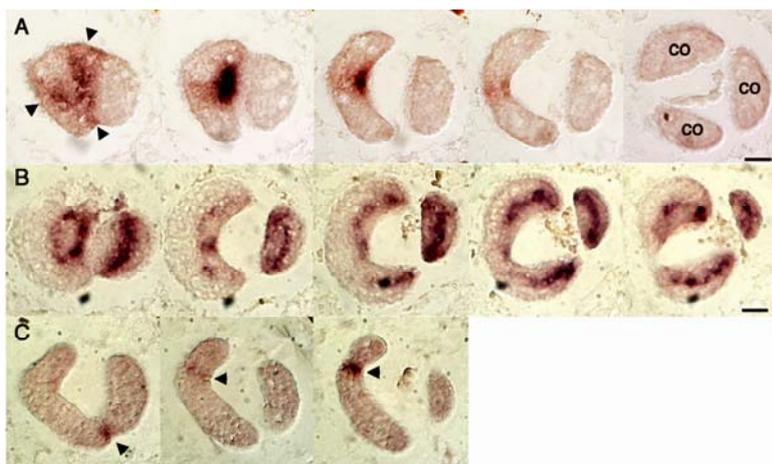


Abb. 13: *STM*, *ANT* und *CUC2*-Expression in *pinoid*-Embryos. (A,B,C) Querschnittserien durch die Apizes dreikeimblättriger *pid-15* Mutanten im frühen Torpedostadium hybridisiert mit *STM* (Reihe A), *ANT* (Reihe B) und *CUC2* (Reihe C) antisense Sonde. Co, Kotyledon. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Im Gegensatz zu den *laterne*-Doppelmutanten ergab die Analyse der Genexpression von *ANT*, *CUC2* und *STM* bei + *enp*/+ *enp* Embryonen keine erkennbaren Abweichungen vom WT. Das Gleiche gilt für dreikeimblättrige *pid-15* +/*pid-15* + Mutanten. Die Transkriptionsfaktoren werden in den für sie typischen Regionen exprimiert und auch die Topologie des apikalen Pols ist, mit Ausnahme der veränderten Anzahl an Keimblattprimordien, vergleichbar mit der der Wildtypen. Wie Querschnitte durch die homozygoten *pid-15*

Embryonen zeigen, wird *CUC2* zwischen den Keimblattprimordien (Abb. 13C) und *ANT* in den Vorläuferzellen der Xylem/Phloem-Elemente der Kotyledonen und des Hypokotyls (Abb. 13B) transkribiert. Nur die *STM*-Domäne ist stellenweise leicht verbreitert (Abb. 13A).

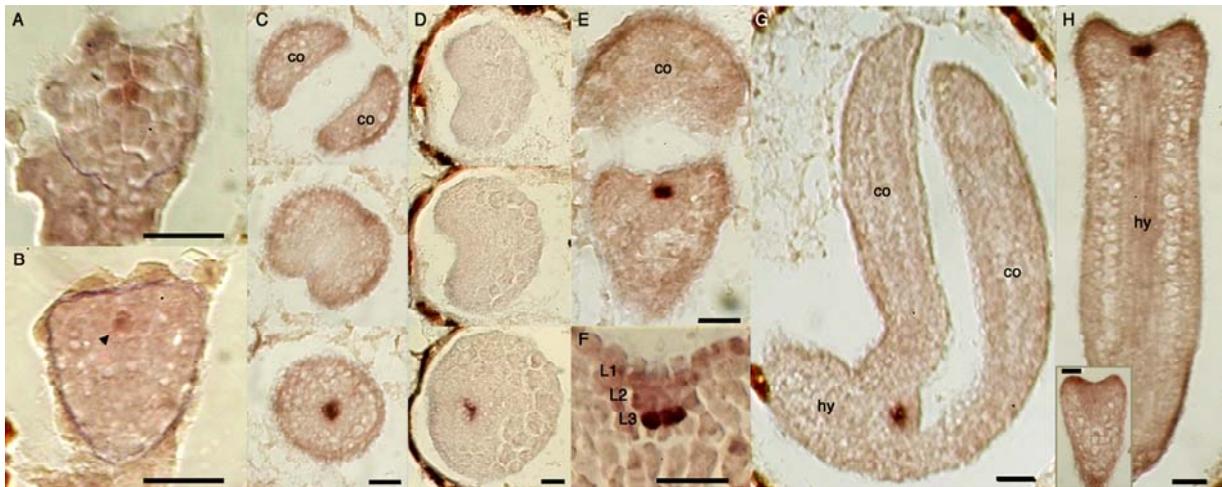


Abb. 14: *WUS*-Expression in WT- und *laterne*-Embryos. (A-C,E,G) WT; (D,F,H) *laterne*. (A,B) Längsschnitte durch WT-Embryos. *WUS*-mRNA wird im Globularstadium in der L2 und L3 detektiert (A), beschränkt sich aber ab dem frühen Herzstadium auf die L3 des Embryoapex (B). (C,D) Querschnittserien durch einen WT im Herz- (C) und einen *laterne*-Embryo im Torpedostadium (D) mit wildtypischen *WUS*-Domänen. (E) Medianer Schnitt durch einen WT, der den apikalen Pol mit *WUS*-Expression in der L3 und die Spitze eines Keimblattes (co) zeigt. (F) Vergrößerung einer repräsentativen, zentralen Einbuchtung im Apex eines vergleichbaren *laterne*-Embryos. *WUS* wird, wie beim WT, in der L3 exprimiert (die Gewebeschichten L1-L3 sind markiert). (G,H) Längsschnitt durch einen WT- (G) und einen *laterne*-Embryo (H) im späten Torpedostadium mit *WUS*-Expression. Der Längsschnitt durch eine weitere *laterne*-Mutante (links unten in Bild H) wurde mit sense Probe hybridisiert. Co, Kotyledon; hy, Hypokotyl. Maßstabsbalken: 20 µm.

Wie bei *stm*- (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996), ist auch bei *wus*-Mutanten die Entwicklung des SAM nachhaltig gestört. Die Stammzellen in der zentralen Zone der Spross- und Blütenmeristeme von homozygoten *wus*-Pflanzen differenzieren sich vorzeitig, was die Termination der Meristeme nach sich zieht (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Im WT wird *WUS*-Transkript ab dem 16-Zell-Stadium in den vier sub-epidermalen Zellen der oberen Hälfte des Embryos detektiert und von da an schrittweise in eine zentralere Position an der Basis des SAM verlagert (Abb. 14A,B und E). Im Torpedostadium beschränkt sich die Expression des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors auf eine kleine Region in der L3 („organisierendes Zentrum“) unterhalb der zwei äußersten Zellschichten mit proliferierenden Zellen (Abb. 14F bzw. 14G). Diese werden durch die Aktivität von *WUS* so beeinflusst, dass sie ihren Stammzellcharakter langfristig beibehalten (Mayer et al., 1998; Schoof et al., 2000). Die *WUS*-Domäne liegt in direkter Nachbarschaft zu den Vorläuferzellen der vaskulären Elemente des Hypokotyls, eine Region die bei *laterne*-Embryonen rein morphologisch nicht von der Mutation betroffen ist (vgl. 2.1.1). *In situ* Hybridisierungen mit *WUS* antisense und sense Sonden bestätigen diese Beobachtung auch bezüglich des Expressionsmusters von *WUS*. Der Transkriptionsfaktor wird in *laterne*-Embryonen augenscheinlich weiterhin in der L3 benachbart zu dem zentralen, provaskulären Gewebe exprimiert (Abb. 14D,F,H).

### 2.2.3 Homozygote *pid-15 enp stm-5* Tripelmutanten mit *laterne*-Phänotyp

In *pid pin1* Doppelmutanten wird die Bildung von Kotyledonen teilweise unterdrückt (vgl. 1.4), was auf die expandierte Expressionsdomäne von *CUC1*, *CUC2* und *STM* zurückgeführt wird. Die Keimblattentwicklung kann jedoch bereits durch die Eliminierung der Aktivität eines der drei Meristem-spezifisierenden Transkriptionsfaktoren wiederhergestellt werden (Furutani et al., 2004). Im Fall homozygoter *pid-15 enp* Embryonen erstreckt sich die *STM*-Domäne über den gesamten apikalen Pol (siehe 2.2.2), weshalb der Effekt einer zusätzlichen Mutation in *STM* auf die Doppelmutanten getestet wurde. Dazu wurden Nachkommen einer *stm-5* Linie mit einer Mutation in der 5' Splice Site, die zu einem starken *stm*-Phänotyp führt (vgl. 5.8.2), mit „spirrigen“ *pid-15 enp/+ enp* Pflanzen gekreuzt. Die *pid-15 enp stm-5/+ enp +* Genotypen, welche aus der F2 Generation isoliert werden konnten, segregierten nur drei Klassen von Keimlingsphänotypen: WT, *stm* und *laterne*. Diese wurden aufgezogen und mittels Pyrosequenzierung (unter Verwendung des PSQ<sup>TM</sup>96MA Systems von Biotage; vgl. 5.4) genotypisiert. Tripelmutanten wurden dabei nur in der letzten Gruppe ermittelt. Zwanzig der 82 analysierten *laterne*-Phänotypen waren in allen drei Genen homozygot mutant (Abb. 15A,F), was wie erwartet in etwa 1/4 ihrer Gesamtzahl entsprach. Alle anderen keimblattlosen Individuen waren entweder *pid-15 enp stm-5/pid-15 enp +* (38/82, Abb. 15F) oder homozygot für *pid-15 enp +* (24/82, Abb. 15B). Folglich ist die Regeneration der Kotyledonen durch die zusätzliche Mutation des *STM*-Locus bei *laterne* nicht möglich. Der Phänotyp von *stm-5* dagegen kann in den Tripelmutanten in Hinblick auf die Produktion von Primärblättern (Endrizzi et al., 1996) sogar teilweise abgeschwächt werden (Abb. 15A,B,D). Die Tripelmutanten gleichen im adulten Stadium ihrer Entwicklung den *pid-15 enp* Pflanzen. Sie legen keine Blütenstände an und ihre Sprosse enden blind, wachsen aber etwas langsamer und bleiben oftmals insgesamt kleiner als die der Doppelmutanten (Abb. 15F).

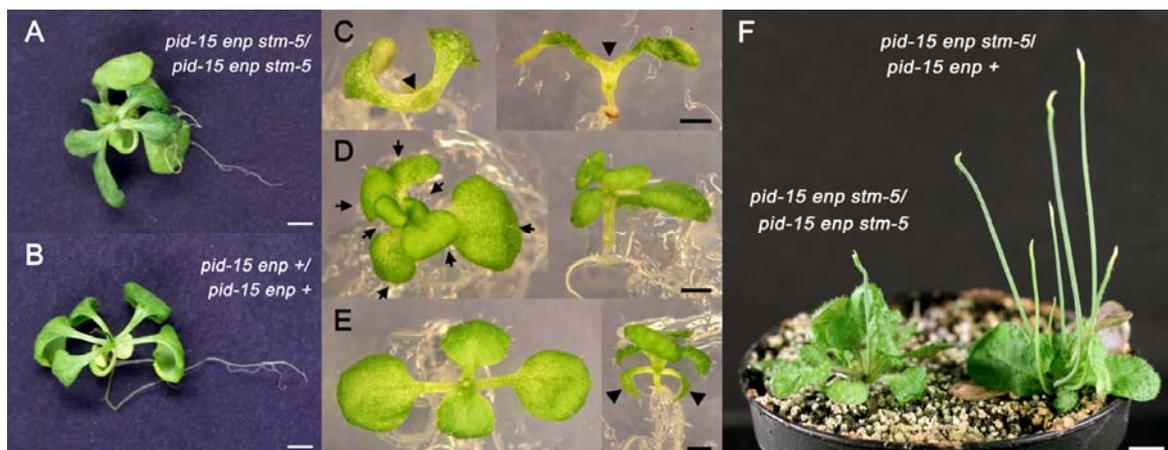


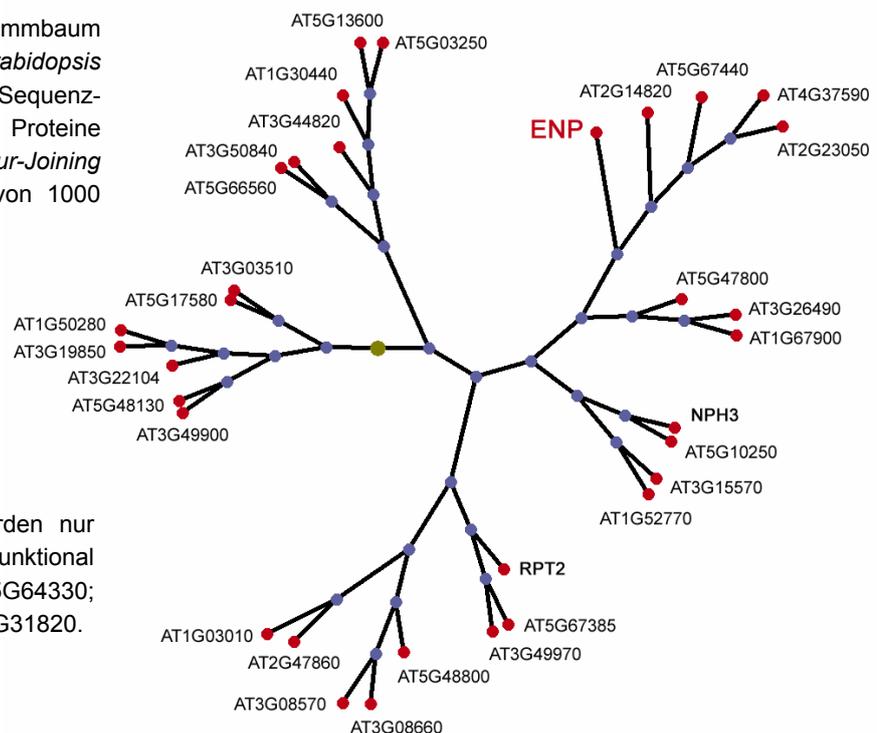
Abb. 15: Analyse der Tripelmutanten *pid-15 enp stm-5*. (A,B) Junge Tripel- (A) versus Doppel- (B) Mutante (Genotypen sind angegeben). (C-E) Vergleich der *stm-5* (C), *laterne*- (D) und WT- (E) Keimlingsphänotypen. Das fehlende SAM (C), die Trichome der Primärblätter (D) und die Kotyledonen (ohne Trichome; E) sind mit Pfeilköpfen bzw. Pfeilen markiert. (F) Gleichaltrige, adulte Tripelmutanten mit einem homo- (links) bzw. heterozygoten (rechts) *stm-5* Allel (Genotypen sind angegeben). Maßstabsbalken: 2,5 mm in A und B; 1 mm in C-D; 5 mm in F.

## 2.3 Expressionsanalyse von *ENHANCER OF PINOID*

### 2.3.1 Struktur von ENP

ENP ist ein Mitglied der pflanzenspezifischen NPH3-Proteinfamilie, deren Namensgeber *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3* (*NPH3*), ursprünglich in einem genetischen Screen für Mutanten, deren Hypokotyle keine phototrope Reaktion auf gerichtetes, blaues Licht zeigten, isoliert wurde (Liscum und Briggs, 1995; Motchoulski und Liscum, 1999). *NPH3* bildet einen Komplex mit *PHOTOTROPIN1* (*PHOT1*), einem Photorezeptor mit einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne am C-Terminus, dessen Autophosphorylierung durch Blaulicht stimuliert wird (Huala et al., 1997; Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001). *PHOT1* gilt als der dominante Rezeptor für die Regulation des Phototropismus. Ein weiteres Homolog zu *NPH3*, *ROOT PHOTOTROPISM2* (*RPT2*) ist ebenfalls ein Interakteur von *PHOT1*, aber im Gegensatz zu *NPH3* primär in die phototrope Antwort der Wurzel und die *PHOT1*-vermittelte Öffnung der Stomata involviert (Inada et al., 2004; Pedmale und Liscum, 2007). *PHOT1* ist ein Mitglied der AGC-Kinasefamilie, die in *Arabidopsis* *PINOID* und 37 weitere Kinasen mit einschließt (Bögge et al., 2003). Die Bezeichnung AGC-Kinase steht dabei für cAMP-abhängige Proteinkinase A, cGMP-abhängige Proteinkinase G und Phospholipid-abhängige Proteinkinase C. Obwohl *PID* und *PHOT1* ebenso wie *ENP* und *NPH3* homologe Proteine sind, konnte bisher weder in herkömmlichen Yeast Two-Hybrid Experimenten (Benjamins et al., 2003; Furutani et al., 2007) anderer Arbeitsgruppen, noch in eigenen Versuchen mit dem CytoTrap™-System von Stratagene, eine Protein-Protein Interaktion von *PID* und *ENP* nachgewiesen werden.

Abb. 16: Phylogenetischer Stammbaum der NPH3-Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Das multiple Sequenzalignment der homologen Proteine wurde mit ClustalW2 (*Neighbour-Joining* Methode unter Verwendung von 1000 Bootstrap-Replikationen) durchgeführt und zur Erstellung eines radialen Stammbaums mit Hilfe der PhyloDraw082 Software eingesetzt. Der Hauptknotenpunkt ist grün, die internen Knotenpunkte sind blau und die Endpunkte sind rot markiert. Bisher wurden nur *NPH3*, *RPT2* und *ENP* funktional charakterisiert. *NPH3*, *AT5G64330*; *RPT2*, *AT2G30520*; *ENP*, *AT4G31820*.





und Liscum, 1999) kein eindeutiges, C-terminales Coiled-Coil Motiv, auf (Abb. 17). Im Fall der *enp-1* Mutanten führt das Stopcodon in Position 468 unmittelbar nach der NPH3-Domäne zum Transkriptionsabbruch und bei *mab4-1* sind die drei Aminosäurereste Gly (G), Leu (L) und Tyr (Y) in Position 408-410 deletiert (vgl. 2.1.4), wobei die letztere zu den hoch konservierten Aminosäuren der NPH3-Domäne zählt (Abb. 17). Durch den Verlust des C-Terminus von ENP ist dagegen keines der bekannten/annotierten Sequenzmotive unmittelbar von der Mutation betroffen. Trotzdem resultiert das *enp-1* Allel, ebenso wie *mab4-1*, in einem mutanten *pid*-Hintergrund in keimblattlosen Keimlingen, die sich zu sterilen, adulten Pflanzen mit blind endenden Sprossen entwickeln.

### 2.3.2 Nachweis alternativer Transkriptionsstartpunkte

Die annotierte cDNA-Sequenz von *ENP* enthält eine ungewöhnlich lange untranslatierte Region am 5'Ende (vgl. 2.1.4). Das Genmodell wird derzeit durch 16 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) gestützt, von denen fünf ganz (EH904771, AV829105, BP861134, AV526911) oder teilweise (AV520562) im 5'UTR liegen. Des Weiteren führen die bisher analysierten SALK-Linien mit T-DNA Insertionen in der 5'Region von *ENP* (SALK\_101855 und SALK\_104491) im Fall der Kreuzung mit homozygoten *pinoid*-Pflanzen zu *laterne*-Phänotypen in der F2-Generation. Die beiden Allele wirken sich folglich ebenso wie *enp-1* und *mab4-1*, deren Mutationen die CDS von *ENP* betreffen (siehe 2.1.4), auf die Keimblattentwicklung der Doppelmutanten aus. Zur detaillierteren Untersuchung der Transkription des Genlocus und der Detektion möglicher mRNA-Varianten wurden im Rahmen der Doktorarbeit RT-PCR und Northern Blot Experimente durchgeführt.

Zuerst sollten mit Hilfe der RT-PCR Analyse (vgl. 6.2.5.2) etwaige alternative Spleißstellen in der prä-mRNA detektiert werden. Zur einfachen Isolierung ausreichender Mengen an gesamt-RNA wurden Rosettenblätter verwendet, da sie *ENP* in ihren Blatträndern stark exprimieren (Furutani et al., 2007). Nach der reversen Transkription der RNA wurde die Erststrang cDNA mit unterschiedlichen Primerkombinationen (Abb. 18) amplifiziert. Das Ergebnis der Sequenzierung der resultierenden cDNA-Fragmente bestätigt die vorhergesagten Exon-Intron Grenzen. Die Spleißstellen stimmen exakt mit dem bestehenden Genmodell überein. In zwei Fällen konnte allerdings auch ein Fragment amplifiziert werden, wenn sich die Bindestelle von einem der verwendeten Primer im Intron befand (Abb. 18). Da Intron 2 und 3 jedoch in keinem der anderen cDNA-Fragmente enthalten waren und auch nicht mit speziell erstellten Primerpaaren (*ENP* Exon/Intron Primer; vgl. 5.4) nachgewiesen werden konnten, handelt es sich bei den besagten Fragmenten höchstwahrscheinlich um PCR-Artefakte. Alternatives Spleißing kann somit mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, nicht jedoch das Vorkommen unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte eventuell in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe. Interessanter Weise wird in den Rosettenblättern zumindest im Fall einer der putativen mRNA-Varianten die vollständige, annotierte 5'UTR von *ENP* transkribiert (Abb. 18, 2F2R). Gleiches trifft auch für die Blüten der Col-0 Ökotypen zu, mit deren gesamt-RNA die RT-PCR Analyse mit einigen Primerpaaren wiederholt wurde.

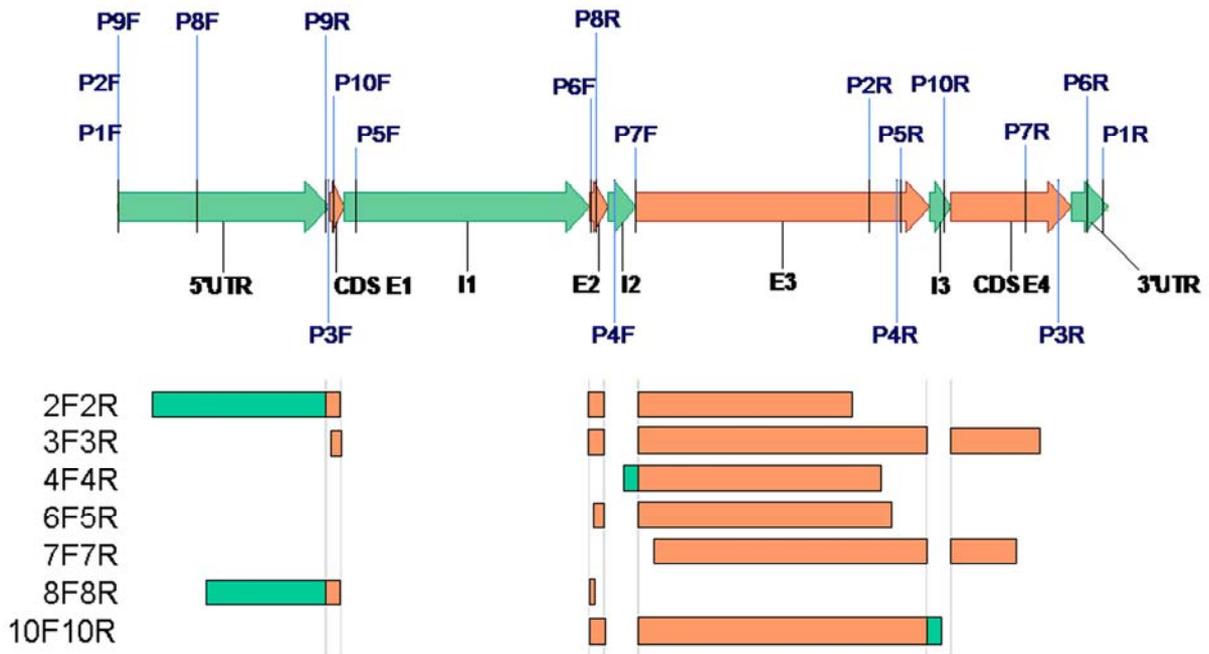


Abb. 18: RT-PCR Analyse der *ENP*-Transkripte in den Rosettenblättern von Col-0 Ökotypen. Die Abbildung zeigt das annotierte Genmodell von *ENP* (oben) und den sequenzierten Teil, der mit unterschiedlichen Primerkombinationen amplifizierten cDNA Fragmente (unten). Die Bindestellen der verwendeten Primer (*ENP* Primer III; vgl. 5.4) sind angegeben. Grün: Introns, 5'UTR und 3'UTR; rot: Exons.

Da *laterne*-Mutanten weder Keimblätter, noch Hochblätter oder Blüten bilden, die Rosettenblätter aber nur geringfügige Veränderungen zeigen (vgl. 2.1.1 und 2.1.3), wurde die Expression von *ENP* in unterschiedlichen Geweben von wildtypischen Col-0 Pflanzen getestet. Als Template für die Northern Blot Sonde diente dabei ein ~1,5 kb großes cDNA Fragment von *ENP* (Position 160-1716 der CDS), das nachweislich (NCBI BLASTn) keine signifikanten Homologien zu anderen Sequenzen des *Arabidopsis* Genoms aufweist. Das vorrangige Ziel der Analyse war die Detektion unterschiedlicher Transkript-Längen, weshalb zur Isolierung der mRNA lediglich mehrere Gramm des jeweiligen Pflanzenmaterials eingesetzt wurden, ohne eine Mengenkalisierung durchzuführen. Der Anzahl der mit der *ENP*-Sonde nachgewiesenen Banden zufolge existieren mindestens drei, möglicherweise aber auch vier verschiedene *ENP*-Transkripte (Abb. 19), deren ungefähre Größe zwischen 1,9 und 2,75 kb liegt. Welche mRNA-Varianten exprimiert werden ist offensichtlich gewebeabhängig. Die kleinste mRNA-Bande tritt z.B. ausschließlich bei den Blüten auf.

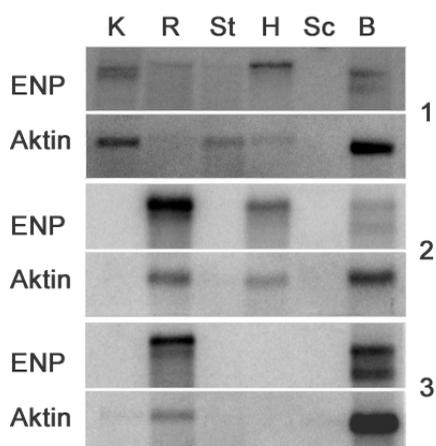


Abb. 19: Northern Blot Analyse zum Nachweis von *ENP*-Transkripten in unterschiedlichen Geweben von *A. thaliana*. Die Abbildung zeigt drei repräsentative Northern Blots. Zur Hybridisierung wurden jeweils eine *ENP*-Sonde und eine Aktin-Sonde (pYA301 mit Aktin-Gen aus *S. cerevisiae*) als Kontrolle eingesetzt. Im Fall der Stängel (St) und Schoten (Sc) konnten, im Gegensatz zu den anderen Geweben, unter Verwendung der gleichen Methode (siehe 6.2.9.1) keine ausreichende Menge an mRNA isoliert werden. K, Keimlinge; R, Rosettenblätter; St, Stängel; H, Hochblätter; Sc, Schoten, B, Blüten.

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, wodurch der Längenunterschied der mRNA-Varianten verursacht wird, wurden die annotierten Exon, Intron und UTR Sequenzen mit Hilfe geeigneter Primerpaare (*ENP* Exon/Intron Primer; vgl. 5.4 und Tab. 1) subkloniert und anschließend als Templates für Hybridisierungs sonden eingesetzt. Da in den Rosettenblättern und Blüten jeweils zwei *ENP*-Transkripte detektiert wurden, von denen nur eines in beiden Geweben gleichermaßen exprimiert wird, wurde ihre mRNA getrennt isoliert und als Ausgangsmaterial für die neuerliche Northern Blot Analyse (vgl. 6.2.9.1) verwendet. Mit der extrahierten mRNA wurde jeweils ein gesondertes Formaldehydgel beladen, wobei von ersterer in etwa 3,4 µg und von letzterer ca. 3,0 µg (NanoDrop Photometer) pro Laufspur aufgetragen wurden. Nach Transfer und Fixierung der mRNA wurden die geblotteten Membranen zwischen den einzelnen Laufspuren in kleinere Teilstücke zerschnitten, um sie mit den verschiedenen Sonden getrennt hybridisieren zu können (Abb. 20). Die Templates zwischen 50 und 130 bp mussten aus Polyacrylamidgelen isoliert werden (siehe 6.2.4.3) und eigneten sich, vermutlich aufgrund ihrer geringen Größe (Tab. 1), nur bedingt für die Herstellung von Northern Blot Sonden. Banden mit niedriger mRNA-Konzentration, wie die der beiden kürzeren und schwächer exprimierten *ENP*-Transkripte (vgl. Abb. 20, Bande 2 und 3), konnten mit ihrer Hilfe grundsätzlich nicht detektiert werden.

AT4G31820	Gesamt-länge (bp)	Primerpaare	Fragment-größe (bp)
5' UTR	803	<i>ENP</i> 5' UTR FIR	758
E1 (CDS)	62	<i>ENP</i> Exon1 CDS FIR	60
I1	935	<i>ENP</i> Intron1 FIR	881
E2	70	<i>ENP</i> Exon2 FIR	58
I2	108	<i>ENP</i> Intron2 FIR	93
E3	1119	<i>ENP</i> Exon3 FIR	1075
I3	81	<i>ENP</i> Intron3 FIR	71
E4 (CDS)	465	<i>ENP</i> Exon4 CDS FIR	462
3' UTR	138	<i>ENP</i> 3' UTR FIR	121

Tab. 1: Größe der in pGEM®-T Easy klonierten *ENP*-Fragmente. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare sind unter Punkt 5.4 aufgeführt. E, Exon; I, Intron.

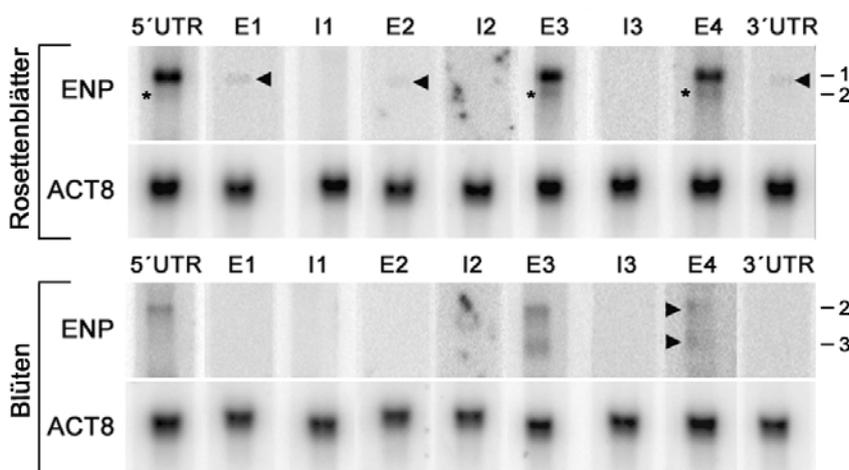


Abb. 20: Northern Blots mit mRNA aus Rosettenblättern (oben) bzw. Blüten (unten) als Ausgangsmaterial. Die jeweils obere Reihe zeigt die einzelnen Streifen der geblotteten Membranen, die mit unterschiedlichen Northern Blot Sonden getrennt hybridisiert wurden.

Schwache Banden sind durch Pfeilköpfe gekennzeichnet und die Sterne markieren das kürzere und deutlich geringer

exprimierte *ENP*-Transkript der Rosettenblätter (2). Als Kontrolle wurde Aktin verwendet (pGEM®-T *ACT8*; *A. thaliana*). E, Exon; I, Intron. Die Bezeichnung E1 und E4 bezieht sich jeweils nur auf die CDS der beiden Exons. 1, ~2,75 kb; 2, ~2,5 kb; 3, ~1,9 kb.

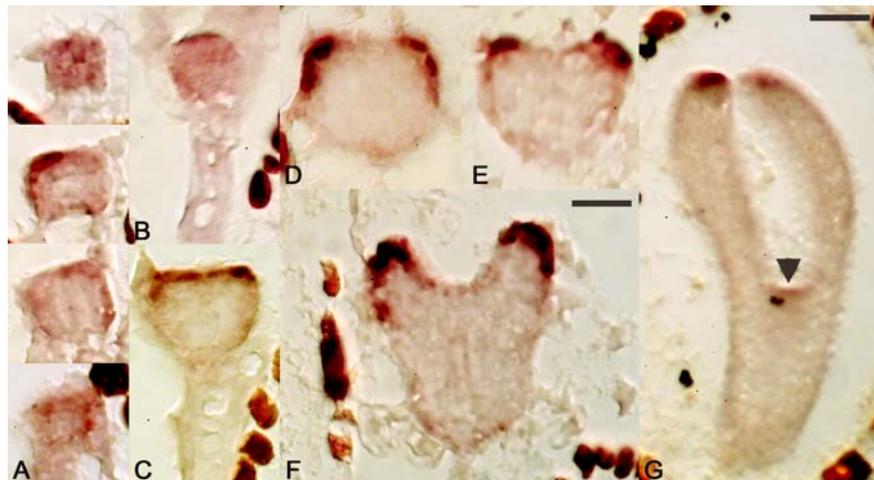
Alle drei Transkripte enthalten Exon 3 und 4. Die 803 bp große Leadersequenz kommt dagegen in der kürzesten mRNA-Variante (Bande 3), die nur in den Blüten exprimiert wird,

nicht vor (Abb. 20) und ihre Länge entspricht relativ genau der Differenz zu Bande 1. *ENP* weist folglich mindestens zwei alternative Transkriptionsstartpunkte auf. Wegen der schwachen Intensität der Banden, die mit den Sonden für Exon 1, Exon 2 und die 3'UTR-Sequenz nachgewiesen werden konnten, bleibt jedoch unklar, was den Größenunterschied des Transkripts mittlerer Länge (Bande 2) bedingt.

### 2.3.3 Die Expressionsmuster von *ENP* in unterschiedlichen Geweben

Die *ENP*-Transkripte wurden im Rahmen der Northern Blot Analysen bereits eindeutig in Keimlingen, Rosettenblättern, Hochblättern und Blüten nachgewiesen (vgl. 2.3.2), was darauf schließen lässt, dass *ENP* während des gesamten Lebenszyklus von *Arabidopsis thaliana* in fast allen Organen exprimiert wird. Um das zeitliche und räumliche Expressionsmuster auf zellulärer Ebene überprüfen zu können, wurde ein *ENP* cDNA-Klon hergestellt (vgl. 5.5.1) und als Template für die *in situ* Hybridisierungs sonden eingesetzt (6.2.9.2.2). Das resultierende 1362 bp große *ENP*-Fragment entspricht einer Region, die die Aminosäuren 44-497 umfasst, weshalb alle postulierten, alternativen mRNAs mit der *ENP*-Sonde gleichermaßen detektiert werden.

Abb. 21: *ENP*-Expressionsmuster in WT-Embryonen. (A) Längsschnittserie durch ein Globularstadium mit *ENP*-mRNA primär in den protodermalen Zellen. (B) Tangentialer Schnitt durch einen globularen Embryo. (C-E) Beim Übergang vom Transitions- (C,D) ins frühe Herz- (E) Stadium beginnt sich das *ENP*-Transkript in den Keimblattprimordien zu akkumulieren bis kein *ENP*-Signal im Hypokotyl und der zentralen Domäne des



Embryoapex mehr detektiert ist. (F) Frontalansicht eines Embryos im Herzstadium. (G) Torpedostadium mit *ENP*-Expression im mutmaßlichen SAM (Pfeilkopf) und den äußersten Keimblattspitzen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  in A-F; 40  $\mu\text{m}$  in G.

Den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierungsexperimente zufolge wird der *ENP*-Genlocus spätestens ab dem 8-Zell-Stadium einheitlich in den Zellen wildtypischer Embryonen transkribiert. Im Globularstadium der Embryogenese konzentriert sich die Expression bereits auf das Protoderm und die inneren Zellen des Embryos werden ausgespart (Abb. 21A,B). Sobald sich die Kotyledonen beim Übergang vom Transitions- zu Herzstadium zu bilden beginnen, beschränkt sich das *ENP*-Signal zunehmend auf die epidermalen Vorläuferzellen der Primordien und zieht sich dabei aus dem Zentrum des apikalen Pols und dem Hypokotyl zurück (Abb. 21C-F). Ab dem Torpedostadium akkumuliert die *ENP*-mRNA in den Rändern und Spitzen der Keimblätter (Abb. 22B-D) und wird zudem auch wieder in den Zellen des mutmaßlichen SAM detektiert (Abb. 21G und 22B,D). Bei den älteren Torpedostadien nimmt die Signalintensität in den Kotyledonen dann allmählich ab und vollentwickelte Embryonen

exprimieren *ENP* nur noch schwach im Apikalmeristem. Das Expressionsmuster von *ENP* ähnelt dem der Serin/Threonin-Kinase *PINOID* (Christensen et al., 2000; Furutani et al., 2004) und es ist anzunehmen, dass beide Gene in vielen Zellen simultan transkribiert werden.

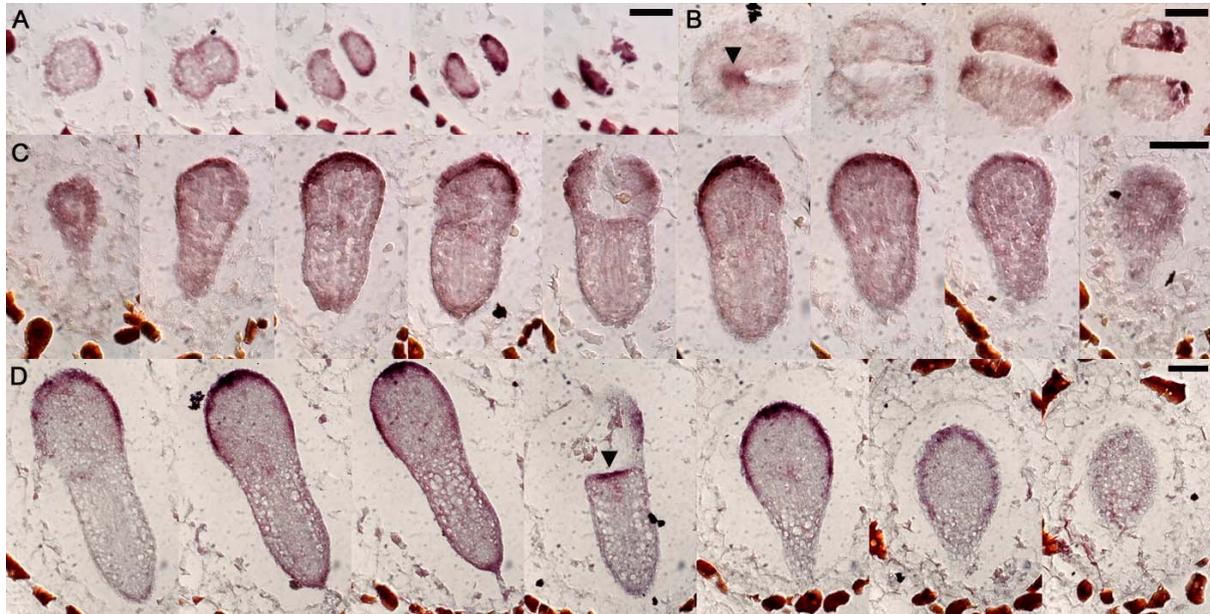


Abb. 22: Schnitterien zur detaillierten Analyse des Expressionsmusters von *ENP* in wildtypische Embryonen (A,B) Querschnitte durch einen dikotylen Embryo im (A) Herz- und (B) Torpedostadium. (C,D) Aufeinanderfolgende Längsschnitte durch ein spätes Herz- (Reihe C) und ein Torpedostadium (Reihe D). (A-D) *ENP*-Transkript akkumuliert vorrangig in den epidermalen Vorläuferzellen der Keimblattränder und -Spitzen. Die Pfeilköpfe in B und D markieren die *ENP*-Domäne im mutmaßlichen SAM der Torpedostadien. Maßstabsbalken: 40 µm.

Bevor die Embryogenese stattfinden kann, werden die Ovulen, die Vorstadien der Samen, in den zwei, durch ein Septum getrennten, Fruchtkammern des synkarpen Gynoeceums von *Arabidopsis thaliana* gebildet (Abb. 23A; Schneitz et al., 1995). Die Ovule (Samenanlage) ist relativ einfach organisiert. Im Verlauf ihrer Entwicklung werden die drei wichtigsten, sporophytischen Musterelemente entlang der proximal-distalen Achse angelegt. Der Nucellus am distalen Ende enthält die Embryosackmutterzelle, aus der sich der weibliche Gametophyt entwickelt. Er wird von zwei Integumenten eingehüllt, die der Chalaza-Domäne an seiner Basis entspringen (Abb. 23B). Am proximalen Ende ist der Funiculus lokalisiert, in dem die Morphogenese der Leitelemente stattfindet. Über ihn stehen die Ovulen mit der Placenta der Fruchtblätter in Verbindung (Abb. 23C). Die *in situ* Hybridisierungen ergaben eine Akkumulation von *ENP*-Transkript in den Spitzen der Integumente und des Nucellus der Samenanlagen in den Fruchtknoten junger Blüten. *ENP* wird folglich sowohl während der Entwicklung der Embryonen als auch der Ovulen in den Organprimordien exprimiert.

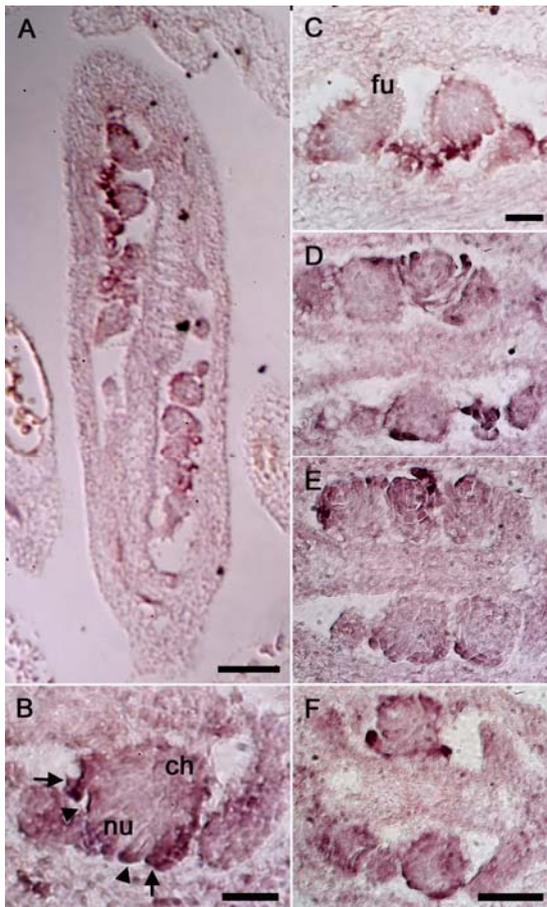


Abb. 23: Expressionsdomänen von *ENP* im Fruchtknoten junger *A. thaliana* Blüten (A) Längsschnitt eines durch das Septum in zwei Fächer unterteilten Fruchtknotens. Die Ovulen entwickeln sich in den beiden Fruchtfächern in einer Reihe entlang der Scheidewand. (B-F) Ausschnitte von Fruchtknoten mit unreifen Samenanlagen, welche *ENP* vorrangig in den Spitzen der Integumente und des Nucellus (nu) transkribieren (B) Ovule im Stadium der Musterbildung. Der Nucellus ist bereits größtenteils von den Integumenten umgeben die aus der Chalaza (ch) hervorgehen. Das innere Integument ist durch Pfeilköpfe, das äußere durch Pfeile markiert. (C) Vergrößerung zweier Ovulen aus A. Medianer Schnitt durch den Funiculus der Samenanlage links im Bild. (D-F) Auszüge einer Längsschnittserie durch einen Fruchtknoten mit unreifen Ovulen in beiden Kammern entlang des Septums. ch, Chalaza; fu, Funiculus; nu, Nucellus; Maßstabsbalken: 80  $\mu\text{m}$  in A; 20  $\mu\text{m}$  in B und C; 40  $\mu\text{m}$  in D-F.

Ein weiterer Teil der postembryonalen Untersuchungen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Masao Tasaka (*Nara Institute of Science and Technology*, Japan) durchgeführt. Danach wird die *ENP*-mRNA nach der Keimung weiterhin vorrangig in den lateralen Organprimordien und dem

SAM von *A. thaliana* detektiert. Junge Folgeblätter exprimieren *ENP* am stärksten in der Blattspitze und an den Rändern der Blattspreite. Die Leitbündel der Blätter sind ebenfalls gefärbt, aber das Hybridisierungssignal ist verhältnismäßig schwach. Sobald die adulte Pflanze beginnt Blütenstände zu bilden, akkumuliert *ENP*-Transkript in der L1 der Infloreszenzmeristeme und markiert dabei die Bereiche in denen neue Blüten angelegt werden. In diesen wird *ENP* zuerst verstärkt in den Primordien der Sepalen und später in den Anlagen der inneren Blütenorgane exprimiert (Furutani et al., 2007).

### 2.3.4 Analyse der Expression von *ENP* in *pinoid*- und *laterne*-Embryonen

Um einen Einfluss der Serin/Threonin-Kinase PINOID auf die Expression von *ENP* während der Embryogenese von *A. thaliana* definitiv ausschließen zu können, wurden *in situ* Hybridisierungen an Schoten homozygoter *pid-15* Pflanzen durchgeführt. Die *ENP*-mRNA ist in einem mutanten *pinoid*-Hintergrund entsprechend dem WT uniform in jungen Embryonen im 8-Zell-Stadium verteilt (Abb. 24A) und konzentriert sich dann zunehmend auf die epidermalen Vorläuferzellen der Keimblattprimordien (Abb. 24C). Ab dem Torpedostadium zeigen die Mutanten das wildtypische *ENP*-Signal in den Kotyledonen und dem embryonalen SAM (Abb. 24D). Ersteres nimmt konstant ab, bis *ENP* in den ausgewachsenen Embryonen nur noch in der L1 des SAM transkribiert wird (Abb. 24B). Die Unterscheidung der *pid*-Mutanten vom WT anhand des Expressionsmusters von *ENP* ist somit unmöglich und eine funktionale PINOID-Kinase scheint demzufolge nicht von Bedeutung für die Transkription

von *ENP* zu sein. In homozygoten *pid-15 enp* Pflanzen lässt sich die *enp*-mRNA (vgl. 5.8.2) in den protodermalen Zellen des Embryoapex nachweisen (Abb. 24E,F). Dabei verteilt sich die Expression, in der Regel mit Ausnahme der zentralen Vertiefung, über den gesamten apikalen Pol (Abb. 24E,G,H) und stimmt insofern mit der *pid-15* Domäne der *laterne*-Embryonen überein (Vogg, 2007).

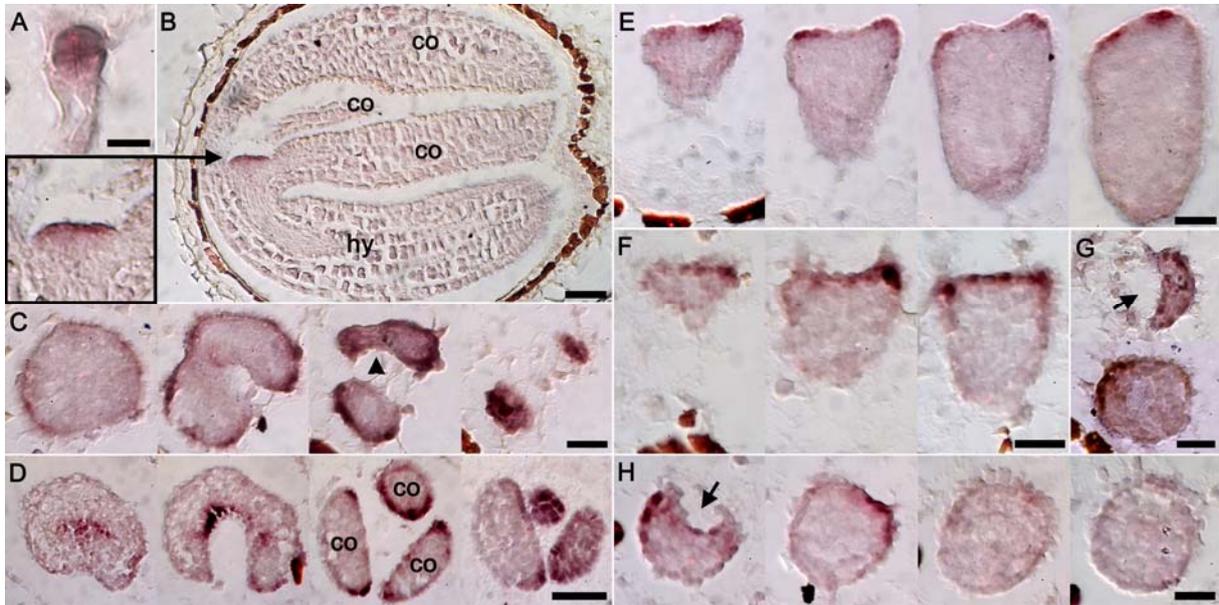


Abb. 24: *In situ* Hybridisierungen zum Nachweis der *ENP*-Expression in mutanten *pinoid*- und *laterne*-Embryonen. (A-D) *pid-15 +/pid-15 +*, (E-H) *pid-15 enp/pid-15 enp*. (A) *pinoid*-Embryo im 8-Zell-Stadium mit wildtypischer *ENP*-Expression. (B) Spätes Torpedostadium mit drei Kotyledonen (co) im Längsschnitt. Das *ENP*-Signal ist auf L1 des SAM (Vergrößerung links) reduziert. (C) Querschnittserie durch einen *pinoid*-Embryo im Herzstadium mit teilweise verwachsen Keimblättern (Pfeilkopf). (D) Einzelne Auszüge einer Querschnittserie durch einen dreikeimblättrigen Embryo im Torpedostadium. *ENP* wird analog zum WT in den Keimblatträndern und -Spitzen und dem embryonalen SAM transkribiert. (E,F) In Längsschnittserien durch *laterne*-Embryonen im (E) Torpedo- und (F) Herzstadium wird *ENP*-mRNA primär in den epidermalen Vorläuferzellen des apikalen Pols detektiert. (G,H) Querschnittserien durch Herz-Stadien mit ringförmiger *ENP*-Expression um die zentrale Vertiefung (Pfeile) im Apex der *laterne*-Mutanten. co, Kotyledon; hy, Hypokotyl. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m in A; 80  $\mu$ m in B; 40  $\mu$ m in D; 20  $\mu$ m in C und E-H.

## 2.4 Die Bedeutung von *ENP* für den gerichteten Auxintransport und die Auxin-abhängige Organentwicklung

Der Auxintransport ist in *pinoid*-Pflanzen nachweislich gestört. In den Sprossachsen der adulten Mutanten wird beispielsweise weit weniger Indolelessigsäure (IAA) basipetal transportiert als im WT (Bennett et al., 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PID an der Kontrolle der polaren Lokalisation von PIN1 in den Membranen der epidermalen Zellen von Infloreszenzmeristemen beteiligt ist. Eine homozygote Mutation des *PID*-Genlocus resultiert in einer vornehmlich basalen statt apikalen PIN1-Lokalisation, was wiederum die Etablierung lokaler Auxinmaxima behindert (Friml et al., 2004), die u.a. für die normale Ausbildung der Blütenorgane erforderlich wären (Benkova et al., 2003; Reinhardt et al., 2000; Reinhardt et al., 2003).

Um die Auswirkung einer zusätzlichen Mutation des *ENP*-Locus zu testen, wurden in Anlehnung an die Versuchsreihe von Bennet et al. (1995) in Zusammenarbeit mit PD Dr. E. Glawischnig (TUM) blind endende Stängel von *laterne*-Mutanten (*pid-15 enp-1/pid-15 enp-1*) zur Quantifizierung des basipetalen Auxintransports, mit Hilfe von <sup>14</sup>C-markiertem IAA, eingesetzt. Dabei konnte im Vergleich zum WT eine signifikante Reduktion des gerichteten Auxintransports festgestellt werden. Zwischen den beiden Mutanten, *pinoid*- und *laterne*, war jedoch kein eindeutiger Unterschied erkennbar (Trembl et al., 2005). Da sich die Untersuchung ausschließlich auf adulte *laterne*-Pflanzen beschränkte, konnte noch keine Aussage über die jüngeren Entwicklungsstadien der Doppelmutante getroffen werden und die Möglichkeit einer stärkeren Beeinträchtigung des Auxintransports als Grund für den Verlust der Kotyledonen blieb insofern weiterhin offen.

#### 2.4.1 Auxinmaxima in WT-, *pinoid*- und *laterne*-Embryonen

Um die differenzielle Verteilung von Auxin im Verlauf der Embryogenese von WT-, *pinoid*- und *laterne*-Pflanzen vergleichen zu können, wurde die Expression von *DR5rev::GFP* bei einer repräsentativen Anzahl an Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien analysiert (vgl. 5.8.3 und 6.2.12.3). Das *DR5rev::GFP* Konstrukt ermöglicht den Nachweis der Auxinmaxima. Schwache Auxin-Konzentrationen können dagegen kaum detektiert werden. Bei WT-Embryonen im Herzstadium (n=70) akkumuliert Auxin immer am basalen Pol. Deutliche Auxinmaxima in den Keimblattprimordien sind zu diesem Zeitpunkt meistens nicht zu erkennen (Abb. 25A). Spätestens ab dem Torpedostadium konzentriert sich das Phytohormon dann gleichmäßig in der Wurzelanlage und den Keimblattspitzen (Abb. 25B,C). Darüber hinaus wird *DR5rev::GFP* häufig auch im zukünftigen SAM (Abb. 25B,I), sowie den vaskulären Vorläuferzellen des Hypokotyls und der Kotyledonen, in denen Auxin in Richtung der Wurzelanlage transportiert wird (Jenik und Barton, 2005), exprimiert. Die *laterne*-Embryonen zeigen immer das erwartete Maximum am Wurzelpol, aber eine verstärkte Akkumulation von Auxin in der Peripherie des Embryoapex, in der sich normalerweise die Keimblattprimordien bilden würden, tritt nicht auf. Stattdessen lassen sich bei *laterne*-Mutanten wiederholt Bereiche höherer Auxin-Konzentration ungleichmäßig über den Apex verteilt nachweisen, die wahrscheinlich mit der Domäne des embryonalen SAM zusammenfallen (Abb. 25K,L). In anderen Fällen wird *DR5rev::GFP* wiederum nur extrem schwach im apikalen Pol exprimiert (Abb. 25M). Ein weiterer interessanter Effekt konnte bei zwei- und dreikeimblättrigen *pid*-Embryonen mit den Genotypen *pid-15/pid-15* und *pid-15 enp-1/pid-15* + beobachtet werden. Sie weisen Störungen im Bezug auf die Ausbildung der Auxinmaxima in den Spitzen der Keimblattprimordien auf (Abb. 25D-H). Das Wurzelmaximum dagegen ist erneut nicht betroffen. Die Anzahl der Kotyledonen mit einem deutlichen Auxinmaximum variiert bei *pid*-Embryonen im Torpedostadium von 0 bis maximal 3. In einigen von ihnen konzentriert sich Auxin z.B. in zwei von drei Keimblattspitzen vergleichbar zum WT, das dritte Keimblatt wird jedoch ausgespart (Abb. 25H). Ferner kommt es vor, dass sich das Maximum großflächig über den Rand des Primordiums verteilt (Abb. 25D,E), weit häufiger sind die Maxima der Kotyledonen aber extrem schwach, oder fehlen ganz (Abb. 25F,G).

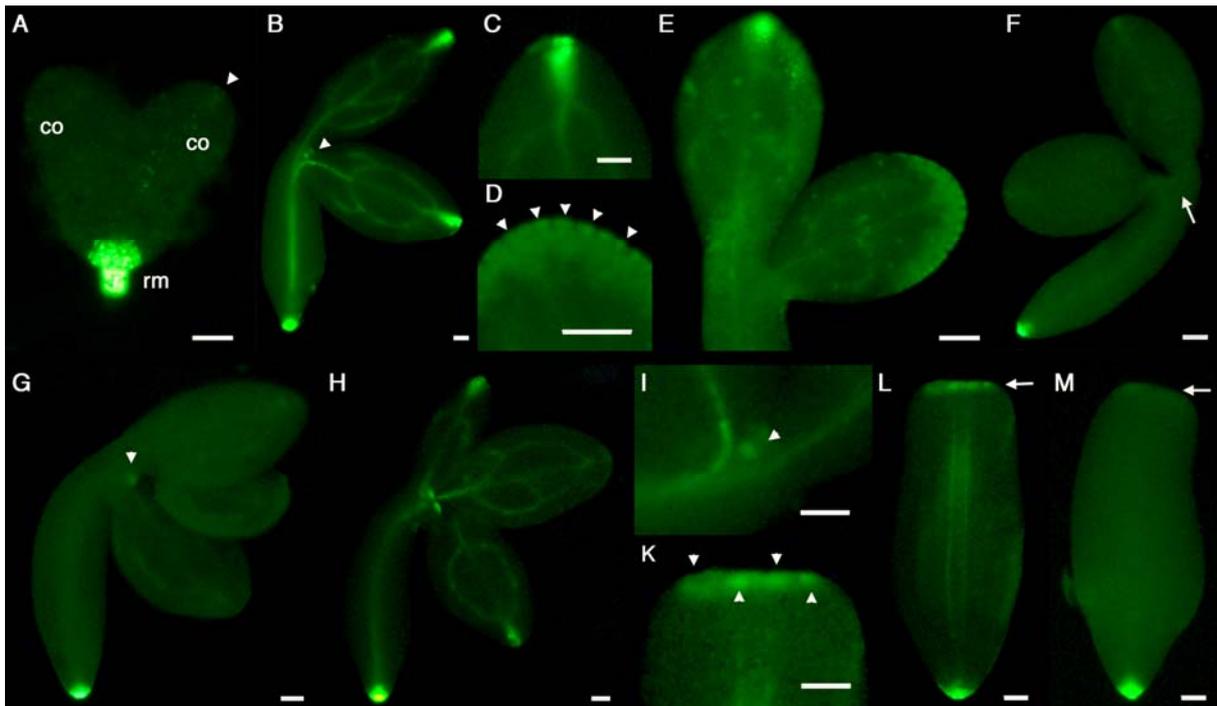


Abb. 25: Expression von *DR5rev::GFP* in WT, *pid-15* und *laterne* (*pid-15 enp-1*) Embryonen. (A) Herzstadium eines WT-Embryonen mit schwachem GFP-Signal im rechten Keimblattprimordium (Pfeilkopf). (B) WT Embryo im Torpedostadium mit Auxinmaximum in der Wurzelanlage und den Keimblattprimordien (Teilvergrößerung in C) und einem zusätzlichen, schwächeren Maximum (Pfeilkopf) im Bereich des embryonalen SAM (gespiegelte Teilvergrößerung in I). (D-H) Torpedo-Stadien zwei- (E,F) und dreikeimblättriger (G,H) *pinoid*-Embryonen. (D) Teilvergrößerung der Keimblattspitze in E. (K-M) Zwei *laterne*-Embryonen im Torpedostadium mit Bereichen höherer Auxin-Konzentration im apikalen Pol (L; Teilvergrößerung in K) und ohne deutliches GFP-Signal im Apex (M). Die Pfeilköpfe markieren einzelne Auxinmaxima. Die Peile weisen auf das fehlende Maximum im SAM des *pid*-Embryos in F und die variable Auxin-Akkumulation im apikalen Pol der *laterne*-Mutanten in L und M hin. co, Kotyledon; rm, Wurzelanlage. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

#### 2.4.2 Analyse des polaren Auxintransports in *laterne*-Embryonen

Die variablen Auxinmaxima der *pid-15* und *laterne*-Mutanten (siehe 2.4.1) deuten auf Unregelmäßigkeiten in Auxintransport oder Synthese hin. Eine direkte Beteiligung von PINOID an der Regulation der subzellulären Lokalisation des Auxin-Efflux-Carriers PIN1 ist bereits erwiesen und hat in der Epidermis der Infloreszenzmeristeme von PIN1 Funktionsverlust-Mutanten eine weitgehende Reorientierung der PIN1-Proteine von apikal nach basal zur Folge (Friml et al., 2004). Um die Polarität des Auxintransports im Apex von *pinoid*- und *laterne*-Embryonen feststellen zu können, wurden transgene *PIN1::GFP*-Pflanzen (vgl. 5.8.3) in homozygote *pid-15* und *laterne* (*pid-15 enp-1/pid-15 enp-1*) segregierende Linien eingekreuzt. *PIN1::GFP* wird grundsätzlich in der äußersten Zellschicht der Keimblattprimordien, dem embryonalen SAM und den vaskulären Vorläuferzellen wildtypischer *Arabidopsis* Embryonen exprimiert. In letzteren markiert das GFP-Signal die basale Plasmamembran, während es in den protodermalen Zellen entgegengesetzt, also in der apikalen Plasmamembran lokalisiert ist ( $n > 80$ ; Abb. 26D-F; Steinmann et al., 1999; Benkova et al., 2003). Für die Analyse mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (siehe 6.2.12.4) erwiesen sich Embryonen ab dem frühen Herzstadium als am besten geeignet, da

eine klare Zuordnung der polaren Position von PIN1 in jüngeren Entwicklungsstadien meistens unmöglich war.

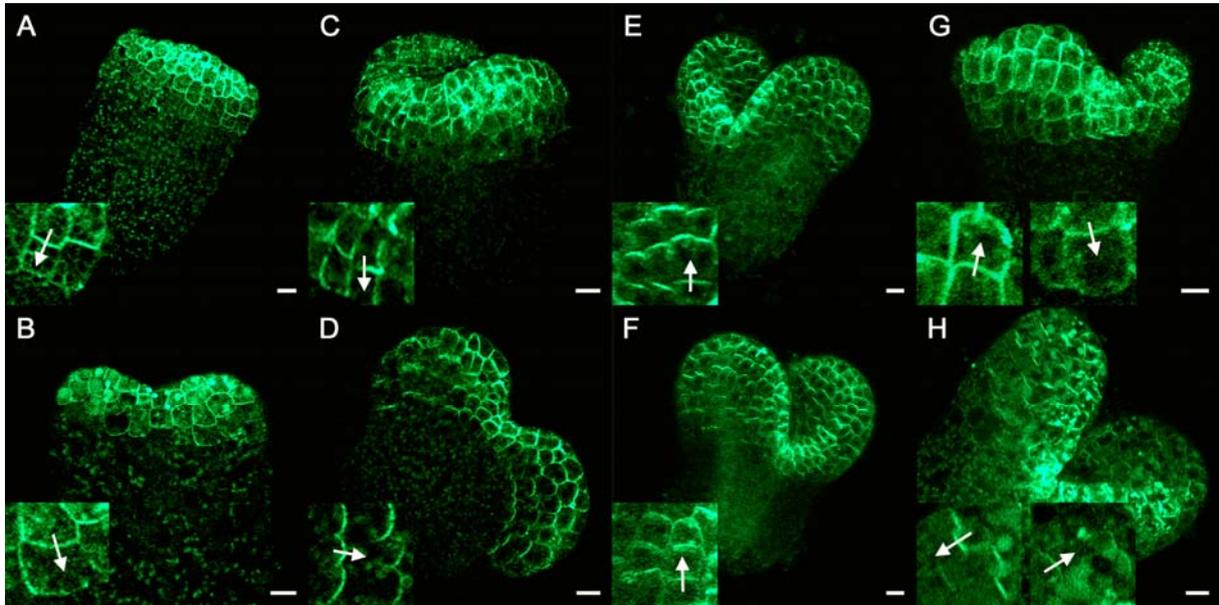


Abb. 26: Lokalisation von PIN1:GFP in WT, *pid-15* und *laterne* (*pid-15 enp-1*) Embryonen im frühen bis mittleren Herzstadium. (A-C) *laterne*, (D-F) WT und (G,H) *pinoid* Embryonen in der Seitenansicht, jeweils mit Ausschnittsvergrößerung(en) in der linken, unteren Ecke. Die Pfeile geben, anhand der Lokalisation von PIN1:GFP in den Plasmamembranen, die jeweilige Richtung des Auxintransports an. Maßstabsbalken: 10µm.

Erstaunlicherweise ist der Efflux-Carrier in den Keimblattprimordien homozygoter *pid-15* Embryonen nicht, wie in den Apizes der adulten Mutanten, vorrangig in der basalen Membran der äußersten Zellschicht lokalisiert. Das Verteilungsmuster von PIN1 ist unregelmäßiger und wechselt häufig sogar innerhalb desselben Keimblattprimordiums zwischen der apikalen und der basalen Membran ( $n > 50$ ; Abb. 26G,H). Erst die *laterne*-Embryonen, mit ihrer zusätzliche Mutation im *ENP*-Locus, zeigen eine weitgehend einheitliche Reversion der PIN1-Polarität ( $n > 50$ ; Abb. 26A-C). Im Allgemeinen enthalten drei bis vier der protodermalen Zellreihen im *laterne*-Apex eine nachweisbare Menge an PIN1:GFP in ihren Plasmamembranen. Die Signalintensität in den obersten Zellreihen ist oftmals so hoch, dass das Vorhandensein von PIN1 in der apikalen Membran der Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Ungeachtet dessen wird das GFP-Signal vorwiegend auf der basalen und teilweise auch den lateralen Seiten der epidermalen Vorläuferzellen detektiert. Vor allem in den unteren Zellreihen, in denen die Lokalisation der PIN1-Proteine besonders klar zu erkennen ist, ist der Auxin-Efflux-Carrier eindeutig in Richtung des basalen Pols orientiert. Eine deutliche laterale Positionierung von PIN1 wie in den *laterne*-Apizes tritt bei WT- und *pinoid*-Embryonen vermehrt im Bereich des embryonalen SAM und in den Spitzen der Keimblattprimordien auf, also in Regionen in denen Auxin normalerweise akkumuliert wird.

### 2.4.3 Die zelluläre Lokalisation der ENP-Proteine

Im Apex der *laterne*-Embryonen (*pid enp/pid enp*) ist der Auxintransport aufgrund einer Polaritätsänderung des Efflux-Carriers PIN1 gestört. Von der Serin/Threonin Kinase PINOID nimmt man an, dass sie durch die Phosphorylierung der PIN1-Proteine deren Lokalisation in den epidermalen Zellen maßgeblich beeinflusst (Michniewicz et al., 2007). Allerdings kommt es im Protoderm der *Arabidopsis*-Embryonen nur im Fall einer simultanen Mutation des *PID*- und des *ENP*-Genlocus zu einer weitgehend einheitliche Reversion der PIN1-Polarität von apikal nach basal (siehe 2.4.2). Auf welche Weise ENP mit PID oder PIN interagiert, ist jedoch noch unklar. Bisher konnte *in vitro* keine Koloalokalisation von ENP und einem der beiden Proteine an der Plasmamembran transfizierter Protoplasten nachgewiesen werden (Furutani et al., 2007). Möglicherweise fungiert ENP, vergleichbar mit anderen Vertretern der NPH3-Familie, als Adapter oder Gerüstprotein (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007), das mit seiner BTB/POZ-Domäne die Bildung von Proteinkomplexen vermittelt. Um die subzelluläre Lokalisation von ENP und deren potentielle Abhängigkeit von der Protein-Protein Interaktionsdomäne *in vivo* testen zu können, wurde die annotierte CDS von *ENP* (*ENP* ORF E1-4) und eine gekürzte Version (*ENP* $\Delta$  ORF E3-4) in den pEGAD-Expressionsvektor *in frame* hinter das EGFP-Gen kloniert (Abb. 27; Peters, 2007). Im Fall von *ENP* $\Delta$  beginnt der ORF mit dem ersten ATG in Exon 3 (Position 160 der annotierten CDS), was eine partielle Deletion des BTB/POZ-Motivs zur Folge hat. pEGAD ist ein binärer Plasmidvektor für die Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation, der die konstitutive Expression der Fusionsproteine und ihre Detektion bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ermöglicht. Insgesamt wurden pro Konstrukt 15 Col-0 (N1092) und 15 La (NW20) Pflanzen transformiert (6.2.11), deren Nachkommen unter Verwendung von Phosphinothricin-haltigem Medium auf Basta-Resistenz selektiert und in Erde weiter gezogen wurden, um die Embryonalstadien der Folgegeneration mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysieren zu können (vgl. 6.2.12.4). Da die Intensität des GFP-Signals 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 GFP:ENP und GFP:ENP $\Delta$  in den Nachkommen von insgesamt 12 bzw. 10 der T1-Pflanzen ausgewertet. Der den Fusionsproteinen vorgeschaltete 35S-Promotor ist ein konstitutiver Promoter, der in fast jedem Zelltyp aktiv ist (Odell et al., 1985) und in Dikotyledonen normalerweise zu einem hohen Expressionslevel des Zielgens führt. Trotzdem konnte die Expression von GFP:ENP und GFP:ENP $\Delta$  zu Beginn der Embryonalentwicklung nur in Ausnahmefällen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 28A,B), weshalb sich die Analyse weitgehend auf Embryonen im Torpedostadium beschränkt. Zwischen den Vertretern der verschiedenen Ökotypen Col-0 (N1092) und La (NW20) traten bei keinem der beiden Konstrukte während der Embryogenese erkennbare Unterschiede auf.



Im Fall des *GFP:ENPΔ*-Konstrukts, dem ein Teil der für die BTB/POZ-Domäne kodierenden Sequenz fehlt, ist das GFP-Signal relativ gleichmäßig im Zytoplasma und mitunter auch an den Plasmamembranen der Einzelzellen verteilt (Abb. 28C und 29B). Gleiches trifft für *GFP:ENP* im Hypokotyl und dem Mesophyll der Keimblattprimordien zu (vgl. Abb. 28C und D). In der Epidermis der Kotyledonen, ein Gewebe in dem Auxin in Richtung der Primordienspitze transportiert wird, akkumuliert *GFP:ENP* dagegen an den apikalen Membranen, was der wildtypischen Verteilung der PIN1 Efflux-Carrier entspricht (Abb. 28D,E und 29A). Es wurde mehrfach beobachtet, dass das GFP-Signal entlang beider Keimblattränder auf eine einzelne terminale Zelle hin ausgerichtet ist (Abb. 28E), in der die Auxinkonzentration möglicherweise ein Maximum erreicht. Die Funktionalität des BTB/POZ-Interaktionsmoduls von ENP ist offensichtlich ausschlaggebend für seine membranständige Lokalisation und könnte z.B. die direkte oder indirekte Bindung an ein Transmembranprotein vermitteln. Das *GFP:ENP*-Fusionsprotein wurde aufgrund des konstitutiven 35S-Promotors zwar prinzipiell in allen Zellen der transgenen Embryonen exprimiert, konnten aber in den tieferen Zellschichten der Torpedo-Stadien nicht mehr detektiert werden. Folglich bleibt zu klären, ob PIN1 und *GFP:ENP* in den vaskulären Vorläuferzellen, in denen *PID* nicht transkribiert wird, ebenso kolokalisieren.

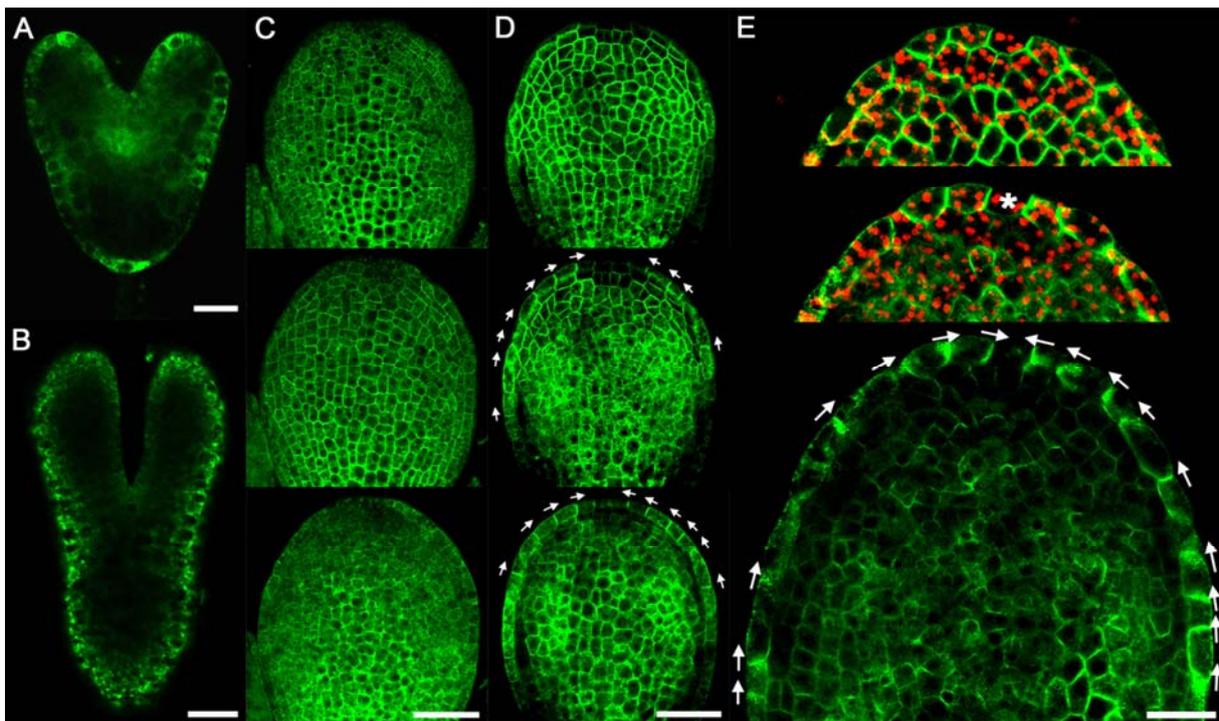


Abb. 28: Lokalisation von 35S::*GFP:ENP* (ORF1-4) und 35S::*GFP:ENPΔ* (ORF3-4) in transgenen Col-0 (N1092) und La (NW20) Embryonen im Vergleich. (A,D,E) 35S::*GFP:ENP* (ORF1-4); (B,C) 35S::*GFP:ENPΔ* (ORF3-4). (A,B,D) Col-0 (N1092) und (C,E) La (NW20) Ökotypen. (A) Embryo im Herzstadium mit membranständigem *GFP:ENP* Signal in einigen protodermalen Zellen. (B) Frühes Torpedo- Stadium mit *GFP:ENPΔ* Expression. (C-E) Unterschiedliche Fokusebenen der Kotyledonen dreier Embryonen im Torpedostadium. (C) Keimblatt mit relativ einheitlicher *GFP:ENPΔ* Verteilung im Zytoplasma und z.T. auch in den Membranen der Mesophyll- und Epidermiszellen. (D) Vergleichbares Keimblatt mit einer apikalen Lokalisation von *GFP:ENP* in den Epidermiszellen. (E) Keimblattspitze eines transgenen 35S::*GFP:ENP* Embryos mit in Richtung einer terminalen Epidermiszelle (Stern) orientiertem GFP-Signal. In den beiden oberen Abbildungen wurde zusätzlich die rote Autofluoreszenz der Plastiden detektiert. Die Pfeile in D und E geben die Polarität des membranständigen *GFP:ENP* Signals an. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m in A, B und E; 40  $\mu$ m in C und D.

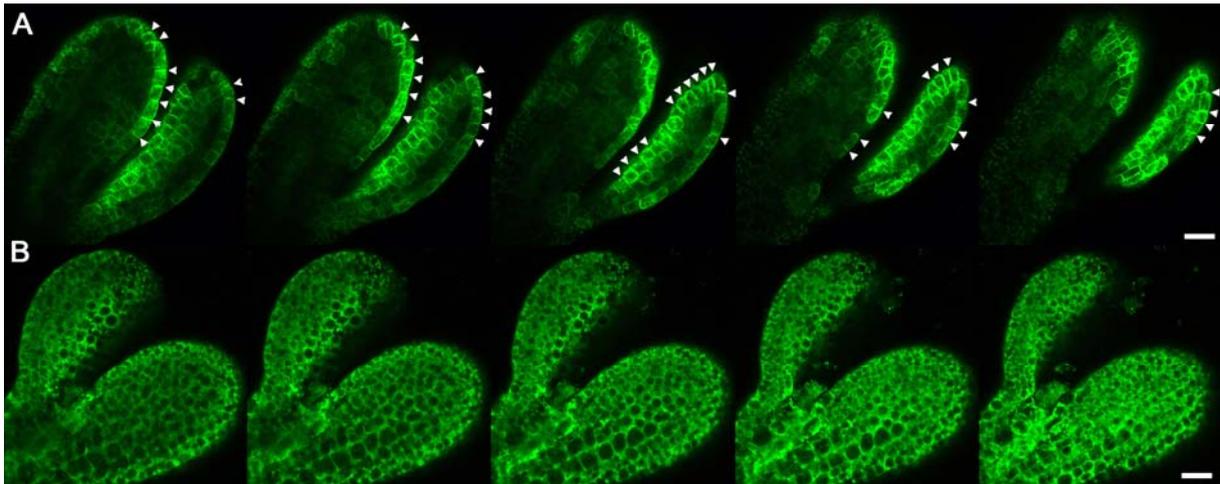


Abb. 29: Aufeinanderfolgende Fokusebenen zwei vergleichbarer La (NW20) Embryonen im Torpedostadium mit konstitutiver (A) *GFP:ENP* ORF1-4 und (B) *GFP:ENPΔ* ORF3-4 Expression. Die Peilköpfe markieren die membranständige, apikal orientierte Lokalisation von GFP:ENP in den epidermalen Zellen der Kotyledonen. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

## 2.5 Expression des *ENP*-Orthologs *ZmENP* in Mais-Embryonen

Gene, die zu den *PIN*-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* homolog sind, sind bei vaskulären Pflanzen weit verbreitet (Paponov et al., 2005). Obwohl sich die Anzahl und Struktur der *PIN*-Proteine vor und seit der Divergenz der Di- und Monokotyledonen erheblich verändert hat, konnten bereits eng mit der *AtPIN*-Familie verwandte Gene in den Gräsern *Triticum* (Weizen) und *Oryza* (Reis) nachgewiesen werden. Neuesten Studien zufolge existieren Orthologe von *PIN1* auch in *Zea* (Mais; Carraro et al., 2006), einem weiteren Vertreter der Monokotyledonen. In starken barren *inflorescence2* (*bif2*) Mutanten, deren weibliche (Kolben) und männliche (Fahne) Infloreszenzen eine signifikante Reduktion ihrer Verzweigungen aufweisen (McSteen und Hake, 2001), ist die Expression und teilweise auch die Lokalisation von *ZmPIN1a* und *ZmPIN1b* gestört (Carraro et al., 2006), was an den Phänotyp und die Wirkung einer Mutation in *AtPID* auf *AtPIN1* in *Arabidopsis* erinnert. Unlängst wurde bestätigt, dass es sich bei *BIF2* um ein Ortholog von *AtPID* handelt (McSteen et al., 2007). Somit kodiert das Mais-Genom sowohl für Vertreter der *PIN*, wie auch der *PID*-Familie und ein zu *A. thaliana* vergleichbares Auxintransport-Netzwerk ist denkbar. Um putative Homologe zu *AtENP* in Mais aufzudecken, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei wurde eine mRNA-Teilsequenz (AY105323) ermittelt, die die BTB/POZ-Domäne und die NPH3 Sequenzregion DI umfasst. Ein zwischen *ENP* und AY105323 auf Nukleotid-Ebene hoch konservierter Bereich (75%ige Sequenzidentität) wurde als Vorlage für eine *in situ* Hybridisierungs-Sonde ausgewählt, mittels zueinander teilweise komplementärer Primer amplifiziert (siehe 5.4), in pGEM®-T Easy kloniert und als Template für die Sondenherstellung eingesetzt (vgl. 6.2.9.2.2; Abb. 30).

ENP	1	-----MKFMKL-GSKPDTFESDGKFKVRYAVSDLESDVTIHL
NPH3	1	MMWESESDGGVGVGGGGGREYGDGVLSSNRKHCQVKTDFELRGC-SWFVAIDLESDILLVK
AY105323	1	-----MKFMKL-GSNPDTFQDDGAEVYSIAASELVSDFITVR
ENP	35	VGEVTFPHLHKFPLLSSKSNRMQRLEVEASEEKTDEITILDMPGGYKAFELCAKFCYGMIVT
NPH3	60	IGDMNFHLHKYPLLSRSGKMNRLIYESRDEPPTIILIDDLPGGPEAFELASKFCYGVVVD
AY105323	35	IGTTRFYLLHKFPLLSKCARFQRLIPTIGDENI-EIHLHDIPGGAKAFGVCAKFCYGMIVT
ENP	95	LNAYNI TAVRCAAEYLEMTEDADRGNLIYKIEVFINSGITFRSWKDSIIVLOTTFSLLPWS
NPH3	120	LITATNISGLRCAAEYLEMTEDLEEGNLIKFTDAFLSYVVLSWVSDSILVLKSCERLSPWA
AY105323	94	LNAYNVIAARCAAEYLEMNETVDKGNLIYKIDVFLSSIFRSWKDSIIVLGIITFAHLPWA
ENP	155	EDLKLVGRCIDSVSAKILLVNPETITWVSYTFNRKL-----SCF-----DKIVEY-HREK
NPH3	180	ENLQIVRRCSSEIATKACSNPKCIRWAYTGGKAPSPSTTNFAGSSERWNEKSDSIFCSPS
AY105323	154	EDLKLVSQCIDSVASKASIDVSVVWVSYTYN-----

Abb. 30: Multiples Alignment der translatierten AY105323 mRNA mit ENP und NPH3. Rot umrandet, BTP/POZ-Domäne; gelb umrandet, NPH3-Sequenzregion DI. Die blaue Linie markiert den Sequenzbereich den die 115 bp lange *in situ* Hybridisierungs-Sonde umfasst. ClustalW 1.82, Boxshade 3.2.

Die nachfolgenden *in situ* Hybridisierungen wurden an Mais-Embryonen durchgeführt, die aus unreifen Maiskörnern 12-14 Tage nach der Pollinierung isoliert und auf Ruhe-Medium eine Woche kultiviert wurden (vgl. Stefanek, 2006). Bei allen weiteren Schritten (Einbettung, Herstellung der Dünnschnitte und Hybridisierung) wurde nach dem bestehenden Protokoll (siehe 6.2.9.2) verfahren. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Sonde mehr als ein *ENP*-Ortholog detektiert, da sie mit der hoch konservierten BTB/POZ-Domäne hybridisiert. Eine intensive Färbung tritt infolge der *in situ* Hybridisierung in den Leitelementen des Apex und der Primärblätter auf (vgl. Abb. 31 und 32). Außerdem wird die zur Sonde komplementäre mRNA im SAM und den jungen Primordien exprimiert, wobei bei letzteren nicht erkenntlich ist, ob sich das Signal bereits auf die vaskulären Elemente beschränkt (Abb 32A,C). Im Scutellum, dem möglichen Keimblatt der Gräser unter den Monokotyledonen, wurde dagegen keine Färbung nachgewiesen.

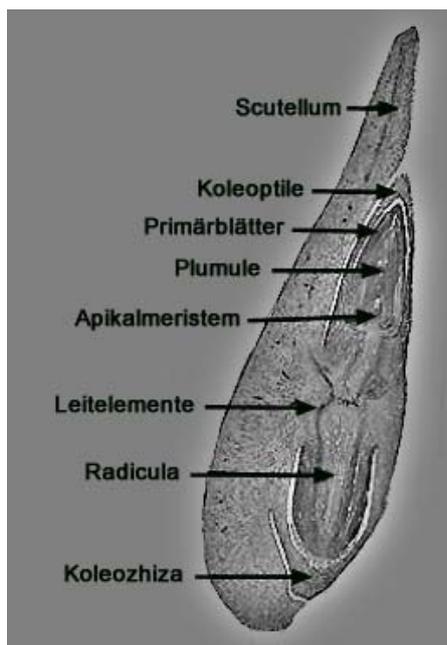


Abb. 31: Morphologie des späten *Zea mays* (Mais) Embryos.

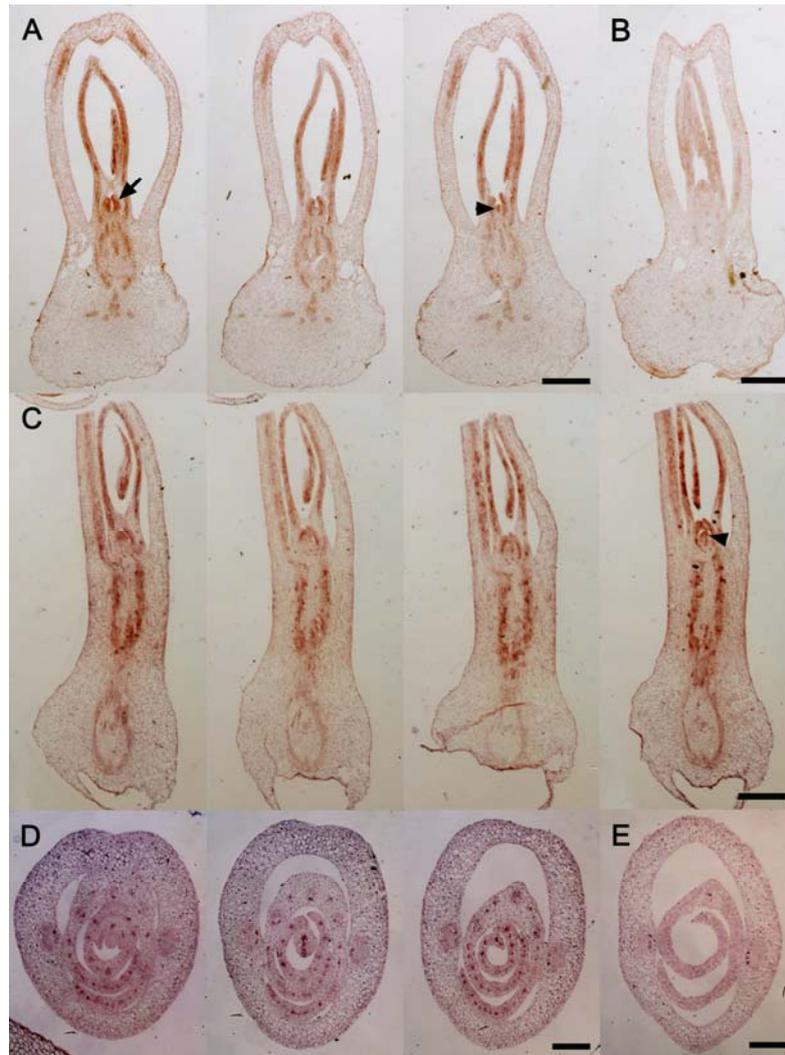


Abb. 32: Isolierte Mais-Embryonen mit starkem Hybridisierungssignal in den vaskulären Elementen. Mit der verwendeten Sonde wurde ein zwischen *AtENP* und AY105323 hoch konservierter Sequenzbereich detektiert, der einem Teil der BTB/POZ-Domäne entspricht. (A,B) Mit antisense (A) und sense Sonde (B) hybridisierte Längsschnittserie. Das Hybridisierungssignal in den jungen Primordien ist durch einen Pfeil markiert. (C) Mit antisense Sonde hybridisierte Längsschnittserie. (D,E) Mit antisense (D) und sense Sonde (E) hybridisierte Querschnittserie. Die Pfeilköpfe in A und C kennzeichnen die Färbung im SAM. Maßstabsbalken: 500 µm in A-C; 300 µm in D und E.

Das mRNA-Fragment AY105323 konnte nachträglich einem putativen Mais Gen (PUT-157a-Zea\_mays-3017255033), auf dessen cDNA-Sequenz anhand von 55 weiteren ESTs rückgeschlossen wurde, zugeordnet werden. Im Folgenden wird es als *ZmENP* bezeichnet. Da das Maisgenom noch nicht vollständig sequenziert ist, ist der Genlocus von *ZmENP* bisher nicht bekannt. Der nachfolgende, phylogenetische Stammbaum (Abb. 33) setzt das putative *ZmENP*-Protein in Relation zu den 33 Vertretern der NPH3-Familie aus *Arabidopsis*. *ZmENP* gehört demnach der gleichen Untergruppe wie *ENP* an und weist neben *ENP* eine besonders große Ähnlichkeit zu AT2G14820, AT5G67440, AT4G37590 und AT2G23050 auf. Gleiches gilt für zwei weitere Homologe aus *Zea mays*, die ausgehend von der *ZmENP*-Proteinsequenz identifiziert werden konnten (Blastp, TIGR; AZM5\_10567 und AZM5\_92915).

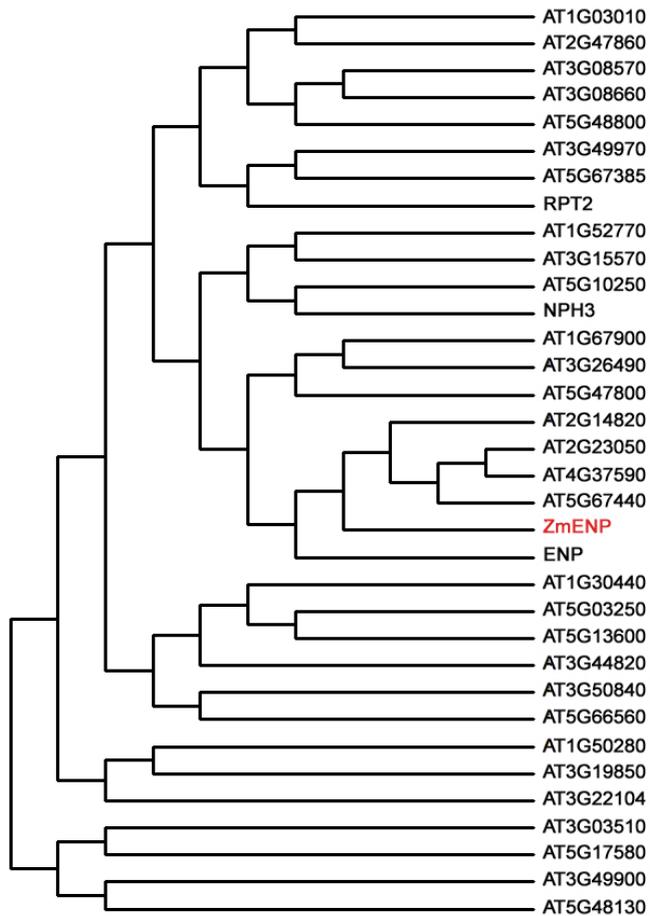


Abb. 33: Phylogenetischer Stammbaum der NPH3-Proteinfamilie von *A. thaliana* und des Mais-Orthologs ZmENP. Das multiple Sequenzalignment der homologen Proteine wurde mit ClustalW2 (*Neighbour-Joining* Methode unter Verwendung von 1000 Bootstrap-Replikationen) durchgeführt und zur Erstellung eines rechteckigen Kladogramms mit Hilfe der PhyloDraw082 Software eingesetzt. ZmENP steht für den translatierten ORF von PUT-157a-Zea\_mays-3017255033 mit einer Länge von 613 Aminosäuren, da ein annotiertes Genmodell noch nicht existiert. Einer ersten, funktionalen Proteinanalyse zufolge (InterProScan) weist ZmENP die für die NPH3-Familie typische BTB/POZ- und NPH3-Domäne auf.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Der synergistische Effekt einer simultanen Mutation von *ENP* und *PID* auf die Keimblatt- und Blütenentwicklung von *A. thaliana*

Die simultane Mutation von *PINOID* und des, noch zu Beginn dieser Doktorarbeit unbekanntem, Genlocus *ENHANCER OF PINOID* führt im Verlauf der Embryogenese von *Arabidopsis thaliana* zu einer Störung der Entwicklung der Keimblattprimordien, die den vollständigen Verlust der Kotyledonen nach sich zieht. Hypokotyl und Wurzel der betroffenen Embryonen weisen dagegen keinerlei Anomalien auf. Der entscheidende Unterschied zu anderen, bekannten Keimblattmutanten ist somit erstens die Spezifität des *laterne*-Phänotyps und zweitens seine 100%ige Penetranz (vgl. 1.4).

Das Fehlen der Kotyledonen wirkt sich im Verlauf der weiteren Entwicklung der Doppelmutanten auf die Topologie des Embryoapex und die Phyllotaxis der Folgeblätter aus. Im Gegensatz zum Wildtyp ist der apikale Pol der *laterne*-Embryonen leicht konkav gewölbt, aber die Zellen in der zentralen Vertiefung behalten ihren meristematischen Charakter. Das embryonale SAM scheint, dem vermehrten Auftreten kleiner, plasmareicher Zellen und der expandierten *STM*-Expressionsdomäne nach zu schließen (vgl. 2.1.1 und 2.2.2), insgesamt vergrößert zu sein. Für die Organisation des Apikalmeristems sind die Signaltransduktionsketten der umgebenden Zellen, also mitunter auch die der Kotyledonen von entscheidender Bedeutung (Laux et al., 2004). Bereits in der Frühphase der Embryogenese besteht, Woodrick et al. (2000) zufolge, eine auffällige Korrelation zwischen der zeitversetzten Festlegung des Zellschicksals der gegenüberliegenden Keimblattprimordien und der anfänglich asymmetrischen Akkumulation von *STM*-mRNA (Long und Barton, 1998). Kurz nachdem sich die Keimblattanlagen hervorzuwölben beginnen lässt sich ihre adaxial-abaxiale Polarität anhand der spezifischen Expressionsmuster von Genen wie *KANADI* (Kerstetter et al., 2001), *PHABULOSA* (McConnell und Barton, 1998; McConnell et al., 2001) und *FILAMENTOUS FLOWER* (Siegfried et al., 1999) festlegen und man geht davon aus, dass die Zellen der adaxialen Seite die Meristementwicklung fördern. Eine Abaxialisierung der Primordien infolge einer Mutation beeinflusst die Entwicklung des SAM dagegen negativ. Die Deletion der Kotyledonen hat folglich einen Effekt auf das komplexe Netzwerk interaktiver Prozesse und die veränderte Morphologie des SAM der *laterne*-Mutanten ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen. Ausgehend von dem meristematischen Gewebe in der zentralen Vertiefung bilden *laterne*-Keimlinge eine variable Anzahl an Blattprimordien. Die Phyllotaxis ist zwar häufig gestört, aber die Primär- und Rosettenblätter entwickeln sich weitgehend normal. Da die Kotyledonen als Referenzpunkte für die Anlage der postembryonalen Blätter betrachtet werden (Woodrick et al., 2000; Berleth und Chatfield, 2002), lässt sich die veränderte Blattstellung vermutlich mit ihrem Verlust erklären.

Ein weiterer, die Organogenese betreffender, Defekt tritt ab dem Zeitpunkt auf zu dem wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen in die generative Phase ihrer Entwicklung übergehen. Die adulten Doppelmutanten legen keine Infloreszenzen an und ihre größtenteils unverzweigten Sprosse enden überwiegend blind. In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mutationen kann es vereinzelt zur Bildung von terminalen Blütenstrukturen kommen. Diese sind jedoch immer steril (siehe 2.1.3). Die unterschiedlich starke Ausprägung des Blütenphänotyps lässt darauf schließen, dass für die grundsätzliche Anlage von

Blütenorganen im Fall einer Mutation von *PID* neben *ENP* noch andere Faktoren eine Rolle spielen. *ENP* ist ein Vertreter einer Genfamilie mit 32 weiteren bekannten Mitgliedern in *Arabidopsis*, von denen vier eine besonders große Homologie zu *ENP* aufweisen (2.3.1) und dessen Aufgaben möglicherweise zumindest partiell übernehmen können.

Der Umstand, dass *enp*-Einzelmutanten nur einen schwachen postembryonalen Phänotyp zeigen und sowohl der Keimblatt- als auch der Blütendefekt von homozygoten *pid*-Pflanzen durch eine zusätzliche Mutation des *ENP*-Locus gezielt verstärkt werden, deutet auf eine synergistische Wirkung der beiden Proteine hin. Beim detaillierten Vergleich der aus den unterschiedlichen *PID/pid* und *ENP/enp* Allel-Kombinationen resultierenden Phänotypen wurde ein Allel-Dosis-Effekt beobachtet, der im Speziellen die Infloreszenzen der Mutanten betrifft (siehe 2.1.3). Die Expressivität und Häufigkeit der Blütenanomalien adulter *enp*-Einzelmutanten nimmt bereits durch ein einzelnes, mutantes *pid*-Allel drastisch zu, wodurch die Fertilität der Mutanten einschränkt wird. Umgekehrt betrachtet wirkt sich ein einzelnes *enp*-Allel ebenfalls negativ auf die ohnehin bereits reduzierte Anzahl an Blüten der homozygoten *pid*-Mutanten aus, die folglich nur sehr wenige Nachkommen hervorbringen. Sowohl der Allel-Dosis-Effekt, als auch die synergistische Wirkung von *pid* und *enp* im Bezug auf die Anlage der Keimblätter und Blüten, sind indikativ für ein enges Zusammenspiel beider Genprodukte während der Embryogenese und in der generativen Phase der Entwicklung adulter Pflanzen.

Der Phänotyp der *laterne*-Pflanzen deutet ferner auf Parallelen in der Entwicklung von Keimblättern und Blütenorganen hin, eine Beobachtung, die schon im Fall der *cuc*-Doppelmutanten gemacht wurde, bei welchen speziell bei Kotyledonen und Blüten Verwachsungen auftreten (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001; Laux et al., 2004). *Laterne*-Doppelmutanten bilden weder Keimblätter noch Blütenstände, aber weiterhin Primär- und Rosettenblätter aus. Folglich ist die Aktivität von *ENP* in einem homozygoten *pid*-Hintergrund für erstere essentiell und für letztere nicht. Bei *pid*- und *pin1*- Einzelmutanten verhält es sich ähnlich. Sie weisen vorrangig Störungen auf, die die Keimblatt- und Blütenentwicklung betreffen (Bennett et al., 1995; Okada et al., 1991; Gälweiler et al., 1998) und im Fall einer gleichzeitigen Mutation beider Loci verstärken sich die spezifischen Defekte nochmals deutlich (Furutani et al., 2004). Offensichtlich basiert die Entwicklung von Kotyledonen und Blütenorganen auf einem ähnlichen molekularen Mechanismus, wogegen die Bildung und Separation der Folgeblätter zumindest teilweise der Kontrolle anderer Gene unterliegt.

### 3.2 Die differentielle Regulation von *ENP*

Den Ergebnissen der Northern Blot Analysen und *in situ* Hybridisierungen zufolge wird *ENHANCER OF PINOID* während des gesamten Lebenszyklus von *Arabidopsis thaliana* in den oberirdischen Organen der Pflanze transkribiert (2.3.2; 2.3.3; Furutani et al., 2007). Das Expressionsmuster deutet somit auf eine generelle Beteiligung von *ENP* an der Initiation von Organen und an deren Wachstumsprozessen hin. Ein Funktionsverlust wirkt sich in einem homozygoten *pinoid*-Hintergrund jedoch nur auf die Entwicklung bestimmter Organe aus, während andere, in denen *ENP* nachweislich auch transkribiert wird, keinen signifikanten Phänotyp zeigen. Möglicherweise übernimmt *ENP* in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebetyp unterschiedliche Aufgaben.

Mittels der RT-PCR und Northern Blot Experimente (2.3.2) wurde gezeigt, dass mindestens drei verschiedene *ENP*-Transkripte mit alternativen Transkriptionsstartpunkten existieren, deren Expression gewebeabhängig ist. Die kleinste detektierte mRNA, der die 5'-Leadersequenz der annotierten *ENP*-cDNA fehlt, tritt beispielsweise unter den getesteten Organen ausschließlich bei den Blüten auf (Embryonen wurden nicht analysiert), während das längste Transkript in selbigen nicht nachgewiesen wurde. Die zeitliche und räumliche Regulation der Gentranskription wird grundsätzlich primär durch den 5'-flankierenden Promotor und die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Es ist vorstellbar, dass spezifische *trans*-agierende Proteine die Transkription der längsten *ENP*-mRNA in den Infloreszenzen reprimieren könnten. Zumindest weist die Gensequenz von *ENP* in der *upstream*-Region WUS- und AuxRE-Elemente auf (Furutani et al., 2007) sowie eine Reihe weiterer Sequenzmotive (TAIR Motif Analysis).

*ENP* ist, abgesehen von der Anlage der Keimblatt- und Blütenprimordien, mindestens an einem weiteren zellulären Prozess beteiligt. Interessanterweise zeichnet sich der Blütenphänotyp von *enp*-Pflanzen nämlich, neben einer leicht variierenden Zahl an Blütenorganen pro Wirtel, auch durch gelegentlich fusionierte Kelch- bzw. Staubblätter aus (vgl. 2.1.3). Derartige Verwachsungen wurden weder bei den Rosetten- noch bei den Hochblättern der Mutanten beobachtet. Somit wirkt sich eine homozygote Mutation des *ENP*-Genlocus, den bisherigen Northern Blot Analysen zufolge, scheinbar ausschließlich auf die Trennung jener Organen aus, in denen das kürzeste *ENP*-Transkript nachgewiesen werden konnte. Der schwache Phänotyp der *enp*-Einzelmutanten lässt sich unter Umständen durch das Vorkommen funktional redundanter Gene erklären, welche Defekte abschwächen oder maskieren könnten. Falls diese Annahme zutrifft, würde eine gleichzeitige Mutation von *ENP* und seinen engsten Homologen in *Arabidopsis* möglicherweise Aufschluss über zusätzliche Funktionsbereiche des BTB/POZ-Proteins geben.

### 3.3 *ENP* beeinflusst die Lokalisation des Auxin Efflux-Carriers PIN1

Die Ausbildung der Kotyledonen ist extrem sensitiv gegenüber Störungen in diversen biologischen Prozessen (vgl. 1.4), welche im Normalfall weitere, z.T. schwerwiegende Defekte im Verlauf der Embryogenese verursachen. *laterne*-Mutanten zeigen im Gegensatz dazu einen sehr spezifischen Keimblattphänotyp und bieten somit erstmals die Möglichkeit das genetische Programm, das der Keimblattentwicklung zugrunde liegt, genauer zu analysieren. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei alternative Hypothesen, die den Verlust der Kotyledonen erklären könnten, getestet. Erstens, eine Unterdrückung der Keimblattprimordien durch Organogenese-hemmende Gene und zweitens, eine Beeinträchtigung des Auxintransports.

Die Unterteilung des Embryoapex in Transkriptionsdomänen, welche normalerweise mit der Trennung der Keimblattanlagen und des SAM einhergeht, gilt als wichtiger Schritt in seiner Entwicklung (Long und Barton, 1998; Berleth und Chatfield, 2002; Laux et al., 2004). Diese Musterbildung ist, den durchgeführten *in situ* Hybridisierungsexperimenten zufolge, bei *laterne*-Embryonen gestört. Die Transkriptionsfaktoren *STM*, *CUC2* und *ANT* kennzeichnen Bereiche des Embryoapex mit unterschiedlichem Zellschicksal. *STM* ist ein Marker für meristematische Zellen, während *CUC2* die Grenzen zwischen Organen definiert und *ANT* in Primordien exprimiert wird. Bei den Doppelmutanten verteilt sich ihre mRNA jedoch

uneinheitlich über den gesamten apikalen Pol und es kommt zu einer deutlichen Überlappung von Expressionsdomänen, welche beim WT spätestens ab dem Herzstadium weitgehend voneinander getrennt wären (2.2.2). Das fleckenartige Verteilungsmuster der Transkripte spiegelt sich nach der Keimung der *laterne*-Pflanzen in der variablen Anzahl und Phyllotaxis ihrer postembryonalen Blätter wieder. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei *pin1 pid* Doppelmutanten gemacht, deren *CUC1*-, *CUC2*- und *STM*-Domänen sich typischerweise über den kompletten Apex erstrecken. Etwa 50% der Doppelmutanten zeigen einen besonders schweren Phänotyp und legen, vergleichbar mit *laterne*-Embryonen, keine Kotyledonen an. Ihre Keimblattentwicklung kann jedoch bereits durch die zusätzliche Mutation eines der drei Meristem-spezifisierenden Transkriptionsfaktoren wiederhergestellt werden (Furutani et al., 2004). *STM* im Speziellen ist für die Etablierung und die permanente Aufrechterhaltung des SAM erforderlich. Im Fall eines Funktionsverlusts sind die betroffenen Embryonen nicht in der Lage, die undifferenzierten Zellen des embryonalen SAM zu bilden. Es werden jedoch unabhängig davon weiterhin Kotyledonen angelegt, die an ihrer Basis leicht verwachsen sind (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). Der stark vergrößerte Aktivitätsbereich von *STM* im Apex der *laterne*-Embryonen könnte folglich ebenso wie bei *pid pin1*-Mutanten die Differenzierung von Zellen unterdrücken, welche normalerweise zur Bildung der Kotyledonen führen würde. Der Keimlingsphänotyp homozygoter *pid-15 enp-1 stm-5* Triplemutanten schließt diese Möglichkeit jedoch aus. Die Triplemutanten gleichen den *laterne*-Pflanzen sowohl im Keimlings- als auch im adulten Stadium ihrer Entwicklung (vgl. 2.2.3). Offensichtlich hat die expandierte *STM*-Domäne nicht den Verlust der Kotyledonen zur Folge, sondern wird vielmehr durch diesen bzw. durch den veränderten Auxinfluss, der ihre Deletion nach sich zieht (s.u.), verursacht. Erst kürzlich wurde die Identifizierung einer konservierten nicht-kodierenden Sequenz (K-Box) in der 5'-upstream Region des *STM*-Gens von *Arabidopsis* publiziert (Uchida et al., 2007). Die Autoren gehen davon aus, dass die negative Regulation des Transkriptionsfaktors in zwei Schritten abläuft, die durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert werden: einen K-Box abhängigen Mechanismus in sich entwickelnden Blättern und einen K-Box unabhängigen im SAM, der möglicherweise durch Auxin ausgelöst wird. Neben den vergrößerten *STM*-Domänen der *pid-15 enp1* und *pin1 pid* Doppelmutanten mit einer Störung des gerichteten Auxintransports deuten noch weitere Anhaltspunkte auf Auxin als Schlüsselfaktor für die anfängliche Suppression von *STM* im SAM hin. In Infloreszenzen konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die Expression von *STM* abnimmt (gleiches gilt auch für *CUC2*), sobald der Auxin Efflux-Carrier PIN1 in einer Region hochreguliert wird (Heisler et al., 2005). Eine ähnliche Situation stellt sich im Wurzelapex von *A. thaliana* dar. Eine korrekte Auxinverteilung und -antwort, in Abhängigkeit vom Transport des Phytohormons durch Mitglieder der PIN-Familie, ist für die differentielle Transkription der *PLETHORA* (*PLT*)-Gene essentiell, welche maßgeblich an der Spezifizierung der Stammzellen des Wurzelmeristems beteiligt sind (Blilou et al., 2005; Galinha et al., 2007).

Das enge Zusammenspiel mit der Serin/Threonin-Kinase PINOID und deren Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation des putativen Auxin Efflux-Carriers PIN1 in den Zellmembranen von *A. thaliana* (Friml et al., 2004; Michniewicz et al., 2007) bringt ENP in Zusammenhang mit dem gerichteten Auxintransport. PIN1 ist in der epidermalen Zellschicht aller Primordien apikal, also in Richtung der Primordienspitzen, orientiert (Gälweiler et al., 1998; Reinhardt et al., 2003; Benkova et al., 2003). Eine Mutation, die den Funktionsverlust von PIN1 nach sich zieht, führt dagegen, wie zuerst am Beispiel der Infloreszenzmeristeme gezeigt werden konnte, zu einer vornehmlich basalen Lokalisation der PIN1-Proteine (Friml et al., 2004). Der

revertierte Auxintransport wirkt der Ausbildung lokaler Maxima des Phytohormons entgegen, die als Referenzpunkte für die Entwicklung von Organen betrachtet werden (Benkova et al., 2003; Reinhardt et al., 2000; Reinhardt et al., 2003). Dementsprechend legen *pid*-Pflanzen nur eine begrenzte Anzahl an Blütenprimordien an, die sich zu abnormen Blüten entwickeln (Bennett et al., 1995; Christensen et al., 2000). Im Gegensatz zu den Apizes der adulten *pinoid*-Mutanten kommt es bei den Embryonen interessanterweise nicht zu einer vollständigen Umkehrung der PIN1-Polarität in den protodermalen Zellen (vgl. 2.4.2). Das Verteilungsmuster von PIN1 ist uneinheitlich und wechselt häufig sogar innerhalb desselben Keimblattprimordiums zwischen der apikalen und der basalen Plasmamembran. Folglich wird Auxin zwar mitunter weiterhin in Richtung der Primordienspitzen transportiert, der Auxinfluss ist jedoch nicht mehr auf selbige fokussiert, was sich auch in den detektierbaren Auxinmaxima widerspiegelt (siehe 2.4.1). Die Keimblattdefekte der *pin*-Mutanten betreffen primär ihre Anzahl, Größe und Form, wobei Keimlinge mit drei anstelle von zwei Kotyledonen besonders häufig auftreten (Gälweiler et al., 1998; Bennett et al., 1995).

Beim Wildtyp akkumuliert Auxin in den Spitzen der Keimblattprimordien, wo sich die Maxima spätestens ab dem Torpedostadium eindeutig nachweisen lassen. Die Kotyledonen der *pid*-Embryonen gleichen Alters weisen jedoch häufig kein deutliches Maximum auf, obwohl sie sich augenscheinlich weitgehend normal entwickeln. Folglich ist die Anreicherung von Auxin in den Keimblattspitzen an sich entweder nicht ausschlaggebend für das Wachstum der Primordien, oder die Konzentration des Phytohormons, welche für die Organogenese ausreichend ist, liegt unter der mittels *DR5rev::GFP* detektierbaren Grenze. Letztere Annahme wird von der Tatsache gestützt, dass auch die Herzstadien der WT-Embryonen nur gelegentlich schwache Auxinmaxima zeigen (2.4.1). Eine vergleichbare Beobachtung wurde bei *topless*-Mutanten gemacht, deren Sprosspol in eine zweite, apikale Wurzel transformiert ist, in welcher kein Auxinmaximum detektiert wird (Long et al., 2002). Der transkriptionelle Corepressor *TOPELESS* (*TPL*) ist für die Unterdrückung wurzelspezifischer Gene in der oberen Hälfte des Embryos von Bedeutung, indem er mit *INDOLE-3-ACETIC ACID12/BODENLOS* (*IAA12/BDL*) interagiert und dessen inhibitorische Wirkung auf *AUXIN RESPONSE FACTOR5/MONOPTEROS* (*ARF5/MP*) verstärkt (Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008). Durch eine Mutation des Genlocus wird folglich die erste Stufe der Auxinantwort, die Auxin-abhängige Degradation von *IAA12/BDL*, umgangen, weshalb in diesem Fall eine lokale Akkumulation des Phytohormons, die für die korrekte Wurzelbildung normalerweise als relevant erachtet wird (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2003), möglicherweise nicht ausschlaggebend ist.

Bei den Embryonalstadien von *Arabidopsis thaliana* bewirkt erst die simultane Mutation von *ENP* und *PID* eine Reversion des Auxintransports von apikal nach basal, da sie den verhältnismäßig schwachen Effekt der *pid*-Einzelmutanten auf die Orientierung der PIN1-Efflux-Regulatoren im Protoderm gezielt verstärkt (vgl. 2.4.2). Zusätzlich wurde auch das vermehrte Auftreten einer lateralen Lokalisation der PIN1-Proteine in den obersten, protodermalen Zellschichten der *laterne*-Apizes, vergleichbar zu der PIN1-Verteilung in der SAM-Region von WT-Embryonen, beobachtet. Der Positionierung der putativen Efflux-Carrier zufolge wird Auxin, wenn es im Apex synthetisiert wird, sowohl in den vaskulären Elementen, als auch in den epidermalen Vorläuferzellen in Richtung des Wurzelpols abtransportiert und auch der aufwärtsgerichtete Auxinfluss wird von den apikalen Zellen in die Gegenrichtung umgeleitet. Im Apex selbst zirkuliert das Phytohormon, kann sich aber nicht in den mutmaßlichen Keimblattanlagen anreichern (Abb. 34). Die Auxinverteilung in *laterne*-Embryonen lässt die gleichen Schlussfolgerungen zu, da das Phytohormon entweder

großflächig im gesamten Apex der Doppelmutanten detektiert wurde, oder seine Konzentration insgesamt zu gering war, um mit Hilfe von *DR5rev::GFP* im apikalen Pol nachgewiesen zu werden (siehe 2.4.1). Im Torpedostadium der *laterne*-Mutanten konnte zudem das Auftreten mehrerer, oft eng beieinander liegender, Bereiche mit einer geringfügig höheren Auxinkonzentration dokumentiert werden. Selbige repräsentieren möglicherweise die Positionen späterer Primärblattprimordien, die in variabler Anzahl und unterschiedlichem Abstand zueinander nach der Keimung gebildet werden (2.1.1). Eine gezielte, lokale Akkumulation von Auxin an gegenüberliegenden Punkten des *laterne*-Apex zur Initiation der Keimblattanlagen wird dagegen offensichtlich durch den basipetal gerichteten Transport verhindert.

Der keimblattlose Phänotyp der *laterne*-Doppelmutanten bestätigt die bestehende Theorie, dass andere Auxin Carrier wie AUX1 und PGP19 nur indirekt oder eingeschränkt am polaren Auxintransport, der die Organogenese bedingt, beteiligt sind (siehe 1.7), da diese (insbesondere im Fall einer Umorientierung der PIN1-Proteine) eine annähernd normale Auxinverteilung nicht eigenständig aufrechterhalten können. Dadurch erklären sich möglicherweise auch die vergleichsweise weniger stark ausgeprägten Keimblattdefekte der *pin1 pid* Doppelmutanten, welche zumindest rudimentäre Kotyledonen ausbilden (Furutani et al., 2004). Der Funktionsverlust der PIN1-Proteine lässt sich wahrscheinlich leichter durch alternative Carrier oder, wie schon in *Arabidopsis* Wurzeln gezeigt wurde (Bliilou et al., 2005), durch andere Mitglieder der PIN-Familie (Friml et al., 2003; Paponov et al., 2005) ausgleichen, als ein revertierter Auxinfluss als Folge einer basalen PIN1-Lokalisation. Geht man nun davon aus, dass in erster Instanz die Umverteilung von Auxin den Verlust der Kotyledonen bei *laterne*-Mutanten hervorruft und ihre Anlage grundsätzlich verhindert, ist eine Inhibierung der Organentwicklung durch vergrößerte *CUC* und *STM*-Expressionsdomänen nicht mehr ausschlaggebend. Da bei *pid1 pin* Pflanzen jedoch der Efflux-Carrier selbst mutiert ist, ist der verbleibende aufwärtsgerichtete Auxinfluss scheinbar ausreichend um, im Fall einer zusätzlichen Mutation der Organogenese-hemmenden Transkriptionsfaktoren, die Keimblattentwicklung zumindest eingeschränkt zu ermöglichen.

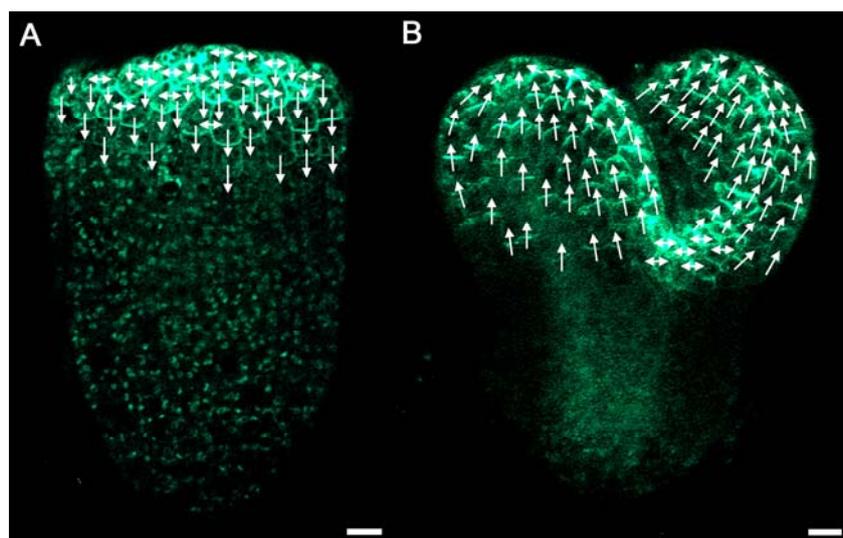


Abb. 34: Auxinfluss in den Apizes von *laterne*- und WT-Embryonen im direkten Vergleich. Die Pfeile geben die Richtung des Auxintransports mit Bezug auf die subzelluläre Lokalisation von PIN1:GFP in den Plasmamembranen des Protoderms an. (A) Apex eines *laterne* (*pid-15 enp-1*)-Embryos. (B) Apex eines WT (*Col-0*)-Embryos. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.4 Analogien zwischen Organogenese und Phototropismus

ENP, PID und PIN1 sind gemeinschaftlich an einem Signaltransduktionsweg beteiligt, der die Auxin-abhängige Organentwicklung von *Arabidopsis thaliana* reguliert (s.o.). Aufgrund der Familienzugehörigkeit und Funktionsweise der drei Proteine liegt nunmehr die Vermutung nahe, dass Organogenese und Phototropismus der Pflanze auf einem ähnlichen molekularen Prinzip basieren.

*ENP* kodiert für eines der 33 NPH3-artigen Proteine in *Arabidopsis* (vgl. 2.3.1). Bisher wurden zwei weitere Mitglieder der Genfamilie, *NPH3* und *RPT2*, funktional charakterisiert und als Signalübermittler phototroper Reaktionen identifiziert (Liscum und Briggs, 1996; Sakai et al., 2000). Der Blaulichtrezeptor PHOT1 (NPH1), der als der dominante Rezeptor für die Regulation des Phototropismus gilt, interagiert nachweislich mit beiden Proteinen, vermittelt die phototrope Antwort aber primär über NPH3 (Christie et al., 1998; Motchoulski und Liscum, 1999; Inada et al., 2004; Pedmale und Liscum, 2007). PHOT1 gehört ebenso wie PID der AGC Kinase-Familie an, einer Klasse von Effektoren, welche normalerweise intrazellulären, sekundären Botenstoffen nachgeschaltet sind (Bögre et al., 2003). Während die Autophosphorylierung von PHOT1 durch Blaulicht ausgelöst wird (Christie et al., 1998), wird PID, wie die breite Mehrheit der AGC-Proteine in *Arabidopsis*, durch PDK1 aktiviert (Bögre et al., 2003; Zegzouti et al., 2006; siehe auch 1.7).

In ihrer aktivierten Form ist die PID-Kinase in der Lage, PIN-Proteine zu phosphorylieren (Michniewicz et al., 2007). Nach den bisherigen Erkenntnissen wird die spezifische (Neu-) Verteilung der Auxin Efflux-Carrier durch das Zyklieren von Vesikeln zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten ermöglicht und man geht davon aus, dass der Phosphorylierungsstatus dabei von entscheidender Bedeutung für die polare Lokalisation der PIN1-Proteine in der apikalen oder basalen Membran der jeweiligen Zelle ist (Geldner et al., 2001; Geldner et al., 2003; Dhonukshe et al., 2007; Michniewicz et al., 2007). Die daraus resultierenden, Efflux-abhängigen, Auxingradienten, die zur Anreicherung des Phytohormons in den Primordien führen, sind für die Organogenese ausschlaggebend (Reinhardt et al., 2000; Berleth und Chatfield, 2002; Reinhardt et al., 2003; Benkova et al., 2003; siehe auch 1.6). Im Fall der Keimblattentwicklung konzentriert sich der aufwärts gerichtete Auxintransport normalerweise auf die beiden Primordien, welche unmittelbar nacheinander angelegt werden und aufgrund einer putativen, lateralen Inhibierung des zweiten Keimblattprimordiums auf gegenüberliegenden Seiten des Embryoapex platziert sind (Woodrick et al., 2000). Die Etablierung der lokalen Maxima und die Ausbildung der Kotyledonen als Konsequenz daraus, basieren auf der apikalen Lokalisation der PIN1-Proteine in Abhängigkeit von ENP und PID (vgl. 2.4.2).

Von Auxin ist bekannt, dass es seinen eigenen Efflux aus Zellen durch Inhibierung der Endozytose und die daraus resultierende Erhöhung der PIN-Level an der Plasmamembran fördert (Paciorek et al., 2005). Möglicherweise bewirken steigende Auxinkonzentrationen auch eine positive Rückkopplung des Signaltransduktionswegs der Organogenese. *PID* weist ein Auxin-responsives Element (AuxRe; TGTCTC) in der Promotorregion auf und die Expression des Gens ist durch das Phytohormon induzierbar (Benjamins et al., 2001). Ersteres wurde für *ENP* ebenfalls bestätigt (Furutani et al., 2007). Somit ist vorstellbar, dass die Beibehaltung der Zielrichtung des Auxintransports durch die verstärkte Expression von *PID* und *ENP* in Form einer positiven Rückkopplungsschleife gewährleistet wird, worüber eine mRNA-Quantifizierung mittels *real-time* RT-PCR nach exogener IAA-Applikation vermutlich Aufschluss geben könnte.

Phototrope Reaktionen erfordern ebenfalls eine asymmetrische Auxinverteilung. Den meisten Modellen liegt die Cholodny-Went-Hypothese von 1937 zugrunde. Diese geht von einer, durch einen physischen Reiz induzierten, lateralen Neuverteilung eines pflanzlichen Morphogens (Auxin) aus, dessen Konzentrationsgradient wiederum das differentielle Wachstum des jeweiligen Organs fördert (Went und Thimann, 1937). Die Perzeption von gerichtetem, blauen Licht führt nachweislich zur Akkumulation von Auxin auf der dem Reiz abgewandten Seite der Hypokotyle analysierter Pflanzenarten (*A. thaliana* eingeschlossen), welche ihrer phototropen Krümmung vorausgeht (Friml et al., 2002; Esmon et al., 2006). Im Phototropismus scheint der PIN-abhängige Auxintransport ebenso eine wichtige Aufgabe zu übernehmen (Friml et al., 2002; Blakeslee et al., 2004). Nach der unidirektionalen Stimulation von *Arabidopsis* Keimlingen kommt es zu einer Modifikation der basalen Lokalisation von PIN1 auf der der Lichtquelle gegenüberliegenden Seite der mittleren Hypokotylregion, in der sich die Krümmung manifestiert. Die Dislokation von PIN1 als Reaktion auf den Lichtreiz wird vermutlich von PHOT1 kontrolliert, da die Verteilung der Efflux-Carrier in den Hypokotylen mutanter *phot1*-Pflanzen nach Blaulichtbestrahlung jener von unbehandelten WT-Keimlingen gleicht. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch im Fall einer Mutation im *COLEOPTILE PHOTOTROPISM1 (CPT1)* Gen gemacht, welches für ein Ortholog von NPH3 in Reis kodiert. Die Defekte der Mutanten betreffen die phototrope Antwort und den lateralen Transfer von Auxin in mit Blaulicht stimulierten Koleoptilen (Haga et al., 2005). Folglich deuten die an den aphototropen Mutanten durchgeführten Untersuchungen auf eine Mitwirkung des PHOT1-NPH3 Komplexes an der Anreicherung von Auxin auf der dem phototropen Reiz abgewandten Seite, durch Beeinflussung der polaren Lokalisation der PIN-Proteine, hin.

Die phototrope Reaktion der Hypokotyle von *Arabidopsis*-Pflanzen wird primär durch Licht der Wellenlänge 390-500 nm ausgelöst. Das exogene Signal führt zur Aktivierung der Flavinmononukleotid (FMN)-Rezeptorkinase PHOT1 (Briggs und Christie, 2002). Im Gegensatz zu PHOT1 besitzt PID keine LOV (*light, oxygen or voltage*)-Domänen, welche die Bindung der FMN-Chromophore vermitteln und zudem für die direkte Interaktion von PHOT1 mit der Coiled-Coil-Domäne von NPH3 von Bedeutung sind (Motchoulski und Liscum, 1999). Die Art des entwicklungsabhängigen Stimulus der letztendlich zur Autophosphorylierung von PID führt ist noch nicht bekannt und es konnte bisher auch keine Protein-Protein Interaktion mit ENP nachgewiesen werden (vgl. 2.3.1).

Trotz der offensichtlichen Unterschiede zwischen Organogenese und Phototropismus im Bezug auf den auslösenden Reiz, die Form der Interaktion der beteiligten Faktoren und das betroffene Gewebe/Organ, basieren beide Prozesse auf den gleichen Schlüsselkomponenten (Abb. 35). Dies wirft die Frage auf, in wie weit das Zusammenspiel von Mitgliedern der AGC Kinase-Familie und NPH3-artigen Proteinen als Antwort auf unterschiedliche, spezifische Signale eine regulatorische Funktion in weiteren Auxin-abhängigen Entwicklungsabläufen übernimmt.

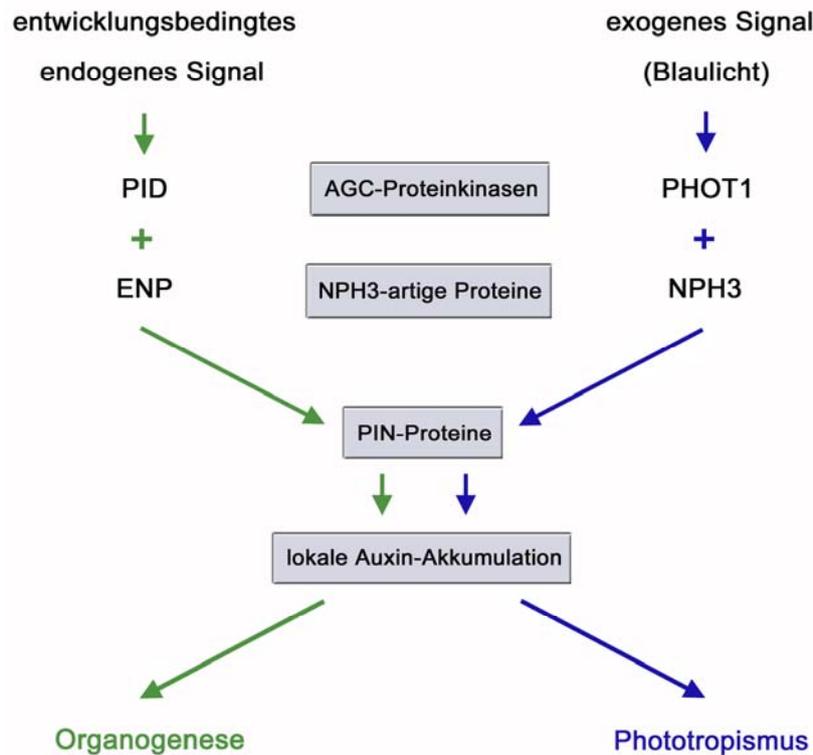


Abb. 35: Analogien zwischen dem Signaltransduktionsweg der Organogenese und des Phototropismus in *A. thaliana*. Die Entwicklung von Organen, im speziellen der Keimblätter und Blüten, wird durch PID und ENP reguliert. Die phototrope Antwort auf blaues Licht basiert auf der Interaktion von PHOT1 und NPH3. *PID* und *PHOT1* kodieren für homologe Proteine der AGC Kinase-Familie. ENP und NPH3 sind Mitglieder der NPH3-Proteinfamilie. In beiden Signalwegen wird die Reaktion auf den jeweiligen Stimulus über die Regulation des PIN-abhängigen Auxintransports vermittelt.

### 3.5. Parallelen zwischen der Organogenese von *A. thaliana* und *Z. mays*

Putative Orthologe von PIN1 und PID wurden unter anderem in den Poaceen (Süßgräser) *Oryza sativa* (Xu et al., 2005; Morita und Kyojuka, 2007) und *Zea mays* (Carraro et al., 2006; McSteen und Hake, 2001; McSteen et al., 2007) nachgewiesen. Beide Genome kodieren auch für NPH3-artige Proteine, welche sich anhand ihrer Sequenz im phylogenetischen Stammbaum der NPH3-Familie mitunter der gleichen Untergruppe wie AtENP zuordnen lassen (Furutani et al., 2007; 2.5). Die Existenz von ENP-, PID- und PIN1-Orthologen in Monokotyledonen unterstreicht ihre Bedeutung für die Pflanzenentwicklung und lässt vermuten, dass die grundlegenden Mechanismen des Auxintransports und der Organogenese zwischen mono- und dikotylen Arten konserviert sein könnten. Eine Involvierung von *OsPIN1*, *OsPID* und *BIF2* in die Auxin-abhängige Ausbildung von Organen (darunter Adventivwurzeln, Sprosse und Blütenorgane) wurde bereits bestätigt (Xu et al., 2005; Morita und Kyojuka, 2007; McSteen und Hake, 2001). *BIF2*, das Co-Ortholog von PINOID in Mais, wird für die Initiation seitlicher Primordien benötigt (McSteen et al., 2007). Im Fall starker *bif2*-Allele weisen die weiblichen und männlichen Infloreszenzen der Maispflanzen, deren Anzahl an Verzweigungen signifikant reduziert ist (McSteen und Hake,

2001), ein abnormes Expressions- und Lokalisationsmuster der ZmPIN1a- und ZmPIN1b-Proteine auf (Carraro et al., 2006) und erinnern damit deutlich an die semisterilen *pid*-Mutanten.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erstmals die Expression eines putativen *AtENP*-Orthologs von *Zea mays* analysiert. Zur *in situ* Hybridisierung wurden Maisembryonen eingesetzt, die 12-14 Tage nach der Pollinierung aus Maiskörnern isoliert und auf Ruhe-Medium eine Woche weiterkultiviert wurden. Ihr Entwicklungsstand ist somit in etwa mit dem später Embryonalstadien ab dem dritten Laubblatt-Stadium (nach Randolph, 1936) und älter vergleichbar. Den Hybridisierungsergebnissen zufolge wird *ZmENP* in den Vorstadien der Leitelemente, jungen Laubblatt-Primordien und dem SAM transkribiert (vgl. 2.5). Das Expressionsmuster in *Zea mays* weicht daher von dem in *Arabidopsis thaliana* ab. Die *AtENP*-mRNA wird im Verlauf der Embryonalentwicklung der Brassicaceae vorrangig in den protodermalen Zellen der Keimblattprimordien und temporär in der L1 des SAM, aber zu keinem Zeitpunkt in den vaskulären Elementen detektiert (siehe 2.3.3).

In ausgewachsenen Mais-Embryonen und jungen Pflanzen kommt es jedoch zu einer deutlichen Überlappung der Expressionsdomänen von *ZmENP*, *ZmPIN1a/b* und *BIF2*. Mittels Expressions- und Immunolokalisationsstudien der Arbeitsgruppe von Serena Varotto wurden die *ZmPIN1*-Transkripte und Proteine ab den späten Embryonalstadien primär in sich differenzierendem vaskulärem Gewebe nachgewiesen. Keimlinge und junge Maispflanzen exprimieren *ZmPIN1*-mRNAs zudem in den lateralen Laubblatt-Primordien, den Spitzen junger Blätter und den sub-epidermalen Zellschichten des SAMs (Carraro et al., 2006). *BIF2* wird ebenfalls in Leitelementen, Blattprimordien und meristematischem Gewebe transkribiert (McSteen et al., 2007). Eine Interaktion der putativen Orthologen ist deshalb auch in Mais denkbar, was für die Möglichkeit einer Konservierung der grundlegenden Mechanismen der Auxin-abhängigen Organogenese zwischen mono- und dikotyledonen Arten spricht. Da allerdings weder die *ZmPIN1* Efflux-Carrier noch *ZmENP*-mRNA eindeutig in den epidermalen Zellen des SAMs und der Primordien detektiert werden konnte (Carraro et al., 2006; 2.5), muss ein alternativer Auxinfluss in *Zea mays* in Betracht gezogen werden. Eine vergleichbare Theorie wird derzeit bereits für Mais-Infloreszenzen diskutiert (Carraro et al., 2006).

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

Die Involvierung von *ENP* in den Signaltransduktionsweg der Auxin-abhängigen Keimblatt- und Blütenentwicklung mit *PID* und *PIN1* als Schlüsselkomponenten wird bereits anhand der Phänotypen der Einzel- und Doppelmutanten deutlich. Obwohl die Expressionsdomänen der Gene überlappen (siehe 2.3.3; Furutani et al., 2007; Christensen et al., 2000; Furutani et al., 2004; Aida et al., 2002; Reinhardt et al., 2003), konnte bisher weder eine eindeutige subzelluläre Kolokalisation in kultivierten *Arabidopsis*-Zellen (Furutani et al., 2004) noch eine Protein-Protein-Interaktion in Yeast Two-Hybrid Experimenten (vgl. 2.3.1) von *ENP* und *PID* bzw. *ENP* und *PIN1* festgestellt werden. Falls *ENP* allerdings über einen Multiproteinkomplex mit *PID* und/oder *PIN1* assoziiert ist, wäre das Yeast Two-Hybrid Verfahren keine geeignete Nachweismethode.

*ENP* kodiert für ein Protein mit zwei hoch konservierten Domänen, das sich der NPH3-Familie mit bisher 33 bekannten, homologen Proteinen in *Arabidopsis* zuordnen lässt (2.3.1).

Neben der zentralen NPH3-Domäne, mit vier konservierten Sequenzbereichen (DI-DIV; Motchoulski und Liscum, 1999) besitzt *ENP*, wie die meisten Mitglieder der Proteinfamilie zusätzlich eine BTB/POZ-Motiv am N-Terminus. Die BTB/POZ-Domäne ist in vielen eukaryontischen Genomen konserviert und wurde bereits in einem breiten Spektrum an Proteinen mit z.T. völlig verschiedenen Funktionen nachgewiesen. In den meisten dieser Proteinklassen fungiert sie als Protein-Protein Interaktionsmodul, das zur Homodi- und Multimerisierung oder Heterodi- und Multimerisierung mit nicht verwandten Proteinen in der Lage ist (Stogios et al., 2005). Eine C-terminale Coiled-Coil-Domäne, welche für viele der NPH3-artigen Proteine charakteristisch ist (Motchoulski und Liscum, 1999; Sakai et al., 2000; Haga et al., 2005) und im Fall von NPH3 die Interaktion mit dem Photorezeptor PHOT1 vermittelt, fehlt bei *ENP* jedoch.

Mittels zweier *35S::GFP*-Konstrukte (*35S::GFP:ENP* und *35S::GFP:ENPΔ*) wurde die subzelluläre Lokalisation von *ENP* und einem verkürzten Protein (*ENPΔ*) mit teilweise deletierter BTB/POZ-Domäne *in vivo* in den Embryonen transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen analysiert (siehe 2.4.3). Dabei stellte sich heraus, dass *ENP*, das funktionale Protein-Protein Interaktionsmotiv vorausgesetzt, in den epidermalen Zellen der Kotyledonen, ebenso wie PIN1 (Steinmann et al., 1999; Benkova et al., 2003), an den apikalen Plasmamembranen lokalisiert ist. Offensichtlich existieren in der Epidermis spezifische Faktoren, welche die polare Verteilung der *ENP*-Proteine in Abhängigkeit von der BTB/POZ-Domäne bedingen.

Möglicherweise fungiert *ENP*, vergleichbar mit anderen Vertretern der NPH3-Familie, als Adapter oder Gerüstprotein (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007). Einer Hypothese von Pedmale und Liscum (2007) zufolge, könnte ein auf CULLIN3 (CUL3)-basierender Ubiquitin-Proteinligase (E3) Komplex mit NPH3 als eine der Kernkomponenten von Bedeutung für die phototrope Signaltransduktion sein. NPH3 wird in Anwesenheit von Blaulicht, als Folge der Photoaktivierung von PHOT1, dephosphoryliert und es ist denkbar, dass sich mit dem Phosphorylierungsstatus von NPH3 auch die Aktivität des E3-Komplexes ändert. CUL3-Proteine fungieren als zentrale Untereinheit einer Reihe multimerer E3-Ligasen und interagieren, gemäß den neuesten Erkenntnissen, u.a. in *Arabidopsis thaliana* mit Proteinen die eine BTB/POZ-Domäne enthalten (Pintard et al., 2004; Gingerich et al., 2005; Weber et al., 2005; Figueroa et al., 2005). Das BTB/POZ-Motiv dient dabei der Komplexbildung mit CUL3, während andere Domänen voraussichtlich die Substraterkennung und dadurch die spezifische Ubiquitinierung von Zielproteinen ermöglichen. Die kovalente Bindung von Ubiquitin an ein Protein führt daraufhin nicht zwangsläufig zu dessen Abbau, sondern kontrolliert eine Vielzahl weiterer, zellulärer Prozesse, wie z.B. die Endocytose von Plasmamembranproteinen und die Proteinsortierung (Hicke, 2001a, b; Smalle und Vierstra, 2004; Urbe, 2005).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Embryonal- und Keimblattentwicklung von *A. thaliana*. Die subzelluläre Lokalisation der PIN1 Auxin Efflux-Carrier wurde in *laterne-*, *pid-*, und WT-Embryonen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass erst die simultane Mutation von *ENP* und *PID* eine weitgehend vollständige Reversion der PIN1-Verteilung von apikal nach basal in den protodermalen Zellen des Embryoapex verursacht (2.4.2), was zum Verlust der Kotyledonen führt. Da die genaue Wirkungsweise von *ENP* bisher noch nicht bekannt ist, bleibt zu überprüfen welche Funktion das NPH3-Protein bei der Sicherstellung der apikalen Lokalisation der PIN1-Proteine in Zellen, in denen es mit den Efflux-Carriern kolokalisiert, übernimmt und in wie weit sich der zugrundeliegende molekulare Mechanismus auf die Organogenese der adulten Pflanze übertragen lässt.

## 4. Zusammenfassung

Im Verlauf der Embryogenese von *Arabidopsis thaliana* werden die Kotyledonen aus Vorläuferzellen gebildet, welche im Gegensatz zu den anderen Blattorganen nicht aus dem Sprossapikalmeristem (SAM) hervorgehen. Die Rolle des Phytohormons Auxin, dessen Relevanz für die Organogenese der Pflanzen allgemein bestätigt wird, und die in den Prozess der Keimblattentwicklung involvierten Gene waren bisher jedoch noch unbekannt.

Die *Arabidopsis*-Mutante *laterne* zeichnet sich durch die spezifische und präzise Deletion der Keimblätter aus. Hypokotyl und Wurzel der betroffenen Embryonen weisen dagegen keine erkennbaren Veränderungen auf. Der *laterne*-Phänotyp wird durch die Kombination zweier Mutationen verursacht. Sie betreffen den Genlocus der Serin/Threonin-Kinase PINOID, welche die polare Verteilung der PIN1 Auxin Efflux-Carrier in den Membranen epidermaler Zellen durch deren Phosphorylierung beeinflusst, und ein zweites Gen, das *ENHANCER OF PINOID* (*ENP*) genannt wurde. *ENP* kodiert für ein BTB/POZ-Protein der NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL (NPH3)-Familie mit 32 weiteren Vertretern in *Arabidopsis*. Im Gegensatz zu NPH3, dem Namensgeber der Proteinfamilie, der mit der zu PID homologen Rezeptorkinase PHOT1 interagiert und als Signalübermittler phototroper Reaktionen die laterale Translokation von Auxin kontrolliert, übernimmt ENP eine regulatorische Funktion in der Organentwicklung.

In den Kotyledonen und Apizes von homozygoten *pinoid*-Embryonen kommt es zu einer teilweisen Umverteilung der PIN1-Proteine in den Zellmembranen des Protoderms von apikal nach basal. Dieser Effekt wird durch eine zusätzliche Mutation des *ENP*-Genlocus drastisch verstärkt. Die Doppelmutanten zeigen eine vollständige Reversion der PIN1-Polarität. Folglich kann das für die Organbildung essentielle Auxin nicht mehr in den Keimblattprimordien der *laterne*-Embryonen akkumuliert werden, was zum Verlust der Kotyledonen führt. Eine Protein-Protein Interaktion von ENP und PID oder PIN1 konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Die *in vivo* Analyse der subzellulären Lokalisation von ENP an transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen deutet jedoch auf eine Kolo-kalisation von ENP und PIN1 in den epidermalen Zellen der Kotyledonen hin, da ENP, eine funktionale BTB/POZ-Domäne vorausgesetzt, ebenso wie PIN1 an den apikalen Plasmamembranen detektiert wird.

*ENP* wird während der gesamten Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* in den Primordien von Organen exprimiert. In Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe existieren allerdings, den Ergebnissen von RT-PCR und Northern Blot Experimenten zufolge, unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte. Bei homozygoten *enp*-Pflanzen wurde ein schwacher Blütenphänotyp festgestellt, darüber hinaus aber keine weiteren Anomalien. Da vier der 33 bekannten NPH3-artigen Proteine in *Arabidopsis* eine größere Homologie zu ENP als zu NPH3 aufweisen, kann die Existenz partiell redundanter Gene, welche möglicherweise die Defekte der *enp*-Einzelmutanten maskieren, nicht ausgeschlossen werden.

Die Identifizierung putativer ENP-, PID- und PIN1-Orthologe in Monokotyledonen unterstreicht ihre Bedeutung für die Pflanzenentwicklung. Zudem lassen die überlappenden Expressionsdomänen von *ZmENP* und *ZmPIN1* vermuten, dass die grundlegenden Mechanismen des Auxintransports und der Organogenese zwischen mono- und dikotylen Arten konserviert sein könnten.

## Summary

During the embryogenesis of *Arabidopsis thaliana* the cotyledons are generated from precursor cells that are not derived from the shoot apical meristem (SAM) from which other leaf organs form. The phytohormone auxin is known to be a crucial factor for plant organogenesis in general. However, the genes involved in this process, have been unknown so far.

In the *Arabidopsis* mutant *laterne* the cotyledons are specifically and precisely lost, while the embryonic hypocotyl and root are not affected. The *laterne* plants carry mutations in *PINOID*, which encodes a serin/threonin kinase that influences the polar distribution of the auxin efflux carrier PIN1 in epidermal cell membranes via phosphorylation, and the novel gene *ENHANCER OF PINOID (ENP)*. *ENP* encodes a BTB/POZ protein of the NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL (NPH3) family with 32 further members in *Arabidopsis*. NPH3, the founder member of the protein family, is thought to function as signal transducer of the phototropic response and to control lateral translocation of auxin along with the PHOT1 receptor kinase, which is homologous to PID. In contrast to NPH3, ENP is taking over a regulatory function in organogenesis.

Homozygous *pinoid*-embryos show a partial redistribution of PIN1 proteins in the epidermal cell membranes of their apices and cotyledons. This effect is reinforced in case of a simultaneous mutation in the *ENP* gene locus, which leads to a complete apical-to-basal reversal of PIN1 polarity. Consequently auxin fails to accumulate in the cotyledon primordia of *laterne* double mutants and cotyledons do not develop. A protein-protein interaction of ENP and PID or PIN was not detected yet, but according to the *in vivo* analysis of transformed *Arabidopsis* plants ENP appears to co-localize with PIN1 at the apical membranes of cotyledon epidermal cells, provided that the BTB/POZ domain is functional.

*ENP* mRNA is expressed in organ primordia during the whole lifecycle of *Arabidopsis thaliana*. However, RT-PCR and Northern Blot experiments revealed different transcriptional start sites depending on the particular tissue. Moreover *enp* single mutants show only a subtle flower phenotype and no other obvious abnormalities. Further defects are possibly masked by partially redundant genes, because four of the known NPH3-like proteins in *Arabidopsis* exhibit high similarity to ENP and are less similar to NPH3.

The identification of putative ENP, PID and PIN1 orthologs in monocotyledons underlines their importance for plant development. Furthermore, the overlapping expression domains of *ZmENP* and *ZmPIN1* in late *Zea mays* embryos indicate, that the basic mechanisms of auxin transport and organogenesis might be conserved between mono- and dicotyledonous plants.

## 5. Material

### 5.1 Chemikalien und molekularbiologische Verbrauchsmittel

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, im pro analysis Qualitätsstandard von den Firmen Biorad (USA), Biozym (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Difco (USA), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Schweden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (USA) und USB (USA) bezogen. Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme lieferten die Firmen Boehringer Mannheim, Gibco BRL (USA), MBI Fermentas (Litauen), New England Biolabs (USA), Serva (Heidelberg) und Stratagene (USA). Desoxynukleotide (dNTPs) wurden bei den Firmen Boehringer Mannheim und Pharmacia erworben. Als Hilfsmittel für molekularbiologische Arbeiten wurden DNA-Affinitätssäulen von Quiagen (Düsseldorf), der NucleoSpin® RNA II Isolierungs Kit von Macherey–Nagel (Düren) und das PolyATtract® mRNA Isolierungs-System von Promega (USA) verwendet. Für *in situ* Hybridisierungen wurden Antikörper gegen Digoxigenin (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments) von Roche (Penzberg) eingesetzt. Agarosegele wurden mit Agarose der Firma FMC BioProducts (Rockland, USA) hergestellt. Für das Northern Blot Verfahren wurde saugfähiges Papier von Whatman (USA), Hybond N+ Nylonmembranen und  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP von Amersham (Braunschweig) verwendet. Falls für ein Verfahren gezielt spezielle Chemikalien und Hilfsmittel erworben wurden, werden selbige in der jeweiligen Anleitung erwähnt.

### 5.2 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	
	Konzentration	Lagerung
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-20°C
Chloramphenicol	25 mg/ml in EtOH	-20°C
Kanamycin	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-20°C
Tetracyclin	25 mg/ml in EtOH	-20°C
Rifampicin	50 mg/ml in Methanol	-20°C

Tab. 2: Antibiotika und ihre Stammlösungen. Die Arbeitskonzentration beträgt 1/1000 der Konzentration der Stammlösung.

### 5.3 Längenstandards

#### 5.3.1 DNA-Längenstandards

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

50  $\mu\text{l}$  Restriktionsansatz:  
 (0,24  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA/ $\mu\text{l}$ )

40  $\mu\text{l}$   $\lambda$ -DNA (3  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ )  
 + 5  $\mu\text{l}$  10x NEB Puffer 2  
 + 5  $\mu\text{l}$   $\lambda$ -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.

Die 1 kb DNA-Leiter Stocklösung (1 µg/µl) wird vor dem Gebrauch 1/10 verdünnt. 10% des Endvolumens entsprechen hierbei dem einzusetzenden Volumen an 10x Laufpuffer.

### 5.3.2 RNA-Längenstandards

Für Formaldehydgele wurde 0,24-9,5 kb RNA-Marker von Invitrogen (Gibco BRL) verwendet.

### 5.4 Primer

Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers (Ulm), Eurogentec (Belgien), Gibco BRL (USA), Invitrogen (Karlsruhe) und MWG (Ebersberg) synthetisiert.

<b>ENHANCER OF PINOID (ENP) Primer I</b>		
<b>Nr.</b>	<b>ENP 31no_F</b>	<b>ENP 31no_R</b>
1	TACTATTCATGTTGGCGAGGTCAC	CGCGGTCAGCATCTTCAGTCATT
2	TTACGCTCAATGCTTACAACA	ATTACGCCATTATTCATCCTTC
3	TGGAAGGATGAATAATGGCGTAAT	TTCCGGGACTAACTCAGATAACTC
4	TTGCCGAAGGTAAACAG	TTCCGGGACTAACTCAGATAACTC
5	TCAGCTAGGCCGATACACGAC	TGCACCACCACCACTCCTC
6	CCCCGTGGCGTCTGTTC	GTTTCTCCCCACCGATTCAGATA
7	CACAAAGTCCGCCAGCCAAGTC	CTAGCCGTCAGATCATTTCACAA
<b>Nr.</b>	<b>enp repeat_F</b>	<b>enp repeat_R</b>
1	GTTGGAGCTGATGAGACGGTGAGA	TCGGATTTTGTAGTTCGGGATGT
<b>ENP Primer II</b>		
<b>Nr.</b>	<b>enp cDNA_F</b>	<b>enp cDNA_R</b>
1	TTGAGGCGAGTGAGAAAAA	AACCGGCGAGTGTGACGAA
2	AGTTCCCGCTGCTATCG	CGTCGCTTCTTCTCCTTTGTTCTC
3	GTTTCTACTGAGGGATCTTA	CTTCTTTTCGGATTTTGTAGTTC
<b>ENP Primer III</b>		
<b>Nr.</b>	<b>SPI/ENP (P_F)</b>	<b>ASPI/ENP (P_R)</b>
1	GTTTCGAGACAAGTTCGTCAG	AACAAATCTTTACGATTAAA
2	TTCGAGACAAGTTCGTCAGAAGGAA	CCGCCATGAACTGATCAACA
3	ATGAAGTTCATGAAGCTAGG	ACGAGCTAGAAGACTTGGCT
4	TAGAAGTAGTTTCTACTGAGGGATT	AGTTAAGAGCGAGATAAGCA
5	TTGATGGGTCAAATGAATCT	CTAGAGAGTGTAAAGTTCAGAGTTA
6	GTTTCAGATCTTGACAGCGA	CCACAAATCCTAAGATCACTTA
7	TTCCCGCTGCTATCGAAGAG	TGTGCACCACCACCACTCCT
8	ATATATCTCTCTATCTTTTCGCC	CTCGCCAACATGAATAGTAA
9	TTCGAGACAAGTTCGTCAGAAGGAA	GTTTCATGAACTTCATATTTCTTCG
10	GGGTCTAAGCCCGATACATTTG	ACAAAAACCAACTTCACCGA
<b>ENP Exon/Intron Primer</b>		
<b>Bez.</b>	<b>SPI/ENP_F</b>	<b>ASPI/ENP_R</b>
<b>Exon 1</b>	GTTTCGAGACAAGTTCGTCAGAAGGAA	CCCTAGCTTCATGAACTTCATATTTCT
<b>Intron 1</b>	TTGATGGGTCAAATGAA	CAATGGCCAGATTAACAT
<b>Exon 2</b>	GTACGCCGTTTCAGATC	AATGTGACCTCGCCAAC
<b>Intron 2</b>	GTACATTTTGTAAATGCTGA	GAGCATAAAAGAGACATCTCTA
<b>Exon 3</b>	TTCCCGCTGCTATCGAA	CTAGCTGATTCGGGA
<b>Intron 3</b>	AGAGTTTCTTGTTCCTGTA	AAAAACCAACTTCACCG
<b>Exon 4</b>	GAACATCCCGAACTAACA	CACATAACACAACCTTCATCAGT
<b>5'utr E1</b>	GAGACAAGTTCGTCAGAAG	ACCCTGAAGCAGCTTTA
<b>E1 CDS</b>	ATGAAGTTCATGAAGCTAGG	ACGAATTTGCCATCAGA
<b>3'utr E4</b>	GGGAGAAACAGAAATTTGTAA	ACGATTAAGAAACACATAAC
<b>E4 CDS</b>	GAACATCCCGAACTAACA	GATATCGAATGTCTGCG

<b>Primer zur Amplifikation von ENP und ENPA</b>			
<b>Bez.</b>	<b>SP/ENP EcoRI</b>	<b>ASP/ENP BamHI</b>	
<b>E1-4</b>	CCTGAATTCATGAAGTTCATGAAGCTAGGGTCTA	ACGGATCCTCACGATATCGAATGTCTG	
<b>E3-4</b>	GCTGAATTCATGCAGCGACTGGTTTTT	GACGGATCCTCACGATATCGAATGTCT	
<b>pEGAD MCS Primer</b>			
<b>Bez.</b>	<b>SP/pEGAD MCS F</b>	<b>ASP/pEGAD MCS R</b>	
	CTACAACAGCCACAACG	CGGATCTCTAGCTTATCGA	
<b>PINOID (PID) Primer</b>			
<b>Nr.</b>	<b>PID F</b>	<b>PID R</b>	
<b>1</b>	TTAACACAGATGAATACTAGTCC	ACAGCTTCGAGGGAATATGTACAGC	
<b>2</b>	ACCAACTCTCTCTGTCTCGCCTCTCTC	ACGGAGTCTTGCCATATATCATCTCG	
<b>3</b>	TCAGATTTTCGCTTACGCAGAGATCCG	AGTCAGAGAGCATAATGTGACCGTC	
<b>4</b>	GCTTGACCATCCATTTTTGCCGACTC	TCGCCGGTGAGGTTGTCTATGACGGAG	
<b>5</b>	ATCTTGTCTTGCAAGAACAGACCTG	ATAGTTGACGGCGGCGCTCGAATG	
<b>6</b>	TCGTTGGTACGCATGAATACCGTGGCACC	TGAGAGAGATGGAAGAAGGAGAAGTG	
<b>Nr.</b>	<b>pid up</b>	<b>pid down</b>	
<b>I</b>	AAAAATAATGGGAAAAAGAGAAG	TCAAGAAATGGCTAAGAGGATAAT	
<b>II</b>	CAGACGGTGAGATGAGTTTAGGAA	GAATCGCCGGTGAGGTTGTCT	
<b>III</b>	ATATTGCTCCGGTGGTGATTTACA	CCGGCGAAGACGAGGAAGA	
<b>IV</b>	GTTCAACGCGACGATTCACCTC	ACGCCGCTGGTTGTACTACTTC	
<b>V</b>	CGAGGTGCGGCGGAGGTTA	TCTAGGCGTGACGAGTTTTATTAT	
<b>SHOOT MERISTEMLESS (STM) Primer</b>			
<b>Nr.</b>	<b>STM05N F</b>	<b>STM05N F</b>	
<b>1</b>	CCCCAAGGAAC TAAGAACAAA	GCAAGAAAATCAAATAAGAATCAT	
<b>2</b>	TGGTTATGCATATCAGTCACAC	AAAAAGGAAATAAAAGGTAAAGTT	
<b>3</b>	TTGCGCAAGTACAGTGGTTA	CTTCATT CAGCTTTTAGGATTTCA	
<b>4</b>	GATTTTGCATTCATACTA	GAATCCATCTACTCATACGA	
<b>5</b>	TAGTAGTTCATGTCTTTATTA	TGTGTTGCGTCCATTACTA	
<b>wuschel-1 Primer</b>			
<b>Bez.</b>	<b>wus FW</b>	<b>wus REV</b>	
<b>1044</b>	CACGTGCATTTTATTTTCATTTGT	GTTTGCCCATCTCCACCTAC	
<b>1128</b>	TTTCTTCATTTCTTTCCCTGTAT	GTTTGCCCATCTCCACCTA	
<b>Mais AY105323 Primer</b>			
<b>Bez.</b>	<b>SP/AY105323 PF</b>	<b>ASP/AY105323 R</b>	
	TTGGGGTCTGTGCCAAGTTTTGCTACGGCATGATT GTCACACTCAATGCCTACAATGTGATTGCAGCCCG	CCCTTGTC AACAGTCTCATTCATCTCCAAGTACTC TGCAGCACAGCGGGCTGCAATCATTGTAGGCAT	
<b>Pyrosequencing Primer</b>			
<b>Bez.</b>	<b>SNP_01 F1 BIO</b>	<b>SNP_01 R1</b>	<b>SNP_01 S1</b>
<b>enp</b>	GCACGCTGCACAGAACGA	GCCACGGGGCTGTGATTT	CGGGGCTGTGATTTG
<b>Bez.</b>	<b>SNP_F1</b>	<b>SNP_R1 BIO</b>	<b>SNP_S1</b>
<b>pid-15</b>	CATGCGCGGAATTTGATTT	CTTGACGACGGAAGAAGGAATC	GATCCGACTAAAAGACTTG
<b>stm-5</b>	CCCTAAAGAAGCTCGTCAACA	AGTATGGATGCAAAAATCACA A	TGGCCTTACCCTTCG
<b>Bez.</b>	<b>mut1 FW</b>	<b>mut1 REV bio</b>	<b>mut1 pyroSEQ</b>
<b>wus-1</b>	CTTCTTCATTTCTTTCCCTG TA	CTTGTTCCTTCACCCAAAAATT	GCCATGTCTATGGATCT

Tab. 3. Verwendete Primerpaare. Der Unterstrich steht für die jeweilige Nummer oder Bezeichnung. Antisense Primer (ASP), biotinyliert (BIO), forward (F, FW), open reading frame (ORF), (Pyro-) Sequenzierung (S, pyroSEQ), reverse (R, REV), sense Primer (SP), single nucleotide polymorphism (SNP).

## 5.5 Klone

### 5.5.1 cDNA-Klone zur Herstellung der *in situ* Hybridisierungs Sonden

p5Δ4 <i>ANT</i>	D. Smyth	(Monash University, Australien)
pBluescribe <i>C1</i>	D. Fernandez	(University of Wisconsin, USA)
pRSC1 <i>CLV1</i>	R. A. Torres Ruiz	(TU München)
pNB4135 <i>CLV3</i>	R. A. Torres Ruiz	(TU München)
pBS KS <i>CUC2</i>	M. Aida	(Nara Inst. of Science and Tech., Japan)
pBS SK <i>merihb1</i>	K. Schneitz	(TU München)
pBluescribe <i>N2</i>	D. Fernandez	(University of Wisconsin, USA)
pBS <i>PID</i> Klon 5a	R. A. Torres Ruiz	(TU München)
pBS II SK <i>WUS</i> A1-1	T. Laux	(Universität Freiburg)
pGEM <i>ENP</i> Fragment 2(A)		

Zur Herstellung des *ENP* cDNA-Klons (pGEM *ENP* Fragment 2(A)) wurde ausgehend von Col-0 cDNA ein 1362 bp Fragment mit den *ENP* Primern II 2F und 2R amplifiziert und in den pGEM®-T Easy Vektor kloniert. Das 1362 bp Fragment entspricht einer Region die die Aminosäuren 44-497 umfasst.

### 5.5.2 *ENP* cDNA-Klone

pGEM <i>ENP</i> Fragment 2(A)	siehe oben
RAFL09-39-B04 (pda08292)	Riken Bio Ressource Center (Japan) ( <i>ENP</i> cDNA, modifizierter Bluescript-Vektor (λFLC-1-B), Ampicilin <sup>R</sup> , T7, T3)
C104870	SALK ( <i>ENP</i> cDNA ohne 5'UTR, pUNI51 Vektor, T3, T7, Kanamycin <sup>R</sup> )

### 5.5.3 BAC *ENP*-Klone

F11C18	ABRC (Ohio) (genomische DNA (Col), Kanamycin <sup>R</sup> ; T7, SP6)
--------	---

## 5.6 Vektoren

pBR322	Fermentas (Tetracyclin <sup>R</sup> , Ampicilin <sup>R</sup> , β-Lactamase)
pEGAD	ABRC (RB-35S-EGFP-(Ala) <sub>10</sub> -MCS-35S-Basta <sup>R</sup> -LB, pBIN19 Vektor-Sequenz, Kanamycin <sup>R</sup> )
pGEM®-T Easy	Promega (Ampicilin <sup>R</sup> , T7, SP6, LacZ mit integrierter MCS)
pBluescript II KS(+/-)	Stratagene, Fermentas (Ampicilin <sup>R</sup> , T7, T3, LacZ mit integrierter MCS (KpnI → SacI))

pBluescript II SK(+/-)      Stratagene, Fermentas  
(Ampicilin<sup>R</sup>, T7, T3, LacZ mit integrierter MCS (SacI → KpnI))

Die pBluescript II SK und KS Vektoren repräsentieren die zwei Orientierungen der MCS innerhalb des *lacZ* Gens, welches das N-terminale Fragment der  $\beta$ -Galactosidase kodiert.

## 5.7 Bakterienstämme

*A. tumefaciens* GV3101      Koncz und Schell (1986)  
(Gentamycin<sup>R</sup>, Rifampicin<sup>R</sup>, Ti-Plasmid ohne T-DNA)

*E. coli* XL-1 Blue MRF      Bullock et al. (1987)  
(*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1 lac<sup>-</sup>*  
*F'*[*proAB<sup>+</sup> lacI lacZ  $\Delta$ M15 Tn10 (tet<sup>R</sup>)*])

XL-1 Blue MRF Zellen sind Tetracyclin resistent und defizient für Endonucleasen (*endA*), Rekombination (*recA*) und für alle bekannten Restriktionssysteme. Sie enthalten das *lacIqZ $\Delta$ M15* Gen auf dem *F'* Episom, welches eine blau-weiß-Selektion rekombinanter Plasmide ermöglicht.

## 5.8 *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial (Ursprungslinien)

### 5.8.1 WT-Linien

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

### 5.8.2 Mutante Linien

*laterne*  
(Tremel et al., 2005)      Die *laterne* Doppelmutation wurde im *Landsberg erecta* Ökotyp durch EMS Mutagenese induziert und durch wiederholtes Selbsten der Ursprungslinie isogenisiert.

*enp (enp-1)*  
(Tremel et al., 2005;  
Furutani et al., 2007)      Die homozygote *enp* Linie wurde durch Auskreuzen aus der *laterne* Ursprungslinie und anschließendes wiederholtes Selbsten isogenisiert. Die EMS induzierte Transition von C nach T im Arg-468 Codon von *ENP* erzeugt ein Stop-Codon.

*pid-15*  
(Tremel et al., 2005)      Die *pid-15* Linie wurde durch Auskreuzen aus der *laterne* 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 *pid*-Phänotyp.

<i>pid-2</i> (Bennett et al., 1995)	<i>pid-2</i> Pflanzen haben einem intermediären Phenotyp (Ler Hintergrund). Die EMS induzierte Mutation resultiert in einem Austausch der Aminosäure 380 von Gly nach Arg (GGG →AGG).
<i>pid-8</i> (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> (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.
<i>stm-5</i> (Endrizzi et al., 1996)	EMS induzierte Transition von G nach A im ersten Intronnukleotid nach dem dritten Exon von <i>STM</i> (Ler Hintergrund). Die Mutation der 5'Splice Site führt zu einem starken <i>stm</i> -Phänotyp.
<i>wus-1</i> (Laux et al., 1996)	<i>wus-1</i> wurde ursprünglich im Ler Ökotyp induziert und ist das stärkste bekannte <i>wus</i> -Allel. Die EMS induzierte Transition von G nach A im ersten Intronnukleotid nach dem zweiten Exon von <i>WUS</i> mutiert die 5'Splice Site.

### 5.8.3 Transgene Linien

<i>DR5rev::GFP</i> (Benkova et al., 2003; Friml et al., 2003)	Auf GFP basierende Marker Linie. Das Konstrukt besteht aus dem synthetischen Auxin-abhängigen Promotor <i>DR5</i> und der für eGFP kodierenden Sequenz. <i>DR5</i> setzt sich aus neun Wiederholungen des AuxRE (TGTCTC), welche invers mit dem CaMV 35S Promotor fusioniert sind, zusammen.
<i>PIN1:GFP</i> (Benkova et al., 2003)	<i>PIN1:GFP</i> wurde durch eine Insertion von mGFP4 in den genomischen <i>PIN1</i> Sequenzbereich (Nukleotide -2320 bis 3508 vom ATG aus) in Position 1510 generiert.

## 5.9 Lösungen

### Allgemeine Lösungen

#### 100x Denhardt's

2% (w/v)	Ficoll 400
2% (w/v)	Polyvinylpyrroliden
2% (w/v)	BSA

Mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf das Endvolumen auffüllen, (sterilfiltrieren,) aliquotieren (2 ml Aliquote) und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern.

#### 50% Dextransulfat

Dextransulfat schrittweise durch Vortexen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  lösen (z.B. 25 g in 50 ml) und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern.

#### 0,5 M EDTA pH 8,0

0,5 M EDTA·Na<sub>2</sub> pH 8,0

Unter Rühren zu  $\frac{3}{4}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auffüllen, pH mit 10 N NaOH oder NaOH-Pellets auf 8,0 einstellen und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf das Endvolumen auffüllen. EDTA geht erst in Lösung, wenn pH 8,0 erreicht ist. Lösung autoklavieren.

#### 100% Formamid<sub>deionisiert</sub>

Zugabe von ca. einem Löffel Serdolit zu 1 l 100% Formamid. Unter andauerndem Rühren üN deionisieren und anschließend filtrieren. Vor Licht schützen und bei  $4^\circ\text{C}$  lagern.

#### $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$

0,1% DEPC (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  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 ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ) angesetzt. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC in die beiden flüchtigen Produkte  $\text{CO}_2$  und Ethanol ( $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OCO})_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).

#### Hoyer's

7,5 g	Gummi arabicum
100 g	Chloralhydrat
5 ml	Glycerol

In 60 ml  $\text{H}_2\text{O}$  unter andauerndem Rühren üN lösen.

**IPTG-Stammlösung**

100 mM IPTG

Im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen.**3 M NaAc pH 5,2**

3 M NaAc pH 5,2

Unter Rühren zu  $\frac{3}{4}$  mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> auffüllen, pH unter dem Abzug mit 100% Eisessig auf 5,2 einstellen und H<sub>2</sub>O<sub>d</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.

**10x PBS**

1,3 M NaCl

30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Unter Rühren erst zu  $\frac{3}{4}$  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.

**PEG (Polyethylenglykol )-Lösung**

15% PEG 8000 (Sigma)

1 M NaCl

5 mM EDTA pH 8,0

Mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> auf das Endvolumen auffüllen.**Phenol**

Vor der Benutzung muss der pH des Phenols auf >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 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% Mecaptoethanol ausgeschüttelt und 15 min bei RT gerührt. Danach wird die obere Phase erneut abgenommen. Der Vorgang wird solange 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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf das Endvolumen auffüllen. Nicht autoklavieren. Bei RT lagern.

### 1x TE pH 8,0

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  pH 8,0

Feststoffe in  $\frac{3}{4}$  des  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ -Endvolumens lösen. pH mit  $\text{HCl}_{\text{konz.}}$  auf 8,0 einstellen, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren. Alternativ kann der Puffer auch aus den Stammlösungen hergestellt werden.

### 1 M Tris-HCl

1 M Tris  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Unter Rühren zu  $\frac{3}{4}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auffüllen. pH mit  $\text{HCl}_{\text{konz.}}$  auf den gewünschten Wert einstellen,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  zugeben bis das Endvolumen erreicht ist und die Lösung autoklavieren. (Der pH von Tris-Puffern ist temperaturabhängig. Bei jedem Temperaturanstieg von  $1^\circ\text{C}$  nimmt er um ca. 0,03 pH-Einheiten ab.)

pH	$\text{HCl}_{\text{konz.}}$
7.4	70 ml/1 l
7.6	60 ml/1 l
8.0	42 ml/1 l

## Lösungen für Agarosegele

### 10x Auftragspuffer

1) 50 mM EDTA  
0,25% Bromphenolblau (w/v)  
0,25% Xylencyanol (w/v)  
25% Ficoll 400 (w/v)

Mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{d}}$  auf das Endvolumen auffüllen und sterilfiltrieren. Bei RT lagern.

2) 50 mM EDTA  
0,25% Bromphenolblau (w/v)  
0,25% Xylencyanol (w/v)  
66% Saccarose (w/v)

Mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{d}}$  auf das Endvolumen auffüllen und sterilfiltrieren. Bei  $4^\circ\text{C}$  lagern.

3) 50 mM EDTA  
0,25% Bromphenolblau (w/v)  
0,25% Xylencyanol (w/v)  
50% Glycerin (w/v)

Mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{d}}$  auf das Endvolumen auffüllen und sterilfiltrieren. Bei  $4^\circ\text{C}$  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.

**50xTAE**

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

Mit H<sub>2</sub>O<sub>d</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>d</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 auf Grund 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.

**Lösungen für Polyacrylamidgele****Polyacrylamidgel Elutionspuffer**

500 mM        Ammoniumacetat  
1 mM          EDTA pH 8,0

Auf das gewünschte Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen und autoklavieren.

**Lösungen für Formaldehydgele****10x MOPS-Puffer**

200 mM        MOPS  
50 mM         NaAc  
10 mM         EDTA

pH 7,0 mit NaOH einstellen. Auf das gewünschte Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen, sterilfiltrieren, vor Licht schützen und bei 4°C lagern. Der Puffer verfärbt sich gelb, wenn er älter, dem Licht ausgesetzt, oder autoklaviert wird. 1x MOPS-Puffer dient als Laufpuffer für RNA-Gele, aber

eine DEPC-Behandlung der Lösungen wird nur nötig wenn Probleme auftreten.

### RNA-Auftragspuffer (NBSB)

100 µl	Formamid <sub>deionisiert</sub>
20 µl	10x MOPS
38 µl	37% Formaldehyd
10 µl	50% Bromphenolblau

Der RNA-Auftragspuffer wird direkt vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

### 0,1% Toluidinblau-Färbelösung

0,1%	Toluidinblau
10%	EtOH

Durch die 10% EtOH in der Färbelösung wird ein späteres Entfärben der Formaldehydgele ermöglicht.

## Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl Methode

### TBF1-Puffer

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

Mit 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
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)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren. Die Zugabe von Lysozym ist optional.

### 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

Autoklavieren. CTAB kann alternativ auch nach dem Autoklavieren zugegeben werden, da sich die Lösung sonst verfärbt.

## Lösungen zur RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

### R1 Puffer

8 M Guanidin·HCl  
20 mM EDTA (TITRIPLEX III)  
20 mM MES

pH 7,0 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Puffer autoklavieren, vor Licht schützen und bei RT lagern. Vor Gebrauch 50 mM β-Mercaptoethanol zugeben.

## 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.

**10x PCR-Puffer**

500 mM KCl  
100 mM Tris-HCl pH 9,0  
10-25 mM MgCl<sub>2</sub>  
1% Triton X-100 (v/v)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das gewünschte Volumen auffüllen und autoklavieren.

Die zu erwartende Ausbeute der PCR-Reaktion ist bei einer KCl-Endkonzentration von 50 mM am größten, wohingegen die optimale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von PCR zu PCR verschieden sein kann. In einem Standard PCR-Puffer beträgt die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration typischer Weise 20 oder 25 mM. Falls bei der Amplifikation des Templates Probleme auftreten, wird das PCR-Ergebnis jedoch oft durch eine Optimierung des MgCl<sub>2</sub>-Gehalts im Puffer verbessert. Das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase liegt bei einem pH oberhalb von 8. Für PCR-Puffer wird Tris HCl pH 9,0 verwendet, da HCl seinen pH in Abhängigkeit von der Temperatur stark ändert. Eine weitere Komponente von PCR-Puffern ist das nicht-ionische Tensid Triton X-100. Das Detergent verändert das Schmelzpunktverhalten von DNA-Doppelsträngen und verbessert damit das PCR-Ergebnis. Ist es zu hoch konzentriert (>1%), wirkt es jedoch hemmend auf die Reaktion.

**Lösungen für *in situ* Hybridisierungen****Antikörperlösung**

Anti-DIG-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments; Roche) 1:1250 mit BSA-Waschpuffer verdünnen. Für jeden Objektträger werden 120 µl benötigt, was bei 20 Objektträgern 1,9 µl Anti-DIG-Antikörper in gerundet 2,4 ml Waschpuffer entspricht. Die Lösung wird frühestens 10 min vor Gebrauch hergestellt.

**Blocking-Lösung**

10x Blocking-Stammlösung:

10% Blocking Reagenz von Boehringer Mannheim (z.B. 2,5 g auf 25 ml) in Maleinsäurepuffer durch Erhitzen lösen und autoklavieren. In 5 ml Aliquots bei -20°C lagern.

1x Blocking-Lösung:

Für 18-20 Objektträger 5 ml 10x Stammlösung auf 50 ml mit Maleinsäurepuffer auffüllen.

**BSA Waschpuffer**

1,0%	BSA (Sigma A-3059)
0,3%	Triton-X 100
100 mM	Tris-HCl pH 7,5
150 mM	NaCl

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 100 ml auffüllen. Für 20 Objektträger benötigt man 150 ml Waschpuffer, der entweder frisch hergestellt oder sterilfiltriert werden muss.

**Färbelösung**

Pro ml TNM-50 Puffer werden 8 µl NBT/BCIP (Roche) eingesetzt. Für 20 Objektträger benötigt man 2,4 ml Färbelösung (gerundet 2,380 ml TNM-50 und 20 µl NBT/BCIP), also 120 µl pro Objektträger.

**Hybridisierungspuffer**

1x	Salz
50%	Formamid <sub>deionisiert</sub>
10%	Dextransulfat
1x	Denhardt's
0,5 mg/ml	tRNA (Roche109541)

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das erwünschte Endvolumen auffüllen. 2 ml Hybridisierungspuffer sind ausreichend für 20 Objektträger. Er kann in größeren Mengen hergestellt und bei 4°C für bis zu zwei Wochen gelagert werden.

**Hydrolysepuffer**

200 µl	0,5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
160 µl	0,5 M NaHCO <sub>3</sub>
600 µl	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>

Der Hydrolysepuffer sollte immer frisch aus den Einzelkomponenten hergestellt werden.

**Maleinsäurepuffer**

100 mM	Maleinsäure pH 7,5
150 mM	NaCl

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. pH 7,5 mit Hilfe von NaOH Chips einstellen. Lösung sterilfiltrieren und bei RT lagern.

**4% Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS**

1-2 NaOH Plätzchen (Merk) in 150 ml 1x PBS lösen und auf 70°C erhitzen (PFA geht nur bei pH 11 und 70°C vollständig in Lösung). 8 g PFA für ein Endvolumen von 200 ml unter dem Abzug abwiegen und 150 ml 1x PBS zugeben. PFA für 10 min bei 70°C im Schüttelwasserbad inkubieren, bis das Paraformaldehyd depolymerisiert und damit gelöst ist. Fixierlösung aus dem Wasserbad nehmen und unter andauerndem Schütteln auf RT abkühlen lassen. Lösung kurz vor Gebrauch, unter Verwendung von pH-Papier, mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 7,0 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 200 ml auffüllen. HCl darf nicht verwendet werden, um den pH einzustellen, da die Kombination aus HCl und Formaldehyd ein starkes

Karzinogen freisetzt. Die Formaldehyd-Fixierungslösung muss immer frisch hergestellt werden, da Formaldehyd flüchtig ist.

### 1 M Phosphatpuffer pH 7,0

57,7%      1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (v/v)  
42,3%      1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (v/v)

### Proteinase K Puffer

100 mM      Tris pH 7,5  
50 mM      EDTA pH 8,0

pH unter Verwendung von pH-Papier mit 37% HCl auf 7,5 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Der Puffer wird im 37°C Wasserbad für den Proteinase K Verdau vorgewärmt. Eine Temperatur von 37°C löst den Eigenverdau der Proteinase K aus und aktiviert sie damit. Gleichzeitig wird eventuelle RNase-Aktivität in der Lösung verhindert.

### Proteinase K Stocklösung

10 mg/ml Proteinase K in 20 mM Tris-HCl pH 7,4 und 2 mM CaCl<sub>2</sub> für 15 min bei 65°C lösen. Anschließend für 2 h bei 37°C inkubieren. Aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

### 10x Salz

100 mM.      Tris pH 7,5  
10 mM      EDTA pH 8,0  
3 M          NaCl

In H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und autoklavieren.

### Soaking Solution (Einweich-Lösung)

2x            SSC  
50%          Formamid (Fluka)

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

### 20x SSC pH 7,5

3 M          NaCl  
0,2 M        Na<sub>3</sub>-Citrat-2H<sub>2</sub>O

Feststoffe unter Rühren in  $\frac{3}{4}$  des H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> Endvolumens lösen und den pH mit 1 N HCl auf 7,5 einstellen. Auf das gewünschte Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen. Lösung autoklavieren.

### TNM-50

100 mM      Tris pH 9,5  
100 mM      NaCl  
50 mM      MgCl<sub>2</sub>

Mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf das Endvolumen auffüllen und falls nötig mit HCl<sub>konz</sub> auf pH 9,5 einstellen. Der TNM-50 Detektionspuffer wird für jede Immunreaktion frisch hergestellt.

**Triethanolamin (TEA)**

2,68 ml Triethanolamin (Sigma T1377) in 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen und mit konzentrierter HCl unter Verwendung von pH-Papier auf pH 8,0 einstellen.

**Lösungen für Northern Blots****Heringssperma-DNA Stocklösung**

10 mg/ml Heringssperma

In H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen. Auf 100°C im Wasserbad erhitzen und ca. 5 min denaturieren. Anschließend sofort auf Eis stellen. Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

**Hybridisierungslösung und Prähybridisierungslösung**

50% Formamid<sub>deionisiert</sub>  
 6x SSC  
 5x Denhardt's  
 0,5% SDS

Mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf das Endvolumen auffüllen. Im Fall der Prähybridisierungslösung wird kurz vor dem Gebrauch zusätzlich 0,1 mg/ml denaturiertes Heringssperma zugeben.

**5x Oligo-Mix**

1 Vol Lösung A  
 2,5 Vol Lösung B  
 1,5 Vol Lösung C

Oligo-Mix aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.

**Lösung 0** 1,27 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
 In 50 ml 1,25 M Tris-HCl pH 8,0 lösen.

**Lösung A** 1 ml Lösung 0  
 18 µl β-Mercaptoethanol  
 15 µl 100 mM dATP  
 15 µl 100 mM dTTP  
 15 µl 100 mM dCTP  
 15 µl 100 mM dGTP

**Lösung B** 2 M HEPES-NaOH pH 6,6

**Lösung C** 90 OD<sub>260</sub>-Units random Hexanukleotide (Pharmacia) in 1 ml 1x TE lösen.

**2x Oligo-STOP**

7,5 M NH<sub>4</sub>Ac  
 1 mg/ml Heringssperma  
 0,5 M EDTA

In H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen, aliquotieren und bei 4°C lagern.

**20 x SSC pH 7,0**

3 M            NaCl  
0,3 M         Na<sub>3</sub>-Citrat-2H<sub>2</sub>O

Feststoffe unter Rühren in  $\frac{3}{4}$  des H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> Endvolumens lösen und den pH mit 1 N HCl auf 7,0 einstellen. Das gewünschte Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> einstellen. Lösung autoklavieren.

**Lösungen für die Pflanzentransformation mittels *A. tumefaciens*****10% Glycerin**

10%            Glycerin (v/v)

Glycerin mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (1/10) 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.

**5.10 Medien****Amp/IPTG/X-GAL-Platten zur Blau/Weiß-Selektion**

Handwarmes Festmedium (z.B. dYT) mit je 100 µg/ml IPTG und X-GAL, sowie 50 µg/ml Amp versetzen, unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gießen und aushärten lassen.

**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>d</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)

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

**Wasseragar**

3,5-4 g Agar-Agar in 400 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</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

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)

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 Baktotryptone

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)

pH auf 7,4 einstellen, mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> auf 1 l auffüllen und nach dem Autoklavieren 2 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M) zugeben.

## 6. Methoden

### 6.1 Pflanzenzucht

#### 6.1.2 Aufzucht auf Erde

Für die Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* eignet sich 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 und mit Hilfe eines lichtdurchlässigen Plastiksacks vor Austrocknung geschützt. Nach einer zweitägigen Stratifikation bei 4°C werden die Töpfe in eine begehbare Heraeus-Pflanzenkammer (18°C, Dauerlicht, 70% Luftfeuchtigkeit) 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.

#### 6.1.2 Anzucht unter sterilen Bedingungen

##### Oberflächensterilisation von Samen

Alle nachfolgenden Schritte 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 stratifiziert, bevor sie in den Lichtschrank (20°C, Dauerlicht) gestellt werden.

#### 6.1.3 Intraspezifische Kreuzung

*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.

## 6.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.1 Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren

Die Alkohol-fällung 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  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.

#### 6.2.1.1 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  $\text{üN}$  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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  rücklösen.

#### 6.2.1.2 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.
- 5-15 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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  rücklösen.

## 6.2.2 Reinigung von Nukleinsäuren

### 6.2.2.1 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) ausschütteln.
- 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 (siehe 6.2.1.1 oder 6.2.1.2) und im gewünschten Volumen rüchlösen.

### 6.2.2.2 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 (vgl. 5.9) 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.

### 6.2.2.3 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. (Durchführung nach Angaben des Herstellers.)

## 6.2.3 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 Hitze einwirkung (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. 6.2.2.1) empfehlenswert.

## 6.2.4 Gele zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren

### 6.2.4.1 Agarosegele

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Größenfraktionierung doppelsträngiger DNA. Agarose ist ein Polysaccharid aus marinen Rotalgen, das sich bei Hitze (100°C) in Elektrolyseepuffer 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<sub>10</sub> der Anzahl ihrer Basenpaare. Der Nachweis der DNA erfolgt mit Ethidiumbromid (EtBr), das sich in die DNA einlagert und unter UV-Lichteinwirkung (312 nm) fluoresziert. Die Größe und DNA-Konzentration der Fragmente wird mit Hilfe eines Längenstandards (z.B. λ-HindIII) abgeschätzt. DNA-Banden können aus dem Gel extrahiert (vgl. 6.2.2.3) und weiterverwertet werden.

- Agarose einwiegen: 1% Gele (w/v) für Fragmenten ≥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 µl EtBr (10 mg/ml) pro 100 ml zugeben.
- Gelschiffchen mit Klebeband abdichten und mit einem Kamm versehen.
- Handwarmes Gel gießen und ca. 30 min auspolymerisieren lassen.
- EtBr-Gel in eine mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrolysebox überführen.
- Auftragspuffer 1/10 zu den DNA-Proben pipettieren.
- Proben und einen Längenstandard in die Geltaschen laden.
- Gel bei einer Spannung von ~100 V laufen lassen, bis die Bromphenolblau-Lauffront die Gelmitte erreicht hat.

### 6.2.4.2 MetaPhor™-Gele

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit wenigen bp Längenunterschied, sind Agarosegele ungeeignet. Man verwendet stattdessen hochauflösende MetaPhor™-Gele. Im Vergleich zu Standardagarosen fällt der Siedeverzug bei ihrer Herstellung jedoch deutlich stärker aus. Eine schrittweise Zugabe zum Elektrophoresepuffer und wiederholtes, kurzes Aufkochen in der Mikrowelle erleichtern das Lösen der MetaPhor™-Agarose.

### 6.2.4.3 Polyacrylamidgele

Nicht-denaturierende Polyacrylamidgele eignen sich um kurze (<100 bp) doppelsträngige DNA Fragmente zu separieren und aus dem Gel besonders rein zurück zu gewinnen. Sie haben im Vergleich zu Agarosegelen eine weit höhere Auflösung und können DNA Moleküle trennen, deren Größe sich nur um 0,1% unterscheidet.

Acrylamid Monomere polymerisieren in einer Reaktion die durch freie Radikale ausgelöst wird zu langen, linearen Ketten aus. Die freien Radikale entstehen durch eine von TEMED verursachte Reduktion von Ammoniumpersulfat. In Gegenwart von N-N'-Methylenbisacrylamid vernetzen sich die Ketten zu einem Gel. Das Verhältnis in dem Acrylamid und Bisacrylamid zueinander eingesetzt werden bestimmt die Stärke der Quervernetzung und damit die Mobilität der DNA im Gel. Gebrauchsfertige 30%ige Mischungen (Rotiphorese® Gel 30 von Roth®) enthalten Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 19:1, 29:1, oder 39,5:1. In Abhängigkeit von der Endkonzentration an Acrylamid im Gel unterscheidet sich zudem der Bereich (bp) in dem die DNA am effektivsten aufgetrennt wird.

Acrylamid Konzentration (%)	Bereich der effektivsten Auftrennung (bp)
12,0	40-200
15,0	25-150
20,0	6-100

Tab. 4: Beispiele für den Einfluss der Acrylamid Endkonzentration im Gel auf die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe.

#### 6.2.4.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Elektrophorese von doppelsträngiger Nukleinsäure wird i.d.R. eine 30%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 29:1 verwendet und sie wird bevorzugt mit einem TBE-Puffersystem aufgetrennt.

Polyacrylamid Gel (%)	Rotiphorese® Gel 30 (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> (ml)	5x TBE (ml)	1% Ammoniumpersulfat (ml)
12	40	33	20	7
15	50	23	20	7
20	66,6	6,4	20	7

Tab. 5: Volumina der Reagenzien die zur Herstellung von 100 ml 12, 15 und 20%igen Polyacrylamidgelen benötigt werden.

- Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 5x TBE und Ammoniumpersulfat zur Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung.
- Vorsichtig mischen (Acrylamid ist ein starkes Nervengift mit kanzerogener Wirkung).

- 35 µl TEMED unter dem Abzug zum 100 ml Ansatz pipettieren und vorsichtig mischen.
- Gel sofort zwischen zwei abgedichtete Platten aus Glas und Aluminium (durch Spacer getrennt) gießen und den Kamm behutsam einstecken.
- Das Gel für 30-60 min bei RT auspolymerisieren lassen.

Das Gel kann vor Gebrauch für mehrere Tage bei 4°C in 1x TBE gelagert werden, bevor es zur Elektrophorese mit 1x TBE als Laufpuffer eingesetzt wird. Native Polyacrylamidgelen werden i.d.R bei Voltzahlen zwischen 1 V/cm und 8 V/cm gefahren. Als Längenstandart und zum Auftragen der Proben eignen sich DNA-Marker und Ladepuffer, die auch für Agarosegele verwendet werden.

#### 6.2.4.3.2 Isolierung von DNA Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

Die „Crush and Soak“ Methode zur Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen wurde ursprünglich von Maxam und Gilbert (1977) beschrieben. Sie resultiert in einer Ausbeute von <30%-90%, in Abhängigkeit von der Größe der DNA Fragmente.

- Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese für 5 min im EtBr-Bad (0,5 µg/ml) inkubieren.
- Bande von Interesse aus dem Gel ausschneiden (UV-Transilluminator).
- Gelstückchen in 2 ml Eppendorf-Gefäß überführen und an der Gefäßwand zerdrücken.
- Das Volumen des Gelstückchens abschätzen (Eppendorf-Gefäß abwiegen).
- 1-2 Vol Polyacrylamidgel Elutionspuffer zugeben.
- Bei 37°C im Roller (Heraeus) inkubieren.

Bei dieser Temperatur lassen sich kleine DNA Fragmente (<500 bp) in 3-4 Stunden eluieren. Im Fall einer längeren Inkubation (üN) kann auf das Zerdrücken von Gelstückchen mit kleinem Volumen verzichtet werden. Größere Fragmente benötigen 12-16 Stunden.

- Zentrifugation für 1 min bei 4°C und 14000 rpm.
- Überstand (keine Polyacrylamid-Fragmente) in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 0,5 Vol Elutionspuffer zu dem Polyacrylamid-Pellet pipettieren.
- Kurz vortexen, erneut abzentrifugieren und die Überstände vereinigen.
- 2 Vol 100% EtOH zugeben, gut mischen und 30 min bei 4°C auf Eis inkubieren.
- Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14000 rpm.
- Pellet mit 70% EtOH waschen und den Überstand anschließend vollständig abnehmen.
- Pellet trocknen und im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bzw. T<sub>0,1E</sub> rüklösen.

#### 6.2.4.4 Formaldehydgele

RNA-Einzelstränge neigen zur Bildung von Sekundärstrukturen, welche die Laufeigenschaften im Gel beeinflussen. Aus diesem Grund wird RNA im Gegensatz zu DNA unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

##### Herstellung des Formaldehydgels (1,2%)

- Zugabe von 0,6 g Agarose zu 5 ml 10x MOPS und 35 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
- Gut vermischen und aufkochen bis die Agarose vollständig gelöst ist.
- Im 65°C Wasserbad auf 65°C abkühlen lassen.
- Zugabe von 9,5 ml Formaldehyd unter dem Abzug.

- Gel gießen und 30 min aushärten lassen.
- Gelkammer mit 1x MOPS füllen bis das RNA-Gel knapp mit Puffer überschichtet ist.
- Gel mit Frischhaltefolie bedecken und beschweren, um Austrocknung zu vermeiden.
- Gel nach dem Laden der Proben 1-2 h bei 65 Volt laufen lassen.

### Probenvorbereitung

Der Auftragspuffer (NBSB) muss im Gegensatz zum Laufpuffer (1x MOPS) immer frisch hergestellt werden (vgl. 5.9).

- Zugabe von 1-2 µl RNA-Lösung zu 8 µl Auftragspuffer.
- Proben bei 62-65°C für 15 min denaturieren und im Anschluss sofort auf Eis überführen.

Die Proben können nun geladen werden. Als Standard dient ein RNA-Marker (0,24–9,5 kb; 1 µg/µl), der bei -70°C gelagert wird, und vor seiner Verwendung ebenfalls denaturiert werden muss.

### Toluidinblau-Färbung

Das RNA-Gel wird in einer 0,1% Toluidinblau-Lösung für 5-15 min eingefärbt und mit 10-20% Ethanol unter leichtem Schwenken wieder entfärbt, bis die Banden im Gel zu erkennen sind. Dafür muss der Ethanol mehrmals gewechselt werden.

## 6.2.5 PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren

### 6.2.5.1 Standard und ProofStart PCR

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 (z.B. pGEM®-T Easy).

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. 6: 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 Plasmid PCR-Fragment	>100 ng ~40 ng ~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. 7: 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 Plasmid PCR-Fragment	100 -1000 ng 1-50 ng 1-50 ng	variabel
ProofStart DNA Polymerase	2,5 U/µl	2,5 U (Template <2kb) 5 U (Template >2kb)	1 µl  2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>			variabel

Tab. 8: 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 die PCR-Reaktion entweder mit Paraffinöl überschichtet oder 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<sub>m</sub> und T<sub>a</sub>) der Primer**

Die T<sub>m</sub> kann für Primer mit einer Länge um 20 Basen z.B. näherungsweise aus ihrem GC-Gehalt berechnet werden:

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

Die Annealingtemperatur (T<sub>a</sub>) 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; 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)	Synthese
	72°C (Template <1 kb)	
5 min	68°C (Template >1 kb)	Vervollständigung begonnener DNA-Stränge
	72°C (Template <1 kb)	
5-15 min	4°C	Kühlung

Tab. 9: 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. 10: ProofStart PCR-Programm.

### 6.2.5.2 RT-PCR

Die reverse Transkription (cDNA-Synthese) dient hauptsächlich dem Nachweis der Expression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben, Organen etc. und der Herstellung von cDNA-Banken. Da RNA nicht amplifiziert werden kann, wird sie zunächst mit einer viralen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer werden meist Oligo-d(T)s aus 16-20 Thymidinen, oder zufällige Hexamere („random hexameres“) verwendet. Oligo-d(T)-Primer binden am poly-A<sup>+</sup>-Schwanz am 3'-Ende der mRNA und ermöglichen die Synthese vollständiger cDNAs bis zu ca. 2 kb Länge. Zufällige Hexamer-Primer hingegen hybridisieren beliebig an die mRNA, wodurch es ermöglicht wird auch alle Bereiche längerer mRNAs revers zu transkribieren. Soll die Expression eines bestimmten Gens nachgewiesen werden, so wird seine DNA-Sequenz amplifiziert, indem, in einem zweiten PCR-Schritt (mit der cDNA als Template), spezifische Primer eingesetzt werden.

Da die prozessierte mRNA in Eukaryoten gespleißt und somit Intron frei ist, gibt die cDNA auch Aufschluss darüber, ob ein Gen in verschiedenen Isoformen expremiert (alternativ gespleißt) wird.

## Gesamt-RNA Isolierung

Für die gesamt-RNA Isolierung eignet sich der NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel (vgl. 6.2.8.3.1). Anders als im NucleoSpin® RNA II Kit Handbuch beschrieben wird die RNA final mit 100 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) eluiert.

## RNA Fällung

100 µl RNA-Lösung + 10 µl 3 M NaAc pH 5,2 (1/10 Vol)  
+ 200 µl 100% EtOH (2 Vol)

- RNA für mind. 3 h bei -70°C fällen.
- Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 14000 rpm.
- Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> rüchlösen und bis zur RT-PCR bei -20°C lagern.

## RNA-Mengenabschätzung

Die gesamt-RNA Ausbeute lässt sich mittels eines 1% Agarosegels an Hand der rRNA- und tRNA-Banden mit ausreichender Genauigkeit abschätzen.

## RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

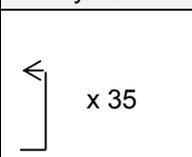
20 µl Ansatz:	
x µl	~0,5 µg gesamt-RNA
y µl	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
2 µl	10x TaqMan® RT-Puffer
4 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1 µl	Oligo-d(T)s (50 µM) bzw. „random hexameres“
4,4 µl	MgCl (25 mM)
0,4 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
0,5 µl	MultiScribe™ RT (50 U/µl)

RT-PCR Programm:	
Temp. (°C)	Dauer (min)
25	20
48	45
95	5
4	10

Die verbleibende gesamt-RNA wird gefällt und bei -70°C gelagert.

## PCR mit „first strand cDNA“

30 µl Ansatz:	
2 µl	aus dem RT-PCR Ansatz
3 µl	10x PCR-Puffer
3 µl	dNTPs (je 2 mM)
3 µl	Primer Forward (10 µM)
3 µl	Primer Reverse (10 µM)
0,6 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
15,4 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

PCR Programm:		
Temp. (°C)	Dauer	Zyklen
94	30 sec	
94	30 sec	
60	1 min	
68	2 min	
68	7 min	
4	15 min	

Für die meisten Transkripte sind 30-40 PCR-Zyklen ausreichend. Handelt es sich jedoch um ein Transkript mit geringer Abundanz, so wird die Anzahl der Zyklen auf 45-50 erhöht.

## 6.2.6 Sequenzierung

Sequenziert wurde bei MWG-Biotech ([www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)).

## 6.2.7 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.

### 6.2.7.1 Alkalische Phosphatase (AP) Behandlung

Nach einem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Die AP katalysiert die Dephosphorylierung der 5'-Enden und verhindert damit die Selbstligation von linearisierten Plasmiden.

- Plasmid-DNA fällen (vgl. 6.2.1).
- Pellet in 42 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendieren.
- 5 µl 10x AP-Puffer zugeben.
- 0,5 µl AP (1 U/µl) mit 2,5 µl H<sub>2</sub>O verdünnen.
- 1,5 µl der Verdünnung zur DNA-Lösung pipettieren und 30 min bei 37°C inkubieren.
- Vorgang mit den verbleibenden 1,5 µl der Verdünnung wiederholen.
- Reaktionsansatz mit Phenol-Chloroform (1:1) ausschütteln.
- wässrige Phase mit EtOH fällen (vgl. 6.2.1.1).
- Pellet in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> oder 1x T0.1E rüchlösen.

### 6.2.7.2 Ligation

In einer Ligation werden fünfmal mehr DNA-Fragment-Moleküle als Vektor-Moleküle eingesetzt:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

10 µl Standard-Ligationsansatz:

25-50 ng	Vektor
x µl	DNA-Fragment
1 µl	25x BSA
1 µl	10x Ligasepuffer (enthält 1-5 mM rATP)
y µl	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
0,2-1 µl	T4 DNA-Ligase (3 Weiss Units/µl)

Bei Fragmenten mit überhängenden Enden reicht meistens eine Inkubation des Ligationsansatzes für 1 h bei RT aus. Die Ligation glatter Enden ist dagegen weniger effizient, weshalb man den Ligationsansatz für mind. 4 h bei 16°C oder üN bei 4°C inkubiert.

### 6.2.7.3 Herstellung kompetenter Zellen

#### 6.2.7.3.1 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  $\mu\text{g}$  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  $\text{OD}_{550}$  von  $<0,5$  bei 37°C und 140 rpm (für ca. 2 h) anziehen.
- 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 rüchlösen.
- 100  $\mu\text{l}$  Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern.

#### 6.2.7.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen (Easy Pore)

Elektrokompetente Zellen sind toleranter gegenüber großen DNA-Mengen ( $\geq 1 \mu\text{g}$ ), 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  $\text{OD}_{600}$  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 rüchlösen.
- 50  $\mu\text{l}$  Aliquote schockgefrieren und bei -70°C lagern, oder sofort verwenden.

#### 6.2.7.3.3 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

- 200 ml YEB-Medium (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rif) mit Agrobakterien (GV3101, Glycerindauerkultur) 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 rüchlösen und abzentrifugieren.
- Die verbleibenden 2 Pellets in insg. 20 ml eiskalter Glycerinlösung vereinigen.
- Zellen abzentrifugieren und mit 4 ml eiskalter Glycerinlösung waschen.
- Agrobakterien in 2 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendieren.
- 100  $\mu\text{l}$  Aliquote sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern.

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

- Aliquot kompetenter Zellen (XL-1 Blue, vgl. 6.2.7.3.1) auf Eis auftauen.
- 50-100 ng Plasmid-DNA (max. 10 µl) zugeben und vorsichtig mischen.
- In ein vorgekühltes Reagenzglas überführen und 20-30 min auf Eis inkubieren.
- 2-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Ansatz danach sofort auf Eis stellen.
- 0,9 ml LB-, oder dYT-Medium zugeben und für 45-60 min bei 37°C im Roller inkubieren.
- 100 µl auf einer LB-, oder dYT-Platte mit Selektionsantibiotikum ausplattieren.
- Inkubation üN bei 37°C im Brutschrank.

### 6.2.7.5 Elektroporation

- 50 µl Aliquot elektrokompenter *E. coli* Zellen (vgl. 6.2.7.3.2) auf Eis auftauen.
- Mit ~100 ng Plasmid-DNA (gelöst in H<sub>2</sub>O) 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.
- Elektroporationskonditionen: 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 gekühltes 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 Aliquot kompetenter Zellen (GV3101, vgl. 6.2.7.3.3) 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.

## 6.2.8 Methoden für die Präparation von Nukleinsäuren

### 6.2.8.1 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.

- 2 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) rücklosen 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 Isopropanol fällen (vgl. 6.2.1.2; 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. 6.2.1.2).

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. 6.2.2.1) wieder entfernt werden.

### 6.2.8.2 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) für 30 sec auf höchster Stufe homogenisieren und umgehend 600 µl 2x CTAB-Puffer zugeben.
- Ansatz kurz vortexen und anschließend für mind. 30 min bei 65°C inkubieren.
- 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und 15 sec vortexen.
- 5 min abzentrifugieren und ~450 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. 6.2.1.2) durchführen.

Nach der Isolierung der genomischen DNA kann die ebenfalls isolierte, störende gesamt-RNA durch einen RNase A Verdau entfernt werden (vgl. 6.2.8.1).

### 6.2.8.3 Gesamt-RNA Isolierung

#### 6.2.8.3.1 NucleoSpin® RNA II Kit

Der NucleoSpin® RNA II Kit eignet sich zur Isolierung von gesamt-RNA aus bis zu 100 mg Pflanzenmaterial. Die Methode basiert auf der Lyse von Zellen mit Hilfe chaotroper Ionen

und einer sofortigen Inaktivierung von RNasen. Die RNA wird im Anschluss durch Adsorption an eine Silica-Membran aus der Lösung isoliert.

Alle zur gesamt-RNA Isolierung benötigten Puffer sind im Kit enthalten. Sie kann bei RT durchgeführt werden. Detaillierte Angaben finden sich im NucleoSpin® RNA II Kit Handbuch.

#### 6.2.8.3.2 Gesamt-RNA Präparation nach Logemann et al. (1987)

Die gesamt-RNA Präparation nach der Methode von Logemann et al. (1987) ermöglicht die Isolierung größerer Mengen RNA aus bis zu 3 g Pflanzenmaterial. Die Ausbeute an gesamt-RNA beträgt normalerweise ca. 0,02-0,05% des Ausgangsmaterials, was 200-500 µg RNA pro Gramm Pflanzenmaterial entspricht.

Sobald mit RNA gearbeitet wird, müssen grundsätzlich alle Lösungen und die zum Einsatz kommenden Gefäße RNase frei sein. Reibschalen, Pistille und Corex-Röhrchen werden mit einer 1/10 verdünnten 12%igen Natrium-Hypochlorit-Lösung behandelt und im Anschluss mehrfach mit H<sub>2</sub>O gespült.

- Reibschale und Pistill mit flüssigem Stickstoff vorkühlen
- 1-2 g gefrorenes Pflanzenmaterial (-70°C) mörsern und dabei nicht antauen lassen.
- 10 ml R1-Puffer (versetzt mit 42,5 µl β-Mercaptoethanol) zugeben.
- Homogenisierte Lösung in ein 50 ml Corex-Röhrchen überführen.
- Für 10 min bei 14000 rpm (JA20, Beckmann) und 4°C zentrifugieren.
- Überstand in ein 50 ml Falcon überführen.
- 10 ml Phenol/Chloroform zugeben und gut schütteln.
- Für 10 min bei 4500 rpm (SX4250, Beckmann Coulter™) und 4°C zentrifugieren.
- Wässrige Phase in ein neues 50 ml Falcon überführen.
- Vorgang mit 10 ml Chloroform wiederholen.
- RNA im Corex-Röhrchen mit 1/10 Vol 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Vol 100% EtOH fällen.
- 2 h oder ün bei -20°C inkubieren.
- Für 30 min bei 14000 rpm (JA20, Beckmann) und 4°C abzentrifugieren.
- Pellet 2x mit 20 ml 3 M NaAc pH 5,2 waschen und jeweils für 10 min bei 14000 rpm (JA20, Beckmann) und 4°C abzentrifugieren.
- Pellet mit 20 ml 70% EtOH waschen (und ün bei -20°C inkubieren).
- Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm (JA20, Beckmann) und 4°C.
- Überstand abgießen, kurz anzentrifugieren und den restlichen Überstand abziehen.
- Pellet gut trocknen lassen und anschließend in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> rücklösen.

#### 6.2.8.4 mRNA Isolierung

Der PolyAtract® mRNA Isolierungs-Kit von Promega basiert auf der Interaktion von Streptavidin und Biotin, und ermöglicht die Extraktion von mRNA aus der gesamt-RNA Lösung. Der 3' poly A-Schwanz einer prozessierten mRNA bindet hierbei an biotinylierte Oligo(dT)-Primer, welche mittels mit Streptavidin beschichteter, paramagnetischer Partikel abgefangen und gereinigt werden. Die Ausbeute beträgt ca. 1-2% der eingesetzten gesamt-RNA. (Durchführung nach Angaben des Herstellers.)

## 6.2.9 Nachweismethoden für mRNA

### 6.2.9.1 Northern Blot

Des Northern Blot Verfahren dient dem Nachweis spezifischer RNA (meist mRNA), also der Analyse der Expression eines bestimmten Gens. Die extrahierte gesamt- oder mRNA wird dabei elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (geblottet). Danach können RNA-Sequenzen von Interesse durch die Hybridisierung mit komplementären, (radioaktiv) markierten Sonden detektiert, ihre Transkriptgröße bestimmt oder alternativ gespleißte mRNAs ermittelt werden. Die nachfolgende Anleitung beschreibt eine Northern Blot Technik bei der aus Pflanzengewebe isolierte mRNA als Ausgangsmaterial verwendet wird.

#### Gesamt-RNA Präparation

Die gesamt-RNA wird nach der Methode von Logemann et al. (1987) isoliert (vgl. 6.2.8.3.2).

#### DNase-Verdau der gesamt-RNA

500 µl gesamt-RNA werden mit 5 µl DNase I (RNase-frei, 10 U/µl) versetzt und 30 min (-1 h) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Vollständigkeit des DNase-Verdaus wird im Anschluss mittels eines 1% Agarosegels (vgl. 6.2.4.1) überprüft. Im Gel sollten die zwei rRNA-Banden (25S und 16S), die tRNA-Bande und im Idealfall mRNA, aber keine DNA-Bande zu erkennen sein.

#### Quantifizierung der gesamt-RNA mit Hilfe des Photometers

Die OD-Werte werden bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge (UV-Licht) mit Hilfe von Quarzküvetten gemessen. Für die Messung werden 5 µl der gesamt-RNA Lösung mit 995 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt und 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> dient als Referenz.

Es gilt:  $OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml RNA}$   
 $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8-2,0$  (reine bis sehr reine RNA)

#### Lagerung der gesamt-RNA

Kurzzeitig: bei -70°C  
 Langfristig: in >2 Vol 100% EtOH und 1/10 Vol 3 M NaAC pH 5,2 bei -70°C

Falls die gesamt-RNA nicht direkt zur mRNA Isolierung eingesetzt wird, kann sie gefällt monatelang bei -70°C gelagert werden.

#### mRNA-Präparation

Für die mRNA Isolierung eignet sich der PolyAtract® mRNA Isolierungs Kit von Promega (vgl. 6.2.8.4). Die Ausbeute beträgt ca. 1-2% der eingesetzten gesamt-RNA. Die mRNA liegt nach dem finalen Elutionsschritt gelöst in 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> vor. Um sie auf ein RNA-Gel laden zu können, wird sie gefällt (bei -70°C in >2 Vol 100% EtOH und 1/10 Vol 3 M NaAC pH 5,2) und später in RNA-Auftragspuffer rückgelöst (s.u.).

### Formaldehyd-Gelelektrophorese

- 1,2%iges Formaldehydgel vorbereiten (vgl. 6.2.4.4).
- Zentrifugation der gefällten mRNA für 10 min bei 14000 rpm und 4°C.
- Pellet mit 70% EtOH waschen.
- Überstand abnehmen und das Pellet gut trocknen (Speedvac für  $\leq 5$  min; EtOH-Reste verhindern, dass die RNA vollständig in die Taschen des Gels sinken kann).
- Pellet und 2  $\mu\text{g}$  RNA-Marker (0,24-9,5 kb, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in je 20  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer aufnehmen.
- Proben bei 62-65°C für 15 min denaturieren und im Anschluss sofort auf Eis überführen.

Die Proben können nun geladen werden. Zwischen dem Längenmarker und den mRNA-Proben sollte mindestens eine Geltasche freigelassen werden. Seine Laufspur wird später vom Gel abgeschnitten und mit Toluidinblau gefärbt (vgl. 6.2.4.4), damit die Laufweite der Marker-Banden mit Hilfe eines Lineals dokumentiert und photographiert werden kann. Dazu wird der Nullpunkt des Lineals an die Geltaschen angelegt.

Die Elektrophorese wird nach dem Laden der Proben für 1-2 h bei 50-70 Volt durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels bis auf 2 cm erreicht hat.

### Northern Blot

- 1,2%iges Formaldehydgel 2x je 20 min in 20x SSC schwenken.
- Wanne mit 20x SSC-Puffer vorbereiten und ihre Mitte mit einer Glasplatte abdecken.
- Vier 3 mm dicke Streifen Whatmanpapier, die Nylonmembran (Hybond-N+) und eine ca. 5 cm dicke Lage von saugfähigem Zellstoff auf die Breite des Gels zurechtschneiden.
- Zwei zugeschnittene Whatmanpapiere und die Nylonmembran mit 20x SSC tränken.
- Einen längeren Streifen Whatmanpapier mit 20x SSC anfeuchten und luftblasenfrei auf die Glasplatte legen, sodass eine Brücke zwischen Glasplatte und Pufferwanne gebildet wird.
- Formaldehydgel luftblasenfrei und mit den Taschenöffnungen nach unten auf die Whatmanbrücke legen.
- Die mit 20x SSC durchtränkte Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel legen.
- Ränder der Nylonmembran mit Parafilmstreifen abdecken.
- Obere, rechte Ecke der Membran als Orientierungshilfe abschneiden.
- Die zwei mit 20x SSC getränkten und zwei weitere, trockene Whatmanpapiere, sowie einen 5 cm dicken saugfähigen Papierstapel der Reihe nach auf die Membran legen.
- Mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschweren.

Man blottet die mRNA für  $\geq 12$  h. Anschließend wird der Northern Blot abgebaut und die Nylonmembran zur Fixierung der RNA bei 80°C für mind. 1 h gebacken. Sie kann bis zur Weiterverwendung bei RT gelagert werden.

### Hybridisierung geblotteter Membranen

Bei der Hybridisierung der geblotteten Membran muss nicht mehr zwingend darauf geachtet werden, dass Lösungen und Geräte RNase frei sind. Für den Fall, dass Probleme auftreten, sollte allerdings auf solche zurückgegriffen werden.

- 50 ml Prähybridisierungslösung vorbereiten.
- Geblottete Membran 1-3 h bei 42°C im Schüttelwasserbad prähybridisieren.

Der Prähybridisierungsschritt ist notwendig um eine unspezifische Bindung der  $^{32}\text{P}$ -markierten einzelsträngigen DNA (ssDNA) zu verhindern. Als Lieferant für unspezifische ssDNA wird üblicherweise Heringssperma verwendet. Während der Prähybridisierung wird eine geeignete DNA-Probe radioaktiv markiert (Oligolabeling, s.u.).

- Hybridisierung der Nylonmembran üN bei 42°C mit der radioaktiv markierten DNA-Probe in 50 ml Hybridisierungslösung (Schüttelwasserbad).
- Membran 20 min mit 2x SSC/0,5% SDS bei RT unter stetigem Schwenken waschen.
- Membran 20 min mit 2x SSC/0,1% SDS bei RT unter stetigem Schwenken waschen.
- Feuchte Membran mit Frischhaltefolie umwickeln und auf einen Phosphor-Screen (vor Verwendung 10 min belichten) auflegen.
- Phosphor-Screen der radioaktiv markierten Membran mind. 4 h aussetzen.
- Signale mit Hilfe eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics, USA) visualisieren.

Die Membran kann, feucht in Frischhaltefolie gewickelt, längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Sie wird, falls notwendig, ohne sie mit heißer, 0,1%iger SDS-Lösung zu stripfen, rehybridisiert, da sonst zuviel Template verloren geht. Schwache Signale nehmen ohnehin nach erneutem Prähybridisieren und Hybridisieren signifikant ab.

### Oligolabeling

Zur Detektion einer spezifischen mRNA wird eine geeignete DNA-Probe nach einer modifizierten Methode von Feinberg und Vogelsang (1983; 1984) radioaktiv markiert.

- 50-100 ng DNA in 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  5 min bei 100°C im Wasserbad denaturieren.
- Die Proben anschließend sofort auf Eis stellen.
- Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  5x Oligomix, 5  $\mu\text{l}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Enzym (5 U/ $\mu\text{l}$ ).
- Vorsichtig mischen und mindestens 1 h bei RT inkubieren.
- Zugabe von 1 Vol 2x Oligo-STOP-Puffer und 2 Vol 100% EtOH (Hochsalzfällung).
- Zentrifugation für mind. 15 min bei 14000 rpm und 18°C.
- Pellet in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aufnehmen.
- DNA 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturieren und danach sofort auf Eis stellen.
- Die markierte DNA zur Hybridisierungslösung pipettieren.

### 6.2.9.2 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung, mit Digoxigenin markierten Sonden, ermöglicht einen sensitiven Nachweis von mRNA in Organen, Geweben und einzelnen Zellen. Auf diese Weise kann die gewebs- oder zelltypspezifische Expression eines bestimmten Gens, und mitunter auch ihr zeitlicher Verlauf, verfolgt werden.

#### 6.2.9.2.1 Herstellung von Gewebedünnschnitten aus frischem Pflanzenmaterial

Als Präparate für den Nachweis von pflanzlicher mRNA eignen sich Gewebedünnschnitte. Für ihre Herstellung wird frisches Material fixiert und danach über mehrere Tage hinweg dehydriert und in Wachs eingebettet.

## Fixierung (Tag 1)

Um das frische Pflanzenmaterial zu fixieren wird 4% Formaldehyd in 1x PBS verwendet. Ziel des Fixierungsschrittes ist es, indirekt den Abbau von RNA zu verhindern und sie trotzdem für die Sonde zugänglich zu machen. Das Formaldehyd in der Fixierlösung vernetzt Proteine ("cross-linking") und inhibiert den enzymatischen Abbau des behandelten Gewebes.

Für eine Fixierung werden pro 2 ml Eppendorf-Gefäß mit Pflanzengewebe insgesamt 3 ml Fixierlösung benötigt, was bei 10 Gefäßen 1,2 g Paraformaldehyd auf 30 ml 1x PBS entspricht. Die Fixierlösung muss vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden, da Formaldehyd flüchtig ist.

Bsp.: Fixierung von *A. thaliana* Schoten

- 2 ml Eppendorf-Gefäße beschriften und die Beschriftung mit Tesafilm überkleben.
- Je 1,5 ml Fixierlösung in jedes Reaktionsgefäß pipettieren und auf Eis stellen.
- Pro Eppendorf-Gefäß 15-20 grüne Schoten absammeln.
- Beide Enden einer jeden Schote mit einem sterilen Skalpell abtrennen (größere Schoten zusätzlich zweiteilen) und die Schoten in ein Eppendorf-Gefäß überführen.
- Reaktionsgefäße baldmöglichst auf Eis evakuieren.
- Alle 15 min langsam, (sonst nimmt das Gewebe Schaden), belüften.
- Schoten mit sterilen Pipettenspitzen (oder ähnlichem) untertauchen.
- Vorgang wiederholen bis alle Schoten auf den Boden gesunken sind.
- Fixiermittel erneuern und die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 4°C lagern.

Alternativ können mit dieser Methode auch andere Pflanzenteile, bis hin zu *A. thaliana* Keimlingen, oder Mais Embryonen fixiert werden. Dabei muss darauf geachtet werden, die 2 ml Reaktionsgefäße nicht zu dicht zu befüllen.

## Dehydrierung (Tag 2)

Alle nachfolgenden Schritte werden (in den 2 ml Eppendorf-Gefäßen) im Kühlraum und unter andauerndem Schütteln durchgeführt.

- Fixierlösung entfernen und das Gewebe mit je 1 ml 1x PBS in  $H_2O_{dd}$  für 30 min waschen.
- Durch frisches 1x PBS ersetzen und für weitere 30 min waschen.
- Inkubation in je 1 ml 30% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.
- Inkubation in je 1 ml 40% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.
- Inkubation in je 1 ml 50% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.
- Inkubation in je 1 ml 60% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.
- Inkubation in je 1 ml 70% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.

Die angegebenen Zeiten dürfen nicht unterschritten werden. Nach Zugabe von 70% Ethanol mit 0,85% NaCl kann die EtOH-Reihe unterbrochen werden, um die Schoten (usw.) üN, oder bis zu vier Monaten, bei 4°C aufzubewahren.

- Inkubation in je 1 ml 85% EtOH mit 0,85% NaCl (w/v) für 1 h.
- Inkubation in je 1 ml 95% EtOH für 1 h.

Falls die Ethanol-Reihe beim 70% EtOH-Schritt nicht unterbrochen wurde, endet hier Tag 2 mit einer Inkubation bei 4°C üN.

### Dehydrierung (Tag 3)

Alle weiteren Schritte werden bei RT im Thermomixer (Eppendorf) durchgeführt. Dem Pflanzengewebe wurde durch die aufsteigende EtOH-Reihe Chlorophyll entzogen. Eosin verleiht ihm zum Ausgleich einen rosa Farbton, welcher später die Unterscheidung zwischen Gewebe und Wachs erleichtert.

- Pflanzenmaterial in je 1 ml 100% EtOH mit 0,1% Eosin (w/v) für 30 min inkubieren.
- Lösung erneuern und weitere 30 min inkubieren.
- 2x in 100% EtOH für 1 h inkubieren.
- Durch HistoClear und EtOH im Verhältnis 1/3 ersetzen und 1h inkubieren.
- Durch HistoClear und EtOH im Verhältnis 1/1 ersetzen und 1h inkubieren.
- Durch HistoClear und EtOH im Verhältnis 3/1 ersetzen und 1h inkubieren.
- Lösung gegen 100% HistoClear austauschen und 1 h inkubieren.
- 100% HistoClear erneuern und eine weitere Stunde inkubieren.

Das Pflanzengewebe wird in 100% HistoClear mit 3-4 Paraplast-Chips üN bei RT ohne zu schütteln inkubiert. Für den Folgetag werden außerdem Paraplast-Chips üN in 50 ml Falcons bei 60°C im Brutschrank geschmolzen. Paraplast darf nicht über 60°C erhitzt werden. Höhere Temperaturen führen zur Zerstörung von synthetischen Polymeren, welche dem Paraplast beigefügt wurden, um Schnitte durch das Wachs zu erleichtern.

### Einbettung (Tag 4)

- Pflanzengewebe bei 42°C ohne zu Schütteln im Thermomixer inkubieren.
- Bis zur Sättigung alle 30 min zwei Paraplast-Chips zugeben.
- Eppendorf-Gefäße in den 60°C Schrank überführen und Paraplast nachlegen bis die Gefäße maximal gefüllt sind (Reaktionsgefäßständer aus Aluminium erleichtern das Auswechseln des Wachses, welches sich bereits bei einem Temperaturverlust von 2°C zu verfestigen beginnt).
- Halbes Volumen entfernen, die Reaktionsgefäße mit geschmolzenem Wachs auffüllen und bei 60°C mind. 4 h inkubieren.
- Wachs entfernen, durch frisches, flüssiges Wachs ersetzen und üN bei 60°C inkubieren.

### Einbettung (Tag 5-7)

- Einbettung bei 60°C inkubieren und 2x täglich das Wachs erneuern.

Durch das mehrmalige Wechseln des Paraplasts wird die Konzentration an verbleibendem HistoClear gesenkt, welches das vollständige Aushärten der Einbettung verhindern würde. Wechselt man das Wachs in Zeitabständen von nur 3-4 h, also mindestens dreimal täglich, so kann das Verfahren um einen Tag verkürzt werden.

### Einbettung (Tag 8)

- Paraplast in den 2 ml Eppendorf-Gefäßen bei RT aushärten lassen.
- Wachskörper zurechtschneiden (steriles Skalpell) und in einem vorgefertigten, rechteckigen Alu-Förmchen zentral platzieren.
- Mit geschmolzenem Wachs übergießen und erneut bei RT aushärten lassen.

Im Kühlschrank (4°C) ist das eingebettete Gewebe mehrere Monate haltbar.

## Dünnschnitte

Die Wachsblöcke werden mit einer Rasierklinge auf Trapezform getrimmt. Dabei werden 2 mm Abstand zum eingebetteten Pflanzenmaterial eingehalten. Danach wird der Block im Mikrotom (Reichert-Jung) so angeordnet, dass die längere der beiden parallelen Seiten nach oben zeigt.

- 7-8 µm dicke Dünnschnitte anfertigen.
- Wassertropfen auf SuperFrost Ultra Plus Objektträger (Menzel-Gläser) pipettieren.
- Schnitte auf die Wassertropfen überführen.
- Objektträger auf einer 42°C heißen Wärmeplatte für mindestens 15 h trocknen lassen.

Die Objektträger können bei 4°C für mindestens zwei Monate gelagert werden.

### 6.2.9.2.2 Herstellung von Digoxigenin markierten RNA-Sonden

Einzelsträngige RNA-Proben eignen sich besser als Sonden, da sie im Vergleich zu doppelsträngiger DNA zu stärkeren *in situ* Signalen und einer geringeren, unspezifischen Hintergrundfärbung führen. Die Gründe dafür sind, dass „reannealing“ während der Hybridisierung unmöglich ist und mit größerer Stringenz gewaschen werden kann, da RNA-RNA Doppelstränge gegenüber DNA-RNA Doppelsträngen viel stabiler sind. Außerdem können unspezifisch gebundene RNA-Proben nach der Hybridisierung selektiv durch eine RNase A Behandlung entfernt werden.

Das Digoxigenin (DIG) System zur Herstellung der Sonden basiert auf einem Steroid, das aus den Blättern von Digitalis Pflanzen isoliert wurde. DIG ist über das Kohlenstoffatom in Position 5 des Pyrimidinringes über einen 11 Kohlenstoffatome langen „Spacer“ mit dem Uridin Nukleotid verbunden. RNA-Polymerasen wie zum Beispiel T3, T7 oder SP6 akzeptieren dieses Substrat, wodurch die *in vitro* Transkription mit DIG-UTP möglich wird.

Zur Herstellung des DNA-Templates für die RNA-Polymerase werden ca. 10 µg Plasmid (mit einer Sequenz von Interesse als Insert) mit 50 Units Enzym üN linearisiert. Es dürfen dazu keine Restriktionsenzyme verwendet werden, die einen 3'-Überhang produzieren. Der Verdau wird überprüft (1% Agarosegel, vgl. 6.2.4.1), eventuell nachverdaut und anschließend gereinigt (GFX™ Kit, vgl. 6.2.2.3). Nach der Reinigung wird die linearisierte Plasmid-DNA mit Hilfe eines 1% Agarosegels und λHindIII als Marker quantifiziert.

20 µl Transkriptionsansatz:

1 µg	linearisiertes Plasmid als Template
2 µl	10x Transkriptionspuffer
2 µl	10x Digoxigenin Labelling Mix (DIG-UTP Mix)
1 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	RNA-Polymerase (T3, T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase; 20 U/µl)
x µl	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>

- Transkriptionsansatz 4-4,5 Stunden im 37°C Wasserbad inkubieren.
- 4 µl DNase I (10 U; RNase frei) zugeben bei 37°C für 15 min verdauen.
- 0,5 Vol 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 2 Vol 100% EtOH zugeben.
- 30 min bis 1 h bei -70°C, oder üN bei -20°C ausfällen.
- Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für mind. 15 min.

- Überstand verwerfen und Pellet mit 70% EtOH in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> waschen.
- Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 10 min.
- Überstand abpipettieren und Pellet an der Luft für etwa 5 min trocknen lassen.
- In 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 1-2 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) aufnehmen und bei -20°C lagern.

Wenn die Transkriptionsreaktion nur wenig Sonde liefert, können die Ergebnisse mit höheren Konzentrationen an RNA-Polymerase und einer um 30 bis 60 min längeren Inkubationszeit verbessert werden. Im Allgemeinen liefert die T7 bzw. die SP6 RNA-Polymerase weit mehr Probe, als die T3 RNA-Polymerase.

### Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Qualität und Konzentration der synthetisierten RNA-Sonde sollte vor ihrem Einsatz mit einem denaturierenden Formaldehydgel überprüft werden (vgl. 6.2.4.4).

#### 6.2.9.2.3 Alkalische Hydrolyse

Nach ihrer Synthese werden die Transkripte einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, um Fragmente von ca. 150 bp Länge zu erhalten. Die Hydrolyse ist notwendig, weil kurze Sonden bessere *in situ* Signale und gleichzeitig weniger Hintergrund erzeugen. Die Hydrolysezeit wird mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung kalkuliert:

$$t = (L_0 - L_f) / (k \cdot L_0 \cdot L_f)$$

$t$  = Hydrolysezeit  
 $k$  = Hydrolysekonstante (0,11 kb/min)  
 $L_0$  = Ausgangslänge  
 $L_f$  = Endlänge

### Hydrolyse

- Sonden 1:1 mit Hydrolysepuffer versetzen.
- Inkubation für die berechnete Zeit bei 60°C im Wasserbad.
- Reaktion nach Ablauf der Zeit mit 1 µl 100% Essigsäure stoppen.

### Fällung

Die hydrolysierten Sonden werden mit 3 M NaAc pH 5,5 in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 100%igem Ethanol gefällt und im Anschluss mit 70% EtOH in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gewaschen (Ethanol fällung, vgl. 6.2.1.1). Danach werden sie in 40 µl 50% Formamid<sub>deionisiert</sub> aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 6.2.9.2.4 *In situ* Hybridisierung

Alle Gefäße werden vor der Verwendung mit destilliertem Wasser ausgewaschen und anschließend mit technischen Ethanol ausgewischt. Für die Herstellung der Lösungen wird autoklaviertes H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verwendet. Eine DEPC-Behandlung der Lösungen und das Backen der Glaswaren und Rührfische bei 160°C ist nur nötig, wenn Probleme bei der *in situ* Hybridisierung auftreten.

### Entparaffinisierung und Rehydrierung der Dünnschnitte

Die Entparaffinisierungs- und Rehydrierungsschritte dienen dazu das Gewebe permeabel zu machen, was u.a. später die Hybridisierung ermöglicht.

Alle nachfolgenden Inkubationsschritte werden in Polyoxymethylen-Behältern (VWR), oder Glaswannen (VWR) durchgeführt. Um die Objektträger (OTs) von einer Lösung zur nächsten überführen zu können, werden sie in einem dazugehörigen Glasgestell (VWR, ausreichend für 18-20 Objektträger) im „Zickzack“ angeordnet.

Der Proteinase K Puffer, 4% PFA in 1x PBS und die Triethanolamin (TEA) Lösung müssen vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden. Die Ethanol-Reihe kann dagegen sogar mehrmals verwendet werden, wenn man die Glaswannen nach Gebrauch abdichtet, oder Behälter aus Polyoxymethylen (POM) benutzt. Für einen Inkubationsschritt in einem POM-Behälter oder einer Glaswanne von ca. 85 cm Breite, 70 cm Tiefe und 50 cm Höhe werden jeweils 200 ml Lösung benötigt.

- Gewebe 2x 10 min mit 100% HistoClear unter andauerndem, langsamem Rühren in einer Glaswanne entparaffinisieren.
- Inkubation für 2x 2 min in 100% technischem Ethanol.
- Inkubation für 1 min in 95% technischem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
- Inkubation für 1 min in 90% technischem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
- Inkubation für 1 min in 80% technischem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 0,85% NaCl
- Inkubation für 1 min in 60% technischem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 0,85% NaCl.
- Inkubation für 1 min in 30% technischem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 0,85% NaCl.
- Inkubation in 0,85% NaCl für 2 min zur Stabilisierung.
- 2 min mit 1x PBS waschen.

### **Proteinase K Verdau**

Die Behandlung der Dünnschnitte mit Proteinase K, dient dem Verdau von Proteinen, welche die RNA-Sonde bei der Hybridisierung behindern würden. Ist die Proteinase K Konzentration zu niedrig, so erzielt man keinen Effekt. Ist sie dagegen zu hoch, wird das Gewebe durch den Verdau zu stark angegriffen. Es ist empfehlenswert eine vergleichsweise niedrige Proteinase K Endkonzentration (z.B. 1 µg/ml) zu wählen, denn das Verdauergebnis lässt sich am einfachsten durch eine Verkürzung oder Verlängerung der Inkubationszeit kontrollieren. Die Proteinaseaktivität wird im Anschluss mit Glycin inhibiert. Man verwendet dazu 1x PBS mit 0,2% Glycin (0,4 g auf 200 ml; 2 mg/ml Endkonzentration). Um eine vollständige Inaktivierung der Proteinase zu gewährleisten muss die Lösung jedes Mal frisch hergestellt werden.

- 20 µl Proteinase K Stocklösung (10 mg/ml) zu den auf 37°C vorgewärmten 200 ml Proteinase K Puffer pipettieren (1 µg/ml Endkonzentration).
- Inkubation der Objektträger für 20 min in der vorgewärmten Lösung.
- Inkubation für 2 min in 1x PBS mit 0,2% Glycin.
- 2 min mit 1x PBS waschen.

### **Postfixierung**

- 2 min mit frisch hergestellter, erkalteter Fixierlösung (4% PFA in PBS) nachfixieren.
- 2 min in 1x PBS waschen.

### **Acetylierung positiver Ladungen**

Durch die Acetylierung positiver Ladungen wird das unspezifische Binden der Hybridisierungs-Proben reduziert. Das Glasgestell mit den Objektträgern wird dazu über

einem Rührfisch in einer Glaswanne platziert. Danach werden 0,6 ml Essigsäureanhydrid zu 200 ml der vorbereiteten TEA-Lösung in eine Glasflasche pipettiert. Die Flasche wird verschlossen und sofort kräftig geschüttelt. Ihr Inhalt wird zügig, da Essigsäureanhydrid in H<sub>2</sub>O nur 30 sec stabil ist, zu den Objektträgern gegeben.

- Inkubation für 2 min unter andauerndem (erst schnellem, dann langsamem) Rühren.
- 2x 5 min mit 1x PBS waschen.
- Inkubation in 0,85% NaCl für 5 min.

### **Dehydrierung**

Die Dehydrierung der Gewebeschnitte ermöglicht ein besseres Penetrieren der Proben. Hierbei entsprechen die Ethanol- und NaCl-Konzentrationen denen der Rehydrierungs-Ethanolreihe. Die Objektträger durchlaufen die Ethanolreihe in 30 sec Schritten, ausgehend von der niedrigsten EtOH-Konzentration. Zuletzt wird frischer, 100%iger, technischer Ethanol verwendet. Die Objektträger können nun bei 4°C für einige Stunden in einer Glaswanne mit etwas Ethanol (Boden bedeckend) gelagert werden.

### **Hybridisierung**

Für die Hybridisierung werden zwei feuchte Kammern vorbereitet und auf 55°C vorgewärmt. Als feuchte Kammer können mit Deckel verschließbare, rechteckige Plastikschalen verwendet werden. Ihr Boden wird mit einer doppelten Lage saugfähigem Papier, welches man mit „Soaking Solution“ tränkt, ausgelegt. Um eine erhöhte Ablagefläche für die Objektträger zu schaffen, eignen sich zugeschnittene Einmal-Plastikpipetten, welche parallel zueinander in der Kammer festgeklemmt werden.

Das Hybridisierungssignal nimmt mit steigender Sondenkonzentration bis zum Sättigungspunkt zu. Wird er überschritten, so wird nur das Hintergrundsignal stärker. Bei Pflanzenmaterial verwendet man 40 ng Sonde pro kb Sondenlänge für jeden Objektträger. Das berechnete Probenvolumen wird mit Hybridisierungspuffer auf ein Endvolumen von 100 µl pro Objektträger gebracht. Hierbei wird für die sense- und antisense- Sonde jeweils ein Mastermix angefertigt.

Nach Herstellung des Mastermix aus Sonde und Hybridisierungspuffer, denaturiert man die Proben für 2 min bei 80°C im Wasserbad und stellt sie anschließend sofort auf Eis. Je Objektträger werden 100 µl Hybridisierungsmix entlang des Zentrums der Schnitte aufgetragen. Die Deckgläser legt man anschließend langsam auf, ohne Luftblasen zu verursachen. Die Schnitte werden nun über Nacht bei 45-60°C (je nach Sonde) in den abgeschlossenen, feuchten Kammern inkubiert. Hierbei werden sense- und antisense-Hybridisierungen strikt getrennt, indem man die Objektträger in zwei verschiedenen Kammern inkubiert.

Für den Folgetag werden 0,2x SSC und 2x SSC im 55°C Wasserbad vorgewärmt.

### **Waschen**

Nach dem Hybridisierungsschritt ist kein RNase-freies Arbeiten mehr nötig, da die nachzuweisende mRNA durch die antisense Sonde stabilisiert wird. Durch das Waschen der Schnitte sollen unspezifisch gebundene Sonden entfernt werden, was später die störende Hintergrundfärbung verringert. Die Objektträger werden dazu in einem Kunststoffgestell (VWR) aufgereiht und mit dessen Hilfe von einem POM-Behälter mit Waschlösung zum nächsten überführt.

- Deckgläser durch auf und ab bewegen der OTs in 55°C warmem 2x SSC entfernen.
- Objektträger 4x je 20 min in 0,2x SSC bei 55°C im Schüttelwasserbad inkubieren.
- 200 ml 37°C warmes 0,2x SSC vorbereiten.
- OTs für ca. 10 min im 37°C warmen 0,2x SSC-Puffer weiter abkühlen lassen.
- Inkubation in 1x PBS für wenige Minuten (oder über Nacht bei 4°C).

### **Blocking**

Um zu vermeiden, dass die Objektträger austrocknen, werden sie zügig, oder einzeln abfertigt. Zuerst lässt man das 1x PBS abtropfen, wischt die Unterseite der OTs mit Küchenpapier trocken und ordnet die OTs in einer feuchten Kammer (Küchenpapier getränkt mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) nebeneinander an. Danach werden je 1-2 ml 1x Blocking-Lösung gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Nach einer Inkubation für 30 min bei RT wird die Lösung erneuert und weitere 15 min inkubiert.

### **Equilibrierung**

- Blocking-Lösung auf das Küchenpapier abgießen und durch 2 ml BSA-Waschpuffer ersetzen.
- Inkubation für 45 min bei RT in der feuchten Kammer.

### **Antikörperbindung**

Die Antikörperlösung sollte frühestens 10 min vor Gebrauch hergestellt werden. Jeder Objektträger wird einzeln abgefertigt. Zuerst wird die BSA-Waschlösung auf das Küchenpapier abgegossen und die Unterseite des Objektträgers abgewischt. Anschließend pipettiert man 120 µl Antikörperlösung auf die Gewebeschnitte und legt das Deckglas unter Vermeidung von Luftblasen langsam auf. Danach werden die Objektträger in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1h 30 min inkubiert.

### **Waschen**

Jeder Objektträger wird einzeln abfertigt um das Antrocknen der Antikörper zu vermeiden, welches zu unspezifischen Signalen führen kann. Der Waschschrift dauert insgesamt 90 min.

- Deckgläser entfernen (vom OT rutschen lassen).
- OTs sofort mit 1-2 ml BSA Waschlösung überschichten.
- Inkubation für 30 min bei RT in der feuchten Kammer.
- Vorgang weitere 2x wiederholen.

### **Equilibrierung**

- Waschpuffer entfernen und die Objektträger in einer Box nebeneinander anordnen.
- Mit TNM-50 Puffer übergießen.
- 2x je 15 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubieren.

Das Detergent Triton-X 100 muss vollständig entfernt werden, sonst entsteht in der nachfolgenden Farbreaktion störendes Präzipitat.

## Farbreaktion

Für die Farbreaktion wird eine feuchte Kammer mit in TNM-50 Puffer getränktem Küchenpapier vorbereitet. Je Objektträger werden 120 µl Färbelösung auf die Schnitte pipettiert und die Deckgläser unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Anschließend lässt man die Objektträger bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss für 12 h inkubieren. Zur Sicherheit wird die feuchte Kammer hierfür mit Alufolie ummantelt. Nach 12 h wird die Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls nachgefärbt. Die Zeit die für die Farbreaktion benötigt wird, ist für jede Sonde unterschiedlich. Es kann 12 Stunden bis zu mehreren Tagen dauern bis ein deutliches Farbsignal zu erkennen ist.

## Stoppen der Farbreaktion und Eindeckeln

Um die Farbreaktion zu stoppen werden die Objektträger 5 min in 1x TE gewaschen. Danach entnimmt man sie dem Puffer, wischt ihre Unterseite mit Küchenpapier ab und lässt sie auf einer Wärmeplatte für 15 min zu trocknen. Zum anschließenden Eindeckeln eignet sich Entellan von Merck.

## 6.2.10 Yeast Two-Hybrid

Für die Yeast Two-Hybrid Experimente wurde das CytoTrap<sup>TM</sup>-System von Stratagene verwendet, welches im Gegensatz zu herkömmlichen Two-Hybrid Systemen den Nachweis einer Protein-Protein Interaktion im Zytoplasma ermöglicht. Dabei wurde nach dem Protokoll von Stratagene verfahren ([www.stratagene.com/manuals/217438.pdf](http://www.stratagene.com/manuals/217438.pdf)).

## 6.2.11 Pflanzentransformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

### 6.2.11.1 Plasmid Mini Präparation aus Agrobakterien

10 ml YEB-Medium (mit 35 µg/ml Rif und dem für das jeweilige Plasmid benötigten Antibiotikum) werden mit einer Einzelkolonie transformierter Agrobakterien (vgl. 6.2.7.5) 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 Eppendorfgläsern 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 Eppendorfglas überführen.
- RNase-Verdau (20 µg/ml) im 37°C Wasserbad für 30 min.
- Phenol-Chloroform-Extraktion durchführen (vgl. 6.2.2.1).
- Wässrige Phasen der zwei Proben vereinigen und mit Isopropanol fällen (vgl. 6.2.1.2).
- 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.

### 6.2.11.2 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 Agrobakteriensuspension 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 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 Pflanzentransformationslösung resuspendieren.
- Blüten von 4-7 Pflanzen für 10-20 sec in die Agrobakteriensuspension 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.
- Tüte danach entfernen und die transformierten Pflanzen nach 2-3 Wochen zum Abreifen der Samen nicht mehr gießen.

### 6.2.12 Mikroskopische Analysemethoden

#### 6.2.12.1 Klärung von Ovulen mit Hoyer's

- Grüne *A. thaliana* Schote in geeignetem Entwicklungsstadium abschneiden.
- Objektträger mit beidseitig klebendem Tesafilm versehen und die Schote darauf fixieren.
- Oberes und unteres Ende mit einem scharfen Skalpell abtrennen und die Schote vorsichtig am Septum entlang aufschneiden.
- Ovulen mit einer Pinzette auf den Objektträger überführen.
- Ovulen mit Hoyer's überschichten und mit einem Deckglas versehen.

Die Klärung dauert in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Ovule unterschiedlich lange. Je älter die Embryonen sind, desto zeitintensiver ist der Vorgang. Sobald die Oberflächenstruktur der Embryonen mit Hilfe der Phasenkontrast- oder der differentiellen Interferenzkontrast-Mikroskopie (Nomarski) zu erkennen ist (ZEISS Axiophot 1), können Aufnahmen gemacht werden. Dazu wurde das DCS700 System von Kodak, eine digitale Kamera (Nikon F5SLR) und die zugehörige Software (Kodak Photo Desk DCS) verwendet. Nach ca. einer halben Stunde werden die Präparate mit jungen Embryonen durch zu starke Klärung unbrauchbar.

### 6.2.12.2 DAPI-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) interkaliert in die DNA, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Kleine, Plasma-reiche und teilungsaktive Zellen (z.B. meristematische Zellen) lassen sich deshalb mit Hilfe der DAPI-Färbung gut vom umgebenden Gewebe unterscheiden.

#### Fixierung

Für die DAPI-Färbung muss das Pflanzenmaterial zuerst z.B. mit 4% Formaldehyd in 1x PBS fixiert werden (vgl. 6.2.9.2.1 (Fixierung, Tag1)). Das Fixiermittel wird anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS wieder entfernt.

#### Chlorophyllextraktion

Das Ergebnis der DAPI-Färbung lässt sich durch eine vorangehende Chlorophyllextraktion verbessern, da die störende Eigenfluoreszenz des Chlorophylls reduziert wird. Dazu durchläuft das Pflanzenmaterial eine aufsteigende Ethanol-Reihe (30%, 50%, 85%, 95% und 100% EtOH) für jeweils 5-10 min bei 40°C im Wasserbad. Der 100% EtOH-Schritt wird solange wiederholt, bis das Gewebe kein Chlorophyll mehr abgibt. Nach einer schrittweise durchgeführten Rehydrierung (absteigende Ethanolreihe) wird das Pflanzenmaterial wieder in 1x PBS aufgenommen.

#### Färbung

Im Fall von *A. thaliana* Embryonen ist, im Gegensatz zu anderem, chlorophyllhaltigerem Pflanzenmaterial, das Fixieren und die Chlorophyllextraktion vor der DAPI-Behandlung nicht von Vorteil.

- Zugabe von 15 µl DAPI (40 µg/ml) zu 6 ml 1x PBS (entspricht 0,1 µg/ml).
- Inkubation des Pflanzenmaterials in 1 ml Färbelösung für 10 min.
- Flüssigkeit abnehmen und dreimal mit 1x PBS waschen.

Derartig behandeltes Gewebe kann bei 365 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop (ZEISS Axiophot 1) unter Verwendung einer HB050 UV-Lichtquelle und eines Filtersystems (F46-000 von AHF) analysiert und in 1x PBS für 1-3 Tage bei 4°C gelagert werden.

### 6.2.12.3 DR5rev::GFP

Das *DR5rev::GFP* Konstrukt besteht aus dem synthetischen, Auxin-abhängigen Promotor *DR5* und dem Reporergeren *GFP* (vgl. 5.8.3). Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm fluoresziert GFP grün, wodurch man in Pflanzen, die mit dem *DR5rev::GFP* Konstrukt transformiert wurden, die Auxinmaxima nachweisen kann (ZEISS Axiophot 1 unter Verwendung einer HB050 UV-Lichtquelle und eines AHF F41-017 Filtersystems).

#### 6.2.12.4 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 in einer bestimmten Ebene, wodurch ein weit präziseres Bild entsteht.

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

- Embryos in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aus den Ovulen isolierten, 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 die grüne Fluoreszenz von GFP in den Zellen transgener *A. thaliana* Embryos zu dokumentieren.

- UPLSAPO 60x W (NA: 1,2) als Objektiv auswählen.
- GFP mit einer Wellenlänge von 488 nm (488 nm Argon Laser) anregen.
- Laserintensität auf 12-15% einstellen, um zu schnelles Bleichen des GFPs 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.

Bei einer Wellenlänge von 488 nm wird neben GFP auch noch die rote Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Chloroplasten angeregt. Die emittierte rote Fluoreszenz kann auf einem anderen Kanal simultan detektiert werden. Da sich jedoch die Dauer eines XYZ-Scans unter Verwendung zweier Kanäle verlängert, ist es sinnvoll die grüne bzw. rote Fluoreszenz nacheinander mit den gleichen Einstellungen aufzunehmen, um das frühzeitige Ausbleichen des GFPs zu verhindern. Die FluoView™ Software ermöglicht eine spätere Überlagerung der Bildserien (Prozessierung → Experiment editieren → Kanäle editieren → Kanäle vereinigen).

Die resultierenden Bilderserien können im Anschluss mit dem kostenlos erhältlichen Olympus FluoView Viewer analysiert und nachbearbeitet werden.

## 7. Literatur

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9, 841-857.

Aida, M., Ishida, T. and Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 126, 1563-1570.

Aida, M., Vernoux, T., Furutani, M., Traas, J. and Tasaka, M. (2002). Roles of *PIN-FORMED1* and *MONOPTEROS* in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 129, 3965-3974.

Baldino, F., Chesselet, M.-F. and Michael, E.L. (1989). High-resolution *in situ* hybridization histochemistry. *Methods in Enzymology* 168, 761-777.

Barton, M.K. and Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* 119, 823-831.

Baud, S., Bellec, Y., Miquel, M., Bellini, C., Caboche, M., Lepiniec, L., Faure, J.D. and Rochat, C. (2004). *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO Rep* 5, 515-520.

Benjamins, R., Ampudia, C.S., Hooykaas, P.J. and Offringa, R. (2003). PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol* 132, 1623-1630.

Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P. and Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 128, 4057-4067.

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jürgens, G. and 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. and Smyth, D.R. (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8, 505-520.

Berleth, T. and 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.

Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Lee, O.R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S.N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W.A. and Murphy, A.S. (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 131-147.

- Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Makam, S.N. and Murphy, A.S. (2004). Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* 134, 28-31.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and 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. and Anthony, R.G. (2003). Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci* 8, 424-431.
- Briggs, W.R. and Christie, J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 7, 204-210.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists).
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio-Techniques* 5, 376.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408, 967-971.
- Carraro, N., Forestan, C., Canova, S., Traas, J. and Varotto, S. (2006). *ZmPIN1a* and *ZmPIN1b* encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. *Plant Physiol* 142, 254-264.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2430-2439.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J. and 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. and Briggs, W.R. (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282, 1698-1701.
- 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.
- Conway, L.J. and Poethig, R.S. (1997). Mutations of *Arabidopsis thaliana* that transform leaves into cotyledons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10209-10214.

- Costa, L.M., Gutierrez-Marcos, J.F. and Dickinson, H.G. (2004). More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. *Trends Plant Sci* 9, 507-514.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.-D. and Friml, J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17, 520-527.
- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P. and Smyth, D.R. (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8, 155-168.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. and Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 10, 967-979.
- Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*, 2 edn (New York, Wiley & Sons).
- Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B. and Liscum, E. (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 236-241.
- Faure, J.D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraiser, V., Prinsen, E., Barlier, I., Van Onckelen, H., Caboche, M. and Bellini, C. (1998). The *PASTICCINO* genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* 125, 909-918.
- Feinberg, A.P. and Vogelsang, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Feinberg, A.P. and Vogelsang, B. (1984). Addendum: A technique for radiolabelling DNA restriction endonucleases fragments to high specificity. *Anal Biochem* 137, 266.
- Figuroa, P., Gusmaroli, G., Serino, G., Habashi, J., Ma, L., Shen, Y., Feng, S., Bostick, M., Callis, J., Hellmann, H. and Deng, X.W. (2005). *Arabidopsis* has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *Plant Cell* 17, 1180-1195.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.
- 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., Kajiwara, T., Kato, T., Trembl, B.S., Stockum, C., Torres-Ruiz, R.A. and 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.
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M. and Aida, M. (2004). *PIN-FORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development* 131, 5021-5030.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449, 1053-1057.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, 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.
- Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E. and Martienssen, R.A. (2006). Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the *trans*-acting siRNA pathway. *Curr Biol* 16, 933-938.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jürgens, G. (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112, 219-230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. and Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425-428.
- Gingerich, D.J., Gagne, J.M., Salter, D.W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L. and Vierstra, R.D. (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280, 18810-18821.
- Grebe, M. (2005). Plant biology. Enhanced: growth by auxin: when a weed needs acid. *Science* 310, 60-61.
- Haberer, G., Erschadi, S. and Torres-Ruiz, R.A. (2002). The *Arabidopsis* gene *PEPINO/PASTICCINO2* is required for proliferation control of meristematic and non-meristematic cells and encodes a putative anti-phosphatase. *Dev Genes Evol* 212, 542-550.
- Haga, K., Takano, M., Neumann, R. and 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.
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. and Jürgens, G. (2002). The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* 16, 1610-1615.
- Hamann, T., Mayer, U. and Jürgens, G. (1999). The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 126, 1387-1395.

- Hardtke, C.S. and 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.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A. and 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.
- Hibara, K., Karim, M.R., Takada, S., Taoka, K., Furutani, M., Aida, M. and Tasaka, M. (2006). *Arabidopsis* *CUP-SHAPED COTYLEDON3* regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell* 18, 2946-2957.
- Hicke, L. (2001a). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-530.
- Hicke, L. (2001b). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E. and Briggs, W.R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120-2123.
- Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K. and Sakai, T. (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 887-896.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y. (2002). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* 43, 467-478.
- Jenik, P.D. and Barton, M.K. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132, 3577-3585.
- Jönsson, H., Heisler, M.G., Shapiro, B.E., Meyerowitz, E.M. and Mjolsness, E. (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1633-1638.
- Jürgens, G. and Mayer, U. (1994). *Arabidopsis*. In: EMBRYOS. Colour Atlas of Development. (London, Wolfe Publishing).
- Jürgens, G., Torres-Ruiz, R.A., Laux, T., Mayer, U. and Berleth, T. (1994). Early events in apical-basal pattern formation in *Arabidopsis*. In *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*. (Berlin, Springer-Verlag).
- Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A. and Hattori, T. (2005). *LEAFY COTYLEDON1* controls seed storage protein genes through its regulation of *FUSCA3* and *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*. *Plant Cell Physiol* 46, 399-406.

- Kaplan, D.R. and 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.
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N.G. and McCourt, P. (1994). *fusca3*: a heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 589-600.
- Kerstetter, R.A., Bollman, K., Taylor, R.A., Bomblied, K. and Poethig, R.S. (2001). *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* 411, 706-709.
- Kimura, M. and Kagawa, T. (2006). Phototropin and light-signaling in phototropism. *Curr Opin Plant Biol* 9, 503-508.
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. and Fischer, R.L. (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 8, 137-153.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204, 383-396.
- Kramer, E.M. (2004). PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends Plant Sci* 9, 578-582.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. and Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 87-96.
- Laux, T., Wurschum, T. and Breuninger, H. (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* 16 *Suppl*, S190-202.
- Leyser, O. (2005). Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? *Cell* 121, 819-822.
- Li, J., Yang, H., Peer, W.A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E.L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S. and Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* 310, 121-125.
- Liscum, E. and Briggs, W.R. (1995). Mutations in the *NPH1* locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7, 473-485.
- Liscum, E. and Briggs, W.R. (1996). Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol* 112, 291-296.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P. and Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* 28, 465-474.

- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163, 16-20.
- Lomax, T.L., Muday, G.K. and Rubery, P.H. (1995). Auxin transport. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Netherlands, Kluwer Academic Publishers), pp. 509–530.
- Long, J.A. and Barton, M.K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 125, 3027-3035.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379, 66-69.
- Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R. and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 312, 1520-1523.
- Long, J.A., Woody, S., Poethig, S., Meyerowitz, E.M. and Barton, M.K. (2002). Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the *TOPLESS* locus. *Development* 129, 2797-2806.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93, 1195-1205.
- Lukowitz, W., Gillmor, C.S. and Scheible, W.R. (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123, 795-805.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P. and Barton, M.K. (1999). The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* 126, 469-481.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M. and 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.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. and Bennett, M.J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J* 18, 2066-2073.
- Mattsson, J., Ckurshumova, W. and Berleth, T. (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol* 131, 1327-1339.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 560-564.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.

- Mayer, U., Torres Ruiz, R.A., Berleth, T., Miséra, S. and Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 402-407.
- McConnell, J.R. and Barton, M.K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125, 2935-2942.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M.K. (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411, 709-713.
- McSteen, P. and Hake, S. (2001). *barren inflorescence2* regulates axillary meristem development in the maize inflorescence. *Development* 128, 2881-2891.
- McSteen, P., Malcomber, S., Skirpan, A., Lunde, C., Wu, X., Kellogg, E. and Hake, S. (2007). *barren inflorescence2* encodes a co-ortholog of the PINOID serine/threonine kinase and is required for organogenesis during inflorescence and vegetative development in maize. *Plant Physiol* 144, 1000-1011.
- Meinke, D.W. (1992). A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* 258, 1647-1650.
- 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. and Friml, J. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130, 1044-1056.
- Morita, Y. and Kyojuka, J. (2007). Characterization of *OsPID*, the rice ortholog of *PINOID*, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant Cell Physiol* 48, 540-549.
- Motchoulski, A. and Liscum, E. (1999). *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286, 961-964.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J* 17, 1799-1809.
- Nole-Wilson, S. and Krizek, B.A. (2006). *AINTEGUMENTA* contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with *YABBY* genes. *Plant Physiol* 141, 977-987.
- Odell, J.T., Nagy, F. and 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. and Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677-684.
- Olsen, O.A. (2004). Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16 Suppl, S214-227.

- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y.D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N. and Friml, J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435, 1251-1256.
- Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I. and Palme, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* 10, 170-177.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C. and Bennett, M.J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J* 25, 399-406.
- Pedmale, U.V. and 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.
- Peters, B. (2007). Das *Arabidopsis thaliana*-Gen *ENHANCER OF PINOID*. Expressionsanalysen und Etablierung von Reporter-Gen-Konstrukten. Bachelorarbeit (Lehrstuhl für Genetik, TUM).
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalova, E. and Friml, J. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312, 914-918.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. and 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. *Mol Cell* 3, 275-285.
- Pintard, L., Willems, A. and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23, 1681-1687.
- Randolph, L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J Agric Res* 53, 881-916.
- Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.E. (2000). *Biologie der Pflanzen*, 3 edn (Berlin, New York, Walter de Gruyter).
- Reinhardt, D., Mandel, T. and 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. and 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. and Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acids Res* 18, 6409-6412.

- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. and Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463-472.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. and 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.
- Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S. and Okada, K. (2000). RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 225-236.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Liu, Y.G., Shibata, D., Kanaya, E., Morita, E.H. and Okada, K. (1999). *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev* 13, 1079-1088.
- Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J. and 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.
- Schneitz, K., Hulskamp, M. and Pruitt, R.E. (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7, 731-749.
- 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.
- Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N. and Bowman, J.L. (1999). Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* 126, 4117-4128.
- Smalle, J. and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55, 555-590.
- 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.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. and Koes, R. (1996). The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85, 159-170.
- Stefanek, R. (2006). Erzeugung transgener Maispflanzen zur Steuerung der Expression von Genen des Sekundärmetabolismus. Dissertation (Lehrstuhl für Genetik, TUM).
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. and Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.

- Stockum, C. (2004). Molecular and developmental analysis of *ENHANCER OF PINOID*, a gene required for cotyledon formation in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit (Lehrstuhl für Genetik, TUM).
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K. and Prive, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6, R82.
- Strasburger, E. (2002). Lehrbuch der Botanik, 35 edn (Berlin, Heidelberg, Spektrum Verlag).
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* 15, 2648-2653.
- Szemenyei, H., Hannon, M. and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319, 1384-1386.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. and Tasaka, M. (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128, 1127-1135.
- Torres-Ruiz, R.A., Lohner, A. and Jürgens, G. (1996). The *GURKE* gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J* 10, 1005-1016.
- Torres Ruiz, R.A. (2000). Molekulare Entwicklungsbiologie des *Arabidopsis*-Embryos. *BIOspektrum* 4, 267-270.
- Treml, B.S. (2003). Phänotypische und molekularbiologische Charakterisierung der Keimblattmutanten *abanico* und *laterne* von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit (Lehrstuhl für Genetik, TUM).
- Treml, B.S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischnig, E. and Ruiz, R.A. (2005). The gene *ENHANCER OF PINOID* controls cotyledon development in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 132, 4063-4074.
- Tsukaya, H. (2002). Leaf Development. *The Arabidopsis Book*.
- Uchida, N., Townsley, B., Chung, K.H. and Sinha, N. (2007). Regulation of *SHOOT MERISTEMLESS* genes via an upstream-conserved noncoding sequence coordinates leaf development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15953-15958.
- Urbe, S. (2005). Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem* 41, 81-98.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J.D., Caboche, M. and Bellini, C. (1998). Mutation in the *Arabidopsis PASTICCINO1* gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol Cell Biol* 18, 3034-3043.
- Vogg, M. (2007). Molekularbiologische Analyse von Keimblattmutanten von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit (Lehrstuhl für Genetik, TUM).

- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A. and de Vries, S.C. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1563-1577.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P. and Hellmann, H. (2005). *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol* 137, 83-93.
- Went, F.W. and Thimann, K.V. (1937). *Phytohormones*. (New York, Macmillan).
- Woodruff, R., Martin, P.R., Birman, I. and Pickett, F.B. (2000). The *Arabidopsis* embryonic shoot fate map. *Development* 127, 813-820.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y. and Huang, H. (2003). Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130, 4097-4107.
- Xu, M., Zhu, L., Shou, H. and Wu, P. (2005). A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiol* 46, 1674-1681.
- Zegzouti, H., Anthony, R.G., Jahchan, N., Bögre, L. and Christensen, S.K. (2006). Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PKD1) in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6404-6409.

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen, sein Interesse an meinem Projekt und die fachliche Unterstützung bedanken. Ebenso gilt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Ramon A. Torres Ruiz, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir dieses interessante Thema zur Promotion anvertraut hat. Insbesondere danke ich ihm für die wertvollen Tipps und Ratschläge, seine humorvolle Art und sein großes Engagement für diese Arbeit.

Die Doktorarbeit wäre in ihrer jetzigen Form ohne eine Förderung durch die DFG und die erfolgreiche Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen nicht realisierbar gewesen. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Yehuda Ben-Shaul, Dr. Markus Herz, Dr. Günther Schweizer, Prof. Dr. Kay Schneitz und seinen Mitarbeitern Dr. Ram Yadav und Dr. Lynette Fulton, Dr. Peter Hutzler, PD Dr. Anton Schäffner und unseren Kooperationspartnern Dr. Masahiko Furutani und Prof. Dr. Masao Tasaka in Japan bedanken.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls für Genetik die zum Gelingen des Projekts beigetragen haben. Bei den Arbeitsgruppenleitern Dr. Monika Frey, Dr. Ulrich Genschel und Dr. Erich Glawischnig möchte ich mich besonders für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, hilfreichen Anregungen und Ideen bedanken. Sehr herzlich bedanke ich mich bei den verbliebenen Postdocs und Doktoranden Dr. Lilla Römisch-Margl, Andreas Fießelmann, Miriam Vogg, Thomas Rauhut, Regina Dick und Zheng Yu für die freundschaftliche und harmonische Arbeitsatmosphäre, lustige Bowling- und Cocktail-Abende und dafür, dass wir immer etwas zu lachen hatten. Peggy Müller, Bjørn Peters, Otti Peis und meinen Praktikanten danke ich sehr für ihre tatkräftige Mitarbeit an meinem Projekt und die lustigen Stunden im Labor. Bei Regina Hüttl und Peter Dobos bedanke ich mich für die technische Hilfeleistung und dafür, dass ich mir ab und zu etwas von ihren Schätzen stibitzen durfte. Den guten Geistern der Lehrstuhls Petra Wick und Carolin Ziegler möchte ich für ihre Unterstützung in bürokratischen Dingen und die Leckereien, die mir immer wieder den Tag versüßt haben, ganz besonders danken.

Vielen Dank auch an die „Ehemaligen“ des Lehrstuhls Dr. Regina Schuhegger, Dr. Holger Schmidt, Dr. Gerti Spielbauer, Dr. Rafal Jończyk, Dr. Katrin Schullehner, Dr. Silvia Ronconi, Rouhe Yin, Katharina Lange, Christine Stockum und alle anderen für die schöne gemeinsame Zeit und ihre Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und technischen Fragen. Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an Dr. Regina Stefanek, Kristina Haage, Heidi Miller-Mommerskamp und Hedi Kellner, durch die die langen Stunden im Labor zu Beginn meiner Promotion wie im Flug vergangen sind.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen engsten Freunden dafür bedanken, dass es sie gibt und ich immer auf sie zählen kann.



# Curriculum Vitae

---

## Zur Person

Dipl.-Biol. Birgit S. Tremel  
Hortensienweg 15  
85551 Kirchheim

E-Mail: birgittr@wzw.tum.de  
Geboren am 17.12.1978 in München  
ledig, keine Kinder

---

## Ausbildung

1985 - 1989 Grund- und Hauptschule Kirchheim/Heimstetten

1989 - 1998 Gymnasium Kirchheim  
Allgemeine Hochschulreife 07/98

1998 - 2003 Studium an der TU München  
Fachrichtung: Biologie  
Schwerpunkt: Genetik, Botanik und Biochemie  
12/03 Abschluss als Dipl.-Biol

### Thema der Diplomarbeit:

Phänotypische und molekularbiologische Charakterisierung der Keimblattmutanten *abanico* und *laterne* von *Arabidopsis thaliana*

2004-2008 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

### Thema der Dissertation:

Die Rolle des Gens *ENHANCER OF PINOID* in der Keimblattentwicklung und dem gerichteten Auxintransport von *Arabidopsis thaliana*.

### Veröffentlichungen:

Tremel, B. S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischnig, E. and Torres-Ruiz, R. A., *Development* 132, 4063 (2005).

M. Furutani, T. Kajiwara, T. Kato, B. S. Tremel, K. Stockum, R. A. Torres-Ruiz, M. Tasaka, *Development* 134, 3849 (2007).



Ich bestätige, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt habe.

Kirchheim, April 2008

.....

Birgit Tremel