

**Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen aus frühen
Stadien der somatischen Embryogenese von
*Nicotiana plumbaginifolia***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Catrin Kaydamov
geb. am: 08. 09. 1968 in: Halle

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. U. Wobus
2. Herr Prof. Dr. M. Luckner
3. Herr Dr. habil. E. Kranz

Halle (Saale), den 08.07.1999

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Pflanzen	9
2.2	Bakterienstämme	9
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	9
2.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> - Stamm	9
2.3	Plasmide und Vektoren	9
2.4	Oligonukleotide	10
2.4.1	Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen	10
2.4.2	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für Sequenzierungen	10
2.5	Medien	11
2.6	Klonierung und Sequenzierung	11
2.7	Isolierung von Gensequenzen durch PCR-Techniken	11
2.7.1	Plasmid-PCR	11
2.7.2	RT-PCR	12
2.7.3	Genomische PCR	12
2.7.4	Nichtradioaktive DDRT-PCR	13
2.7.5	Radioaktive DDRT-PCR	13
2.7.6	Subtraktive Hybridisierung	14
2.8	λ ZAP Express TM cDNA-Bank-Screening und <i>in vivo</i> Excision von Plasmid-DNA	14
2.9	DNA-Analyse (<i>Southern-Blot</i>)	15
2.10	RNA-Analyse (<i>Northern-Blot</i>)	15
2.11	Antigen- und Antikörperproduktion	16
2.11.1	Expression von Genfragmenten im <i>E. coli</i> -QIAexpress TM System	16
2.11.2	Expression von Genfragmenten im <i>E. coli</i> -ThioFusion TM Expression System	16
2.11.3	N-terminale Proteinsequenzierung und synthetische Polypeptide	16
2.11.4	Antikörperproduktion	17
2.12	Gelelektrophoretische Proteinanalyse	18
2.12.1	Proteinextraktion und Elektrophorese	18
2.12.2	<i>Western-Blot</i>	18
2.13	Immunhistologie	19
2.13.1	Lichtmikroskopie	19
2.13.2	Elektronenmikroskopie	20

2.14 Somatische Embryogenese von <i>N. plumbaginifolia</i>	20
2.15 Blattscheiben- und Suspensionskulturtests	21
2.15.1 Blattscheibentest	21
2.15.2 Suspensionskulturtest	21
2.16 Herstellung transgener Pflanzen	22
2.16.1 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.16.2 Pflanzentransformation	22
2.16.3 Anzucht der Pflanzen	22
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Morphogenetische Charakterisierung des somatischen Embryogenese-systems von <i>N. plumbaginifolia</i>	23
3.2 Isolierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen aus embryogenen Stadien von <i>N. plumbaginifolia</i>	24
3.2.1 Isolierung von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der DDRT-PCR - Technik	24
3.2.2 Isolierung von cDNA-Fragmenten durch subtraktive Hybridisierung	25
3.2.3 Charakterisierung ausgewählter cDNA-Fragmente	26
3.3 GTP-bindende Proteine und WD40-Protein	38
3.3.1 Isolierung partieller DNA - Fragmente mittels PCR - Techniken	39
3.3.2 Isolierung vollständiger cDNA-Sequenzen aus einer λ ZAP Express™ cDNA- Bank für frühe Embryogenesestadien von <i>N. plumbaginifolia</i>	41
3.3.3 Computergestützte DNA - und Proteinsequenzanalyse der isolierten cDNA - Klone	41
3.3.4 Gewebespezifität und entwicklungsabhängige Regulation der mRNA-Expression	45
3.3.5 Einfluß von Hormonen, Umwelt- und Streßfaktoren auf die mRNA-Expression	47
3.3.6 Abschätzung der Anzahl der Genkopien durch genomische <i>Southern-Blot</i> -Analyse	52
3.3.7 Expression genspezifischer Fragmente in bakteriellen Vektor-Systemen in <i>E. coli</i>	53
3.3.8 Gewebespezifität und entwicklungsabhängige Regulation der Proteinexpression	56
3.3.9 Immunzytologischer Proteinnachweis in Embryo und Endosperm	58
3.3.10 Herstellung transgener Pflanzen	62
4 DISKUSSION	73
5 ZUSAMMENFASSUNG	94
6 LITERATURVERZEICHNIS	96
7 ANHANG	I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abscisinsäure
Abb	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession-Nummer
ALP	alkalische Phosphatase
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AMV	„avian myeloblasosis virus“
As	Aminosäure
BA	N ⁶ -Benzyladenin
BAP	6-Benzylaminopurin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ Rinderserumalbumin
CaMV	„cauliflower mosaic virus“ Blumenkohl-Mosaik-Virus
cDNA	komplementäre Einzelstrang-DNA
Da	Dalton
DDRT-PCR	„differential display reverse transcription“-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithio-1,4-threitol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EGTA	Bis-Aminoethyl-Glykoether-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GA ₃	Gibberellinsäure
G α	G-Protein- α -Untereinheit
G β	G-Protein- β -Untereinheit
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IES	Indol-3-essigsäure
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo

Kan ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
KLH	„keyhole limpet haemocyanin“ Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke
μCi	mikro Curie
μM	mikro Mol
mM	milli Mol
mRNA	„messenger RNA“ Boten-RNA
NBT	„Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid“, 4-Nitrotetrazoliumchloridblau
Neo ^r	Neomycinresistenz
NES	α-Naphthylessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate-buffered saline“ phosphatgepufferte Saline
PCR	„polymerase chain reaction“ Polymerasekettenreaktion
pfu	„plaque forming units“ Plaque-bildende Einheit
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcription-PCR“ reverse Transkription-PCR
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
Spec ^r	Spectinomycinresistenz
TBS	„tris-buffered saline“ Tris-gepufferte Saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	„unit“, Einheit
UTR	„untranslated region“ nichttranslatierte Region
v	Volumen, Volumina
WD40	Tryptophan (W)- Asparaginsäure (D)
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

1 Einleitung

Der Lebenszyklus höherer Pflanzen ist ein Generationswechsel zwischen der dominanten Sporophyten- (embryonale, juvenile und adulte vegetative Phase) und kurzen Gametophytenentwicklung (generative Phase). In Angiospermen finden Gametophytenentwicklung und Embryogenese im Innern der Blüte statt.

Zygotische Embryogenese

Im Unterschied zu Tieren besitzen Pflanzen keine separate Keimbahn. Die Gametendifferenzierung erfolgt in einer vergleichsweise späten Phase des Lebenszyklus, ausgehend von einer Population von Zellen, die vorher bereits am Aufbau des vegetativen Pflanzenkörpers beteiligt waren. Der Übergang von der vegetativen zur generativen Phase ist Ausdruck der Entwicklungsplastizität totipotenter pflanzlicher Zellen. Im Unterschied zum hochorganisierten tierischen Embryo stellt der nur aus Wurzel-Sproß-Achse und Kotyledonen bestehende pflanzliche Embryo im ungekeimten Samen ein vereinfachtes Abbild des adulten Organismus dar. Mit der Keimung setzt sich durch Zellelongationen und weitere Zellteilungen die Embryonalentwicklung fort.

Bei den Angiospermen sind Embryogenese und Samenentwicklung Ergebnis einer doppelten Befruchtung. Aus der haploiden Eizelle entsteht die diploide Zygote, die nach meist inäqualer Teilung Embryo und Suspensor entwickelt. Die Befruchtung der diploiden Zentralzelle führt zur Bildung des Endosperms, eines triploiden Nährgewebes. Weitere Zellteilungen, Zelldifferenzierungen und Zellstreckungen führen in Dikotylen über aufeinanderfolgende globuläre, herz- und torpedoförmige Embryonalstadien zum reifen Embryo mit Wurzel- und Apikalmeristemanlagen, den Kotyledonen und dem provaskulären Gewebe. THOMAS et al. (1993) unterteilen die zygotische Embryogenese in drei Hauptphasen. Extensiven Zellteilungen in der frühen Phase (Einzell- bis Herzstadium) folgen Zellexpansionen, Akkumulation von Reservestoffen und transienter Anstieg der ABA-Konzentration in der mittleren Phase (Herz- bis Torpedostadium). Damit ist die Embryogenese „sensus stricto“ abgeschlossen. Die späte Phase kennzeichnen Samenreife, Austrocknung und Samenruhe.

Vermutlich wird die Befruchtung in Pflanzen von Mechanismen ähnlich denen in Tieren kontrolliert. Dazu zählen das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen zur Induktion von Zellteilungsaktivitäten und die Ausbildung von Zellpolarität, gefolgt von asymmetrischen und internen Zellteilungen sowie Auslösung der Zelldifferenzierungen. In Angiospermen ist die Ausbildung der Polarität sowohl des weiblichen Gametophyten als auch der Zygote konstitutiv, so daß die erste Zellteilungsebene vermutlich genetisch determiniert ist.

Unter Verwendung von Mutanten wurde für *Arabidopsis thaliana* aus Sättigungsanalysen abgeleitet, daß nur wenige Gene (etwa 40) für die Kontrolle der Embryomusterbildung ausreichen (MAYER et al., 1991). Wirkungsmechanismen sogenannter Embryomustergene

sind in Pflanzen weitgehend unbekannt. Als Gen mit möglicher regulatorischer Funktion während der Embryoentwicklung ist das *STM*-Gen der SHOOT-MERISTEMLESS-Mutante von *A. thaliana* zu nennen, das ein Homeodomäne-enthaltendes Protein kodiert (LONG et al., 1996). Einige Gene, die die Organisation der Blütenorganogenese in *Arabidopsis* und *Antirrhinum* regulieren, wurden ebenfalls als Transkriptionsfaktoren identifiziert (COEN und MEYEROWITZ, 1991). Viele embryonale Mutanten weisen Defekte von „housekeeping“-Genen mit essentiellen Stoffwechselfunktionen auf. So ist die erste biochemische embryoletale Mutante von *Arabidopsis* Biotin-auxotroph (*bio1*) und kann ohne Biotin-Zugabe keine vollständigen Embryonen ausbilden (SHELLHAMMER und MEINKE, 1990). In der *Arabidopsis*-Embryomutante GNOM sind sehr frühe Ereignisse der Pflanzenmorphogenese wie die Position der ersten Zellteilungsebene und die Kontrolle gerichteter Zellexpansionen in der Zygote gestört (LLOYD, 1991). Das GNOM-Genprodukt zeigt Homologien zum Sec7-Protein der Hefe, einem zytosolischen Protein des sekretorischen Stoffwechseltransportweges (SHEVELL et al., 1994). Da GNOM-Gen-Transkripte sowohl während der Embryomusterbildung als auch in adulten Geweben abundant sind, ist auch hier eher auf allgemeine zelluläre Funktionen als auf Embryogenesespezifität zu schließen. Zellen mit erhöhter Teilungsaktivität, wie sie in jungen Embryonen auftreten, sind metabolisch aktiv und transkribieren vermehrt Gene für Prozesse wie Atmung, Zellteilung und Zellwandsynthese. Deshalb ist zu erwarten, daß viele während der Embryogenese exprimierte Gene in allen meristematischen Geweben hohe Transkriptionsraten aufweisen (LINDSEY und TOPPING, 1993). Eine Unterscheidung von Genen mit „housekeeping“ und spezifischen regulatorischen Funktionen in der pflanzlichen Embryogenese wird dadurch erschwert (MEINKE, 1995).

Die Rolle von Wachstumsregulatoren als Signalmoleküle für die zygotische Embryogenese wurde anhand von *Arabidopsis*-Mutanten mit verändertem Cytokinin- oder Auxingehalt diskutiert. In der *amp1*-Mutante wurde ein erhöhter Cytokiningehalt gefunden, der offenbar Einfluß auf die Bildung der Kotyledonenprimordien nimmt (CHAUDHURY et al., 1993). Die *pin1*-Blütenmutante ist durch fusionierte Kotyledonen als Folge einer Störung des polaren Auxintransports gekennzeichnet. LIU et al. (1993a,b) postulieren, daß polarer Auxintransport entweder an der Etablierung der Bilateralsymmetrie globulärer Embryonen beteiligt ist oder mit der Initiation der Kotyledonen im späten globulären Embryo assoziiert sein könnte.

Während der späten Samenentwicklungsstadien (späte Embryogenese) werden embryo-spezifische Reserveproteine und LEA-Proteine („late embryogenesis abundant“) akkumuliert. Die Regulation der Reserveproteinexpression erfolgt auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene (GOLDBERG et al., 1989) und ist spezifisch für Embryo und Endosperm (THOMAS, 1993). Einige LEA-Proteine sind ABA (Abscisinsäure)-induzierbar und nehmen vermutlich Einfluß auf die Trockentoleranz der Samen (DURE et al., 1989).

Molekulare und biochemische Analysen der frühen pflanzlichen Embryogenese sind aufgrund der physikalischen Unzugänglichkeit des winzigen zygotischen Embryos erschwert. Zugang zu frühen Embryogenesestadien können *in vitro*-Zellkultursysteme wie somatische Embryogenese und Mikrosporenembryogenese vermitteln, deren Verwendung weitere Möglichkeiten zur Identifizierung mutmaßlicher embryogenesespezifischer Gensequenzen eröffnen.

Die somatische Embryogenese

Nicht nur die Zygote, sondern auch somatische Zellen der Pflanze weisen Totipotenz auf. Die Flexibilität des zellulären Differenzierungsprogrammes ermöglicht, embryogene Stadien aus ausdifferenzierten Zellen unter definierten Bedingungen zu erzeugen. Die Initiation der Embryogenese von somatischen Zellen erfordert Dedifferenzierung und essentielle Neuprogrammierung ihres Genexpressionsprogrammes mit zeitlich und räumlich determinierter Musterbildung während der Embryogenese.

Asexuelle Embryogenese findet auch spontan in vielen Pflanzenarten statt. So können sich somatische Embryonen auf vegetativen (Blattrand, Hypokotylepidermis) oder maternalen reproduktiven Geweben (Nuzellus, Synergiden-Zellen) der Pflanzen entwickeln.

Unter *in vitro*-Kulturbedingungen sind zahlreiche Pflanzenarten zur somatischen Embryogenese befähigt. Somatische Zellen können auf synthetischen Medien nach Wachstumshormon-Zusatz (Auxin, Cytokinin) zur Proliferation induziert werden. Aus einigen proliferierenden Zellen entwickeln sich nach Transfer auf hormonarme bzw. -freie Medien somatische Embryonen, die zu Ganzpflanzen regenerieren. Somatische Embryogenese kann direkt auf Gewebeoberflächen (Blatt, Sproß) bzw. an isolierten Einzelzellen (Protoplasten, Mikrosporen) oder indirekt über intermediäre Kallus- bzw. Suspensionskulturen verlaufen (WILLIAMS und MAHESWARAN, 1986).

Induktion des Embryogenesegeschehens erfolgt in der zygotischen Embryogenese durch Ei-Sperma-Kontakte, in der somatischen Embryogenese durch Hormon- bzw. Streßbehandlung. Die somatische Embryogenese ist daher in zwei Phasen zu unterteilen. In der Induktionsphase erwerben somatische Zellen embryogene Kompetenz, in der Expressionsphase finden Zellteilung, Differenzierung und Reifung unter Ausbildung globulärer, Herz- und Torpedo-Stadien, die den Entwicklungsstadien zygotischer Embryonen ähneln, statt. Das erste *in vitro*-Kultursystem für somatische Embryonen wurde für *Daucus carota* entwickelt (STEWART et al., 1958). Aufgrund des relativ einfachen Verfahrens der Erzeugung somatischer Embryonen sind *Daucus-in vitro*-Kulturen die bisher am häufigsten genutzten Modellsysteme für molekulare Analysen der somatischen Embryogenese (DE JONG et al., 1993). Allerdings erschwert die Bildung proembryogener Strukturen in der *in vitro*-Kultur, aus denen die somatischen Embryonen hervorgehen, die exakte Bestimmung des Embryogenese-Zeitpunktes. Außerdem liegen verschiedene Entwicklungsstadien und undifferenzierte Zellaggregate zu jeder Zeit der Kultivierung vor.

Vorteilhafter sind Mikrokallus- oder Protoplastenkulturen von *Medicago sativa*, die eine exakte Zeitpunktbestimmung der Induktionsphase erlauben (DUDITS et al., 1991). Neben zahlreichen Experimentalsystemen dikotyler Pflanzen wurden auch *in vitro*-Kultursysteme von Monokotylen wie Reis (ABDULLAH et al., 1986) oder Weizen (VASIL et al., 1990) etabliert. Unter den exogen zugesetzten Hormonen spielt Auxin, meist 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D), eine kritische Rolle bei Zellzyklus-Reaktivierung und Induktion somatischer Embryobildung. Die zugesetzten hohen 2,4D-Konzentrationen selbst sind ein Streßsignal, da die Embryogeneseinduktion hohe Auxinkonzentrationen erfordert, die das Kalluswachstum hemmen. Embryogenese kann auch durch Verwundung ausgelöst werden, wobei durch Protoplastierung der stärkste Verwundungseffekt erzielt wird.

Experimentelle Befunde zur Rolle von Hitzeschock-Genen in der Entwicklungsreprogrammierung unterstützen die These, somatische Embryogenese als spezifische Form einer Streßreaktion zu definieren. In Übereinstimmung mit der transienten Hitzeschock-Genexpression in frühen Stadien der tierischen Embryogenese (BOND und SCHLESINGER, 1987) identifizierten GYÖRGYÉY et al. (1991) ein kleines Hitzeschock-Gen (Mshsp 18), das in globulären und herzförmigen somatischen Embryonen von Luzerne exprimiert wird. Als molekulares Chaperon (ELLIS, 1990) könnte dieses Hitzeschock-Protein eine Assemblierung von zellulären Polypeptiden beim Übergang von somatischen zu embryogenen Zellen gewährleisten.

Induktion und Realisierung der Embryogenese in *in vitro*-Systemen sind von der Hormonkonzentration abhängig. Bei *D. carota* (KOMAMINE et al., 1992) und *Santalum album*-Suspensionskulturen (RAO, 1996) ist exogenes Auxin (2,4D) für die Determination der Embryogenese erforderlich, wirkt jedoch hemmend auf die nachfolgende Entwicklung embryogener Zellcluster. Morphogenetische Bonitierung des Zellmaterials ergab, daß nur wenige Zellen eines verwendeten Primärexplantats wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Grad ihrer Auxinsensitivität embryogen werden.

Neben Auxinen können andere Phytohormone sowie die Zelldichte Induktion und Verlauf des Embryogeneseprozesses beeinflussen. Stimulierende Effekte von Zytokinin und Gibberellinsäure (GA₃) sowie der negative Einfluß von ABA wurden in embryogenen *in vitro*-Kulturen nachgewiesen (RAO, 1996; KOMAMIME et al., 1992). In *Daucus*-Kulturen fördert hohe Zelldichte die Bildung embryogener Zellcluster aus Einzelzellen (NOMURA und KOMAMIME, 1985) und niedrige Zelldichte die Entwicklung somatischer Embryonen aus embryogenen Zellen (FUJIMURA und KOMAMIME, 1979).

Auxin (2,4D)-Behandlung reprogrammiert differenzierte somatische Zellen, teilungsaktiv zu werden und ein Entwicklungspotential ähnlich dem der tierischen Eizelle nach der Befruchtung auszuprägen. In beiden Fällen basiert die embryogene Differenzierung auf der Aktivierung von Signalkaskaden, die infolge von Hormon- bzw. Spermienbindung induziert werden. Zu den wichtigsten Signaltransduktionsereignissen, die zur Entwicklung des Seeigelembryos nach Eizellbefruchtung führen (EPEL, 1990), zählen der Abbau von

Phosphoinositol, Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen-Konzentration und des pH-Wertes sowie die Rekonstruktion der Ei-Plasmamembran. Weiterhin erfolgt die Bildung eines aktinreichen Zytoskeletts und die Aktivierung des Zellzyklusses mit erhöhter DNA- und Protein-Synthese einschließlich der Akkumulation von Zyklinen. Einige der genannten molekularen Veränderungen finden auch in 2,4D-behandelten Pflanzenzellen statt. Diese Übereinstimmungen von pflanzlichen und tierischen Systemen ermöglichen Rückschlüsse zu Signaltransduktionsereignissen bei der Induktion somatischer Embryonen.

In tierischen Systemen spielt der Phosphatidylinositol-Metabolismus bei der Befruchtung eine große Rolle. Dabei nehmen heterotrimere G-Proteine eine Schlüsselposition ein. Sie vermitteln die Übertragung von extrazellulären Signalen auf intrazelluläre Effektoren durch Wechselwirkung mit aktivierten plasmamembrangebundenen Rezeptoren. Während des Phosphatidyl-Zyklusses aktiviert vermutlich ein G-Protein die inositolspezifische Phospholipase C, die das Membranlipid Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) spaltet. PIP_2 ist Ausgangsprodukt für die Synthese der sekundären Boten Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). IP_3 setzt aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Reticulum Ca^{2+} -Ionen frei, während DAG in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen die Proteinkinase C aktiviert, die eine Kaskade von Phosphorylierungen einleitet. Bei der Befruchtung von Seeigeleiern konnte eine vermehrte Produktion von IP_3 und DAG sowie die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern im Ei nachgewiesen werden (CIAPA und WHITAKER, 1986). Im Analogieschluß postulierten DUDITS et al. (1995) eine Beteiligung des Phosphatidyl-Zyklusses an hormonvermittelten Signaltransduktionskaskaden bei Zellteilungsinduktion und somatischer Embryogenese in Pflanzen. Ein positiver Auxineinfluß (IES=Indol-3-essigsäure, 2,4-D) auf die Polyphosphoinosithydrolyse in Abhängigkeit von GTP-bindenden Proteinen und Phospholipasen sowie hormoninduzierte Veränderungen des zytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes sind in Pflanzen experimentell belegt worden (POOVAIAH et al., 1987; PALME, 1992). GTP-bindende Proteine wurden immunologisch in Pflanzenextrakten nachgewiesen (BLUM et al., 1988) sowie deren Gene aus verschiedenen Pflanzenspezies identifiziert (MA, 1994). Eine mögliche Rolle der Phospholipasen A2, C und D im Phosphoinositol-Zyklus in Pflanzen wird diskutiert (PALME, 1992; LEHLE, 1990). Experimentelle Daten belegen den Zusammenhang zwischen Erhöhung des zytosolischen IP_3 -Gehaltes und Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium in Pflanzenzellen (DROBAK et al., 1985). JANSEN et al. (1990) konnten an *Daucus*-Suspensionskulturen zeigen, daß erhöhte Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Wachstumsmedium zu einer erhöhten Anzahl somatischer Embryonen führt.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die somatische Embryogenese wurde an *M. sativa*-embryogenen Kulturen untersucht (SCHAEFER, 1985). Wie nach Befruchtung der tierischen Eizelle (EPEL, 1990) konnte auch in Zellen embryogener Kulturen im Vergleich zu denen nichtembryogener Kalluskulturen ein durchschnittlich höherer intrazellulärer pH-Wert gemessen werden.

Ein Merkmal der Induktion der somatischen Embryogenese durch externe Stimuli ist die Reaktivierung des Zellzyklusses in differenzierten Pflanzenzellen. Dabei sind induzierte Zellteilungsaktivitäten Voraussetzung für die Umschaltung vom somatischen zum embryogenen Zelltyp. Dies erfordert koordinierte Expression zahlreicher Gene verbunden mit post-translationaler Modifikation regulatorischer Proteine, die in die Zellzykluskontrolle involviert sind. Untersuchungen differenter tierischer Systeme führten zur Aufdeckung ubiquitärer regulatorischer Zellzyklusproteine einschließlich der p34^{cdc2}-Proteinkinase sowie verschiedener Zykline. Dabei ist p34^{cdc2}-Proteinkinase u.a an der Phosphorylierung von kernlokalisierten Proteinen wie Histonen (MORENO und NURSE, 1990), aber auch an Veränderungen von Mikrotubulibewegungen (VERDE et al., 1990) beteiligt. Mittels eines peptidspezifischen Antikörpers gegen die p34^{cdc2}-Proteinkinase konnte in verschiedenen Pflanzenextrakten ein 34kDa-Protein nachgewiesen werden (FEILER und JACOBS, 1990; HIRT et al., 1991). Außerdem wurden cdc2-Gen-homologe cDNAs in *A. thaliana* (HIRAYAMA et al., 1991), *M. sativa* (HIRT et al., 1991) und anderen Pflanzenspezies identifiziert. Die Isolierung einer Zyklin-cDNA aus Zellen somatischer Embryonen von *D. carota* ist weiterer Beleg für die mutmaßliche Beteiligung von Zellzyklusproteinen an Embryogenese-prozessen (HATA et al., 1991). Aufgrund ihrer zellzyklusabhängigen Expression könnten auch Histone als molekulare Marker für die Induktionsphase und die Realisierung des embryogenen Programmes dienen (DUDITS et al., 1995). Ebenso könnten Aktivitäten auxin- und wundinduzierter Gene als Kandidaten für den Nachweis embryogenesespezifischer Genexpressionsveränderungen fungieren, da Auxine und Streß in vielen Gewebekultursystemen Induktoren für den Übergang zum embryogenen Zelltyp sind. Ein differentielles Screening einer cDNA-Bank mit Spezifität für 2,4D-behandelte Mikrokallus-Suspensionskulturen von *M. sativa* führte zur Isolierung zahlreicher Gene mit charakteristischen Expressionsmustern spezifisch für den Übergang zur Embryodifferenzierung und der darauffolgenden Bildung von Embryostadien. So wurde ein mutmaßliches Ca²⁺-bindendes Protein identifiziert, dessen mRNA-Transkript in globulären, aber nicht in herz- und torpedoförmigen Embryonen nachzuweisen war (DUDITS et al., 1995).

Im Vergleich zu Kallus-Kulturen wurden mehr als 20 Gensequenzen aus somatischen Embryokulturen von *D. carota* überwiegend durch differentielles Screening kloniert. Die meisten Gene wiesen erhöhte mRNA-Transkriptmengen in späteren Embryonalstadien (Herz, Torpedo) auf. Neben zahlreichen unbekanntenen Klonen wurden Gene für LEA-Proteine, Oleosin, Lipidtransferprotein, saure Endochitinase, ATPase, Peroxidase, Elongationsfaktoren sowie für verschiedene prolin- und glycinreiche Proteine identifiziert (Übersicht bei ZIMMERMANN, 1993). SMITH et al. (1993) isolierten aus sich entwickelnden *Daucus*-Embryonen eine cDNA, deren kodiertes Protein in die Zellteilungskontrolle involviert ist. Eine von KAWAHARA et al. (1992) beschriebene cDNA, spezifisch für globuläre Embryonen, kodiert den Translationselongationsfaktor 1- α in *D. carota*. Die Expression des SERK-Gens (*somatic embryogenesis receptor-like kinase*) ist ein Marker für *D. carota*

Zellen mit Kompetenz zur Bildung somatischer Embryonen und findet auch spezifisch in frühen zygotischen Embryogenesestadien statt (SCHMIDT et al., 1997). Obwohl Funktion und zelluläre Lokalisierung nicht bekannt sind, läßt die Ähnlichkeit der abgeleiteten SERK-Proteinsequenz mit Leucin-reichen Rezeptorkinasen eine Beteiligung an Signaltransduktionswegen der frühen Embryogenesephase vermuten. Embryogenesespezifische Klone sind auch aus *M. sativa* und *Glycine max* isoliert worden. Die von GIROUX und PAULS (1997) klonierten cDNAs ASET1-3 unbekannter Funktion zeigten eine auf frühe somatische Embryogenesestadien von *M. sativa* begrenzte mRNA-Expression. MA et al. (1994) identifizierten das Gen (*Sbh1*) eines mutmaßlichen Transkriptionsfaktors der Sojabohne, das überwiegend in somatischen Embryonen beim Übergang vom Herz- zum Torpedostadium exprimiert wird.

In vitro kultivierte Pflanzenzellen sekretieren in ihr Kulturmedium Komponenten, die zumeist Bestandteil von Zellwänden sind. Diese extrazellulären Proteine (EP) und Arabinogalactanproteine (AGP) können Zellproliferation sowie somatische Embryogenese begünstigen. So ermöglicht die von DE JONG et al. (1992) klonierte saure Endochitinase (EP3) aus *D. carota* die Wiederanschaltung der Embryoentwicklung in der temperatursensitiven embryogenesedefekten *Daucus*-Zelllinie ts11. Der gleiche Effekt wurde mit einem Nod-Faktor erzielt (DE JONG et al., 1993). Nod-Faktoren sind Lipopolysaccharide mit Funktionen in der Signalvermittlung zwischen knöllchenbildenden Rhizobien und Leguminosen. Eine positive Regulation des embryogenen Potentials in *D. carota* wurde auch für sekretierte AGPs nachgewiesen (KREUGER und VAN HOLST, 1993).

Heterogene Verteilung zytoplasmatischer Determinanten unter Ausbildung von Zellpolarität ist ein generelles Phänomen bei der Initiation der somatischen und zygotischen Embryogenese. Neben Auxin beeinflussen auch andere exogene Stimuli (Zytokinin, Kalzium) die Zellpolarität und die Zellteilungsebene (MAHESWARAN und WILLIAMS, 1985; KOMAMIME et al., 1992). Es wird angenommen, daß exogene Wachstumsregulatoren in Wechselwirkung mit pH-Gradienten und elektrischen Feldern in der Umgebung von Zellen deren Polarität ändern (DIJAK et al., 1986; SMITH und KRIKORIAN, 1990). Daß die Etablierung von Zellpolarität in engem Zusammenhang mit der Reorganisation des Zytoskeletts steht, wurde u.a. an embryogenen Kulturen von *D. carota* (CYR et al., 1987) und *M. sativa* (DIJAK und SIMMONDS, 1988) nachgewiesen. Die Neuordnung zellulärer Strukturen in Abhängigkeit vom Zytoskelett wird u.a. durch Kinasen vermittelt (PUTNAM-EVANS et al., 1990). Ein direkter Auxineinfluß auf die Orientierung kortikaler Mikrotubuli wurde an Mais-Koleoptilen experimentell belegt (BERGFELD et al., 1988).

Wie zygotische Embryonen produzieren somatische Embryonen Speicherproteine, allerdings in geringeren Mengen und früheren Entwicklungsstadien (SHOEMAKER et al., 1987). Weiterhin synthetisieren und akkumulieren sie ABA bzw. exprimieren ABA-induzierbare Gene.

Trotz Unterschieden beim Erwerb embryogener Kompetenz eignen sich somatische Embryogenesensysteme als alternative Experimentalansätze zum zygotischen Entwicklungsweg. Durch relativ hohe Stadiensynchronität und Embryogeneseeffizienz liefern einige direkte somatische Embryogenesensysteme ausreichend Material für molekulare und biochemische Untersuchungen. Weiterhin ermöglichen sie Analysen zu Hormon- bzw. Streßeinfluß auf die Genexpression während der Embryoentwicklung. Möglichkeiten der direkten Transformation von *in vitro* kultivierten Zellen mit DNA-Fragmenten erleichtern Mutagenese-, *antisense*- und Kosuppressions-Versuche zur Analyse potentieller embryogenesespezifischer Gene.

Zielstellung der Arbeit

Grundlage dieser Arbeit bildete ein *in vitro*-Kultursystem zur Induktion der somatischen Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* (A. Tewes, IPK, Gatersleben). Ausgehend von Mesophyllprotoplasten erfolgt mit relativ hoher Synchronität ohne intermediäre Kallusbildung eine direkte Entwicklung somatischer Embryonen, aus denen nach 6-8 Wochen Ganzpflanzen regenerieren. Um frühe Ereignisse der pflanzlichen Embryogenese von der ersten inäqualen Zellteilung bis zur Ausbildung globulärer Embryostadien zu untersuchen, sollten mittels differentieller Screening-Techniken [DDRT („differential display reverse transcription“)-PCR-Technik, subtraktive Hybridisierung] hoch abundante cDNA-Sequenzen aus frühen somatischen Embryogenesestadien isoliert werden. Außerdem sollte die gezielte Isolierung von cDNA-Sequenzen für heterotrimere G-Proteine mittels RT-PCR experimentelle Anhaltspunkte für deren mutmaßliche Rolle in der pflanzlichen Embryogenese liefern. Zur Charakterisierung der isolierten Gensequenzen sollten RNA- und Proteinexpression während der somatischen Embryogenese und in verschiedenen Geweben sowie die Regulierbarkeit der Transkriptmengen in Abhängigkeit von Hormonen und Streßfaktoren analysiert werden. Weiterhin sollten immunhistologische Techniken angewandt werden, um die intrazelluläre Kompartimentierung der korrespondierenden Proteine in zygotischen Embryonen zu untersuchen. Der Einsatz von *antisense*- oder Kosuppressions-Konstrukten sollte durch Hemmung des endogenen Transkripts zum Ausfall der Proteinfunktion in transgenen Pflanzen führen und so Aufschluß über mögliche Proteinfunktionen während der pflanzlichen Entwicklung geben.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzen

Nicotiana tabacum L. Varietät Samsun SNN (allotetraploid)

Nicotiana plumbaginifolia Viv. (diploid)

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 *Escherichia coli* -Stämme

GI724	F ⁻ , I ⁻ , lacI ^q , lacPL8, ampC::P _{trp} cl (Invitrogen)
M15 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , rif ^S , lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F', recA ⁺ , uvr ⁺ , lon ⁺ (ZAMENHOF und VILLAREJO, 1972)
SG13009 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , rif ^S , lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F', recA ⁺ , uvr ⁺ , lon ⁺ (GOTTESMAN et al., 1981)
TG1	Δ(lac-pro), supE, thi, hsdΔ5/F'traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , lacZΔM15 (GIBSON et al., 1984)
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10, (Tet ^r)] ^c (JERPSETH et al., 1992)
XL1 Blue MRF'	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10, (Tet ^r)] ^c (JERPSETH et al., 1992)
XL0LR TM	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, recA1, thi-1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10, (Tet ^r)] ^c (Stratagene)

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* - Stamm

C58C1 [pGV2260] (DEBLAERE et al., 1985)

2.3 Plasmide und Vektoren

pBK-CMV	Neo ^r , Kan ^r (Stratagene)
pBluescript SK ⁺	Amp ^r (Stratagene)
pCR TM II	Amp ^r (Invitrogen)
pCR-Script TM SK (+)	Amp ^r (Stratagene)
pGSGLUC1	Spec ^r (SAITO et al., 1990)

pQE 30, pQE 32	Amp ^r (Qiagen)
pRT103	Amp ^r (TÖPFER et al., 1993)
pTrx, pTrxFus	Amp ^r (Invitrogen)
λ ZAP Express TM	(ALTING-MEES et al., 1988)

2.4 Oligonukleotide

Fluoreszenzmarkierte und unmarkierte Oligonukleotide wurden vom Servicelabor des IPK, Gatersleben hergestellt.

2.4.1 Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen

Athio-as	5' - TTAATTCTGCAGTCGTCTATCTTGTGAGG - 3'
Athio-s	5' - TAATTAGTCGACACAAGAAGCAAAGGCCG - 3'
A/ZGB-as1	5' - CCCA(GA)CTTCCTGTACACAATGC - 3'
A/ZGB-sk2	5' - GTCAGTGC(AC)TCTCAAGATGG(AG)AG - 3'
blike-as	5' - AACCATCAGGAGAGACTGGC - 3'
blike-s	5' - TGGGACGGTGAGCTTCGC - 3'
MP2	5' - GACGGAT(AT)GA(GA)CAAGAA(GA)CAAAGGC - 3'
MP20	5' - GGAATTC(AG)TC(AGT)AT(CT)TT(AG)TT(AGCT)AG(AG)AA - 3'
Pdd01	5' - TACAACGAGG - 3'
Pdd02	5' - TGGATTGGTC - 3'
Pdd03	5' - CTTTCTACCC - 3'
Pdd04	5' - TTTTGGCTCC - 3'
Pdd05	5' - GGAACCAATC - 3'
Pdd06	5' - AAACCTCCGTC - 3'
PsH-as	5' - TTTACTCGAG(T) ₁₅ - 3'
PsH-s	5' - AAATGAATTC(G) ₁₅ - 3'
PT7	5' - AATACGACTCACTATAG - 3'
P35S-60	5' - AGGGATGACGCACAATC - 3'
T ₁₁ GG	5' - TTTTTTTTTTTGG - 3'
T ₁₂ AC	5' - TTTTTTTTTTTTAC - 3'

2.4.2 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für Sequenzierungen

FSeqA	5' - GAACATCCTCCTTTGATGGG - 3'
FSeqAs1	5' - GTGCCGCTATTAGTGAGTACG - 3'
FSeqAs2	5' - GGTAGATGAGACGCTGAG - 3'
FSeqAs3	5' - GGCTACTGGCGTATCATATC - 3'
FSeqB	5' - CGGTCCCAGGATCCAGAA - 3'
FSeqBLs1	5' - CATCGTTTGGTCACTCACG - 3'
FSeqBLs2	5' - GTTACAGCCATCGCCACC - 3'
FSeqBLs1f	5' - CGCATTCTGATTGGGTCTC - 3'
FSeqBLs2f	5' - GCTCGCCGTTTCGTCGGTCA - 3'
FSeqBs1	5' - CAGAGCTGAAAGAGCGGC - 3'
FSeqBs2	5' - CCATCCTGTATCAAGAATGC - 3'
FSeqBs3	5' - CCCCAGACTGTTTGTATCTG - 3'
FSeqBs4	5' - GGAACCTGGTTCAGAGGATGG - 3'
FSeqBs5	5' - GGTGATTGTTATGTGTGGGA - 3'

FSeqSARs1 5' - GGAGATGTGGCAGAAGAGGC - 3'

2.5 Medien

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) nach SAMBROOK et al. (1989) bei 37°C angezogen. *A. tumefaciens* wurde auf CPY-Medium (0,1% Hefeextrakt, 0,5% Trypton, 0,5% Saccharose, 2mM MgSO₄; pH 7,2) bei 28°C kultiviert. Die λ ZAP Express™ cDNA-Bank wurde auf NZY-Medium (SAMBROOK et al., 1989) ausplattiert.

Grundlage für die Herstellung der Medien für pflanzliche Zellkulturen bildete die Vorschrift von MURASHIGE und SKOOG (1962). Der pH-Wert der im folgenden angeführten Medien wurde vor dem Autoklavieren auf pH 5,8 eingestellt. Alle Festmedien enthielten zusätzlich 1% Difco-Agar.

MS: MURASHIGE und SKOOG-Medium (MS), 2% Saccharose
 MSCla: MS-Medium, Claforan (250mg/ml)
 ¼ MS: MS-Medium, ¼ der Salze, keine Vitamine, keine Saccharose

2.6 Klonierung und Sequenzierung

Die Durchführung von Standardmethoden (Plasmidisolierung, Restriktionsspaltungen, gelelektrophoretische Auftrennungen von Nukleinsäuren und Proteinen, allgemeine Klonierungsschritte) erfolgte gemäß den Protokollen von SAMBROOK et al. (1989). Bei der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie bei der Isolierung von Plasmid-DNA in der für die Sequenzierung erforderlichen Qualität kamen die entsprechenden Kits der Firma Qiagen zum Einsatz. Die *E. coli*-Stämme TG1 und GI724 wurden durch Elektroporation (INOUE et al., 1990), der *E. coli*-Stamm XL1-Blue mit Hilfe der Hitzeschock-Methode (COHEN et al., 1972) transformiert. Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach SANGER et al. (1977) und CHEN und SEEBURG (1985) unter Verwendung Fluorescein-markierter Oligonukleotide mit Hilfe eines automatischen A.L.F.-Sequenziergerätes (S. König, IPK Gatersleben). Das Software-Paket „PC/GENE“ Version 6.85 (IntelliGenetics) diente der Sequenzauswertung. DNA- und Protein-Sequenzvergleiche wurden mit dem BLAST-Programm (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, ALTSCHUL et al., 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt.

2.7 Isolierung von Gensequenzen durch PCR-Techniken

2.7.1 Plasmid-PCR

Die Amplifikation definierter Fragmente mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden von Plasmid-DNA zur Markierung oder weiteren Klonierung fand nach folgendem Programm

statt: nach 10min Denaturierung bei 94°C, 30-35 Zyklen: 54-63°C für 1min, 72°C für 1-2min, 95°C für 1min mit einer Endsynthese von 5-10min bei 72°C.

2.7.2 RT-PCR

Ein partielles DNA-Fragment der G-Protein- α -Untereinheit wurde durch RT-PCR („reverse transcription“-PCR) mit den degenerierten Primern MP2 und MP20 (vgl. 2.4) isoliert. Die reverse Transkription erfolgte an 20 μ g Gesamt-RNA, isoliert aus embryogenen Zellen (Tag 3 und 6 nach Protoplastierung) von *N. plumbaginifolia*, unter Zugabe von 80U RNase-Inhibitor, 2,5 μ M *antisense*-Primer (MP20), 10mM DTT, 2mM dNTP's und 400U Superscript™ II reverse Transkriptase (Gibco BRL) in einem Reaktionsansatz von 25 μ l. Nach einstündiger Inkubation bei 35°C und anschließender Hitzeinaktivierung (5min, 95°C) der reversen Transkriptase wurden an 3 μ l cDNA die komplementären Stränge unter folgenden Bedingungen synthetisiert: je 3 μ M MP2 und MP20, 1,5mM MgCl₂, 0,1mM dNTP's, 2U PrimeZyme DNA Polymerase (Biometra) in 50 μ l - 40 Zyklen: 56°C für 1min, 72°C für 1min, 94,5°C für 30s mit einer Endsynthese von 10min bei 72°C. Das erhaltene PCR-Fragment wurde aus einem 1%igen Agarosegel (1 μ g/ml EtBr) eluiert (vgl. 2.6) und in den PCR-Vektor pCR™ II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert.

2.7.3 Genomische PCR

Die Amplifikation eines partiellen Fragmentes der G-Protein- β -Untereinheit erfolgte unter Verwendung der degenerierten Primer A/ZGBsk2 und A/ZGBas1 (vgl. 2.4) von 100ng genomischer DNA aus *N. plumbaginifolia* unter nachstehenden Bedingungen: je 0,2 μ M Primer, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 2U *Taq* DNA Polymerase (Biomaster) in 50 μ l - 35 Zyklen: 55°C für 55s, 72°C für 1min, 94° für 50s mit nachfolgender Endsynthese von 10min bei 72°C. Das erhaltene PCR-Fragment wurde aus einem 0,8%igen Agarosegel eluiert (vgl. 2.6) und wie unter 2.7.2 beschrieben kloniert.

Die Selektion transgener *N. tabacum*-Pflanzen (mit den Konstrukten: 35S-G α -as, 35S-WD40-as; vgl. 3.3.10) erfolgte durch genomische PCR mit dem CaMV 35S Promotor-spezifischen Primer P35S-60 (vgl. 2.4) und den entsprechenden genspezifischen Primern von 1 μ g genomischer DNA unter folgenden Bedingungen: je 0,5 μ M beider Primer, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 3U PrimeZyme DNA Polymerase (Biometra) in 100 μ l - 30 Zyklen: 58°C für 40s, 72°C für 1,5min, 95°C für 40s mit einer Endsynthese von 5min bei 72°C.

2.7.4 Nichtradioaktive DDRT-PCR

Die nichtradioaktive DDRT-PCR („differential display reverse transcription“ - PCR) erfolgte mit einigen Modifikationen wie von SOKOLOV und PROCKOP (1994) bzw. YOSHIDA et al. (1994) beschrieben.

20µg Gesamt-RNA, isoliert aus Gewebekultur- bzw. Pflanzenmaterial, wurden 30min bei 37°C mit RNase-freier DNase I (Boehringer) inkubiert, nach einer Phenol / Chloroform-Behandlung mit 0,7v 96%igen Ethanol und 0,3M Natriumacetat aus der wäßrigen Phase gefällt und in 10µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. 5µl RNA wurden in folgendem Ansatz revers transkribiert (vgl. 2.7.2): 2,5µM Oligo-dT-Primer T₁₁GG (vgl. 2.4), 5mM MgCl₂, 2mM dNTP's, 50U RNase-Inhibitor, 40U AMV reverse Transkriptase (Boehringer) in 25µl. Anschließend erfolgte eine Amplifikation von 3µl cDNA unter nachstehenden Bedingungen: je 0,6µM Oligo-dT-Primer T₁₁GG und 10mer Zufallsprimer, 1,5mM MgCl₂, 125µM dNTP's, 4U PrimeZyme DNA Polymerase (Biometra) in 40µl - 45 Zyklen: 42°C für 1min, 72°C für 1min, 94,5°C für 1min mit einer Endsynthese von 10min bei 72°C. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt, ausgewählte Banden eluiert und direkt oder nach Reamplifikation unter identischen Bedingungen kloniert (vgl. 2.6).

2.7.5 Radioaktive DDRT-PCR

Die radioaktive DDRT-PCR wurde mit wenigen Abwandlungen wie von LIANG et al. (1993) beschrieben durchgeführt.

Nach einer DNase I-Behandlung (vgl. 2.7.4) wurden je 2µg RNA, isoliert aus Gewebekultur- bzw. Pflanzenmaterial, in nachstehendem Ansatz revers transkribiert (vgl. 2.7.2): 2,5µM Oligo-dT-Primer T₁₂AC (vgl. 2.4), 0,1mM dNTP's, 30U AMV reverse Transkriptase (Promega) in 20µl. An 2µl cDNA wurden unter Zugabe von 1,25µM Oligo-dT-Primer T₁₂AC, 0,5µM 10mer Zufallsprimer, 1,5mM MgCl₂, 50µM dNTP's, 50µCi [³⁵S] dATP und 3U *Taq* DNA Polymerase (Promega) die komplementären Stränge in 40µl unter folgenden Bedingungen synthetisiert. 40 Zyklen: 42°C für 1min, 72°C für 30s, 94°C für 30s mit einer Endsynthese von 5min bei 72°C. Zur Elution ausgewählter Banden wurden 15µl der PCR-Ansätze auf einem präparativen 6%igen PAA-Sequenzgel aufgetrennt und die anhand eines zuvor exponierten Röntgenfilms (2-3h, Kodak X-Omat, Biomax) ermittelten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in 100µl Wasser für 15min gekocht. Nach der Zentrifugation (15min; 15.000 rpm) wurde die DNA unter Zugabe von 0,3M Natriumacetat pH 4,9 sowie Glycogen (10mg/ml) und 2,5v reinem Ethanol aus dem Überstand bei -20°C über Nacht gefällt. Ein Zehntel der in 50µl tridestilliertem Wasser gelösten DNA-Fragmente wurde zur Reamplifikation (nach identischem PCR-Programm) unter nachstehenden Bedingungen eingesetzt: je 0,5µM Oligo-dT-Primer T₁₂AC und der entsprechende 10mer Zufallsprimer, 1,5mM MgCl₂, 50µM dNTP's und 2U *Taq* DNA Polymerase (Promega) in

40µl. Ausgewählte PCR-Produkte konnten nach Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel eluiert und kloniert werden (vgl. 2.6).

2.7.6 Subtraktive Hybridisierung

Die Herstellung einer für frühe Stadien der somatischen Embryogenese von *N. plumbaginifolia* spezifischen subtraktiven cDNA-Bank erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von HARA et al. (1991). Als *target*-RNA (Ziel-RNA) diente die aus frühen Embryogenesestadien (Tag 3 und 6) isolierte Gesamt-RNA. Die *subtractor*-RNA (zu subtrahierende RNA) wurde aus Blättern gewonnen. Unter Anwendung des *Dynal-MPC (Magnetic Particle Concentrator) -systems* (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) wurde die subtraktive Hybridisierung wie in BORISJUK et al. (1998) beschrieben durchgeführt. Die amplifizierten embryogenesespezifischen cDNAs wurden direkt in den PCR-Vektor pCR™ II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert und nachfolgend sequenziert (vgl. 2.6).

2.8 λ ZAP Express™ cDNA-Bank-Screening und *in vivo* Excision von Plasmid-DNA

Eine λ ZAP Express™ *Eco* RI / *Xho* I cDNA-Bank wurde aus Poly (A)+-RNA, isoliert aus somatischen Embryogenesestadien von *N. plumbaginifolia* (Tag 3, 6 und 10), hergestellt (Stratagene). Entsprechend der von Stratagene gelieferten Protokolle wurden das primäre und sekundäre Screening durchgeführt. Mit einer Phagendichte von $4,4 \times 10^4$ pfu / 145mm Petrischale wurden $5,3 \times 10^5$ Phagen der Expressions-cDNA-Bank auf 12 NZY-Platten verteilt. Dabei wurden 25µl einer 10^{-1} -Phagenverdünnung zusammen mit je 1,2ml *E. coli*-XL1-Blue MRF' Zellen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,8$) pro Petrischale in 9ml Topagarose (0,7%) ausplattiert und 9h bei 37°C inkubiert, bis Plaques von 1-2mm Größe sichtbar waren. Nach 1-2h Abkühlung bei 4°C konnten pro Petrischale 2 Filter (Nylon-Membranen: Hybond N+, Amersham) aufgelegt werden, die nach entsprechender Vorbehandlung (je 5min in 0,5M NaOH/1,5M NaCl und 0,5M Tris-HCl/1,5M NaCl, je 10min 20xSSC und 6xSSC, trocknen und 2h bei 80°C backen) mit den verschiedenen Sonden hybridisiert wurden. Als Hybridisierungssonden dienten die durch PCR-Techniken isolierten DNA-Fragmente (vgl. 2.7), die zuvor unter Verwendung des „Megaprime™ DNA labelling systems“-Kits (Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers in *random priming* Reaktionen (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1984) mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markiert wurden. Die Abtrennung nichteingebauter Nukleotide vom Sondenmaterial wurde durch „NucTrap® Probe Purification Columns“ (Stratagene) vorgenommen. Vorhybridisierung (2-4h) und Hybridisierung (12-18h) der Filter erfolgten bei 65°C in 5xSSPE/5xDenhardt's Lösung/ 0,5% SDS (Amersham; DENHARDT, 1966) unter Zugabe von 100µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA. Die Filter wurden bei 65°C dreimal in 2xSSPE

(360mM NaCl, 200mM Natriumphosphat, pH 7,2, 2mM EDTA, 0,1% SDS) und einmal mit 1xSSPE (180mM NaCl, 100mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1mM EDTA, 0,1% SDS) für je 15min gewaschen, kurz auf Filterpapier getrocknet und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Zur Autoradiographie wurde die Membran unter Verwendung eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat, Amersham) und zweier Verstärkerfolien für 48h bei -80°C exponiert.

Ein sekundäres Screening der ausgewählten Phagen mit positiven Signalen wurde auf kleinen Petrischalen (500pfu/ 100mm NZY-Platte) unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Die *in vivo* Excision der zu den ausgewählten rekombinanten λ ZAP Express-Phagen korrespondierenden pBK-CMV-Plasmide erfolgte entsprechend dem Stratagene-Protokoll.

2.9 DNA-Analyse (*Southern-Blot*)

Gesamt-DNA aus *A. tumefaciens* wurde nach der Methode von ARMITAGE et al. (1988) isoliert, mit Restriktionsendonuklease *Hind* III vollständig verdaut, die erhaltenen DNA-Fragmente in einem 1,3%igen Agarosegel aufgetrennt und durch alkalisches Blotten in 0,4N NaOH-Lösung auf eine Nylon-Membran (Hybond N⁺, Amersham) übertragen. Die nichtradioaktive Hybridisierung erfolgte mit den entsprechenden Fluorescein-markierten Genfragment-CaMV 35S-Promotor-Sonden gemäß den Angaben des Herstellers („ECL *random prime labelling system, version II*“, Amersham).

Zur Isolierung genomischer DNA aus Blättern von Wildtyp- und transgenen Pflanzen kam die Methode von MILLER et al. (1988) zur Anwendung.

Der Nachweis der Kopienzahl der untersuchten Gene in den *N. plumbaginifolia*- und *N. tabacum*-Genomen erfolgte durch *Southern*-Hybridisierung (SOUTHERN, 1975). Dazu wurden 10-20 μ g genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen in separaten Ansätzen vollständig gespalten, die Fragmente in 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt und wie für *Agrobacterium*-DNA beschrieben geblottet. Die Filter wurden mit radioaktiv markierten genspezifischen Sonden (vgl. 2.8) bei 60°C in 500mM Natriumphosphat pH 7,2, 7% SDS, 1% BSA unter Zugabe von 100 μ g/ml denaturierter Heringsperma-DNA 4h vorhybridisiert und 16h hybridisiert und anschließend dreimal in Natriumphosphat-Puffer (40mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1% SDS, 2mM EDTA) für je 20-30min bei 60°C gewaschen (CHURCH und GILBERT, 1984). Nach 12h Exposition wurden die Signale mittels Phosphorimager-Screening ausgewertet.

2.10 RNA-Analyse (*Northern-Blot*)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blättern, Wurzeln, Stengeln und Blüten von *N. tabacum*- und *N. plumbaginifolia*-Pflanzen sowie aus Zellstadien des somatischen Embryogenesesystems von *N. plumbaginifolia* wurde nach LOGEMANN et al. (1987)

durchgeführt. 20-40µg Gesamt-RNA wurden nach 10minütiger Denaturierung bei 65°C in 1,5%igen Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt (SAMBROOK et al., 1989), in 20xSSC auf Nylon-Membranen (Hybond N+, Amersham) transferiert und anschließend durch UV-Licht (320nm) fixiert. Die Hybridisierung erfolgte bei Wahl der Hybridisierungstemperatur von 65°C wie unter 2.9 beschrieben.

2.11 Antigen- und Antikörperproduktion

2.11.1 Expression von Genfragmenten im *E. coli*-QIAexpress™ System

Teile der proteinkodierenden Regionen der Gene wurden als Restriktionsfragmente entsprechend den Leserahmen in die Expressionsvektoren pQE30 oder pQE32 (Qiagen) kloniert und anschließend die bakteriellen Expressionsstämme *E. coli* M15[pREP4] oder SG13009[pREP4] mit diesen Konstrukten transformiert. Die Überexpression und die Extraktion der rekombinanten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen aus den Bakterienzellen entsprechend der *QIAexpress™ Systems*-Protokolle. Nach Aufreinigung an Agarose-fixierten Nickelionen (Ni-NTA *Spin Kit*, Qiagen) wurden die rekombinanten Proteine zur Immunisierung von Kaninchen und Mäusen für die Antikörperproduktion (vgl. 2.11.4) eingesetzt.

2.11.2 Expression von Genfragmenten im *E. coli*-ThioFusion™ Expression System

Mit Hilfe der Oligonukleotide Athio-s und Athio-as (vgl. 2.4) und der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) wurde ein Teil der proteinkodierenden Region der G-Protein- α -Untereinheit amplifiziert und dabei mit geeigneten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen für die anschließende Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pTrxFus (Invitrogen) versehen. Die Transformation des *E. coli*-Stammes GI 724, die Anzucht der Bakterienklone, die Expression des Fusionsproteins und die Extraktion der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden analog den Invitrogen-Vorschriften vorgenommen.

2.11.3 N-terminale Proteinsequenzierung und synthetische Polypeptide

Die Expression eines Teilfragmentes des Klons NL28 im *E. coli*-QIAexpress™ System (vgl. 2.11.1) wurde durch Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz (C. Horstmann, IPK Gatersleben) überprüft. Nach elektrophoretischer Auftrennung der aus den IPTG-induzierten NL28-Bakterienkulturen isolierten Proteine in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel (vgl. 2.12) erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran (NEN®). Die Membran wurde vor dem Transfer in folgenden Lösungen inkubiert: 1min 96%iger Ethanol, 3min Millipore-Wasser und 15min Transferpuffer (0,025M Tris, 0,25M Glycin,

20% Methanol; pH 8,3). Nach erfolgtem Transfer und Waschen für 3x4min in Millipore-Wasser wurden die Proteine für 2min mit 0,025% Brillantblau R250 in 40%igem Methanol angefärbt. Nach Entfärben in 50%igem Methanol wurde erneut 4x mit Millipore-Wasser gewaschen und nach Trocknen die entsprechende Proteinbande für die Aminosäuresequenzierung ausgeschnitten.

Aus der abgeleiteten Proteinsequenz des Klons pNLA35 wurde ein Hydropathieprofil erstellt, aus dem die beiden hydrophilen Peptide ermittelt wurden [Peptid1: Pro-Glu-Asn-Ala-Leu-Lys-Arg-Ala-Glu-Glu-Leu-Ileu-Thr-Val-Gly-Gln-Lys-Gln-Glu-Ala-(Tyr); Peptid2: Glu-His-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Arg-Lys-Ser-Ileu-Ileu-Glu-Lys-Arg-Lys-Glu-Glu-Gln-Glu-(Tyr)].

Die Polypeptidsynthese und Peptidkopplung an das Trägerprotein KLH mittels Bisdiazobenzidin im Verhältnis 10:1 wurde von der SNPE GmbH (Frankfurt / Main) durchgeführt.

Rekombinantes Polypeptid sowie die Kopplungsprodukte aus KLH und Immunozeptiden wurden als Antigene zur Produktion polyklonaler Antiseren eingesetzt.

2.11.4 Antikörperproduktion

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte sowohl in Kaninchen als auch in Mäusen.

Die Immunisierung von Kaninchen wurde nach modifiziertem Protokoll von MANTEUFFEL und PRZYBYLSKA (1987) durchgeführt. Für die primäre Immunisierung wurden 0,5mg/ml Proteinlösung (Antigen) im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freundschens Adjuvans gemischt und Versuchstiere an multiplen Stellen (Rücken und Nacken) subkutan immunisiert. Zweite und dritte Immunisierung erfolgten nach 36 bzw. 46 Tagen mit jeweils der gleichen Antigenmenge, die jedoch mit inkomplettem Adjuvans gemischt wurde. 10 Tage nach der dritten Immunisierung wurde Probeblut entnommen und zur Bestimmung von Spezifität und Titer des Antiserums mittels *Dot-Blot* oder *Western-Blot* getestet. In Abhängigkeit von der Serumqualität wurde die Immunisierung fortgesetzt oder das Versuchstier zur Serumgewinnung geschlachtet.

Die Immunisierung von Mäusen wurde in modifizierter Form nach CEVENINI et al. (1991) vorgenommen. Dabei erfolgte die Antigenaufbereitung für die 1. (0 Tage), 2. (30 Tage) und 3. Immunisierung (40 Tage) wie für Kaninchen beschrieben. Zur Immunisierung wurde Versuchstieren 100µg/ml Antigenlösung intraperitoneal gespritzt. 7 Tage nach der 3. Immunisierung wurde Probeblut aus dem Augensinus entnommen und das Serum wie oben beschrieben getestet. Bei guter Serumqualität wurde den Versuchstieren intraperitoneal eine Ehrlich-Ascites-Zellsuspension appliziert und nach 5-6 Tagen die gebildete Peritonealflüssigkeit entnommen. Durch Zentrifugation (5000rpm, 15min) wurde zellfreier Ascitis gewonnen.

Die Reinigung der Antikörper (IgG-Fraktion) aus Serum bzw. Ascitisflüssigkeit erfolgte durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation (50% bzw. 30% Sättigung) und anschließender Affinitätschromato-

graphie an Protein A-Sepharose bzw. Anti-IgG-Antikörper-Sepharose oder durch Immunabsorption (SMITH und FISCHER, 1984) an Träger-fixiertem Antigen.

2.12 Gelelektrophoretische Proteinanalyse

2.12.1 Proteinextraktion und Elektrophorese

Lösliche und Mikrosomen-Proteinfraktionen wurden aus Blättern, Wurzeln, Stengeln und Blüten von im Gewächshaus kultivierten Pflanzen sowie aus *in vitro*-Zellkulturstadien des somatischen Embryogenesesystems von *N. plumbaginifolia* isoliert. Das Gewebekultur- und Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 50mM Hepes-Puffer (5mM EDTA, 0,1mg/ml butyliertes Hydroxytoluen, 2mM DTT, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 1mg/ml BSA, 0,5M Saccharose, 1mM PMSF; pH 7,5) extrahiert. Nach Filterung des Homogenisats durch ein Nylonnetz (40µm) erfolgte eine Zentrifugation (8000g) bei 4°C für 10min. Der resultierende Überstand wurde erneut gefiltert und anschließend in einer Ultrazentrifuge (Beckman, München) bei 110000g für 45min zentrifugiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes der löslichen zytoplasmatischen (Überstand) und der mikrosomalen Proteinfraktionen (Pellet) wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt. BSA diente dabei als Standardprotein.

Die Proteine wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel nach LAEMMLI (1970) aufgetrennt und anschließend mit Brillantblau R250 angefärbt oder für den Immunnachweis auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (vgl. 2.12.2).

2.12.2 Western-Blot

Die im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Polypeptide (vgl. 2.12.1) wurden in Transfer-Puffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol, 1% SDS) auf Nitrozellulosemembranen (BA85, 0,4µm; Schleicher&Schüll) elektrophoretisch überführt. Nach dem Transfer wurden die Membranen zweimal 5min in TBS (10mM Tris-HCl, 0,9% NaCl; pH 7,4) mit 0,5% Triton X-100 und anschließend einmal 5min in TBS ohne Detergenz bei Raumtemperatur (Rt) gewaschen. Die Membranen wurden 4h bei Rt mit 3% BSA in TBS abgesättigt und anschließend einmal 5min in TBS gewaschen. Die Inkubation mit den entsprechenden primären genspezifischen Antikörpern erfolgte in TBS mit 0,5% BSA / 0,05% Tween 20 für 1h bei Rt oder 12h bei 4°C. Anschließend wurden die Membranen dreimal in TBS mit 0,5% Triton X-100 und einmal in TBS ohne Detergenz für je 10min bei Rt gewaschen und 1h bei Rt mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat (je nach verwendetem primären Antikörper: Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat, Amersham) in TBS mit 1% BSA inkubiert. Nach Entfernung des ungebundenen Antikörper-Enzym-Konjugates durch die obengenannten Waschschritte erfolgte der Signalnachweis durch Chemolumineszenztechnik unter Verwendung des ECL-Systems („*Western blotting analysis system*“,

Amersham). Wahlweise wurden auch Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG-Biotin und Streptavidin-ALP in Kombination mit einer BCIP / NBT-Aktivitätsfärbung (Sigma) zum Signalnachweis eingesetzt.

Als Kontrollen für die *Western-Blot*-Experimente wurde anstelle der primären Antikörper die IgG-Fraktion aus dem Serum nichtimmunisierter Kaninchen oder Mäuse verwendet.

2.13 Immunhistologie

2.13.1 Lichtmikroskopie

Für die Genprodukte der cDNA-Klone Np22c28 und pNLA35 wurden immunhistologische Untersuchungen an zygotischen Embryonen von *N. plumbaginifolia* am Lichtmikroskop durchgeführt.

Die Blüten von *N. plumbaginifolia*-Pflanzen wurden per Hand befruchtet und die Ovarien 3, 6, 8 und 10 Tage nach Befruchtung herauspräpariert. Nach Fixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS mit 2mM EGTA für 4h bei Rt oder 12h bei 4°C wurden die Ovarien 30min unter Vakuum infiltriert. Weitere Behandlungen der fixierten Proben wie die schrittweise Dehydrierung und die anschließende Einbettung in Paraplast Plus (Sherwood Medical) erfolgten nach BORISJUK et al. (1998). Die unter Verwendung eines Mikrotoms angefertigten Gewebedünnschnitte (3-5µm) wurden auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Sigma) auf einen Tropfen Wasser überführt und 4-5 Tage bei 37°C luftgetrocknet. Nach Überprüfung der Gewebeschnittqualität durch Anfärbung mit Toluidinblau wurden die Immunfärbungen durchgeführt. Nach Entfernung des Einbettungsmediums durch drei aufeinanderfolgende Spülungen der Objektträger in Rotihistol (Roth) für je 20min erfolgte eine Rehydrierung der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100-10%). Die Objektträger wurden für 5min in PBS überführt, anschließend 15min mit 500mM Lysin in PBS behandelt und mit 10% Pferdeserum und 3% BSA-enthaltender PBS-Lösung abgesättigt. Der Nachweis der entsprechenden Proteine wurde unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-ALP-systems (Sigma) nach MANTEUFFEL und PANITZ (1993) durchgeführt. Nach ALP-vermittelter Färbung mit dem Substratgemisch NBT/BCIP wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Entellan (Merck) eingebettet. Das Auswerten der Präparate erfolgte an einem Axioskop (Zeiss). Die Bilder wurden mit der Mikroskopkameraeinrichtung MC80 (Zeiss) auf einen Kodak Ektachrome 400 Diafilm aufgenommen.

Als Kontrolle für die immunhistologischen Experimente diente die aus dem Serum nichtimmunisierter Kaninchen gereinigte IgG-Fraktion, die in identischer Konzentration wie der entsprechende primäre Antikörper eingesetzt wurde.

2.13.2 Elektronenmikroskopie

Für die Genprodukte der cDNA-Klone $\alpha 2/4$, $\beta 16/1$, 50Sar und pNLA35 erfolgte der immunzytologische Nachweis mit dem Transmissionselektronenmikroskop (EM) an jungen Stadien (6 bis 8 Tage nach Befruchtung) sich entwickelnder Samen von *N. plumbaginifolia*. Die Samen wurden für 2h in 3% Formaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd enthaltendem 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,2) bei Rt präfixiert. Nach Einfrieren der Proben unter Hochdruck erfolgte eine Gefriersubstitution in Aceton mit 6% Glutaraldehyd zunächst für 50h bei -90°C, danach für 112h bei -70°C in frischem Medium und abschließend für 1h bei -35°C. Nach Infiltration mit dem Harz Lowycryl HM20 (Plano GmbH) bei -35°C wurden die Gewebeblöcke in einer AFS-Apparatur (LEICA) für 70h bei -35°C UV-polymerisiert. Ultradünnschnitte des eingebetteten Zellmaterials wurden auf EM-Trägernetze aufgezogen und wie folgt markiert:

Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte für 15min in einem Tropfen 3%iger BSA-Lösung in TBS (pH 7,8) bei Rt inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern, verdünnt in TBS / 0,1% BSA, erfolgte für 60-90min unter leichtem Schütteln bei Rt. Nach fünfmaligem Waschen für je 5min in TBS wurden die Schnitte mit einem Protein A-Gold-Komplex (PAG 15, BIOCELL) in einer Verdünnung von 1:30 in TBS mit 0,1% BSA für 60min bei Rt inkubiert. Die Schnitte wurden dann viermal für je 5min mit 0,5% BSA und 0,1% Tween-20 enthaltender PBS-Lösung und einmal für 5min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach Kontrastierung der Schnitte mit 5%igem wäßrigen Uranylacetat für 20min erfolgte der Nachweis der Immunogoldmarkierung an einem CEM 902A Transmissions-Elektronenmikroskop (CARL ZEISS). Die EM-Bilder wurden unter Verwendung eines AGFA Duoscan Scanners und der Software-Programme Adobe Photoshop 3.0 (Adobe Systems Inc.) und Micrografx Designer 4.1 (Micrografx Inc.) bearbeitet.

2.14 Somatische Embryogenese von *N. plumbaginifolia*

Für die Untersuchungen zur differentiellen Expression von Genen im Verlauf der somatischen Embryogenese von *N. plumbaginifolia* stand ein von Frau Dr. Tewes (IPK, Gatersleben) etabliertes direktes somatisches Embryogenesesystem zur Verfügung. Demzufolge soll das von REINBOTHE et al. (1992) publizierte Protokoll zur Induktion der somatischen Embryogenese an *N. plumbaginifolia*-Mesophyllprotoplasten nur kurz erläutert werden. *N. plumbaginifolia*-Pflanzen wurden 4-6 Wochen unter sterilen Bedingungen auf modifiziertem MS-Medium (TEWES et al., 1991) angezogen. Blätter der *in vitro* kultivierten Pflanzen dienten als Ausgangsmaterial für die Protoplastenisolierung. Nach Einschneiden der oberen Epidermis und Entfernen der Mittelrippe wurden die verwundeten Blätter in Petrischalen auf K3-Medium (NAGY und MALLIGA, 1976) unter Zusatz von 0,4M Saccharose, 1% Zellulase Onozuka R-10 und 0,4% Mazeroenzym R-10 bei Dunkelheit und 26°C für 12-16h inkubiert. Die freigesetzten Protoplasten wurden nach mehreren Waschschr

0,5M Saccharose in K3-Medium und mit W5-Puffer (MENCZEL et al., 1981) in K3-Medium mit 0,4M Mannitol, 3% Saccharose, 2mg/l NES und 1mg/l BA überführt. Die mit einer Zelldichte von 7×10^3 Zellen/ml Medium gestartete *in vitro*-Protoplastenkultur erfolgte zunächst bei Dunkelheit und anschließend bei Schwach-Licht. Nach 6 Tagen wurden die Hormonkonzentrationen durch Medienaustausch auf 0,02 mg/l NES und 0,2 mg/l BA reduziert. Zwischen dem 10. und 17. Tag erfolgte durch Verdünnung des Kulturmediums mit modifiziertem MS-Medium ohne Mannitol eine schrittweise Reduktion der Medien-Mannitol-Konzentration von 0,4M auf 0,2M.

Eine kontinuierliche Zellsuspensionskultur wurde aus Kallusgewebe von *N. plumbaginifolia* angelegt und auf modifiziertem MS-Medium mit 2mg/l 2,4-D (TEWES et al., 1991) unter konstanten Kulturbedingungen (Dunkelheit, 22°C) kultiviert.

2.15 Blattscheiben- und Suspensionskulturtests

2.15.1 Blattscheibentest

Durch einen Blattscheibentest wurde der Einfluß von Auxin (2mg/l=10,8µM NES), Zytokinin (1mg/l=4,4µM BA), Abscisinsäure (50µM ABA), Gibberellinsäure (50µM GA₃), Salicylsäure (1mM) und von osmotischem Streß (0,6M Mannitol) auf die Expressionsmuster spezifischer mRNA-Spezies analysiert. Aus Blättern von Tabakpflanzen wurden zu beiden Seiten der Mittelrippe Blattscheiben ausgestanzt. Jeweils die gegenüberliegenden Blattscheiben wurden einer Behandlung und dem dazugehörigen Kontrollansatz zugeordnet. Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Wertes des Pflanzenmaterials wurden die Blattscheiben in einer 0,2M Mannitol-Lösung ohne Hormonzugabe (Kontrolle) bzw. mit Hormon- oder Salicylsäurezusatz inkubiert. Mit Ausnahme der Salicylsäurebehandlung (12h) erfolgten alle Hormon-Inkubationen und die osmotische Streßbehandlung über 3 Tage.

Verwundungsstreß wurde direkt an der Pflanze selbst durch Einritzen der Blätter und Blattprobennahmen nach 6 und 24h getestet.

2.15.2 Suspensionskulturtest

An Suspensionskulturen wurde der konzentrationsabhängige Einfluß von Auxin (2mg/l bzw. 0,2mg/l NES) und Zytokinin (1mg/l bzw. 0,1mg/l BA) sowie die Applikation von Kalzium (15mM CaCl₂) auf die Expression spezifischer mRNA-Spezies getestet. Die jeweilige Inkubation erfolgte über 3 Tage. Als Kontrolle der Zytokinin- und Kalziumbehandlung diente eine unbehandelte Dauersuspensionskultur (vgl. 2.14). Zum Nachweis des Auxineinflusses wurde die Suspensionskultur, die normalerweise in auxinhaltigem Medium kultiviert wird, 3 Tage durch Medienverdünnungen schrittweise abgehungert, um die endogene Auxinkonzentration gegen 0 zu reduzieren.

Gleichfalls wurde der Einfluß einer Kälte- bzw. Hitzeschockbehandlung sowie der Lichteinfluß unter Verwendung von Zellsuspensionskulturen untersucht. Dazu wurden die Zellkulturen im Dunkeln gehalten und entweder für 24h bzw. 3 Tage bei 4°C kältebehandelt oder einem Hitzeschock ausgesetzt (15min 40°C, 3h 25°C, 1,5h 40°C). Die Belichtung der Suspensionskulturen erfolgte für 4 bzw. 8h mit $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.16 Herstellung transgener Pflanzen

2.16.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Durch Elektroporation wurde der *A. tumefaciens*-Stamm C58C1 [pGV2260] mit Plasmid-DNA transformiert und anschließend bei 28°C kultiviert. Der Nachweis der klonierten DNA-Fragmente in den rekombinanten Bakterienklonen erfolgte mittels nichtradioaktiver *Southern*-Hybridisierung (vgl. 2.9).

2.16.2 Pflanzentransformation

N. tabacum-Pflanzen wurden mit Hilfe des *A. tumefaciens* vermittelten Gentransfers transformiert. Für die als *leaf disk* Transformation bezeichnete Methode (HORSCH et al., 1985) wurden Blätter von Gewächshaus- bzw. *in vitro* kultivierten Pflanzen nach einer 15minütigen Oberflächensterilisierung mit 30% Domestos und anschließendem mehrmaligen Spülen in sterilem Wasser verwendet. Nach Auslegen der Blattstückchen auf MS-Medium mit 0,1mg/l NES und 1,0mg/l BAP für 2 Tage folgte eine zweitägige Kokultivierung mit den entsprechenden rekombinanten Agrobakterien auf demselben Medium. Die anschließend auf MSCla-NES-BAP-Platten überführten Blattstückchen bildeten nach etwa 4-6 Wochen Sprosse, welche zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin transferiert wurden. Die auf Kanamycin-Medium *in vitro* regenerierten Pflanzen wurden in Erde gepflanzt und in das Gewächshaus überführt.

2.16.3 Anzucht der Pflanzen

Reife *N. tabacum*- und *N. plumbaginifolia*-Samen wurden für 5min in 10%iger NaOCl-Lösung oberflächensterilisiert und anschließend zweimal 10min in sterilem Wasser gespült. Die Keimung erfolgte auf $\frac{1}{4}$ MS- oder MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin für die Samen transgener Pflanzen und ohne Kanamycin-Zusatz für Wildtypsamen. *N. plumbaginifolia*-Samen wurden vor der Überführung auf MS-Medium auf angefeuchtetem Filterpapier vorgekeimt. Nach Anzucht der Sämlinge auf MS-Medium in Kulturkammern (22°C, 50% Luftfeuchte, $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Belichtung, 16h Licht- / 8h Dunkelrhythmus) wurden diese in Erde überführt und im Gewächshaus (16h Licht- / 8h Dunkelrhythmus) weiter kultiviert.

3 Ergebnisse

3.1 Morphogenetische Charakterisierung des somatischen Embryogenesesystems von *N. plumbaginifolia*

Da zygotische Embryonen der frühen pflanzlichen Embryonalentwicklung einer experimentellen Bearbeitung schwer zugänglich sind, wurde als Untersuchungsmaterial ein direktes somatisches Embryogenesesystem von *Nicotiana plumbaginifolia* (A. Tewes; IPK Gatersleben) gewählt. Ausgehend von Mesophyllprotoplasten führt dieses *in vitro* Kultursystem ohne intermediäre Kallusbildung mit hoher Frequenz und relativer Homogenität direkt zu embryogenen Zellstadien und nachfolgend zur Regeneration von Ganzpflanzen (vgl. 2.14). Freigesetzte Mesophyllprotoplasten werden nach erfolgten Zellwandregenerationen durch einen kurzen Puls (3 Tage) hoher NES/BA-Konzentrationen zu Zellteilungen angeregt. Nach drei Tagen der *in vitro*-Kultur führen kontinuierliche Verdünnungen der NES (1/100)- bzw. BA (1/5)-Konzentrationen zur Ausbildung embryogenesetypischer inäqualer Zellteilungsstadien (3. Tag). Weitere Zellteilungen erfolgen intern, so daß am 6. Tag der *in vitro*Zellkultur bis zu 8 Zellstadien ausgebildet werden. Nach der Ausbildung mehrzelliger kompakter Zellaggregate (bis Tag 15) werden globuläre (bis Tag 18) und danach höherorganisierte embryogene (Tag 21) Zellstrukturen sichtbar, die später ergrünen (um Tag 27) und Sproßprimordien entwickeln (ab Tag 34). Innerhalb von 6-8 Wochen regenerieren aus der embryogenen Zellpopulation Ganzpflanzen. Abb. 1 zeigt Entwicklungsstadien des somatischen Embryogenesesystems von *N. plumbaginifolia* während der *in vitro*-Kultivierung.

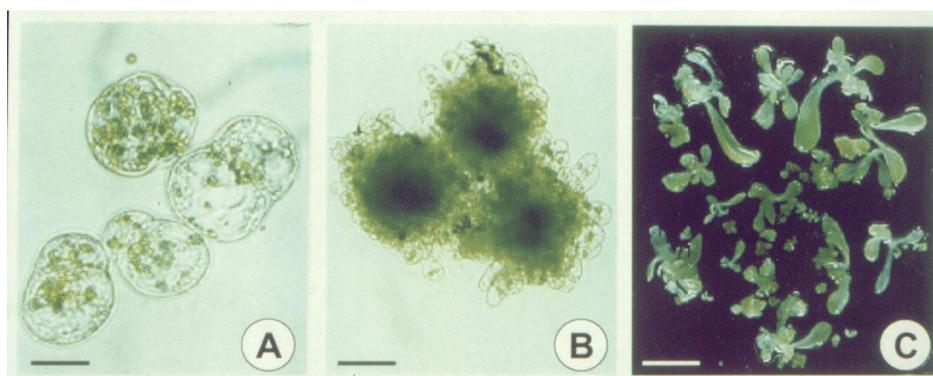


Abb. 1 Direkte somatische Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia*. Lichtmikroskopische Aufnahmen charakteristischer Entwicklungsstadien: **(A)** erste inäquale Zellteilung, 3. Kulturtag; **(B)** globuläre Embryonen, 14. Kulturtag; **(C)** wurzellose Sproßsegmente, 40. Kulturtag. Die Balkenlängen entsprechen 20µm (A), 75µm (B), 1cm (C)

Als Kontrollen des somatischen Embryogenesesystems wurden Blattgewebe *in vitro* kultivierter Pflanzen und eine kontinuierliche Suspensionskultur von *N. plumbaginifolia* verwendet. Letztere stellt eine hochproliferierende Zellkultur mit embryogener Potenz dar,

die unter konstanten *in vitro*-Kulturbedingungen bei hohen Auxinkonzentrationen jedoch keine embryogenen Strukturen ausbildet (vgl. 2.14).

3.2 Isolierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen aus embryogenen Stadien von *N. plumbaginifolia*

DDRT („differential display reverse transcription“)-PCR-Technik (vgl. 3.2.1) sowie subtraktive Hybridisierung (vgl. 3.2.2) wurden eingesetzt, um aus frühen embryogenen Stadien (bis Tag 10, vgl. 3.1) hoch abundante, partielle cDNA-Sequenzen zu isolieren. Zur weiteren Charakterisierung ausgewählter cDNA-Sequenzen wurden die korrespondierenden vollständigen Klone aus λ ZAP Express™ cDNA-Banken (Stratagene) isoliert. Eine der Expressions-cDNA-Bibliotheken repräsentiert mRNA-Populationen aus frühen somatischen Embryogenesestadien (Tag 3, 6 und 10) von *N. plumbaginifolia* (vgl. 3.1), während die andere aus RNA von *N. tabacum*-Blattgewebe hergestellt wurde. Weiterhin wurden computergestützte Sequenzanalysen, genomische *Southern-Blot*-Experimente, Untersuchungen zu gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen mRNA- und Proteinexpressionsmustern sowie immunhistologische Proteinnachweise durchgeführt (vgl. 3.2.3).

3.2.1 Isolierung von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der DDRT-PCR - Technik

Zur Isolierung von cDNA-Sequenzen für Gene, die in frühen Embryogenesestadien induziert werden bzw. ein erhöhtes Expressionsniveau aufweisen, wurden unabhängige DDRT-PCR-Experimente sowohl mit radioaktiv markierten als auch unmarkierten dNTPs durchgeführt.

Für die radioaktiven DDRT-PCR-Versuche (vgl. 2.7.5) wurde Gesamt-RNA aus embryogenen Stadien (Tage 3, 6, 10), Blattgewebe und Suspensionskulturzellen von *N. plumbaginifolia* isoliert. Dabei bildeten Suspensionskultur und Blattgewebe die Kontrollansätze für die embryogenen Zellstadien. Nach reverser Transkription aller mRNAs in unabhängigen Reaktionen mit dem Oligo-dT-Primer T₁₂AC erfolgte die Amplifikation der cDNAs unter Zugabe eines 10mer Zufallsprimers. Insgesamt wurden in separaten Ansätzen fünf verschiedene 10mer Zufallsprimer (Pdd02-Pdd06; vgl. 2.4) verwendet. Aus den 6%igen Sequenzgelen von fünf DDRT-PCR-Versuchen wurden im Vergleich zu den Kontrollansätzen 24 Banden (195-441bp) mit erhöhter Expression in embryogenen Stadien (Tage 3, 6 oder / und 10) isoliert, reamplifiziert und in den PCR-Vektor pCR™ II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert.

Ausgangsmaterial der nichtradioaktiven DDRT-PCR-Versuche (vgl. 2.7.4) bildeten zwei Gesamt-RNA-Präparationen, isoliert aus einem Gemisch embryogener Stadien (Tage 6, 10) und aus Blattgewebe. Nach reverser Transkription der mRNAs mit dem Oligo-dT-Primer T₁₁GG erfolgten unter Zusatz eines 10mer Zufallsprimers (Pdd01, Pdd02, Pdd04, Pdd06; vgl. 2.4) je vier unabhängige PCR-Amplifikationen. Aus dem 1,5%igen Agarosegel wurden

im Vergleich zu den Blattkontrollen 6 cDNA-Banden (405-900bp) mit erhöhtem Expressionsniveau in embryogenen Stadien isoliert und in den PCR-Vektor pCR™ II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert. Abb. 2 zeigt die im 1,5%igen Agarosegel aufgetrennten PCR-Banden der nichtradioaktiven DDRT-PCR-Versuche.

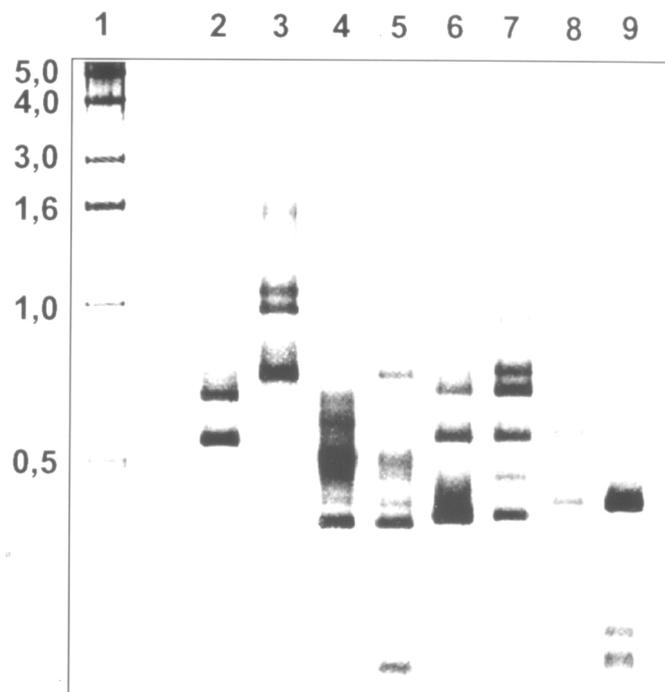


Abb. 2 Vergleich der mRNA-Expressionsmuster von Blättern (Bahnen: 2, 4, 6, 8) und Embryogenesestadien der Tage 6 und 10 (Bahnen: 3, 5, 7, 9) von *N. plumbaginifolia* durch nichtradioaktive DDRT-PCR. Die RT-PCR-Amplifikationen erfolgten mit dem *antisense*-Primer T₁₁GG in Kombination mit einem der vier *sense*-Primer Pdd01 (Bahnen: 2, 3), Pdd02 (Bahnen: 4, 5), Pdd06 (Bahnen: 6, 7) oder Pdd04 (Bahnen: 8, 9). Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im 1,5%igen TAE-Agarosegel mit EtBr gefärbt. Bahn 1: DNA-Marker (GIBCO-BRL). Die Größen der Molekulargewichtsstandard-DNA-Fragmente sind links in kb angegeben

3.2.2 Isolierung von cDNA-Fragmenten durch subtraktive Hybridisierung

Zur Isolierung embryogenesespezifischer Gene wurde ein subtraktives Hybridisierungsexperiment durchgeführt (L. Sitailo, IPK Gatersleben; vgl. 2.7.6). Dabei sollte die Subtraktion des mRNA-Populationsgemisches, isoliert aus embryogenen Zellstadien (Tag 3 und 6), von einer Blattgewebe-mRNA-Population zur gezielten Anreicherung von cDNA-Sequenzen mit Spezifität für frühe Embryogenesestadien führen. Unter Verwendung des *Dynal-MPC* (*Magnetic Particle Concentrator*) -systems (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) erfolgte die subtraktive Hybridisierung wie in BORISJUK et al. (1998) beschrieben. Die erhaltenen cDNA-Spezies wurden unter Zusatz der beiden *sense*- und *antisense*-Primer PsH-s und PsH-as (vgl. 2.4) amplifiziert und in den PCR-Vektor pCR™ II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert.

Ausgewählte partielle cDNA-Inserts der rekombinanten Bakterienklone wurden sequenziert und mRNA-Expressionsanalysen unterzogen.

3.2.3 Charakterisierung ausgewählter cDNA-Fragmente

Aus frühen Embryogenesestadien (Tag 3, 6 und 10) von *N. plumbaginifolia* konnten unter Anwendung differentieller Screening-Methoden (vgl. 3.2.1 und 3.2.2) zahlreiche partielle cDNA-Sequenzen isoliert und kloniert werden. Um Aufschlüsse über mögliche Funktionen der isolierten Gensequenzen zu erhalten, wurden DNA- und Proteinhomologievergleiche mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken durchgeführt. Neben zahlreichen Klonen ohne Homologien zu bekannten Sequenzen konnten die kodierenden Regionen einiger cDNA-Sequenzen aus DDRT-PCR-Versuchen als Sequenzen für ein WD40-Protein (vgl. 3.3), ribosomale Proteine oder für eine Pektinmethylesterase identifiziert werden. Die subtraktive Hybridisierung ergab, bedingt durch die Primerwahl, einen hohen Anteil (40%) an Klonen mit Homologien zu dem Kalzium-bindenden Protein Calreticulin. Außerdem konnten cDNA-Sequenzen, die für ein kleines Sar-homologes GTP-bindendes Protein (vgl. 3.3) und für die ribosomalen Proteine S17, S5 und L15 kodieren, isoliert werden. Inwieweit die korrespondierenden mRNA-Spezies Embryogenesespezifität besitzen, wurde durch *Northern*-Experimente überprüft. Dazu wurden 10-20µg Gesamt-RNA aus Protoplasten, embryogenen Stadien (Tage 3, 6, 10, 14, 28), Suspensionskultur und Blattgewebe mit den radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Die geringe Größe einiger PCR-Produkte führte zu ineffizienter radioaktiver Markierung und so zu nicht auswertbaren *Northern*-Resultaten. Von den übrigen getesteten PCR-Produkten zeigten nur zwei (Kat41-3, NL28) höhere Expression in frühen Embryogenesestadien. Neben den cDNA-Klonen mit Homologien zu GTP-bindenden Proteinen (vgl. 3.3) wurden die drei partiellen cDNA-Klone Kat41-3, NL28 und NL35 weiter charakterisiert.

3.2.3.1 Kat41-3 (c41-3)- ein mutmaßlicher Transkriptionsfaktor

Nach radioaktiver DDRT-PCR mit den Primern T₁₂AC und Pdd04 (vgl. 2.7.5 und 3.2.1) wurden aus einem 6%igen SDS-PAA-Gel drei PCR-Produkte (41, 42, 43) im Größenbereich von 200-400bp isoliert. Deutlich höhere Quantitäten dieser PCR-Produkte wurden unter Verwendung von mRNA-Präparationen aus Zellkulturstadien der Tage 3 oder / und 6 im Vergleich zum Tag 10 bzw. zur Dauerkultur erhalten. Von mRNA-Präparationen späterer Kulturstadien (Tag 14, 28) bzw. Blättern war keine Amplifikation von PCR-Produkten der obengenannten Größen nachzuweisen. Die Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pCRTM II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) und die Transformation von *E. coli* XL1 Blue ergab pro Ausgangs-PCR-Fragment 1 (Kat43-10) bzw. 2 (Kat41-1 und Kat41-3; Kat42-15 und Kat42-19) Typen rekombinanter Bakterienklone. Die fünf DNA-Fragmente (195-376bp) wurden nach Amplifikation durch Plasmid-PCR (vgl. 2.7.1) mit den Primern T₁₂AC und

Pdd04 isoliert, radioaktiv markiert und als Sonden für *Northern-Blot*-Experimente eingesetzt (vgl. 3.2.3). Mit Ausnahme von Kat41-3 erwiesen sich die Klone als „falsch positive DDRT-PCR-Fragmente“ ohne differentielles mRNA-Expressionsmuster bzw. war deren korrespondierende mRNA (Kat43-10) nicht nachweisbar.

Die Kat41-3-mRNA zeigte im *Northern-Blot* ein differentielles Expressionsmuster mit hohen Transkriptmengen in frühen Embryogenesestadien (Daten nicht gezeigt). Das partielle DNA-Fragment Kat41-3 wurde vollständig sequenziert. Es ist 296bp lang, enthält das C-terminale Ende (98bp) eines offenen Leserahmens (ORF) und eine 198bp 3'-nicht-translatierte Region (UTR) inklusive poly A-Schwanz sowie an den Enden die Primer-Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Ein Sequenzvergleich des DNA-Fragmentes Kat41-3 auf Nukleotid- und Proteinebene mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken ergab keine signifikanten Homologien.

Zur Isolierung der korrespondierenden vollständigen cDNA wurde das DNA-Fragment Kat41-3 als radioaktiv markierte Sonde zum Screening von 400.000 Phagen der λ ZAP Express™ cDNA-Bank für frühe embryogene Stadien eingesetzt (vgl. 2.8). Nach zwei Screening-Runden konnten drei cDNA-Klone isoliert werden, von denen nur ein Klon (c41-3) einen vollständigen ORF enthielt.

Die DNA- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz des Klons c41-3 sind im Anhang I dargestellt. Die cDNA enthält ein Insert von 664bp Länge, das in dem entsprechenden Bereich eine 83,9%ige Nukleinsäuresequenzidentität mit dem dd-Fragment Kat41-3 aufwies. An Position 39 beginnt ein 498bp langer ORF, der für ein 165As langes Protein mit einem ermittelten Molekulargewicht von 17,86kDa kodiert. Sequenzvergleiche auf Nukleotid- und Proteinebene mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken (vgl. 2.6) ergaben Aminosäuresequenzhomologien zu den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren BTF3 aus *Homo sapiens* (49,70%, BTF3_HUMAN, Accession-Nummer: P20290; ZHENG et al., 1990) und *Mus musculus* (49,70%, BTF3_MOUSE, Acc.-Nr.: Q64152; DENG und BEHRINGER, 1995) sowie zu dem BTF3-homologen Protein aus *Candida elegans* (40,99%, BTF3_CAEEL, Acc.-Nr.: Q18885; FULTON, swissprot-Datenbank). Das Protein wurde daher mit NPBTF3L bezeichnet (für *N. plumbaginifolia* **BTF3** like). Mit Hilfe des PCGENE Programmes PROSITE wurde die NPBTF3L-Sequenz auf potentielle Domänenstrukturen untersucht. Mehrere Phosphorylierungsorte (Proteinkinase C [5], Caseinkinase II [3]) sowie N-Myristoylierungsstellen (4) wurden gefunden. Potentielle DNA-Bindungsdomänen wurden nicht identifiziert.

Um das Expressionsverhalten der korrespondierenden NPBTF3L-mRNA hinsichtlich Gewebespezifität und Entwicklungsabhängigkeit zu untersuchen, wurden *Northern-Blot*-Experimente durchgeführt (vgl. 2.10). Dazu wurde Gesamt-RNA aus Protoplasten, 7 Embryogenesestadien, der Dauerkultur, jungen, mittelalten und alten Blättern sowie aus Wurzeln, Stengeln und Blüten mit dem radioaktiv markierten c41-3-Fragment hybridisiert. Abb. 3A zeigt die mRNA-Expression im Verlauf der somatischen Embryogenese. Hohe

Transkriptmengen der NPBTF3L-mRNA sind in frühen embryogenen Stadien bis zum 6. Kulturtag nachzuweisen mit der stärksten Akkumulation am 1. und 3. Kulturtag. In späteren embryogenen Stadien (ab Tag 14) sinkt der mRNA-Gehalt drastisch. Der geringste mRNA-Gehalt ist in der Dauerkultur zu verzeichnen. Abb. 3B zeigt die mRNA-Expression in verschiedenen Geweben. Wurzeln, Stengel und Blüten enthalten hohe mRNA-Transkriptmengen. In Blättern sinkt der mRNA-Gehalt mit zunehmendem Alter.

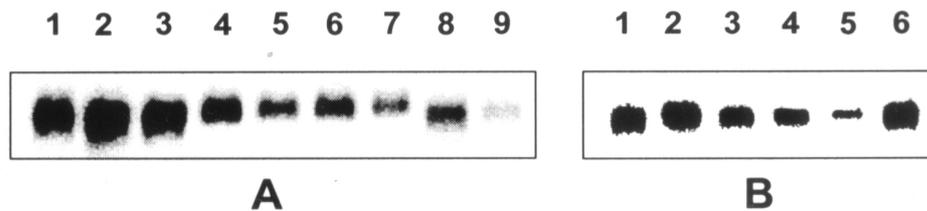


Abb. 3 Entwicklungsabhängige (A) und gewebespezifische (B) Expression der NPBTF3L-mRNA. Zur *Northern*-Analyse wurden 20µg Gesamt-RNA in einem 1,5%igen Formaldehyd / Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten c41-3-Fragment hybridisiert. (A) Bahn 1: Protoplasten; 2-8: Embryogenesestadien der Kulturtage 1, 3, 6, 10, 14, 21, 28; 9: Dauerkultur; (B) Bahn 1: Wurzel; 2: Stengel; 3-5: junges, mittelaltes, altes Blatt; 6: Blüte

3.2.3.2 NL28 (Np22c28)- ein unbekanntes Protein

Das PCR-Fragment NL28 wurde nach radioaktiver DDRT-PCR mit den Primern T₁₂AC und Pdd06 (vgl. 2.4.1 und 2.7.5) aufgrund seiner großen Abundanz in mRNA-Präparationen aus Zellen der Kulturtage 3 und 10 isoliert. Nach Klonierung in den Vektor pBluescript SK⁺ (Stratagene) wurde es vollständig sequenziert (Daten nicht gezeigt). Die NL28-Sequenz ist 740bp lang und enthält einen ORF von 351bp, der für eine 117As-Proteinteilsequenz kodiert, sowie eine 3'-UTR von 389bp ohne Poly A-Schwanz. Nach einem Homologievergleich auf Nukleotid- und Proteinebene mit bekannten Sequenzen aus den Datenbanken (vgl. 2.6) konnten keine Homologien der partiellen NL28-Sequenz zu bekannten Genen bzw. Proteinen festgestellt werden.

Um die korrespondierende vollständige cDNA zu isolieren, wurde das NL28-DNA-Fragment radioaktiv markiert und für das Screening der λ ZAP ExpressTM cDNA-Bank für frühe embryogene Stadien (vgl. 2.8) verwendet. Nach Screening und Rescreening konnten drei positive cDNA-Klone isoliert werden, von denen allerdings keiner einen vollständigen ORF enthielt. Der cDNA-Klon mit dem längsten Insert (Np22c28) wurde vollständig sequenziert. Die DNA- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz des cDNA-Klons Np22c28 ist in Anhang II dargestellt. Das 1346bp lange cDNA-Insert besteht aus einem langen, aber unvollständigen ORF von 975bp sowie einer 371bp langen 3'-UTR. Sowohl die 5'-UTR und der N-terminale Teil der kodierenden Sequenz als auch der Poly A-Schwanz fehlen. In den überlappenden Bereichen der kodierenden Regionen und der 3'-UTRs weisen die Sequenzen von Np22c28-cDNA und NL28-PCR-Fragment eine 95,4%ige Nukleinsäure-

sequenzidentität auf. Die von Np22c28 kodierte partielle Proteinsequenz von 324As wurde mit Hilfe des PCGENE Programmes PROSITE hinsichtlich potentieller Domänenstrukturen untersucht. Es konnten mehrere Phosphorylierungsstellen [Proteinkinase C (5), Caseinkinase II (1)], N-Myristoylierungsstellen (4) und N-Glykosylierungsstellen (3) sowie eine Tyrosin-Sulfatidierungsstelle identifiziert werden.

Weder die Nukleotid- noch die abgeleitete Proteinsequenz ergaben bei einem Vergleich mit bekannten Datenbank-Sequenzen signifikante Homologien.

Um die Kopienzahl des Np22c28-Gens im *N. plumbaginifolia*-Genom abzuschätzen und homologe Sequenzen in anderen Pflanzengenomen nachzuweisen, wurde ein genomisches *Southern-Blot*-Experiment durchgeführt (vgl. 2.9). Genomische DNA aus Blättern von *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* und *A. thaliana* wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI, die in der Np22c28-Sequenz selbst keinen Schnittort besitzt, gespalten und mit dem radioaktiv markierten NL28-Fragment hybridisiert (Abb. 4). Eine starke und wenige sehr schwache Hybridisierungsbanden im *N. plumbaginifolia*-Genom lassen auf ein *single*- oder *low-copy*-Gen schließen. Sowohl im *A. thaliana*- als auch im *N. tabacum*-Genom weisen Kreuzhybridisierungen mit dem NL28-Fragment auf homologe Sequenzen und damit auf mögliche Konservierung im Pflanzenreich hin.

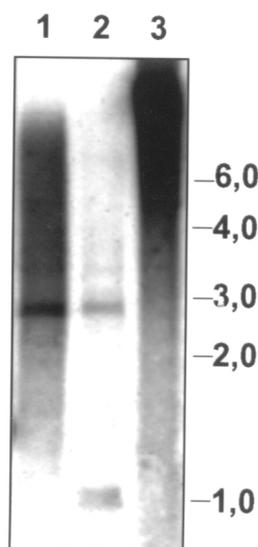


Abb. 4 Nachweis des Np22c28-Gens in den Genomen von *N. plumbaginifolia* (*Np*), *N. tabacum* (*Nt*) und *A. thaliana* (*At*). 10µg genomische DNA wurde mit *Eco* RI gespalten, in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markierten NL28-Fragment hybridisiert. Bahn 1: *Np-Eco* RI; 2: *At-Eco* RI; 3: *Nt-Eco* RI. Die Größen der Molekulargewichtsstandard-DNA-Fragmente sind rechts in kb angegeben

Zur Expressionsanalyse der korrespondierenden mRNA wurde Gesamt-RNA aus Protoplasten, 5 embryogenen Stadien, jungem Blatt und Dauerkultur mit dem radioaktiv markierten NL28-Fragment hybridisiert (vgl. 2.10). Die Np22c28-mRNA weist ein zwei-phases Expressionsmuster im Verlauf der somatischen Embryogenese auf (Abb. 5). Nach geringer Akkumulation der mRNA am 3. Kulturtag, die dem Gehalt in der Dauerkultur entspricht, ist am 6. Kulturtag kein Transkript mehr nachzuweisen. Die starke mRNA-Akkumulation am 10. bis 15. Kulturtag unterliegt im weiteren Kulturverlauf erneuter

Reduktion, so daß am 28. Kulturtag kein Transkript mehr nachweisbar ist. In Protoplasten ist kein und im Blattgewebe nur ein schwacher mRNA-Gehalt zu verzeichnen.

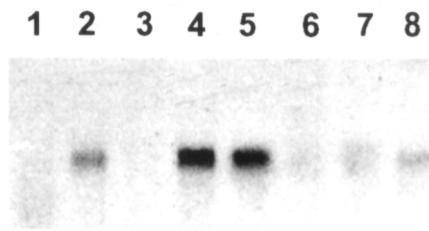


Abb. 5 Entwicklungsabhängige Expression der Np22c28-mRNA. Zur *Northern*-Analyse wurden 10µg Gesamt-RNA in einem 1,5%igen Formaldehyd / Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten NL28-Fragment hybridisiert. Bahn 1: Protoplasten; 2-6: Embryogenesestadien der Tage 3, 6, 10, 15, 28; 7: Blatt; 8: Dauerkultur

Neben RNA-Analysen sollten auch die Expression des von Np22c28 kodierten Proteins hinsichtlich Gewebe- und Entwicklungsspezifität sowie seine immunhistologische Lokalisierung in zygotischen Embryonen von *N. plumbaginifolia* überprüft werden. Deshalb wurde zur Produktion rekombinanter Antigensequenzen ein Teil der proteinkodierenden Region von Np22c28 in dem *E. coli*-QIAexpress™ System überexprimiert (vgl. 2.11.1). Die angebotenen pQE-Vektoren stellen Überexpressionsplasmide für *E. coli* dar, welche eine hohe IPTG-induzierte Expression der klonierten Gensequenzen im Zytoplasma der Bakterienzellen ermöglichen. Aufgrund ihrer N- bzw. C-terminalen Fusion mit sechs Histidinresten können rekombinante Proteine an einer Nickelmatrix affinitätschromatografisch gereinigt werden (HOCHULI et al., 1990; JANKNECHT et al., 1991).

Für die Klonierung wurde entsprechend dem Leserahmen der Expressionsvektor pQE32 gewählt. Das 740bp-NL28-Fragment, welches die Sequenz für den 117As langen C-terminalen Teil des unbekanntem Proteins enthielt, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Hind* III aus dem Vektor pBluescript SK⁺ herausgespalten und in den ebenfalls *Pst* I / *Hind* III-gespaltenen Vektor pQE32 kloniert. Als Negativkontrollen für Expressionsstudien erfolgten Klonierungen in die Vektoren pQE30 und pQE31. Aufgrund der falschen Leserahmen dürfte in beiden Fällen kein Protein exprimiert werden. Nach Überprüfung der Konstrukte mittels Restriktionsspaltungen im Zwischenwirt *E. coli* XL1 Blue erfolgte die Transformation des *E. coli*-Expressionsstammes M15 [pREP4]. Nach Expressionsinduktion des rekombinanten Polypeptids durch IPTG wurden Gesamtproteine aus der Bakterienkultur bei Kulturstart (0h) und nach IPTG-Zugabe (3h, 5h) isoliert und lösliche bzw. unlösliche Proteinfractionen in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Ein rekombinantes Polypeptid der erwarteten Größe von 17,5kDa ist nur nach IPTG-Induktion und ausschließlich in den Bakterien mit dem pQE32-NL28-Konstrukt nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Dabei befand sich der Hauptanteil des überexprimierten Polypeptids mit mehr als 5% des Gesamtproteinanteils in der löslichen Fraktion. Durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz (vgl. 2.11.3) konnte das rekombinante Polypeptid als *his*-NL28-

Proteinfragment identifiziert werden. Die Isolierung der *his*-NL28-Banden aus löslichen Fraktionen im PAA-Gel erfolgte über Elektroelution in einem „*Model 422 Electro-Eluter*“ (BioRad) entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach Dialyse gegen PBS wurde das eluierte *his*-NL28-Polypeptid für die Immunisierung von Kaninchen zur Antikörperproduktion eingesetzt (vgl. 2.11.4). Abb. 6 zeigt den Nachweis der bakteriellen Expression des rekombinanten *his*-NL28-Polypeptids in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel nach Proteinfärbung (A) und im *Western-Blot* (B).

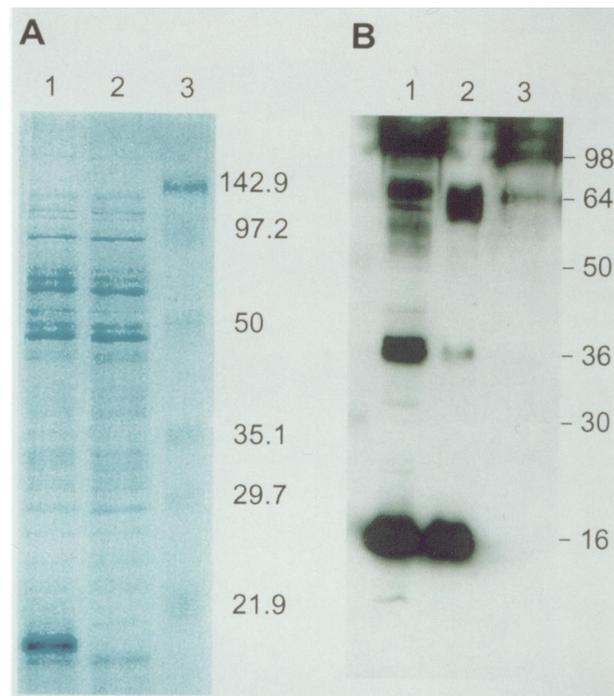


Abb. 6 Bakterielle Expression des rekombinanten *his*-NL28-Polypeptids. Die zytoplasmatischen Proteinfractionen der IPTG-induzierten (A-1, B-1,2) und nichtinduzierten (A-2) NL28-Bakterienkulturen wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Brillantblau R250 angefärbt (A) oder für die *Western-Blot*-Analyse (B) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunnachweis erfolgte mit dem NL28-Antikörper (1:1000), einem anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (1:10000) und dem ECL-System (Amersham). Für die Proteinfärbung wurden 20µg, für die *Western-Blot*-Analyse 1µg (1) bzw. 0,5µg (2) Protein eingesetzt. Bahn 3 repräsentiert den Proteinstandard (Bio-Rad). Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind jeweils rechts in kDa angegeben

Zur Analyse der Gewebespezifität der Np22c28-Proteinexpression wurden zytoplasmatische und mikrosomale Fraktionen aus Wurzeln, Stengel, Blättern verschiedenen Alters (jung, mittelalt, alt) und Blüten isoliert (vgl. 2.12.2). Die zytoplasmatisch lösliche Proteinfraction der IPTG-induzierten *his*-NL28-Bakterienkultur diente als Positiv-Kontrolle der Immunreaktion. Nach Auftrennung der Proteinfractionen in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der immunologische Nachweis mit dem NL28-spezifischen Antikörper und dem ECL-System (vgl. 2.12.1). Abb. 7 zeigt eine hohe Expression des mutmaßlichen Np22c28-Proteins in der mikrosomalen, aber nicht zytoplasmatischen Fraktion von jungen Blättern und Blüten und einen geringen Np22c28-

Proteingehalt in Wurzeln und Stengeln. In mittelalten und alten Blättern ist kaum Protein nachzuweisen. Ein Nachweis des Proteins in embryogenen Zellkulturstadien war nicht möglich, so daß auf eine Analyse der entwicklungsabhängigen Regulation der Proteinexpression verzichtet werden mußte.

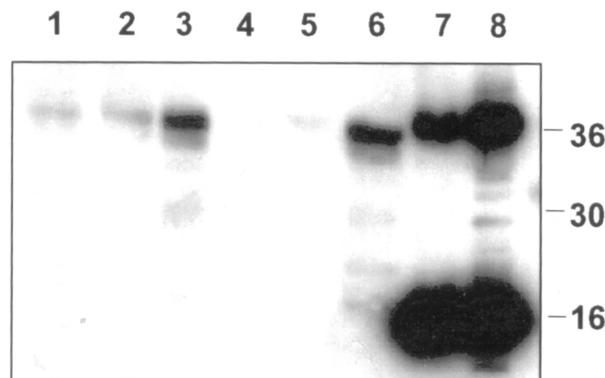


Abb. 7 Gewebespezifität der Np22c28-Proteinexpression. Mikrosomenfraktionen verschiedener Gewebe von *N. plumbaginifolia* wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis des Np22c28-Proteins erfolgte mit dem NL28-Antikörper (1:1000), einem anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat (1:3000) und dem ECL-System (Amersham). Bahnen 1-6: je 50µg Proteine aus Wurzel, Stengel, jungem, mittlerem, altem Blatt und Blüte; 7, 8: 0,5µg und 1µg Proteine aus induzierter NL28-Bakterienkultur (Positivkontrolle). Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine (Bio-Rad) sind rechts in kDa angegeben

Zur zellulären Lokalisierung des Np22c28-Proteins wurden immunhistologische Untersuchungen an zygotischen Embryonen von *N. plumbaginifolia* durchgeführt (vgl. 2.13.1). Dazu wurden Gewebedünnschnitte von Embryonen im präglobulären, globulären, Herz-, späten Herz- und Torpedo-Stadium mit dem NL28-Antikörper inkubiert und die Immunmarkierungen nach ALP-vermittelter Färbung lichtmikroskopisch ausgewertet. Abb. 8 zeigt die Lokalisierung des Np22c28-Proteins in zygotischen Embryonen. Das gewebespezifische Verteilungsmuster des Np22c28-Proteins in den Ovarien verändert sich während der Entwicklung des Embryos. In den präglobulären Stadien (A,B) ist das Protein nur im Embryo selbst und in der Schicht der inneren Integumentzellen (Endothelium) in hohen Konzentrationen lokalisiert. Endosperm und die sich entwickelnde Samenschale waren nicht markiert. Erst im globulären Stadium (C) wird Markierung des Endosperms nachweisbar, während es im Herzstadium (D) zu einer drastischen Umverteilung des Np22c28-Proteins kommt. Die Proteinexpression im Embryo selbst und im Integument verringert sich, die Akkumulation des Proteins im Endosperm steigt rapide an. Die Embryoentwicklung vom späten Herzstadium (E) zum Torpedostadium (F;G) führt zur Angleichung der Np22c28-Proteinkonzentrationen in Embryo und Endosperm. Das Np22c28-Protein wird demzufolge bis zum globulären Embryonalstadium fast ausschließlich im Embryo selbst und im Integument akkumuliert, während es in späteren Stadien überwiegend im Endosperm nachzuweisen ist.

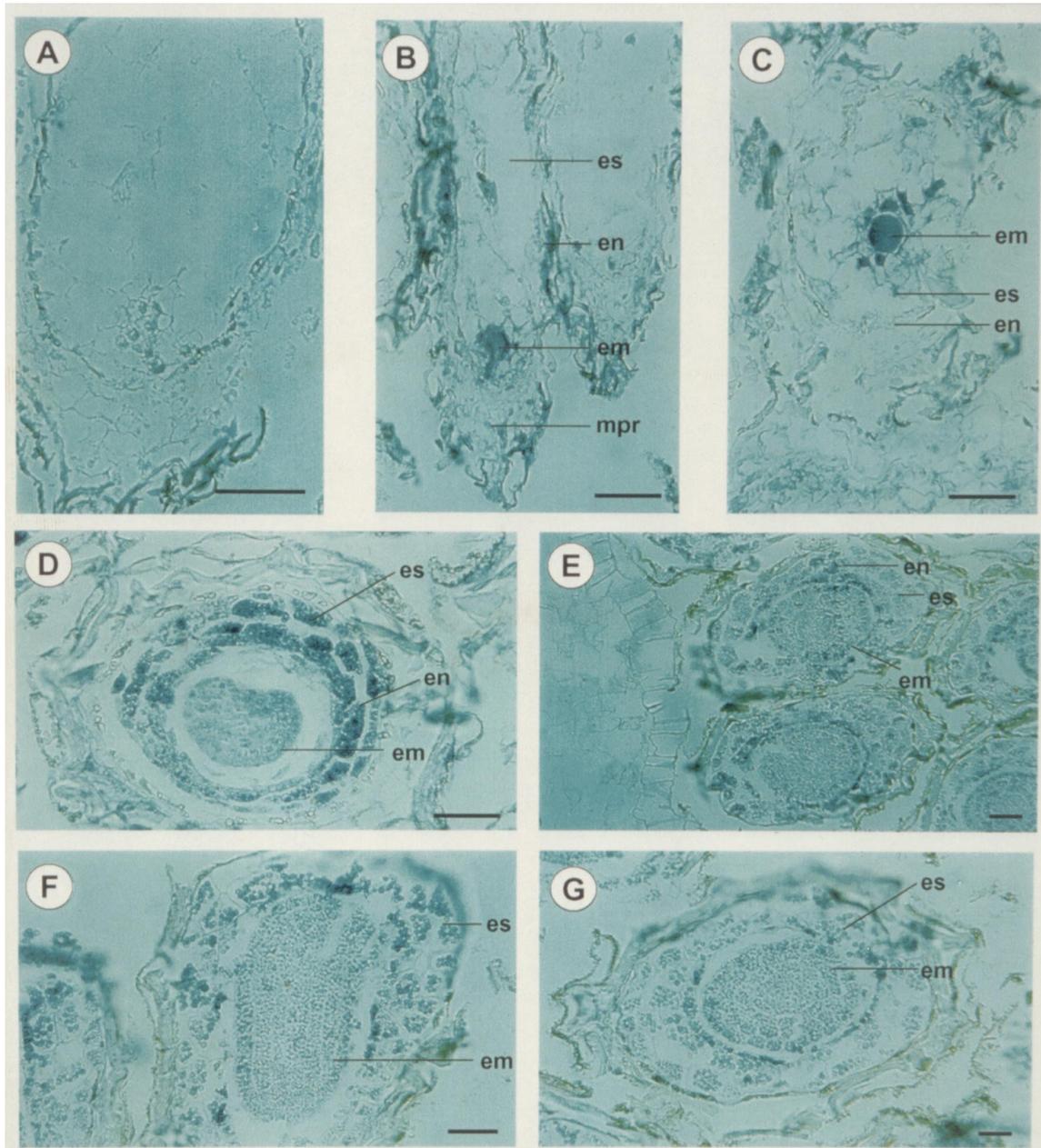


Abb. 8 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen und gewebespezifischen Expression des Np22c28-Proteins während der zygotischen Embryogenese von *N. plumbaginifolia*. Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit dem NL28-Antikörper (1:400; B, C, D, E, F, G), anti-Kaninchen-IgG-Biotin (1:200) und Streptavidin-ALP-Konjugat (1:100) sowie BCIP/NBT-Färbung. Zur Spezifitätskontrolle der immunologischen Reaktion wurde Kaninchen-Prä-Immunsereum als primärer Antikörper eingesetzt (A). **(A,B)** prä-globuläres Stadium, **(C)** globuläres Stadium, **(D)** Herzstadium, **(E)** transverser Schnitt zu (D), **(F)** Torpedostadium, **(G)** transverser Schnitt zu (F) Die Balkenlängen entsprechen 100 μ m; es=Endosperm, em=Embryo, en=Endothel, mpr=Mikropyle

3.2.3.3 NL35 (pNLA35)- ein mutmaßlicher Translationsinitiationsfaktor

Nach radioaktiver DDRT-PCR mit der Primerkombination T₁₁GG / Pdd02 wurde ein 350bp langes PCR-Fragment (NL35) isoliert, dessen korrespondierende mRNA eine erhöhte Quantität in den embryogenen Stadien Tag 3 und 10 aufwies (vgl. 2.4.1 und 2.7.5). Das

Fragment wurde in den Vektor pBluescript SK⁺ (Stratagene) kloniert und vollständig sequenziert (Daten nicht gezeigt). Es besteht aus einer 47bp 5'-UTR und einem ORF von 303bp, der für eine Proteinsequenz von 101As kodiert. Ein Sequenzvergleich des NL35-Fragmentes auf Nukleotid- und Proteinebene mit bekannten Datenbank-Sequenzen ergab keine signifikanten Homologien.

Zur Isolierung eines vollständigen cDNA-Klons wurde das NL35-Fragment radioaktiv markiert und zum Screening einer λ ZAP Express™ cDNA-Bank für *N. tabacum*-Blattgewebe (Stratagene) verwendet (vgl. 2.8). Nach primärem und sekundärem Screening konnte ein cDNA-Klon (pNLA35) mit vollständiger kodierender Sequenz isoliert werden.

Die DNA- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz von pNLA35 ist im Anhang III dargestellt. Das Insert von pNLA35 ist 3256bp lang und enthält einen 2877bp langen ORF, der für ein Protein aus 958As mit einem berechneten Molekulargewicht von 111,61kDa kodiert. 5'- und 3'-UTRs bestehen aus 44 bzw. 336bp. Die Sequenzen von NL35-PCR-Fragment und pNLA35-cDNA weisen in den überlappenden Bereichen eine 99,25%ige Aminosäuresequenzidentität auf. Mit Hilfe des PCGENE Programmes PROSITE wurde das pNLA35-kodierte Protein auf potentielle Domänenstrukturen untersucht. Mehrere N-Glykosylierungsstellen (3) und N-Myristoylierungsstellen (3) sowie zahlreiche Phosphorylierungsstellen [Proteinkinase C (16), Caseinkinase II (17), cAMP-/cGMP-abhängige Proteinkinase (3)] und ein potentielles Kernlokalisierungssignal konnten identifiziert werden. Homologievergleiche auf Proteinebene mit bekannten Datenbank-Sequenzen ergab Homologien zur großen Untereinheit (p180) des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF3. Mit den entsprechenden Sequenzen aus *H. sapiens* (HUM_eIF3, Acc.-Nr.: HSU78311; JOHNSON et al., 1997), *C. elegans* (CAE_eIF3, Acc.-Nr.: P34339; DU, swissprot-Datenbank) und *Saccharomyces cerevisiae* (IF32_YEAST, Acc.-Nr.: P38249; VAN DER AART, swissprot-Datenbank) ist die pNLA35-Proteinsequenz in 35%, 33% und 30% der Aminosäuren identisch.

Zur Abschätzung der Kopienzahl des zum pNLA35-homologen Protein aus *N. plumbaginifolia* korrespondierenden Gens im *N. plumbaginifolia*-Genom und zum Nachweis homologer Sequenzen in anderen Pflanzengenomen wurde ein genomisches *Southern-Blot*-Experiment durchgeführt (vgl. 2.9). Genomische DNA aus *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* und *A. thaliana* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI bzw. *Eco* RI gespalten, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markierten NL35-Fragment hybridisiert (Abb. 9). Das pNLA35-homologe Protein wird im *N. plumbaginifolia*-Genom von einem *single*- oder *low-copy*-Gen kodiert. Da auch im *A. thaliana*-Genom pNLA35-homologe Sequenzen nachzuweisen sind, kann auf eine mögliche Konservierung im Pflanzenreich geschlossen werden.

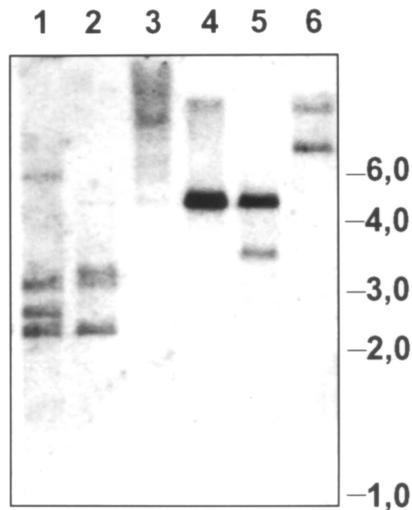


Abb. 9 Nachweis des pNLA35-Gens in den Genomen von *N. plumbaginifolia* (*Np*), *N. tabacum* (*Nt*) und *A. thaliana* (*At*). 10 µg genomische DNA wurde mit *Eco* RI bzw. *Bam* HI gespalten, in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markierten NL35-Fragment hybridisiert. Bahn 1: *Np-Eco* RI; 2: *At-Eco* RI; 3: *Nt-Eco* RI; 4: *Np-Bam* HI; 5: *At-Bam* HI; 6: *Nt-Bam* HI. Die Größen der Molekulargewichtsstandard-DNA-Fragmente sind rechts in kb angegeben

Anhand eines *Northern-Blot*-Versuches wurde die entwicklungspezifische Expression der pNLA35-homologen korrespondierenden mRNA überprüft (vgl. 2.10). Dazu wurde Gesamt-RNA aus Protoplasten, 5 embryogenen Stadien, der Dauerkultur und Blattgewebe mit dem radioaktiv markierten NL35-Fragment hybridisiert (Abb. 10). Die pNLA35-homologe mRNA weist im Verlauf der somatischen Embryogenese ein zweiphasiges Expressionsmuster auf. Nach geringer Expression in Protoplasten und am 1. Kulturtag kommt es zu einer starken mRNA-Akkumulation am 3. Kulturtag. Am 6. Kulturtag tritt drastische Verringerung des mRNA-Gehaltes ein. Erneute Akkumulation führt zu den höchsten Transkriptmengen am 10. Kulturtag, die sich bis zum 15. Kulturtag leicht verringern. Das pNLA35-homologe Transkript ist auch im Blattgewebe, aber nicht in der Dauerkultur nachweisbar.

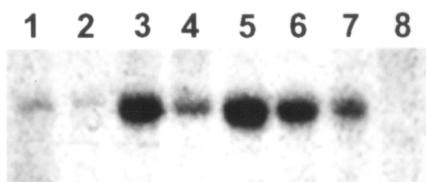


Abb. 10 Entwicklungsabhängige Expression der pNLA35-mRNA. Zur *Northern*-Analyse wurden 10 µg Gesamt-RNA in einem 1,5%igen Formaldehyd / Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten NL35-Fragment hybridisiert. Bahn 1: Protoplasten; 2-6: Embryogenesestadien der Tage 1, 3, 6, 10, 15; 7: Blatt; 8: Dauerkultur

Um für *Western-Blot*-Experimente und immunhistologische Untersuchungen Antikörper gegen das pNLA35-Genprodukt herzustellen, wurden zwei 21mer-Peptide, abgeleitet aus dem hydrophilen N-terminalen (Peptid 1) bzw. mittleren Bereich (Peptid 2) der pNLA35-Proteinsequenz, synthetisiert und an Hämocyanin als Trägerprotein gekoppelt (SNPE GmbH, Frankfurt / Main; vgl. 2.11.3 und 2.11.4).

Eine Expressionsanalyse des pNLA35-homologen Proteins in *N. plumbaginifolia* hinsichtlich Gewebespezifität und Entwicklungsabhängigkeit mittels *Western-Blot* konnte unter Anwendung der Anti-NL35-Antikörper nicht durchgeführt werden.

Eignung zeigte das produzierte Antiserum dagegen für die immunhistologische Lokalisierung des pNLA35-homologen Proteins in Gewebedünnschnitten von zygotischen Embryonen. Die Inkubation mit dem pNLA35-Antikörper und die lichtmikroskopische Auswertung sind unter 2.13.1 beschrieben. Abb. 11 zeigt den Nachweis des pNLA35-homologen Proteins von *N. plumbaginifolia* in verschiedenen Entwicklungsstadien zygotischer Embryonen. Das pNLA35-homologe Protein wird in allen Embryogenesestadien nur im Embryo selbst und nachfolgend im Endosperm exprimiert. In frühen Stadien bis zum globulären Embryo (B, C) überwiegt eindeutig die Markierung des Embryos, während im frühen und späten Herzstadium (D, E) die Proteinakkumulationen in Embryo und Endosperm nahezu gleich sind. Im Torpedostadium (F, G) weist das Endosperm eine stärkere Markierung auf.

Zur intrazellulären Lokalisierung des pNLA35-homologen Proteins wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (vgl. 2.13.2). Abb. 12 zeigt den immunzytologischen Nachweis des pNLA35-homologen Proteins in Embryo- und Endospermzellen unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen. Embryozellen weisen Markierungen auf, die vermutlich den Endomembranen und dem Zellkern zuzuordnen sind (Abb. 12A). In Endospermzellen sind vorrangig Speichervakuolen, jedoch auch Membranstrukturen im Zytoplasma markiert (Abb. 12B).

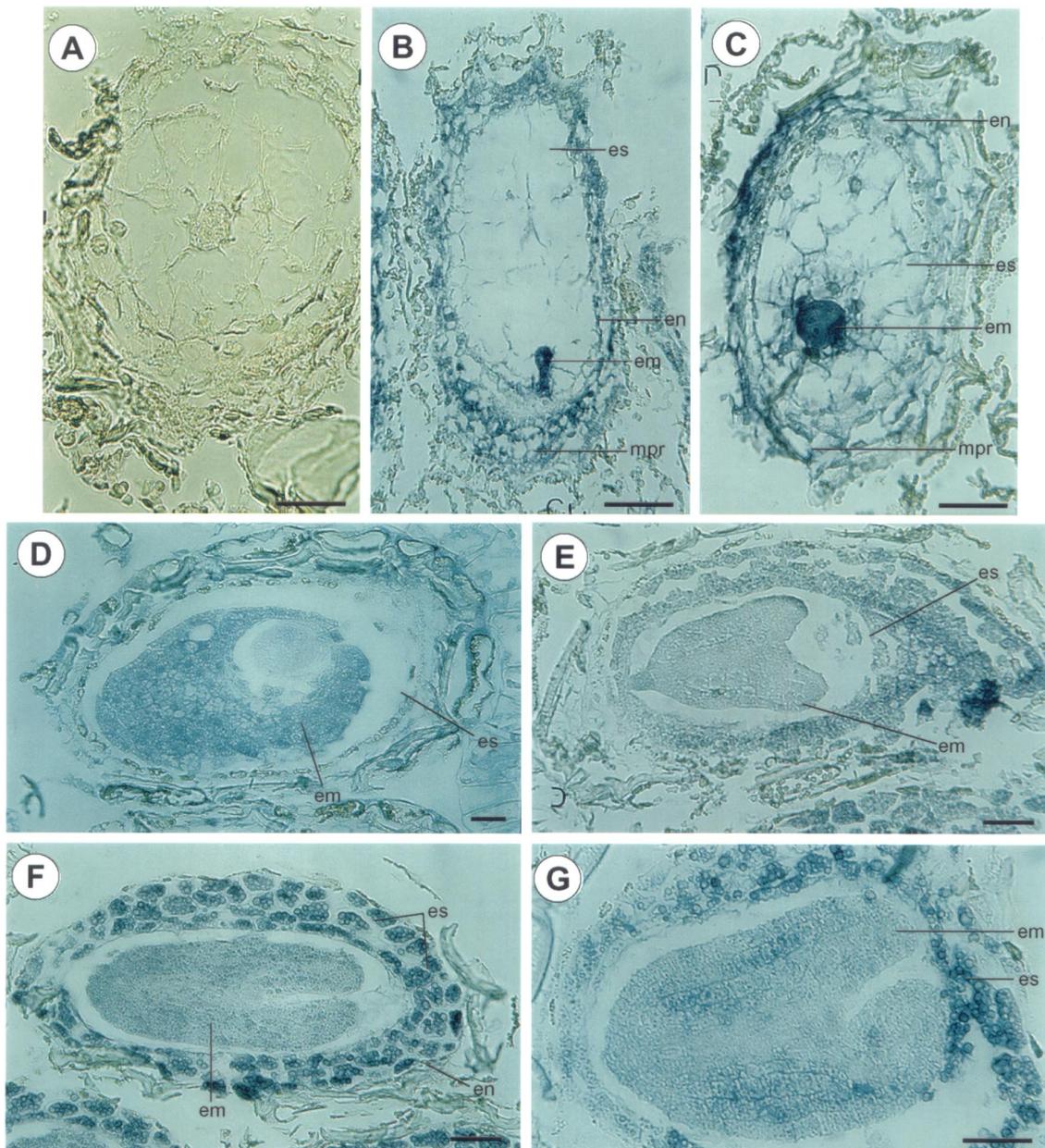


Abb. 11 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen und gewebespezifischen Expression des pNLA35-homologen Proteins während der zygotischen Embryogenese von *N. plumbaginifolia*. Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit einem 1:1-Gemisch der pNLA35-anti-Peptid-Antikörper 1 und 2 (1:100; B, C, D, E, F, G), anti-Kaninchen-IgG-Biotin (1:200) und Streptavidin-ALP-Konjugat (1:100) sowie BCIP/NBT-Färbung. Als Negativkontrolle wurde Kaninchen-Prä-Immunsereum eingesetzt (A). **(A, C)** globuläres Stadium, **(B)** prä-globuläres Stadium, **(D)** Herzstadium, **(E)** spätes Herzstadium, **(F)** Torpedostadium, **(G)** spätes Torpedostadium. Die Balkenlängen entsprechen 100µm; es=Endosperm, em=Embryo, en=Endothel, mpr=Mikropyle

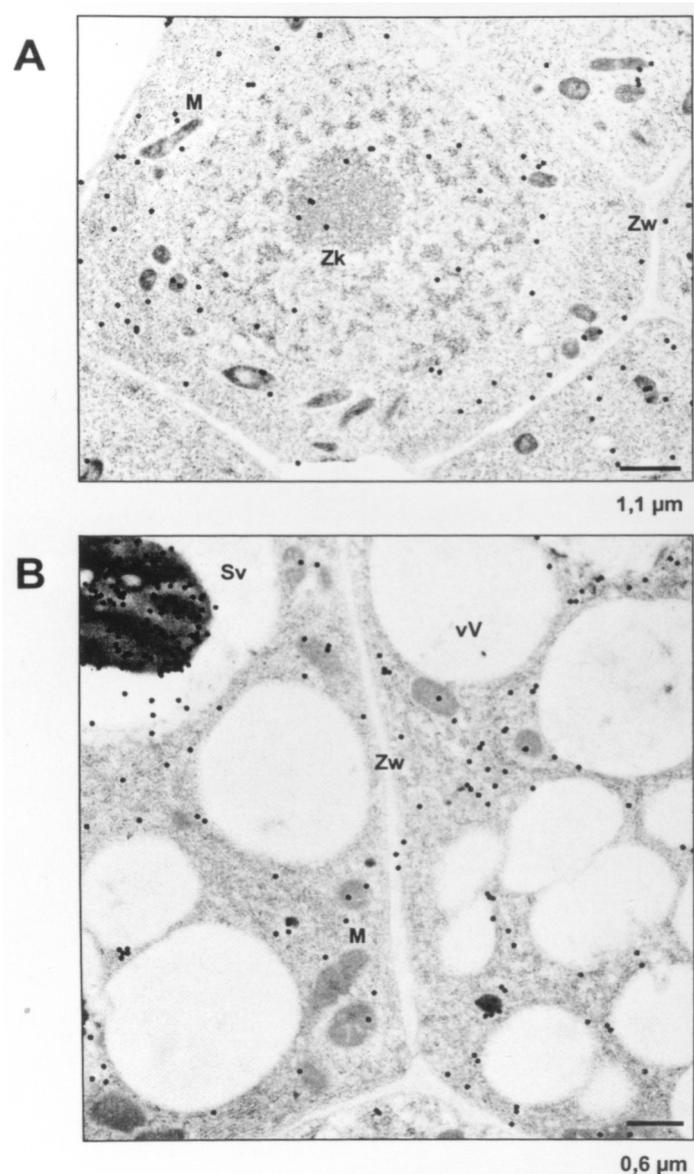


Abb.12 Intrazelluläre Lokalisierung des pNLA35-homologen Proteins in Embryo- und Endospermzellen unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen. Der immunzytologische Nachweis erfolgte mit einem 1:1-Gemisch der pNLA35-anti-Peptid-Antikörper 1 und 2, einem Protein A-Gold-Komplex am Transmissionselektronenmikroskop. Die Immunogoldpartikel wurden am Computer grafisch vergrößert. **(A)** Embryo, **(B)** Endosperm. M=Mitochondrium, Sv=Speichervakuole, vV=vakoulärer Vesikel, Zk=Zellkern, Zw=Zellwand

3.3 GTP-bindende Proteine und WD40-Protein

Da bei der Suche nach embryogenesespezifischen cDNA-Sequenzen durch differentielle Screening-Methoden zahlreiche Klone mit Homologien zu GTP-bindenden Proteinen gefunden wurden, bestand Anlaß zur Untersuchung von GTP-bindenden Proteinen im Embryogenese-prozeß. Dabei konnten cDNA-Teilsequenzen für ein WD40-Protein (vgl. 3.2.1 und 3.2.3) sowie ein kleines Sar-homologes GTP-bindendes Protein (vgl. 3.2.2

und 3.2.3) isoliert werden. Weiterhin wurde bei Untersuchungen zum Einfluß des Stickstoff/Kohlenstoff-Verhältnisses auf das Embryogeneseverhalten von Zellkulturen ein cDNA-Klon mit Homologie zur Rab/Ypt-Subfamilie der ras-verwandten kleinen GTP-bindenden Proteine in DDRT-PCR-Versuchen identifiziert (SENGER, 1995; Daten nicht gezeigt).

Außerdem legten experimentelle Befunde zur Rolle des Phosphatidylinositol-Metabolismus bei der Befruchtung eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen am Embryogenese-prozeß tierischer Systeme nahe, die von DUDITS et al. (1995) auch auf die somatische Embryogenese von Pflanzen übertragen wurden. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit durch gezielte Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Sequenzen, die für α - und β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine von *N. plumbaginifolia* kodieren, experimentelle Anhaltspunkte für eine mögliche Beteiligung dieses Signaltransduktionsweges in der pflanzlichen Embryogenese erbracht werden.

3.3.1 Isolierung partieller DNA - Fragmente mittels PCR - Techniken

Unter Anwendung von PCR-Techniken konnten gezielt (RT-PCR, genomische PCR) bzw. zufällig (DDRT-PCR, subtraktive Hybridisierung) partielle DNA-Fragmente, die für GTP-bindende und verwandte Proteine kodieren, amplifiziert und in den Vektor pCRTM II (TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert werden.

3.3.1.1 G-Protein- α -Untereinheit (PCR α 2-1)

Aus Zellen früher Embryogenesestadien (Tag 3, 6) wurde mittels RT-PCR ein partielles Fragment einer G-Protein- α -Untereinheit ($G\alpha$) amplifiziert. Der *sense*-Primer MP2 wurde aus einem Nukleotidsequenzvergleich der beiden pflanzlichen Gene *GPA1* und *TGA1* aus *A. thaliana* (MA et al., 1990) bzw. *Lycopersicon esculentum* (MA et al., 1991) abgeleitet und entspricht dem Heptapeptid RIEQETK (Anhang VI, Position: 143-167). Die Sequenz für den *antisense*-Primer MP20 basiert auf dem Hexapeptid FLNKFD (Anhang VI, Position: 936-919) innerhalb einer hochkonservierten Region bekannter $G\alpha$ s aus Tieren und Hefe (STRATHMANN et al., 1989). Mit Hilfe des *antisense*-Primers MP20 wurde die mRNA embryogener Zellen in cDNA umgeschrieben und in einer anschließenden PCR-Reaktion unter Zugabe des *sense*-Primers MP2 amplifiziert (vgl. 2.7.2). Das erhaltene PCR-Produkt (PCR α 2-1) mit der erwarteten Größe von 801bp wurde kloniert und vollständig sequenziert. Ein Homologievergleich mit entsprechenden Sequenzbereichen der pflanzlichen $G\alpha$ s *GPA1* und *TGA1* ergab eine 95%ige bzw. 98%ige Aminosäuresequenzidentität mit dem klonierten Fragment.

3.3.1.2 G- Protein- β - Untereinheit (PCR β TA1)

Aus den verfügbaren Sequenzdaten pflanzlicher G-Protein- β -Untereinheiten (G β) aus *A. thaliana* und *Zea mays* (*AGB1*, *ZGB1*; WEISS et al., 1994) wurden nach einem Sequenzvergleich beider Gene entsprechend den hochkonservierten Regionen (90-95%iger Nukleinsäuresequenzidentität) zwei degenerierte Primer (vgl. 2.4) für die Isolierung homologer *N. plumbaginifolia*-G β -Teilsequenzen abgeleitet. Mit Hilfe des *sense*-Primers A/ZGBsk2 und des *antisense*-Primers A/ZGBas1, welche den Heptapeptiden SASQDGR und LCTGSWD entsprachen (Anhang VII, Positionen: 364-386 und 1186-1207), sollte durch RT-PCR ein etwa 840bp-Fragment amplifiziert werden. Mehrere Versuche, ein spezifisches Fragment aus der RNA embryogener Zellen oder Blattgewebe unter verschiedenen PCR-Bedingungen und Einsatz weiterer Primer zu amplifizieren, schlugen fehl (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde auf die Methode der genomischen PCR zurückgegriffen, die unter Anwendung der obengenannten Primer zum Erfolg führte (vgl. 2.7.3). Das erhaltene 1,3kb-PCR-Produkt (PCR β TA1) konnte nach Klonierung, Ansequenzierung und Homologievergleich mit den entsprechenden Sequenzbereichen der *A. thaliana*- und *Z. mays*-Gene *AGB1* und *ZGB1* als Teilfragment einer G β identifiziert werden.

3.3.1.3 WD40-Protein (PCRKat7-2)

Durch nichtradioaktive DDRT-PCR (Primerkombination: T₁₁GG / Pdd04; vgl. 2.7.4 und 3.2.1) wurde ein 405bp langes PCR-Fragment (PCRKat7-2) isoliert. Die zu diesem Teilfragment korrespondierende mRNA zeigte im Vergleich zur Kontrolle (Blattgewebe) eine signifikant höhere Expression in embryogenen Zellen der Kulturtage 6 und 10, erkennbar nach gelelektrophoretischer Auftrennung an der wesentlich stärkeren PCR-Bande (vgl. Abb. 2, Bahn: 9 und 3.2.1). Nach Klonierung, Sequenzierung und Datenbank-Homologiesuchen auf Nuklein- und Aminosäuresequenzebene konnte diese partielle Sequenz als Teilfragment eines WD40-Proteins mit 94,74%iger Aminosäuresequenzidentität zu einem aus *N. tabacum* isolierten Protein (ArcA; ISHIDA et al., 1993) identifiziert werden. Bei der Auswertung der Sequenzdaten trat ein häufig in DDRT-PCR-Experimenten zu findendes Problem auf. In der Sequenz von PCRKat7-2 war die Basenabfolge des verwendeten Oligo-dT-Primers nicht nachzuweisen. Stattdessen wurde an beiden Enden des Fragmentes die Pdd04-Primersequenz 5'-TTTTGGCTCC-3' identifiziert.

3.3.1.4 Sar-homologes kleines GTP-bindendes Protein (PCR8Com)

Bei der Anreicherung von cDNA-Sequenzen, spezifisch für frühe embryogene Stadien (Tag 3, 6), durch subtraktive Hybridisierung (vgl. 2.7.6 und 3.2.2) wurde u. a. ein 423bp PCR-Fragment (PCR8Com) mit Hilfe der Primer PsH-s und PsH-as (vgl. 2.4) amplifiziert. Sequenzierung und Datenbank-Homologiesuche des klonierten Fragmentes ergab eine

89,3%ige Aminosäuresequenzidentität zu einer Teilsequenz der kodierenden Region des kleinen GTP-bindenden Proteins Sar1 von *A. thaliana* (D'ENFERT et al., 1992).

3.3.2 Isolierung vollständiger cDNA-Sequenzen aus einer λ ZAP Express™ cDNA-Bank für frühe Embryogenesestadien von *N. plumbaginifolia*

Die durch PCR-Techniken (vgl. 3.3.1) isolierten partiellen DNA-Fragmente stellten das Sondenmaterial zur Isolierung der korrespondierenden vollständigen cDNA-Sequenzen aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bibliothek für frühe Embryogenesestadien der Tage 3, 6 und 10 von *N. plumbaginifolia* (Stratagene) dar.

Nach dem Screening von 530000 Phagen mit einem radioaktiv markierten Gemisch der PCR-Fragment-Sonden PCR α 2-1, PCR β TA1 und PCRKat7-2 wurden 37 Phagen ausgestochen, erneut ausplattiert und einem Rescreening unter Verwendung des gleichen Sondagemisches unterzogen (vgl. 2.8). 31 dieser Phagen zeigten auch nach dem sekundären Screening positive Signale. Zur Isolierung der vollständigen cDNA-Sequenz des partiellen DNA-Fragmentes PCR8Com wurden 430000 Phagen der Expressionsbank mit diesem Fragment hybridisiert, von denen nach primärem und sekundärem Screening 10 Phagen selektiert werden konnten. Nach *in vivo* Excision der korrespondierenden pBK-CMV-Plasmide aller ausgewählten Phagen wurden deren cDNA-Inserts ansequenziert und durch Sequenzhomologievergleich identifiziert. Insgesamt konnten 21 cDNA-Klone, deren Inserts für eines der gesuchten Gene kodierten, aus der Expressionsbank isoliert werden.

3.3.3 Computergestützte DNA - und Proteinsequenzanalyse der isolierten cDNA - Klone

Von 21 aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bank isolierten cDNA-Klonen wurden 6 DNA-Inserts durch *Primer-walking* vollständig sequenziert. Je 1 Klon konnte als G-Protein- α - oder β -Untereinheit und je 2 Klone als kleines Sar-homologes GTP-bindendes Protein sowie WD40-Protein identifiziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden umfangreichen Computeranalysen (PCGENE, BLAST-Programm; vgl. 2.6) unterzogen.

3.3.3.1 G-Protein- α -Untereinheit

Die DNA- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz des Klons α 2/4 sind im Anhang VI dargestellt. Die cDNA enthält ein Insert von 1487bp Länge, das in dem entsprechenden Bereich eine 98,75%ige Nukleinsäuresequenzidentität mit dem RT-PCR-Fragment PCR α 2-1 aufwies. An den Positionen 40 und 64 befinden sich zwei mögliche Startkodone, die beide im identischen Leserahmen als Translationsinitiationskodons genutzt werden könnten. Aufgrund eines Aminosäuresequenzvergleichs mit bekannten pflanzlichen G α s ist die Nutzung des zweiten ATGs als Startkodon wahrscheinlicher. Diese Annahme wird

dadurch gestützt, daß nur die, das zweite ATG flankierenden Sequenzen, Homologien zur Konsensus-Sequenz (A/T)(C/A)AACAAATGGC für das pflanzliche Translationsinitiations-signal (LÜTCKE et al., 1987) aufwiesen. Der an Position 64 beginnende 1155bp lange ORF endet mit einem TGA-Stopkodon und kodiert für ein Protein aus 384As mit einem mutmaßlichen Molekulargewicht von 44,749kDa (PCGENE / PHYSICHEM). Nuklein- und Aminosäuresequenzvergleiche ermöglichten eine eindeutige Identifizierung des Proteins als α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, das mit NPGP α 1 (für: *N. plumbaginifolia* **G-Protein alpha-Untereinheit 1**) bezeichnet wurde. Die 255bp lange 3'-UTR enthält 207bp stromabwärts vom Stopcodon des *NPGPA1*-Gens ein mögliches Polyadenylierungssignal AACAAA. Spezifische Domänen in der Proteinsequenz wurden mit Hilfe des PCGENE-Programmes PROSITE gesucht. Drei potentielle N-Myristoylierungsstellen, zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen [Proteinkinase C (5), Caseinkinase II (8), Tyrosinkinase (2)] und ein potentieller ATP/GTP-Bindungsort wurden gefunden. Ein Homologievergleich von NPGP α 1 mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen ergab auf Aminosäureebene signifikante Homologien zu pflanzlichen G α s, die zwischen 75% (*Oryza sativa*, GBA1_ORYSA, Acc.-Nr.: P49083; SEO et al., 1995) und 98% (*N. tabacum*, NTHHTGPA, Acc.-Nr.: Y08154; SAALBACH, EMBL-Datenbank) lagen. Dagegen ist die Homologie von NPGP α 1 zu tierischen G α -Sequenzen wie aus *H. sapiens* (GBAK_HUMAN, Acc.-Nr.: P08754; ITOH et al., 1988) oder *Drosophila melanogaster* (GB01_DROME, Acc.-Nr.: P16378; THAMBI et al., 1989) mit 32% gering. In Übereinstimmung zu Untersuchungen von pflanzlichen G α s konnte nur ein Typ G α aus *N. plumbaginifolia* isoliert werden. Im Anhang XII sind ein Proteinsequenzalignment von NPGP α 1 mit einigen pflanzlichen und tierischen G α s und die Markierung essentieller Proteinregionen der Sequenz dargestellt.

3.3.3.2 G-Protein- β -Untereinheit

Die DNA- und die daraus abgeleitete Proteinsequenz des Klons β 16/1 ist im Anhang VII dokumentiert.

Das Insert des cDNA-Klones β 16/1 ist 1505bp lang und enthält einen ORF von 1134bp, der für ein 377As langes Protein kodiert. Ein Aminosäuresequenzvergleich mit bekannten Proteinen aus den Datenbanken erlaubte seine Identifizierung als β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins von *N. plumbaginifolia*, das mit NPGP β 1 (für: *N. plumbaginifolia* **G-Protein beta-Untereinheit 1**) bezeichnet wurde. Die das mutmaßliche Startcodon (Pos.124) des *NPGPB1*-Gens flankierenden Sequenzen zeigten keine Homologien zur Pflanzen-Translationsinitiations-Konsensussequenz (LÜTCKE et al., 1987). In der 5'-UTR des *NPGPB1*-Gens befindet sich ein kurzer Leserahmen von 5 Aminosäuren (Met-Phe-Asp-Phe-Pro), welcher zwei Nukleotide stromaufwärts vom möglichen Startcodon des *NPGPB1*-Gens endet. Für die NPGP β 1-Proteinsequenz wurde ein Molekulargewicht von 41,3kDa berechnet. Unter Verwendung des PCGENE-Programmes PROSITE konnten als potentielle

Proteindomänen mehrere Phosphorylierungsstellen [Proteinkinase C (6), Caseinkinase II (6)] und N-Myristoylierungsstellen (9) sowie eine Tyrosin-Sulfatidierungsstelle und sieben WD40-Repeats identifiziert werden. Ein Homologievergleich von NPGP β 1 mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen ergab auf Aminosäureebene signifikante Homologien zu pflanzlichen G β s, die zwischen 78% (*Z. mays*, GBB_Maize, Acc.-Nr.: P49178; WEISS et al., 1994) und 98,4% (*N. tabacum*, GBB1_TOBAC, Acc.-Nr.: P93397; LEIN und SAALBACH, swissprot-Datenbank) liegen. Zu tierischen G β s wie denen aus *H. sapiens* (GBB1_HUMAN, Acc.-Nr.: P04901; CODINA et al., 1986) bzw. *D. melanogaster* (GBB1_DROME, Acc.-Nr.: P26308; YARFITZ et al., 1988) zeigt NPGP β 1 mit 48,53% bzw. 44,41% wesentlich geringere Aminosäuresequenzidentität.

In Übereinstimmung mit Literaturdaten zur Isolierung pflanzlicher G β s konnte aus *N. plumbaginifolia* nur eine G β -Sequenz identifiziert werden.

Im Anhang XIV sind ein Aminosäuresequenzalignment von NPGP β 1 mit ausgewählten pflanzlichen und tierischen G β s dargestellt und sieben WD40-Repeats markiert.

3.3.3.3 WD40-Protein

Die Anhänge VIII und IX zeigen die DNA- und die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen der Klone β 13/2 und β 112/1.

Die Inserts der cDNAs β 13/2 und β 112/1 sind 1261 bzw. 1280bp lang. Der cDNA-Klon β 13/2 enthält einen 987bp langen ORF, der an Position 74 beginnt und für ein 328As langes Polypeptid mit einem berechneten Molekulargewicht von 36kDa kodiert. Das Insert des zweiten cDNA-Klones β 112/1 trägt einen an Position 20 beginnenden ORF von 981bp. Für das daraus abgeleitete Polypeptid von 326As wurde ein Molekulargewicht von 35,82kDa ermittelt. Die kodierenden Regionen beider cDNA-Klone sind auf DNA-Ebene 83,23% (=161 Nukleotidaustausche) und auf Proteinebene 90,8% (30 Aminosäureaustausche) homolog zueinander und in den entsprechenden Bereichen 100% (β 13/2) bzw. 82,5% (β 112/1) identisch mit der Nukleotidsequenz des DDRT-PCR-Fragmentes PCRkat7-2. Ihre 5'- und 3'-UTRs sind in den überlappenden Bereichen in 94,74% bzw. 53,72% der Nukleotide identisch. Durch Sequenzvergleiche mit den in Datenbanken verfügbaren DNA-Sequenzen war ihre Identifizierung als WD40-Proteine mit Ähnlichkeiten zu G-Protein- β -Untereinheiten möglich. Die aus *N. plumbaginifolia* isolierten Proteinsequenzen wurden daher mit NPGBLP1 (β 13/2) und NPGBLP2 (β 112/1) bezeichnet (NPGBLP= *N. plumbaginifolia* **G**-Protein **beta**-Untereinheit-*like* **P**olypeptid). In Computer-Analysen (PCGENE / PROSITE) der Aminosäuresequenzen von NPGBLP1 und NPGBLP2 wurden weitgehende Übereinstimmungen in den potentiellen Domänenstrukturen gefunden. Beide Proteinsequenzen enthalten zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen [cAMP- /cGMP-anhängige Proteinkinase (1), Caseinkinase II (5), Proteinkinase C (6/7)], N-Myristoylierungsstellen (5) und N-Glykosylierungsstellen (1/2) sowie eine potentielle

Amidierungsstelle und sieben WD40-Repeats. Mit einer potentiellen Domäne für ein C-terminales „microbodies targeting signal“ weist das NPGBLP2-Protein eine Besonderheit auf. Ein Aminosäuresequenzvergleich von NPGBLP1 bzw. NPGBLP2 mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen ergab signifikante Homologien zu WD40-Proteinen höherer Pflanzen, die zwischen 73,93% bzw. 75,61% (*O. sativa*, GBLP_ORYSA, Acc.-Nr.: P49027; IWASAKI et al., 1995) und 96,32% bzw. 91,72% (*N. tabacum*, GBLP_TOBAC, Acc.-Nr.: P49026; ISHIDA et al., 1993) liegen. Mit 67-71% konnten relativ hohe Aminosäuresequenzhomologien zu WD40-Proteinen aus Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*, GBLP_CHLRE, Acc.-Nr.: P25387; SCHLOSS, 1990) und Tieren (*Rattus norvegicus*, RACK1, Acc.-Nr.: A36986; RON et al., 1994) ermittelt werden. Im Anhang XV sind ein Aminosäuresequenzalignment von NPGPBL1 und NPGPBL2 mit ausgewählten pflanzlichen und tierischen WD40-Proteinen dargestellt und sieben WD40-Repeats markiert.

3.3.3.4 Sar-homologes kleines GTP-bindendes Protein

Die DNA- und die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen der cDNA-Klone 3Sar und 50Sar sind in den Anhängen X und XI dargestellt. Beide besitzen Inserts von 972bp (3Sar) bzw. 1032bp Länge (50Sar). Der 579bp lange ORF des cDNA-Klons 3Sar, der an Position 47 beginnt, kodiert für ein 193As-Protein mit mutmaßlichem Molekulargewicht von 21,935 kDa. In der Sequenz des cDNA-Klons 50Sar beginnt an Position 158 ein 582bp langer ORF, der einem 194As-Protein mit berechnetem Molekulargewicht von 22,031kDa entspricht. Die Sequenzen beider Klone sind in ihren kodierenden Regionen auf DNA- und Proteinebene 79,38% bzw. 91,71% identisch und zeigten bei einem Homologievergleich mit dem PCR-Produkt PCR8Com 81,05% (3Sar) bzw. 99,74% (50Sar) Nukleinsäuresequenzidentität. Dagegen sind 5'- bzw. 3'-UTRs beider cDNAs nur in 32,61% bzw. 40,0% der Nukleotide homolog. Aufgrund einer Homologiesuche in den Datenbanken konnten die von beiden cDNA-Klonen kodierten Proteine eindeutig als Sar-homologe kleine GTP-bindende Proteine identifiziert werden und erhielten die Bezeichnung NPSARGTP1 (50Sar) und NPSARGTP2 (3Sar) für *N. plumbaginifolia* Sar-homologes GTP-bindendes Protein. Eine computergestützte Analyse (PCGENE / PROSITE) hinsichtlich potentieller Domänen führte für beide Proteine infolge ihrer signifikanten Homologie zu sehr ähnlichen Resultaten. Mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen [Caseinkinase II (3), Proteinkinase C (2/3)], je zwei potentielle N-Myristoylierungsstellen, je eine Tyrosin-Sulfatidierungsstelle und je ein ATP/GTP-Bindungssignal A wurden gefunden. Ein Aminosäuresequenzvergleich von NPSARGTP1 bzw. NPSARGTP2 mit den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen ergab Homologien zu Sar-homologen Proteinen aus Pflanzen, die zwischen 73,2% bzw. 73,58% (*N. tabacum*, SAR1_TOBAC, Acc.-Nr.: P52885; SHEN, swissprot-Datenbank) und 89,64% bzw. 91,71% (*A. thaliana*, SAR1A_ARATH, Acc.-Nr.: O04834; D'ENFERT et al., 1992) liegen.

Mit 58-64% Aminosäuresequenzidentität zeigten beide cDNA-Klone auch Homologien zu Proteinen aus Hefe (*S. cerevisiae*, SAR1_YEAST, Acc.-Nr.: P20606; NAKANO und MURAMATSU, 1989) und Tieren (*M. musculus*, SARA_MOUSE, Acc.-Nr.: P36536; SHEN et al., 1993).

Im Anhang XVI sind ein Aminosäuresequenzalignment von NPSARGTP1 und NPSARGTP2 mit bekannten pflanzlichen und tierischen Sar-homologen Proteinen dargestellt und mutmaßliche essentielle Regionen markiert.

3.3.4 Gewebespezifität und entwicklungsabhängige Regulation der mRNA-Expression

Um die gewebespezifische und entwicklungsabhängige Expression der G-Protein-homologen bzw. -verwandten Gene auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden *Northern-Blot*-Experimente durchgeführt (vgl. 2.10). Die erforderlichen Hybridisierungssonden wurden aus den entsprechenden cDNA-Klonen mittels Plasmid-PCR oder Restriktionsspaltungen bzw. einer Kombination beider Methoden isoliert. Zur Herstellung einer G α -Sonde wurde unter Verwendung der Primer MP2 und MP20 (vgl. 2.4) ein 801bp-Fragment von der kodierenden Region der $\alpha 2/4$ -cDNA amplifiziert. Analog dazu wurde von der kodierenden Region der $\beta 16/1$ -cDNA unter Einsatz der Primer A/ZGBsk2 und A/ZGBas1 (vgl. 2.4) ein 840bp-Fragment als G β -Sonde amplifiziert. Zur Analyse der WD40-mRNA-Expression wurden Sonden von beiden cDNA-Klonen hergestellt. Zunächst erfolgte eine Amplifikation unter Verwendung der Primer PT7 und FSeqBls1 ($\beta 12/1$) bzw. FSeqBls2 ($\beta 3/2$; vgl. 2.4) von den cDNAs. Eine anschließende Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl* II bzw. *Eco* RV führte zu einem 1,08kb- ($\beta 12/1$) bzw. 1,0kb-Fragment ($\beta 3/2$). Beide Fragmente enthielten die nahezu vollständigen kodierenden Regionen und jeweils einen Teil der 3'-UTRs. Durch Spaltung der 50Sar-cDNA mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xba* I konnte ein aus 5'-UTR und kodierender Sequenz bestehendes 740bp-Fragment als Sar-Sonde isoliert werden. Die radioaktive Markierung der Sonden wurde wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Im Falle der $\alpha 2/4$ -Sonde erfolgte eine Doppelmarkierung mit je 50 μ Ci [α - 32 P]-dCTP und [α - 32 P]-dATP, da die Signalstärken für den Nachweis von G α -mRNA-Transkripten bei Anwendung der unter 2.10 beschriebenen Bedingungen unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Aus Geweben und Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, 20 μ g (für $\beta 16/1$, $\beta 12/1$ und $\beta 3/2$, 50Sar) bzw. 40 μ g (für $\alpha 2/4$) gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und fixiert (vgl. 2.10). Die Hybridisierungen erfolgten wie unter 2.10 beschrieben.

Zur Analyse der Gewebespezifität der mRNA-Expression wurden Wurzeln, Stengel, Blätter verschiedenen Alters (jung, mittelalt, alt) und Blüten von *N. plumbaginifolia* verwendet (Abb. 13A). Die G α -mRNA weist hohe Transkriptmengen in Wurzeln, Stengeln und Blüten, aber einen deutlich geringeren mRNA-Gehalt in Blättern aller Altersstufen auf. Dagegen

wird die G β -mRNA konstitutiv mit gleichmäßig hohem RNA-Gehalt in allen Geweben exprimiert. Beide Klone des WD40-Proteins zeigten in unabhängigen *Northern*-Experimenten das gleiche mRNA-Expressionsmuster mit hohem RNA-Gehalt in Wurzeln, Stengeln und Blüten. Der WD40-mRNA-Gehalt in Blättern ist vergleichsweise gering und nimmt mit zunehmendem Blattalter deutlich ab. Die Sar-mRNA zeigt die höchsten Transkriptmengen in alten Blättern und in Blüten sowie in Stengeln. In jungen und mittelalten Blättern sowie in Wurzeln ist ein geringerer Sar-mRNA-Gehalt zu verzeichnen. Die Untersuchung zur Entwicklungsabhängigkeit der mRNA-Expression erfolgte an somatischen Embryogenesestadien der Kulturtage 0, 1, 3, 6, 10, 14 und 28 (Abb. 13B). Als Kontrollen dienten Blätter von *in vitro*-kultivierten Pflanzen und die Suspensionskultur. Das G α -mRNA-Expressionsmuster unterliegt starken Schwankungen während des Embryogeneseprozesses. Eine hohe Akkumulation der G α -Transkriptmengen ist in sehr frühen embryogenen Stadien (Tag 1, 3) und in der Suspensionskultur erkennbar, während Protoplasten, embryogene Zellstadien am 10. Kulturtag und Blätter geringe mRNA-Gehalte aufweisen. Die G β -mRNA wird mit relativ hohem RNA-Gehalt in nahezu allen embryogenen Stadien, in Protoplasten und Blättern konstitutiv exprimiert. Eine Ausnahme bilden embryogene Zellen des Kulturtages 1 und die Suspensionskultur mit geringen G β -Transkriptmengen. Beide Klone des WD40-Proteins zeigten das gleiche mRNA-Expressionsprofil mit hohen mRNA-Gehalten in allen embryogenen Stadien und in der Suspensionskultur, aber geringeren Transkriptmengen in Protoplasten und Blättern. Die Sar-mRNA weist Akkumulation zu Beginn der Zellteilungen (Tag 3) und in späteren embryogenen Stadien (Tag 14 und 28) sowie in Suspensionskultur und Blättern auf.

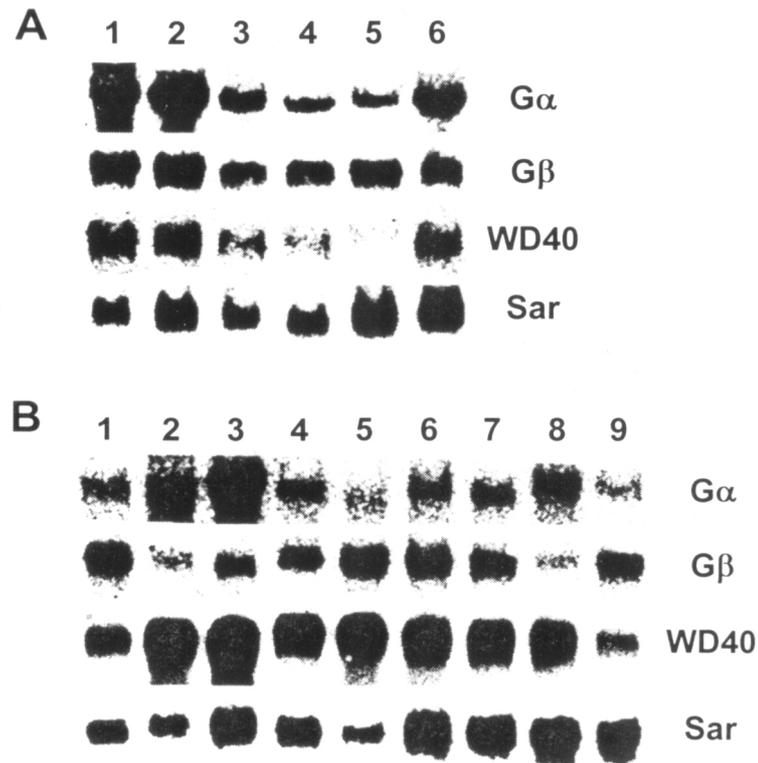


Abb. 13 Gewebespezifische (A) und entwicklungsabhängige Expression (B) der $G\alpha$ -, $G\beta$ -, WD40- und Sar-mRNA-Transkripte in *N. plumbaginifolia*. 20 μ g ($G\beta$, WD40, Sar) bzw. 40 μ g ($G\alpha$) Gesamt-RNA der somatischen Embryogenesestadien bzw. der Gewebe wurden in 1,5%igen Formaldehyd / Agarose-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit entsprechenden radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten hybridisiert (vgl. 3.3.4). **(A)** Bahn 1: Wurzel; 2: Stengel; 3-5: junges, mittelaltes, altes Blatt; 6: Blüte. **(B)** Bahn 1: Protoplasten; 2-7: Embryogenesestadien der Tage 1, 3, 6, 10, 14, 28; 8: Dauerkultur; 9: Blatt

Die mRNA-Spezies aller drei GTP-bindenden Proteine bzw. des WD40-Proteins sind nicht nur in verschiedenen embryogenen Stadien sondern auch in allen getesteten Geweben nachweisbar. Übereinstimmend sind in Wurzel-, Stengel- und Blütengewebe sowie in späten embryogenen Stadien (Tag 14 und 28) hohe Transkriptmengen der vier mRNAs zu verzeichnen. $G\alpha$ und $G\beta$ weisen sowohl in Untersuchungen der Gewebespezifität als auch der Entwicklungsabhängigkeit sehr unterschiedliche mRNA-Expressionsmuster auf. Berücksichtigt werden muß, daß die $G\alpha$ -mRNA aufgrund ihrer geringen Abundanz nur durch Einsatz hoher Gesamt-RNA-Mengen und Doppelmarkierung der Sonde nachweisbar war.

3.3.5 Einfluß von Hormonen, Umwelt- und Streßfaktoren auf die mRNA-Expression

In *Northern-Blot*-Experimenten wurde geprüft, inwieweit Pflanzenhormone, Umweltfaktoren und Stressoren die mRNA-Expression der G-Protein-homologen oder -verwandten Gene

beeinflussen. Testgewebe bzw. -zellmaterial stellten zum einen Blattscheiben, zum anderen Suspensionskulturen dar. Die Bedingungen der *Northern*-Hybridisierungen (aufgetragene RNA-Mengen; Auswahl, Isolierung und Markierung der Sonden) sind unter 3.3.4 beschrieben.

3.3.5.1 Blattscheibentest

Blattscheibentests (vgl. 2.15.1) wurden durchgeführt, um den Einfluß der Hormone Auxin (NES), Zytokinin (BA), Abscisinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA_3) sowie verschiedener Stressoren (osmotischer Streß, Verwundung, Salicylsäure) auf die mRNA-Expression in differenziertem, nicht mehr zellteilungsaktivem Gewebe zu untersuchen. Um ausreichende Mengen homogenen Materials zu sichern, wurden *N. tabacum*-Pflanzen verwendet. In Vorversuchen wurde nachgewiesen, daß die mRNAs der entsprechenden hochhomologen *N. tabacum*-Gene mit den Gensonden aus *N. plumbaginifolia* unter stringenten Bedingungen kreuzhybridisierten und identische mRNA-Expressionsmuster lieferten (Daten nicht gezeigt). Für jede Hormon- bzw. Streßbehandlung wurde eine Tabakpflanze verwendet, um individuellen Schwankungen in der mRNA-Expression Rechnung zu tragen.

Abb. 14A zeigt die Autoradiogramme der *Northern-Blots* zum Einfluß von Hormonen und osmotischem Streß auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene. Der $G\alpha$ -mRNA-Gehalt wird durch Behandlung mit NES erhöht und durch ABA-Einfluß leicht reduziert, während die Zugabe von BA und GA_3 bzw. osmotischer Streß keine Veränderungen der $G\alpha$ -mRNA-Expression verursacht. Ein der $G\alpha$ -mRNA ähnliches Expressionsmuster weist die $G\beta$ -mRNA auf, ausgenommen, daß ABA-Behandlung mRNA-Akkumulation bewirkt. Vergleichbar den mRNA-Spezies von $G\alpha$ und $G\beta$ steigt der mRNA-Gehalt des WD40-Proteins unter NES-Einfluß. Außerdem führt BA-Behandlung zu Akkumulation, während osmotischer Streß die WD40-mRNA-Menge reduziert. ABA und GA_3 bleiben ohne Einfluß auf den WD40-mRNA-Gehalt. Die Sar-mRNA-Transkriptmengen erhöhen sich durch BA- und ABA-Behandlung bzw. durch osmotischen Schock, während die Hormone NES und GA_3 keine Auswirkungen auf die mRNA-Expression zeigen.

In Abb. 14B sind die Autoradiogramme der *Northern-Blots* zum Einfluß von Verwundung und Salicylsäure auf die mRNA-Transkriptmengen dargestellt. Verwundung verursacht zunächst nach 6h eine geringe Akkumulation der Transkriptmengen der $G\alpha$ -, $G\beta$ - und WD40-mRNAs. Nach 24h-Verwundungsstreß kommt es allerdings im Vergleich zu den unverwundeten Kontroll-Blattscheiben zu einer geringen Reduktion der $G\alpha$ - und $G\beta$ -Transkripte und zu einer drastischen Verminderung des WD40-mRNA-Gehaltes. Die Expression der Sar-mRNA wird durch Verwundungsstreß nicht beeinflußt. Im Gegensatz dazu ist nach Salicylsäurebehandlung keine der untersuchten mRNA-Spezies im Blattgewebe nachweisbar.

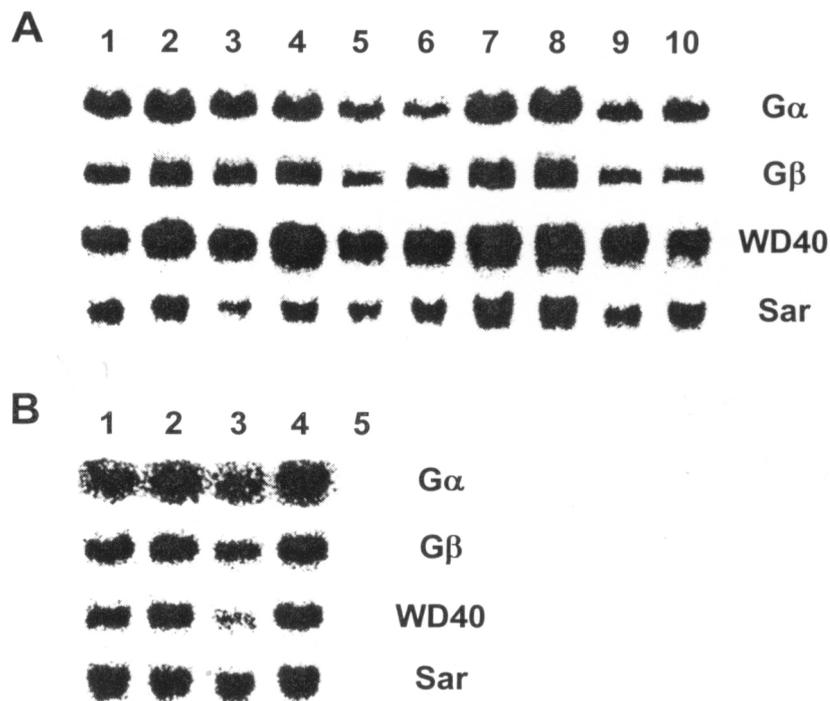


Abb. 14 Hormonelle und Streß-Regulation der Expression von G α -, G β -, WD40- und Sar-mRNA-Transkripten in Blattscheiben von *N. tabacum* SNN. 20 μ g (G β , Sar), 30 μ g (WD40) bzw. 40 μ g (G α) Gesamt-RNA wurden in 1,5%igen Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit entsprechenden radioaktiv markierten cDNA-Sequenzen hybridisiert (vgl. 3.3.5). **(A)** Blattscheiben wurden 3 Tage in Auxin (2mg/l=10,8 μ M NES), Zytokinin (1mg/l=4,4 μ M BA), Abscisinsäure (50 μ M ABA) oder Gibberellinsäure (50 μ M GA₃) inkubiert bzw. einem osmotischen Streß (0,6M Mannitol=oS) ausgesetzt. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ gekennzeichnet. Bahnen 1, 2: K_{NES}, NES; 3, 4: K_{BA}, BA; 5, 6: K_{ABA}, ABA; 7, 8: K_{GA₃}, GA₃; 9, 10: K_{oS}, oS. **(B)** Blattscheiben wurden 12h mit 1mM Salicylsäure (Sal) behandelt oder 6h bzw. 24h nach Verwundungsstreß (V) getestet. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ gekennzeichnet. Bahnen 1-3: K_V, V (6h), V (24h); 4, 5: K_{Sal}, Sal

Die Ergebnisse der Blattscheibentests weisen darauf hin, daß NES eine Akkumulation der mRNA-Transkripte sowohl der G α und G β als auch des Wd40-Proteins verursacht, während BA nur die WD40- und Sar-mRNA-Gehalte erhöht. Im Gegensatz zu GA₃, das den Gehalt der untersuchten mRNA-Spezies nicht beeinflusst, führt ABA zu gegenläufigen Veränderungen (Akkumulation der G β - und Sar-mRNA; Reduktion der G α -mRNA). Verwundungsstreß verursacht geringe bis drastische Verminderung und Salicylsäurestreß völlige Blockade der Synthese bzw. Abbau aller mRNA-Spezies. Dahingegen zeigt osmotischer Streß nur Auswirkungen auf die Transkriptmengen des WD40- (Reduktion) und des Sar-homologen Proteins (Akkumulation).

3.3.5.2 Suspensionskulturtest

Um den Einfluß hoher und niedriger Konzentrationen von Auxin (NES) und Zytokinin (BA) sowie Kalzium (CaCl₂) und verschiedenen Umweltfaktoren (Hitze, Kälte, Licht) auf die

mRNA-Expression in teilungsaktiven Zellen zu analysieren, wurden Suspensionskulturen eingesetzt (vgl. 2.15.2). Für alle Experimente, mit Ausnahme des Auxintests, wurde die *N. plumbaginifolia*-Dauerkultur verwendet (vgl. 2.14 und 3.1). Um den Auxineinfluß zu untersuchen, mußten Auxin-Hungerkulturen zur Reduktion des in Dauerkulturen hohen endogenen Auxinniveaus hergestellt werden (vgl. 2.15.2).

Abb. 15A zeigt den Einfluß von NES und BA sowie von Kalzium auf die mRNA-Transkriptmengen der untersuchten Gene. Der $G\alpha$ -mRNA-Gehalt wird durch niedrige NES-Konzentration (0,2mg/l) stark reduziert, während niedrige BA-Konzentration (0,1mg/l) sowie Kalzium nur geringe Verminderung des mRNA-Gehaltes zur Folge haben. Dahingegen bleibt die $G\alpha$ -Transkriptmenge durch hohe NES- (2mg/l) und BA-Konzentrationen (1mg/l) unbeeinflusst. Im Vergleich zur $G\alpha$ -mRNA-Spezies zeigt die $G\beta$ -mRNA zum Teil gegenläufige Mengen-Veränderungen. Während die geringe Erhöhung des $G\beta$ -mRNA-Gehaltes mit einem Anstieg der NES-Konzentration korreliert, verursachen weder Zytokinin noch Kalzium Veränderungen der $G\beta$ -Transkriptmenge. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Blattscheibentests, beeinflusst Auxin nicht den WD40-mRNA-Gehalt. Hohe Zytokininkonzentrationen und Kalzium führen zur Akkumulation des WD40-Transkripts. Bemerkenswert ist, daß das Abhungern der Dauerkultur zu einer Erhöhung der WD40-mRNA-Menge in der Auxin-Hungerkultur führt, eine Streßreaktion, die bei keiner anderen mRNA-Spezies nachweisbar war. Der Gehalt der Sar-mRNA wird weder durch NES und BA noch durch Kalzium beeinflusst.

Abb. 15B stellt den Einfluß der Umweltfaktoren Licht, Hitze und Kälte auf die mRNA-Transkriptmengen dar. Eine vier- bzw. achtstündige Belichtung der im Dunkeln gehaltenen Suspensionskulturen beeinflusst die Transkriptmengen der untersuchten Gene nicht. Hitzestreß führt zu nahezu vollständigem Ausbleiben von $G\alpha$ - und $G\beta$ -Transkripten, während die Sar- und WD40-mRNA-Gehalte nur leicht reduziert werden. Kältestreß verursacht geringe Akkumulation des WD40-mRNA-Gehaltes und schwache Reduktion des $G\alpha$ -Transkripts. Dahingegen bleiben die Sar- und $G\beta$ -Transkriptmengen von Kälte unbeeinflusst.

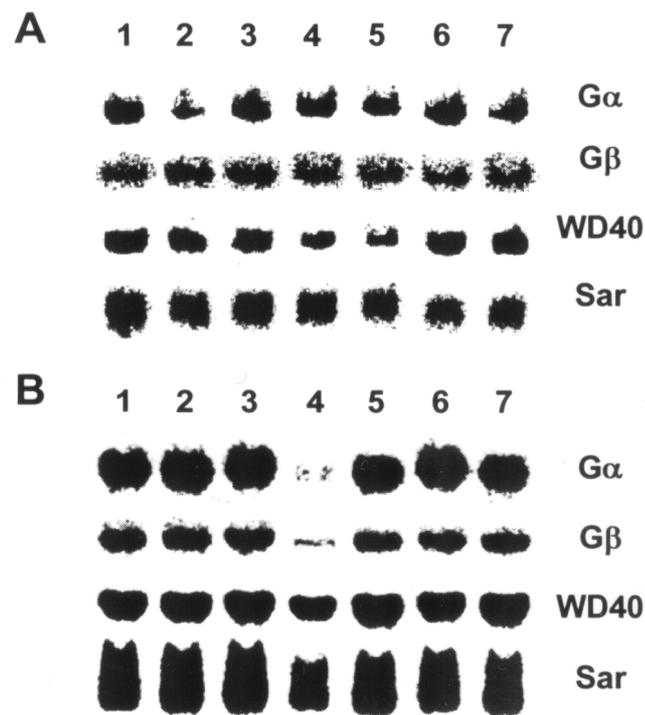


Abb. 15 Hormonelle Regulation sowie Einfluß von Ca^{2+} und Umweltfaktoren auf die Expression der $\text{G}\alpha$ -, $\text{G}\beta$ -, WD40- und Sar-mRNA-Transkripte in Suspensionskulturen von *N. plumbaginifolia*. 20 μg ($\text{G}\beta$, WD40, Sar) bzw. 40 μg ($\text{G}\alpha$) Gesamt-RNA wurden in 1,5%igen Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit den entsprechenden radioaktiv markierten cDNA-Sequenzen hybridisiert (vgl. 3.3.5). **(A)** Suspensionskulturen wurden 3 Tage auf hormonhaltigen Medien (Auxin=NES, Zytokinin=BA) oder unter Kalzium (CaCl_2)-Zusatz kultiviert. Die Kontrolle für Auxin ist eine Auxin-Hungerkultur (H); für den Zytokinin- und Kalzium-Einfluß wurde eine normale Dauerkultur (K) als Kontrolle verwendet. Bahn 1: H_{NES} ; 2, 3: NES (0,2mg/l), NES (2mg/l); 4: $\text{K}_{\text{BA}, \text{CaCl}_2}$; 5, 6: BA (0,1mg/l), BA (1mg/l); 7: CaCl_2 (15mM). **(B)** Suspensionskulturen wurden unter Licht (L=Belichtung mit $500\mu\text{mol m}^{-2} \text{m}^{-1}$), Temperaturerhöhung (H=40°C) oder Kälte (Kä=4°C) kultiviert. Die Kontrolle ist eine bei 22°C im Dunkeln gehaltene und an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten aliquotierte Dauerkultur (K). Bahn 1: $\text{K}_{\text{L}, \text{H}, \text{Kä}}$ (0-24h); 2, 3: L (4h), L (8h); 4: H; 5: Kä (24h); 6: $\text{K}_{\text{Kä}}$ (3T); 7: Kä (3T)

Im Ergebnis der Suspensionskultur- und Blattscheibentests kann geschlußfolgert werden, daß die Pflanzenhormone NES und BA in zellteilungsaktiven und -inaktiven Zellen teilweise unterschiedliche Veränderungen der Transkriptmengen der untersuchten mRNA-Spezies hervorrufen. Völlige Übereinstimmungen gibt es nur bei der $\text{G}\beta$ -mRNA, bei der NES zu einer Akkumulation in teilungsaktiven und -inaktiven Zellen führt und BA keinen Einfluß auf den mRNA-Gehalt ausübt. Dahingegen steigert NES die $\text{G}\alpha$ - und WD40-mRNA-Gehalte und BA die Akkumulation der Sar-mRNA nur im zellteilungsinaktiven Blattgewebe, während identische NES- und BA-Konzentrationen in den teilungsaktiven Dauerkulturzellen diese mRNA-Spezies nicht beeinflussen. Kalzium und Kältestreß reduzieren oder steigern nur die mRNA-Mengen der $\text{G}\alpha$ und des WD40-Proteins in teilungsaktiven Zellen. Licht hat keine Auswirkungen auf die Transkriptmengen der untersuchten mRNA-Spezies, während Hitzestreß alle mRNA-Niveaus mehr oder weniger drastisch reduziert.

3.3.6 Abschätzung der Anzahl der Genkopien durch genomische *Southern-Blot-Analyse*

Zur Abschätzung der Kopienzahl G-Protein-homologer bzw. -verwandter Gene in den Genomen von *N. plumbaginifolia* und *N. tabacum* wurden genomische *Southern-Blot-Analysen* durchgeführt. Aus Blättern von *N. tabacum* und *N. plumbaginifolia* wurde genomische DNA isoliert, gespalten, auf eine Nylonmembran geblottet und mit den entsprechenden Sonden unter stringenten Bedingungen hybridisiert (vgl. 2.9). Verwendet wurden nur solche Restriktionsendonukleasen, die in den entsprechenden cDNA-Sequenzen selbst keinen Schnittort besitzen. Als Hybridisierungssonden wurden DNA-Teilsequenzen der cDNA-Klone eingesetzt (vgl. 3.3.4).

Abb. 16A-D zeigt den Nachweis der Kopienzahl der untersuchten Gene in beiden *Nicotiana*-Genomen. Die $G\alpha$ (Abb. 16A) wird wahrscheinlich von einem *single-copy*-Gen kodiert, da die Hybridisierung der *Bam* HI-gespaltenen DNA beider Genome und der *Xba* I-verdauten DNA von *N. plumbaginifolia* mit der $\alpha 2/4$ -Sonde nur eine Bande ergab. Die Existenz von zwei Banden in der *Xba* I-verdauten *N. tabacum*-DNA ist vermutlich auf einen Schnittort in möglichen Introns oder auf die Allotetraploidie des *N. tabacum*-Genoms zurückzuführen. Für die $G\beta$ (Abb. 16B) liegen wahrscheinlich im *N. plumbaginifolia*-Genom nur wenige Kopien vor, worauf je eine starke und wenige schwache Hybridisierungsbanden hinweisen. Im Vergleich dazu enthält das allotetraploide *N. tabacum*-Genom mehrere Kopien des $G\beta$ -Gens oder weitere hochhomologe Sequenzen, die mit der $\beta 16/1$ -Sonde kreuzhybridisieren. Aus den *Southern*-Hybridisierungen mit den Sonden $\beta 112/1$ und 50Sar ist ersichtlich, daß sowohl für das WD40-Protein (Abb. 16C) als auch für das Sar-homologe Protein (Abb. 16D) mehrere Genkopien bzw. strukturell verwandte Gene in beiden *Nicotiana*-Genomen vorliegen müssen.

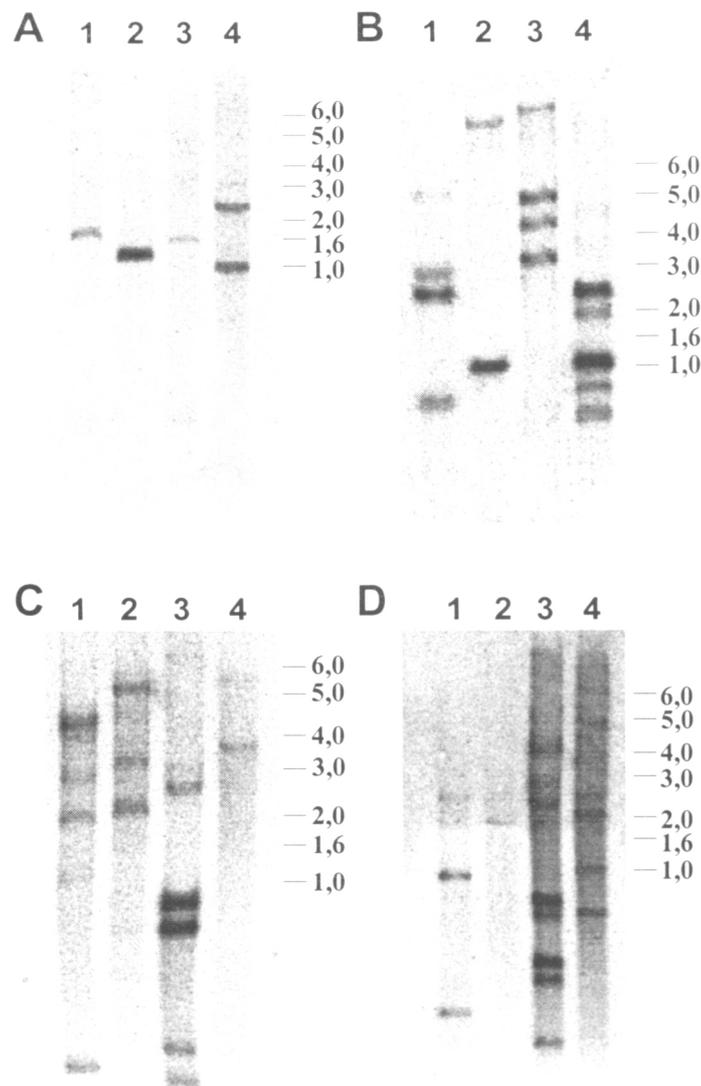


Abb. 16 Nachweis der Anzahl der Gene von $G\alpha$ (A), $G\beta$ (B), WD40-Protein (C) und Sar-Protein (D) in den Genomen von *N. plumbaginifolia* (*Np*) und *N. tabacum* (*Nt*). 20 μ g genomische DNA der beiden Pflanzenarten wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten, in 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit den entsprechenden radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten hybridisiert (vgl. 3.3.4 und 3.3.6). Die Größen des DNA-Molekulargewichtsstandards sind jeweils rechts in kb angegeben. **(A)** Bahnen 1, 2: *Np-Bam* HI, *Np-Xba* I; 3, 4: *Nt-Bam* HI, *Nt-Xba* I. **(B)** Bahnen 1, 2: *Np-Eco* RI, *Np-Xba* I; 3, 4: *Nt-Eco* RI, *Nt-Xba* I. **(C)** Bahnen 1, 2: *Np-Eco* RI, *Np-Hind* III; 3, 4: *Nt-Eco* RI, *Nt-Hind* III. **(D)** Bahnen 1, 2: *Np-Eco* RI, *Np-Pst* I; 3, 4: *Nt-Eco* RI, *Nt-Pst* I

3.3.7 Expression genspezifischer Fragmente in bakteriellen Vektor-Systemen in *E. coli*

Da für *Western-Blot*-Experimente und immunhistologische Untersuchungen spezifische Antikörper gegen die Translationsprodukte aller G-Protein-homologen und -verwandten Gene produziert werden sollten, wurden zur Antigenproduktion Teile der kodierenden

Regionen der korrespondierenden cDNAs in bakteriellen Expressionssystemen (QIAexpress™ System oder ThioFusion™ Expression System) in *E. coli* überexprimiert.

3.3.7.1 QIAexpress™ System

Zur Überexpression von Teilsequenzen der Gene für G β , WD40-Protein und Sar-Protein wurde das QIAexpress™ System (Qiagen) genutzt (vgl. 2.11.1 und 3.2.3.2).

Für die Klonierung der partiellen Gensequenzen wurden die pQE-Vektoren der 30er Serie (pQE30, 32) verwendet, welche die Histidinreste 5' vom Polylinker enthalten. Fragmente aus den kodierenden Regionen des ursprünglichen PCR-Klons (PCR8Com) oder der isolierten cDNA-Klone (β 16/1, β 12/1) wurden nach Herausspaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen entsprechend ihrer Leserahmen in einen der zwei Vektoren kloniert. Ein 706bp G β -*Bam* HI / *Eco* RV-Fragment und ein 423bp Sar-*Eco* RV / *Hind* III-Fragment wurden mit dem *Bam* HI / *Sma* I- bzw. *Sma* I / *Hind* III-verdauten Vektor pQE32 ligiert, während ein 405bp WD40-*Eco* RV / *Hind* III-Fragment in den *Sma* I / *Hind* III-gespaltene Vektor pQE30 kloniert wurde. Nach Überprüfung der Konstrukte mittels Restriktions-spaltungen im Zwischenwirt *E. coli* XL1 Blue erfolgte die Transformation der *E. coli*-Expressionsstämme M15 [pREP4] oder SG13009 [pREP4]. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch IPTG (2mM Endkonzentration) induziert und Gesamtproteine nach zwei- bis fünfstündiger Kultivierung aus induzierten und nichtinduzierten (Kontrollen) Bakterienkulturen in einem 12,5%igen PAA-Gel aufgetrennt. Nach Proteinfärbung (vgl. 2.12.1) konnte der Hauptanteil aller rekombinanten Proteine in den zytoplasmatisch löslichen Fraktionen (teilweise >10% des Gesamtproteinanteils) nachgewiesen werden. Durch Affinitätschromatographie wurden die rekombinanten Proteine von der Nickelmatrix durch pH-Wertverschiebung eluiert und nach Dialyse gegen PBS zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt (vgl. 2.11.4). In den Abb. 17 und 18 sind die Expression der rekombinanten Proteine *his*-G β (27,6kDa), *his*-WD40 (17kDa) und *his*-Sar (21kDa) in den löslichen Fraktionen von *E. coli* M15 [pREP4] nach Proteinfärbung (A) und *Western-Blotting* (B) dargestellt.

3.3.7.2 ThioFusion™ Expression System

Zur G α -Antigenproduktion wurde das ThioFusion™ Expression System (Invitrogen) eingesetzt (vgl. 2.11.2). In diesem System werden rekombinante Proteine als Thioredoxin-Fusionsproteine nach Tryptophaninduktion in *E. coli* überexprimiert.

Ein 801bp Fragment des G α -Gens wurde mit Hilfe der Primer Athio-s und Athio-as (vgl. 2.4) und der Pfu DNA Polymerase in einer Standardreaktion (vgl. 2.7) von der α 2/4-cDNA amplifiziert und mit den für die spätere Klonierung notwendigen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Sal* I versehen. Das erhaltene PCR-Produkt wurde nach Zwischenklonierung in den *blunt end*-Vektor pCR-Script und anschließender Heraus-

spaltung mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Sal*I in den Expressionsvektor pTrxFus kloniert und der *E. coli*-Stamm G1724 transformiert. Die Fusionsstelle konnte anschließend durch Sequenzierung bestätigt werden. Zur Kontrolle von Expressionsbedingungen und Zellaufschluß dienten Bakterienkulturen, die mit dem Vektor pTrx, der die Synthese des Thioredoxin-Peptids ohne Fremdsequenzen vermittelt, transformiert wurden. Bakterienkultivierung, Tryptophan-Induktion der Überexpression (Probennahme nach 0, 2, 4 und 6h Induktion), Zellaufschluß und Isolierung der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden entsprechend den Herstellerprotokollen durchgeführt (Invitrogen). Die Expression von G α -Thioredoxin(G α -Thio)-Fusionsprotein und Thioredoxin in löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurde in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel durch Proteinfärbung sowie mittels *Western-Blot* unter Verwendung eines anti-Thio™Antikörpers (Invitrogen), anti-Maus-POD-Konjugats und dem ECL-System überprüft (vgl. 2.11.2, Daten nicht gezeigt). Während sich der Hauptanteil des Thioredoxins erwartungsgemäß in der löslichen Fraktion befand, war das G α -Thio-Fusionsprotein fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachzuweisen. Die Polypeptidbande des Fusionsproteins der unlöslichen Fraktionen wurde nach Proteinfärbung aus einem 7,5%igen PAA-Gel ausgeschnitten, die mit PBS gewaschenen Gelstücke unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt (vgl. 2.11.4). Abb. 17 zeigt die Expression des rekombinanten Fusionsproteins (43kDa) in der unlöslichen Fraktion von *E. coli* G1724 nach Proteinfärbung (A) und *Western-Blotting* (B).

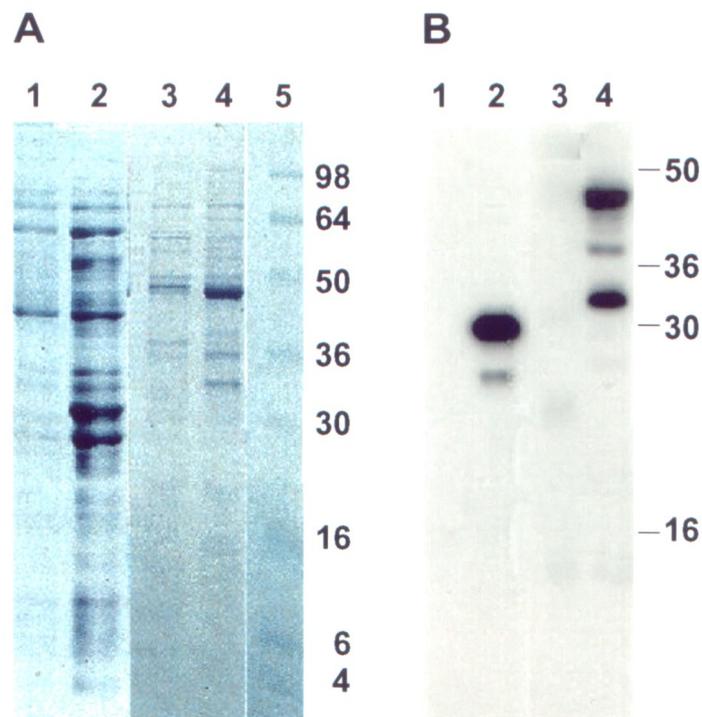


Abb. 17 Bakterielle Expression rekombinanter *his*-G β - bzw. G α -Thioredoxin-Polypeptidfragmente. 10 μ g (A) bzw. 1 μ g (B) Gesamtprotein der zytoplasmatischen (für G β) bzw. unlöslichen (für G α) Fraktion der Bakterienkulturen wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Brillantblau R250 gefärbt (A) oder für die *Western-Blot*-Analyse (B) auf eine

Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunnachweis erfolgte mit dem anti-G β - bzw. anti-G α -Thio-Antikörper (1:1000), einem anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (1:10000) und dem ECL-System (Amersham). **(A)** Bahnen 1, 2: uninduzierte und IPTG-induzierte *his*-G β -Bakterienkulturen; 3, 4: uninduzierte und Tryptophan-induzierte G α -Thio-Bakterienkulturen; 5: Proteinstandard (Bio-Rad). **(B)** Bahnen 1, 2: uninduzierte und IPTG-induzierte *his*-G β -Bakterienkulturen; 3, 4: uninduzierte und Tryptophan-induzierte G α -Thio-Bakterienkulturen. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind jeweils rechts in kDa angegeben

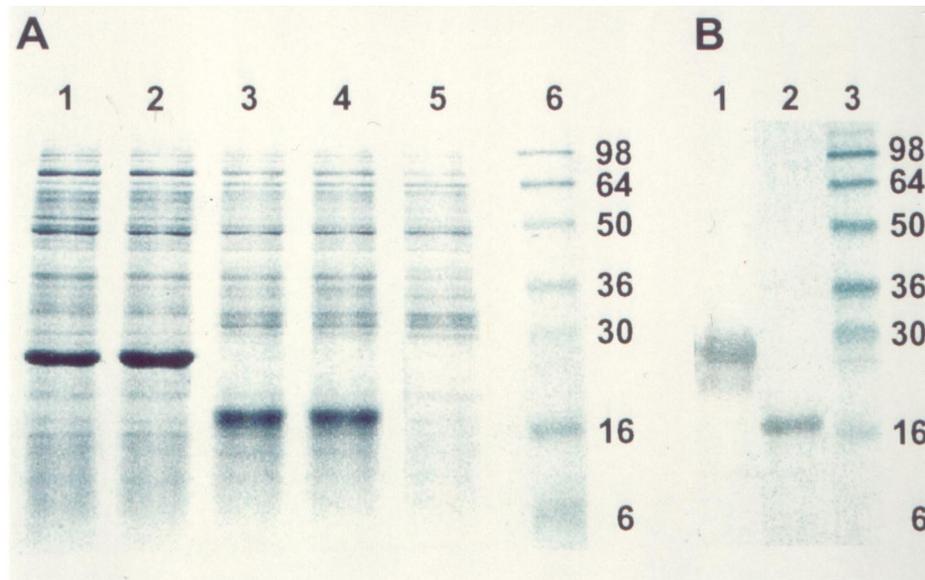


Abb. 18 Bakterielle Expression rekombinanter *his*-WD40- und *his*-Sar-Polypeptidfragmente. 15 μ g (A) bzw. 5 μ g (B) Gesamtprotein der zytoplasmatischen Fraktion der Bakterienkulturen wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Brillantblau R250 gefärbt (A) oder für die *Western-Blot*-Analyse (B) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunnachweis erfolgte mit dem anti-WD40- bzw. anti-Sar-Antikörper (1:1000), einem anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat (1:750) und durch NBT/BCIP-Färbung. **(A)** Bahnen 1, 2: IPTG-induzierte Sar-Bakterienkulturen zweier Transformanten; 3, 4: IPTG-induzierte WD40-Bakterienkulturen zweier Transformanten; 5: uninduzierte WD40-Bakterienkultur; 6: Proteinstandard (Bio-Rad). **(B)** Bahn 1: IPTG-induzierte Sar-Bakterienkultur; 2: IPTG-induzierte WD40-Bakterienkultur; 3: Proteinstandard (Bio-Rad). Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind jeweils rechts in kDa angegeben

3.3.8 Gewebespezifität und entwicklungsabhängige Regulation der Proteinexpression

Untersuchungen zur gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Expression von G α , G β , WD40- und Sar-Proteinen erfolgten mittels *Western-Blot*-Analysen (vgl. 2.12.2). Verwendet wurden lösliche und mikrosomale Fraktionen unterschiedlicher Gewebe und embryogener Stadien (vgl. 2.12.1). Für den immunochemischen Nachweis wurden entweder das Biotin-Streptavidin-ALP-System (Sigma) oder ein Antikörper-POD-Konjugat in Kombination mit dem ECL-System (Amersham) eingesetzt.

Bei Einsatz identischer Proteinmengen im SDS-PAA-Gel waren mutmaßliche Polypeptidbanden für alle GTP-bindenden Proteine und das WD40-Protein nur in der mikrosomalen, nicht aber in der zytoplasmatischen Proteinfraction nachweisbar. Eine mutmaßliche G α -

Proteinbande ($\approx 48\text{kDa}$) konnte in Wurzel, Stengel, jungen Blättern und Blüten (Abb. 19), jedoch nicht in älteren Blättern oder in embryogenen Stadien (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Dabei besitzen Blüten den höchsten $G\alpha$ -Proteingehalt. In jungen Blättern bindet der anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörper zusätzlich an eine Polypeptidbande von $\approx 54\text{kDa}$, deren Gehalt im Vergleich zur 48kDa -Polypeptidbande deutlich höher ist. Die $G\beta$ wird in allen somatischen Embryogenesestadien mit Ausnahme von Protoplasten (Tag 0) exprimiert (Abb. 20A). Der $G\beta$ -Proteingehalt steigt vom 3.-6. Kulturtag an. Nach Reduktion am 10. Tag folgt ein erneuter Anstieg vom 14.-28. Kulturtag. Ein eindeutiger Nachweis der $G\beta$ in verschiedenen Geweben war aufgrund des starken Hintergrundes, verursacht durch die geringe $G\beta$ -Menge im Verhältnis zum Gesamtprotein der Mikrosomenfraktion der Gewebe, nicht möglich. Abb. 20B zeigt die konstitutive, hohe Expression zweier mutmaßlicher WD40-Proteine von etwa 36 bzw. 37kDa in allen untersuchten Embryogenesestadien und Geweben sowie in der Dauerkultur. Dabei weisen embryogene Stadien und Dauerkultur einen höheren Gehalt des 37kDa-Proteins auf, während in Blatt und Wurzel beide Proteine in gleichem Verhältnis akkumuliert werden. Die Expression des Sar-Proteins (Abb. 20C) beginnt in frühen embryogenen Stadien (Tag 3) und steigt kontinuierlich bis zum 11. Kulturtag an. Nach Reduktion am 14. Kulturtag folgt erneuter Anstieg bis zum 28. Kulturtag. In Protoplasten ist kein Sar-Protein, in Dauerkultur, Blatt und Wurzel nur ein geringer Gehalt nachweisbar.

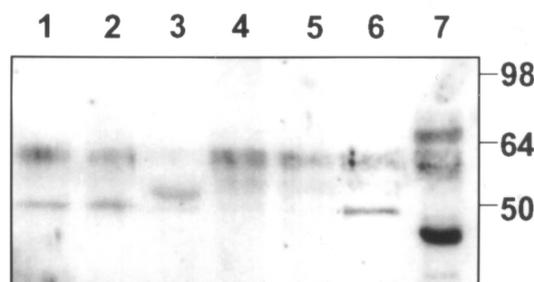


Abb. 19 Gewebespezifität der $G\alpha$ -Proteinexpression. Mikrosomenfraktionen verschiedener Gewebe von *N. plumbaginifolia* wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis des $G\alpha$ -Proteins erfolgte mit dem anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörper (1:1000), einem anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (1:10000) und dem ECL-System (Amersham). Bahnen 1-6: je $20\mu\text{g}$ Proteine aus Wurzel, Stengel, jungem, mittlerem, altem Blatt und Blüte; 7: $1\mu\text{g}$ Proteine aus Tryptophan-induzierter $G\alpha$ -Thio-Bakterienkultur (Positivkontrolle). Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine (Bio-Rad) sind rechts in kDa angegeben

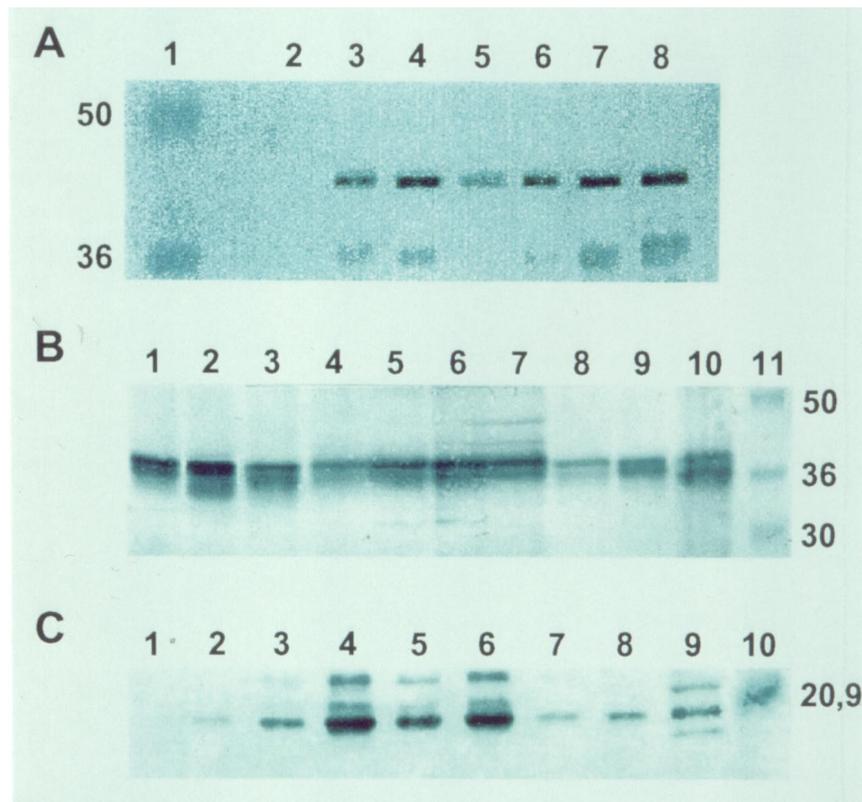


Abb. 20 Entwicklungsabhängige Expression von G β - (A), WD40- (B) und Sar-Protein (C) während der somatischen Embryogenese von *N. plumbaginifolia*. 30 μ g (A, B) bzw. 20 μ g (C) Gesamtprotein der Mikrosomenfraktion wurden in 12,5%igen SDS-PAA-Gele aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit dem spezifischen Antikörper, anti-Maus-IgG-Biotin (1:200) und Streptavidin-ALP (1:100) inkubiert. **(A)** Bahn 1: Proteinstandard (Bio-Rad); 2-8: Embryogenesestadien der Tage 0, 3, 6, 10, 14, 21 und 28. Verdünnung des anti-G β -Antikörpers: 1:100. **(B)** Bahnen 1-7: Embryogenesestadien der Tage 0, 1, 3, 6, 11, 14, 28; 8: Dauerkultur; 9: Blatt; 10: Wurzel; 11: Proteinstandard (Bio-Rad). Verdünnung des anti-WD40-Antikörpers: 1:100. **(C)** Bahnen 1-6: Embryogenesestadien der Tage 0, 3, 6, 11, 14, 28; 7: Dauerkultur; 8: Blatt; 9: Wurzel; 10: Proteinstandard (Bio-Rad). Verdünnung des anti-Sar-Antikörpers: 1:50. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind jeweils rechts in kDa angegeben

3.3.9 Immunzytologischer Proteinnachweis in Embryo und Endosperm

Der immunzytologische Nachweis von G α , G β und Sar-Protein in Embryo- und Endospermzellen erfolgte mit Hilfe der Immunogold-Technik und dem Transmissions-elektronenmikroskop (vgl. 2.13.2). Ultradünnschnitte von Embryo- und Endospermgewebe unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen (6-8 Tage nach Befruchtung) wurden mit den primären Antikörpern und einem Protein A-Gold-Komplex inkubiert.

G α -Protein ist in Zellen des Embryos überwiegend an Membranstrukturen (ER, Plasmamembran), jedoch auch im Kern lokalisiert (Abb. 21A) und ist in Endospermzellen vorrangig in Speichervakuolen sowie vereinzelt an Membranen nachweisbar (Abb. 21B). Die G β weist im Embryo ein G α -ähnliches Verteilungsmuster (Abb. 22A), jedoch im Endosperm vorrangig eine Markierung von Zytoplasma und Membranen sowie eine beginnende Akkumulation in

Speichervakuolen auf (Abb. 22B). Das Sar-Protein ist überwiegend in Speichervakuolen von Endospermzellen (Abb. 23A) und in geringem Maße in Zytoplasma und Kernen von Zellen des Embryos nachzuweisen (Abb. 23B).

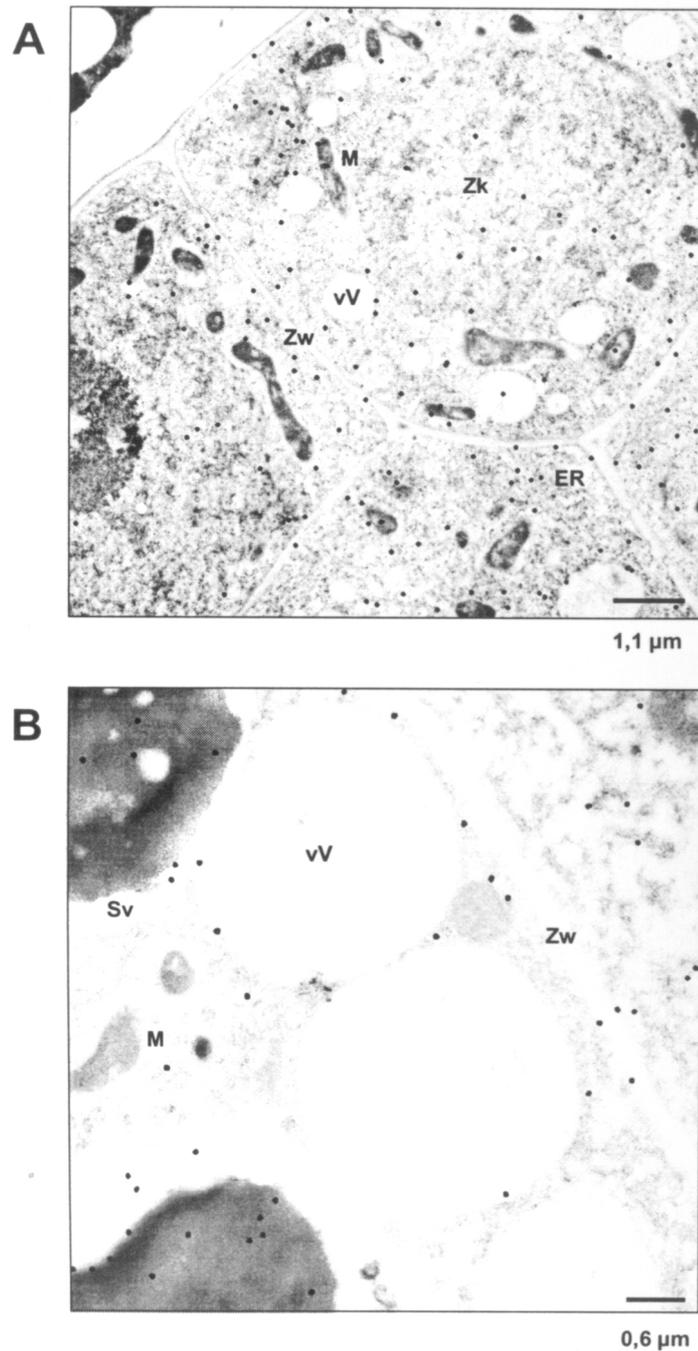


Abb. 21 Intrazelluläre Lokalisierung der $G\alpha$ in Zellen von Embryo und Endosperm unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen. Der immunzytologische Nachweis erfolgte mit dem anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörper, einem Protein A-Gold-Komplex am Transmissionselektronenmikroskop. Die Immunogoldpartikel wurden am Computer grafisch vergrößert. **(A)** Embryo, **(B)** Endosperm. ER=endoplasmatisches Reticulum, M=Mitochondrium, Sv=Speichervakuole, vV=vakoulärer Vesikel, Zk=Zellkern, Zw=Zellwand

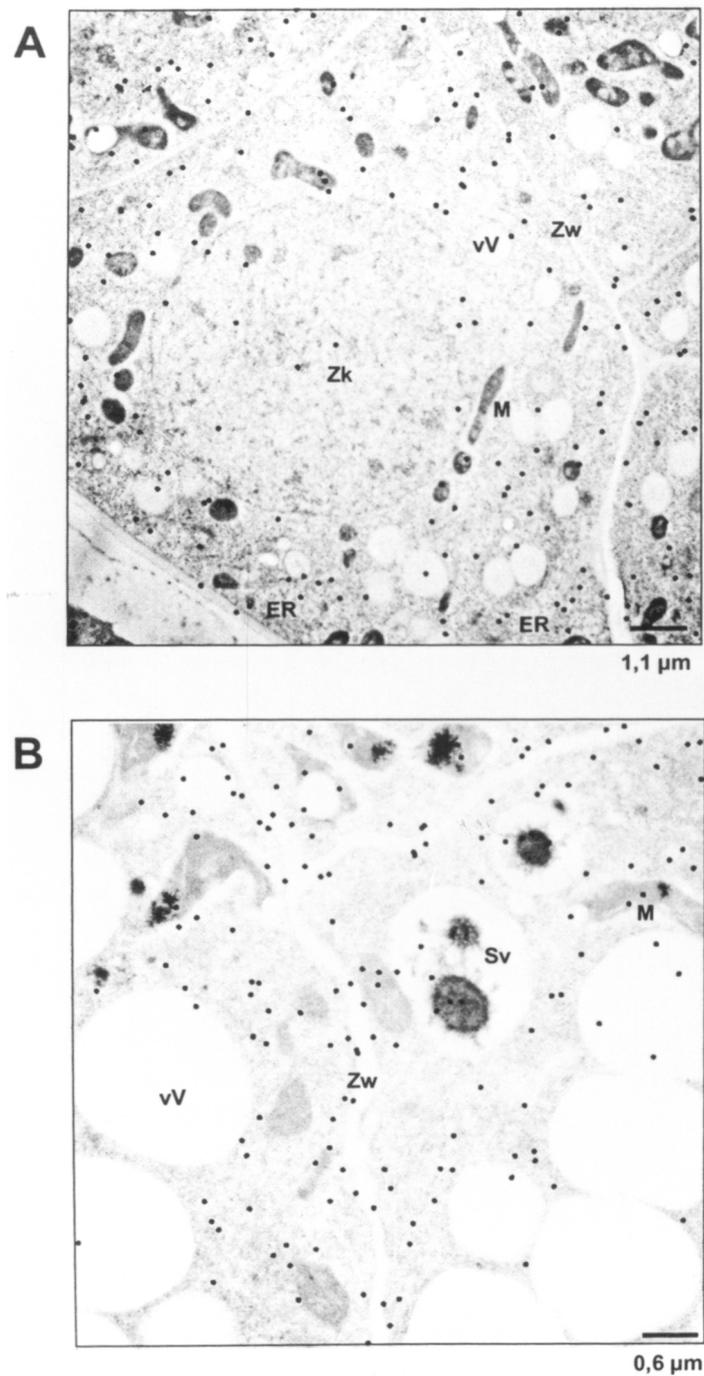


Abb. 22 Intrazelluläre Lokalisierung der G β in Zellen von Embryo und Endosperm unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen. Der immunzytologische Nachweis erfolgte mit dem anti-G β -Antikörper, einem Protein A-Gold-Komplex am Transmissionselektronenmikroskop. Die Immunogoldpartikel wurden am Computer grafisch vergrößert. **(A)** Embryo, **(B)** Endosperm. ER=endoplasmatisches Reticulum, M=Mitochondrium, Sv=Speichervakuole, vV=vakoulärer Vesikel, Zk=Zellkern, Zw=Zellwand

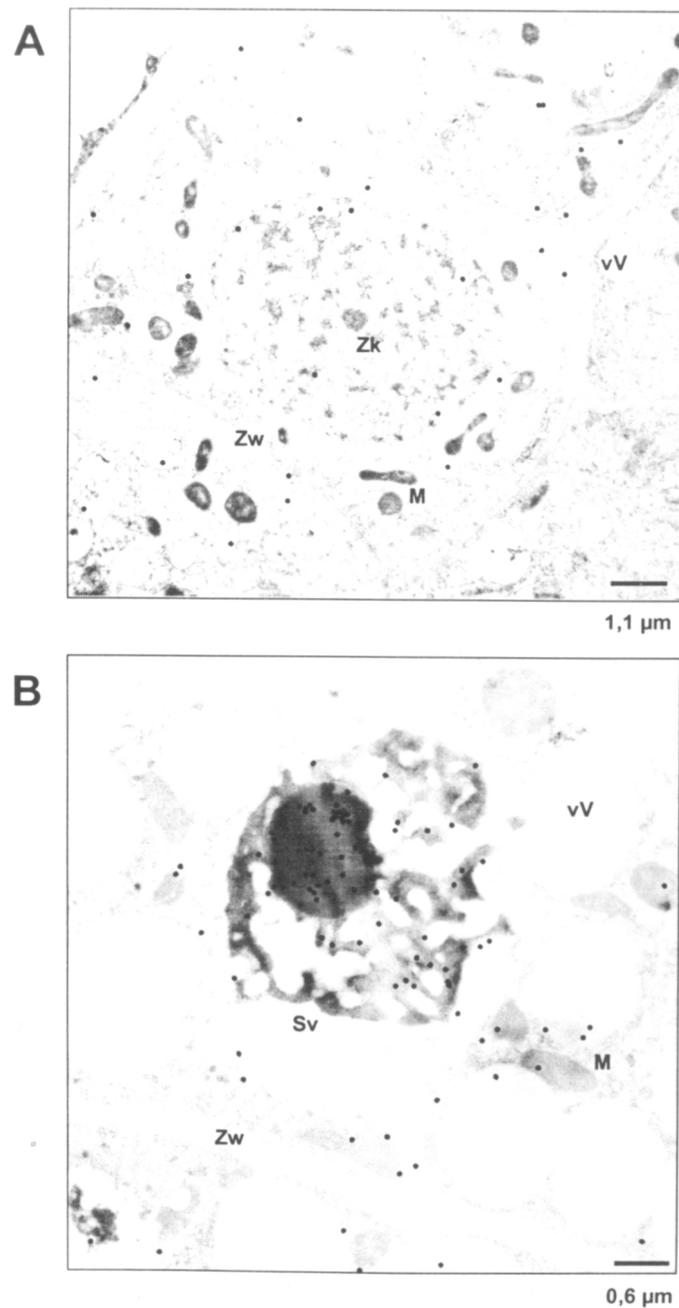


Abb. 23 Intrazelluläre Lokalisierung des Sar-homologen Proteins in Zellen von Embryo und Endosperm unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen. Der immunzytologische Nachweis erfolgte mit dem anti-Sar-Antikörper, einem Protein A-Gold-Komplex am Transmissionselektronenmikroskop. Die Immunogoldpartikel wurden am Computer grafisch vergrößert. **(A)** Embryo, **(B)** Endosperm. M=Mitochondrium, Sv=Speichervakuole, vV=vakoulärer Vesikel, Zk=Zellkern, Zw=Zellwand

3.3.10 Herstellung transgener Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten transgene Pflanzen mit reduzierter Expression der $G\alpha$, $G\beta$ bzw. des WD40-Proteins hergestellt werden. Für alle drei Gene wurde ein *antisense*-Ansatz, für das Gen der $G\beta$ zusätzlich ein Kosuppressionsversuch durchgeführt. Aufgrund der besseren Transformierbarkeit und Handhabung sowie der großen Homologie der isolierten cDNA-Sequenzen aus *N. plumbaginifolia* zu den korrespondierenden Tabakgenen wurde *N. tabacum* als Wirtspflanze verwendet.

3.3.10.1 Konstruktion der Promotor-Gen-Kassetten

Um eine ubiquitäre Expression der *antisense*- bzw. partiellen *sense*-RNA in der Pflanze zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Genfragmente unter die Kontrolle eines konstitutiven Promotors gestellt. Grundlage für die Konstruktherstellung bildete der Vektor pRT103 (TÖPFER et al., 1993), der den starken konstitutiven CaMV 35S-Promotor enthält. Partielle Fragmente aus den kodierenden Regionen der drei Gene wurden in *antisense*- (as) bzw. *sense*-Orientierung (cs) stromabwärts vom CaMV 35S-Promotor (35S) kloniert und *E. coli* XL1 Blue mit diesen Konstrukten transformiert. Für $G\alpha$ wurde ein aus dem PCR-Klon PCR α 2-1 isoliertes 800bp *Bam* HI / *Xba* I-Fragment mit dem analog gespaltenen Vektor pRT103 ligiert. Zur Klonierung eines *antisense*-Fragmentes für das WD40-Protein wurde die DNA des PCR-Klons PCRKat7-2 zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III gespalten, die entstandenen Enden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, Boehringer-Mannheim) aufgefüllt und eine anschließende Spaltung mit *Xba* I durchgeführt. Das entstandene 405bp-Fragment wurde mit dem *Sma* I / *Xba* I-verdauten Vektor ligiert. Ausgangsmaterial für die Klonierung eines 572bp-Fragments der $G\beta$ in *sense*- und *antisense*-Orientierung bildete der cDNA-Klon β 16/1. Nach *Eco* RV / *Hind* III-Doppelspaltung und Klenow-Behandlung der *Hind* III-Enden des isolierten Fragmentes erfolgte eine *blunt-end*-Ligation mit dem durch *Sma* I linearisierten Vektor. Die Orientierung des $G\beta$ -Fragmentes im Vektor wurde anhand von *Pst* I-Spaltungen der Plasmid-DNA rekombinanter Bakterienklone ermittelt. Alle pRT103-Genfragment-Konstrukte wurden zur Überprüfung der Klonierung mit den geeigneten genspezifischen Primern sequenziert (für 35S- $G\alpha$ -as: FSeqA; für 35S-WD40-as: FSeqB; für 35S- $G\beta$ -as und 35S- $G\beta$ -s: FSeqBs4; vgl. 2.4.2). Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in *N. tabacum*-Pflanzen wurden die 35S-Genfragment-Kassetten als *Hind* III-Fragmente aus den entsprechenden pRT103-Plasmiden herausgespalten und in den binären Vektor pGSG LUC1 kloniert (SAITO et al., 1990). Dieser Vektor enthält neben der T-DNA, dem β -Lactamasegen und dem stromabwärts vom TR2-Promotor gelegenen β -Glucuronidasegen auch das NPT II-Gen unter der Kontrolle des TR1-Promotors, wodurch Selektion transgener Pflanzen auf kanamycinhaltigem Medium möglich wird.

3.3.10.2 Erzeugung stabil transformierter Tabakpflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer

Der *A. tumefaciens*-Stamm C58C1 [pGV2260] wurde mit den die 35S-Genfragment-Kassetten enthaltenden Binärvektoren durch Elektroporation transformiert (vgl. 2.16.1). Die Selektion rekombinanter Agrobakterienklone erfolgte mittels nichtradioaktiver *Southern-Blot*-Hybridisierung unter Verwendung der entsprechenden Fluorescein-markierten 35S-Genfragment-Kassetten als Sonden (vgl. 2.9). Nach der *Agrobacterium*-vermittelten „leaf disk“-Transformation (vgl. 2.16.2) konnten für die *antisense*-Konstrukte der G α und des WD40-Proteins 55 (35S-G α -as) bzw. 54 Pflanzen (35S-WD40-as) auf Kanamycin regeneriert werden. Die Transformation mit den *antisense*- und Kosuppressions-Konstrukten der G β ergab 65 (35S-G β -as) bzw. 68 regenerierte Pflanzen (35S-G β -cs). Der Nachweis der T-DNA erfolgte durch PCR-Analysen. Nach Isolierung genomischer DNA und PCR-Reaktion mit einem CaMV 35S-Promotor-spezifischen Primer (P35S-60; vgl. 2.4) und den entsprechenden genspezifischen Primern wurden die transgenen Pflanzen selektiert. Regenerierte Pflanzen, die nach Transformation mit den Konstrukten 35S-G β -as und 35S-G β -cs heranwuchsen, wurden ohne vorherige PCR-Analysen für RNA-Expressionsuntersuchungen verwendet.

3.3.10.3 Analyse von Pflanzen mit *antisense*-Konstrukten

Mit Hilfe von *Northen-Blot*-Experimenten sollte ermittelt werden, ob und inwieweit die Expression der partiellen *antisense*-mRNA-Transkripte die Expression der korrespondierenden endogenen mRNAs in den transgenen Pflanzen beeinflusst. Transgene Pflanzen mit reduziertem endogenen RNA-Gehalt sollten auf mögliche phänotypische Veränderungen im Verlauf ihrer weiteren Entwicklung untersucht und nachfolgend durch RNA- und Protein-Expressionsanalysen charakterisiert werden.

Charakterisierung der transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen

Die Analyse von 54 regenerierten 35S-WD40-as-Pflanzen durch genomische PCR mit den Primern P35S-60 und FSeqBIs2f (vgl. 2.4) ergab 35 transgene Pflanzen (Transformationsrate: 66%). Zur Analyse der endogenen und *antisense*-WD40-mRNA-Expression in transgenen und Wildtyp-Pflanzen der F0- bis F2-Generationen wurde Gesamt-RNA (vorwiegend aus Blättern, teilweise aus Wurzeln) isoliert und mit dem radioaktiv markierten 1,08kb- β I12/1-Fragment (vgl. 3.3.4) hybridisiert.

In 33 juvenilen transgenen F0-Pflanzen konnte *antisense*-WD40-mRNA mit meist hohen Transkriptmengen im Blattgewebe nachgewiesen werden. Etwa 80% dieser Pflanzen wiesen erhöhte Expression der endogenen WD40-mRNA im Vergleich zum Wildtyp-Niveau auf. Zwei transgene Pflanzen, bei denen keine (TGwd11) bzw. sehr wenig (TGwd6)

antisense-RNA nachgewiesen werden konnte, akkumulierten ebenfalls deutlich mehr endogenes Transkript als der Wildtyp. Transgene Pflanzen mit verminderter oder ausbleibender Expression der endogenen WD40-mRNA wurden nicht gefunden. Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen dem Gehalt an endogenen und *antisense*-WD40-Transkripten in den transgenen Pflanzen festgestellt werden. Abb. 24A zeigt die Heterogenität in der endogenen und *antisense*-WD40-mRNA-Expression am Beispiel von 12 transgenen Pflanzen der F0-Generation. Unterschiede in allgemeinen Wachstumsparametern sowie in der Entwicklung des Organismus bzw. der einzelnen Organe zwischen transgenen und den Wildtyp-Pflanzen waren nicht erkennbar. Die Auswertung der gesamten F0-Generation der transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen ergab, daß keine der Pflanzen einen reduzierten endogenen mRNA-Gehalt aufwies. Stattdessen schien die Expression der *antisense*-WD40-mRNA bei der Mehrzahl der Pflanzen zu einer unerwarteten Überexpression des endogenen WD40-Transkripts zu führen, die keine phänotypischen Veränderungen verursachte.

Die Analyse der F1-Generation sollte klären, ob eine stabile Weitergabe des Transgens an die nächste Generation erfolgt und ob der erhöhte Gehalt des endogenen Transkripts in den transgenen Pflanzen durch Expression der *antisense*-RNA oder durch *in vitro*-Kultureffekte hervorgerufen wurde. Zur Bestimmung der Segregationsverhältnisse wurden pro F0-Ausgangspflanze sowie einer Kontrollpflanze nach Selbstbefruchtung 100 Tabaksamen auf kanamycinhaltigem $\frac{1}{4}$ MS-Medium ausgelegt und nach 4-6 Wochen kanamycinresistente (grün) und kanamycinsensitive (weiß) Pflänzchen ausgezählt. Aufgrund der relativ engen Kopplung des Kanamycinresistenzgens (NPTII) und des Transgens ist das ermittelte Spaltungsverhältnis auf das Transgen übertragbar. Bei allen transgenen Pflanzen der F0-Generation konnte eine stabile Weitergabe des Transgens auf die Nachkommen nachgewiesen werden. Von 10 transgenen F0-Pflanzen mit signifikanter Erhöhung des endogenen WD40-Transkriptgehalts im Blattgewebe wurden 2-5 Kanamycinresistente Nachkommen für RNA-Expressionsanalysen ausgewählt. In allen untersuchten juvenilen F1-Pflanzen wurde im Blattgewebe eine hohe Expression der *antisense*-WD40-mRNA und bei der Mehrzahl der Pflanzen (>90%) auch ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Gehalt des endogenen WD40-Transkripts nachgewiesen. Abb. 24B zeigt die Expression endogener und *antisense*-WD40-mRNA im Blattgewebe am Beispiel juveniler F1-Nachkommen der F0-Pflanzen TGwd 7, 16 und 21. Die Ergebnisse der RNA-Analysen an juvenilen F1-Pflanzen bestätigen den unerwarteten Überexpressionseffekt in der F0-Generation. Vermutet wird, daß der erhöhte Gehalt an endogenem WD40-Transkript eher durch die *antisense*-RNA-Expression als durch *in vitro*-Kultureffekte hervorgerufen wurde.

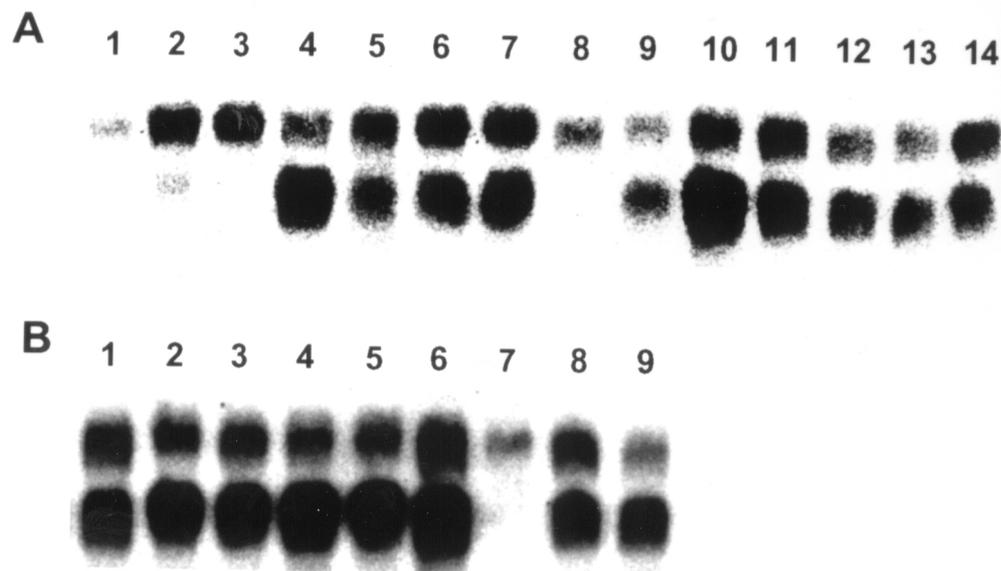


Abb. 24 Nachweis endogener und *antisense*-WD40-mRNA-Transkripte im Blattgewebe junger transgener WD40-*antisense*-Pflanzen der F0-Generation (A) und F1-Generation (B). 30µg Gesamt-RNA aus Blättern transgener (TGwd) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) wurden in 1,5%igen Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit dem radioaktiv markierten WD40-Fragment hybridisiert (vgl. 3.3.9). **(A)** Bahnen 1-7: WT1, TGwd 6, TGwd 11, TGwd 16, TGwd 18, TGwd 21, TGwd 24; 8: WT2; 9-14: TGwd 27, TGwd 32, TGwd 33, TGwd 34, TGwd 36, TGwd 39. **(B)** Bahnen 1, 2: TGwd 7-7, TGwd 7-9; 4-6: TGwd 16-1, TGwd 16-3, TGwd 16-4, TGwd 16-6; 7: WT; 8, 9: TGwd 21-1, TGwd 21-5

Die Stabilität der Überexpression des endogenen WD40-Transkripts in Abhängigkeit vom Entwicklungsverlauf wurde ebenfalls an transgenen F1-Pflanzen untersucht. Ausgewählt wurden 8 transgene F1-Pflanzen, die im juvenilen Entwicklungsstadium im Blattgewebe den höchsten endogenen WD40-mRNA-Gehalt und damit den höchsten Überexpressionseffekt aufwiesen. Für die *Northern-Blot*-Experimente wurde Gesamt-RNA sowohl aus Blättern als auch aus Wurzeln der adulten Pflanzen verwendet. Abb. 25A zeigt, daß trotz des weiterhin hohen Gehalts an *antisense*-RNA der Überexpressionseffekt im Blattgewebe adulter Pflanzen weitestgehend verloren geht. Während nur in einer transgenen Pflanze geringe Überexpression festgestellt werden konnte, wiesen die übrigen transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen unveränderten oder etwas geringeren endogenen WD40-RNA-Gehalt auf. Generell verzeichnen alle transgenen Pflanzen im Blattgewebe signifikant höhere Expression an *antisense*- im Vergleich zu endogener WD40-mRNA. Im Unterschied dazu wird im Wurzelgewebe der transgenen Pflanzen deutlich mehr endogenes als *antisense*-WD40-Transkript akkumuliert. Dabei bleibt der dem Wildtyp vergleichbare hohe Gehalt an endogenem WD40-Transkript in allen transgenen Pflanzen von der *antisense*-RNA-Expression unbeeinflusst, unabhängig davon, wieviel *antisense*-WD40-Transkript gebildet wird (Abb. 25B).

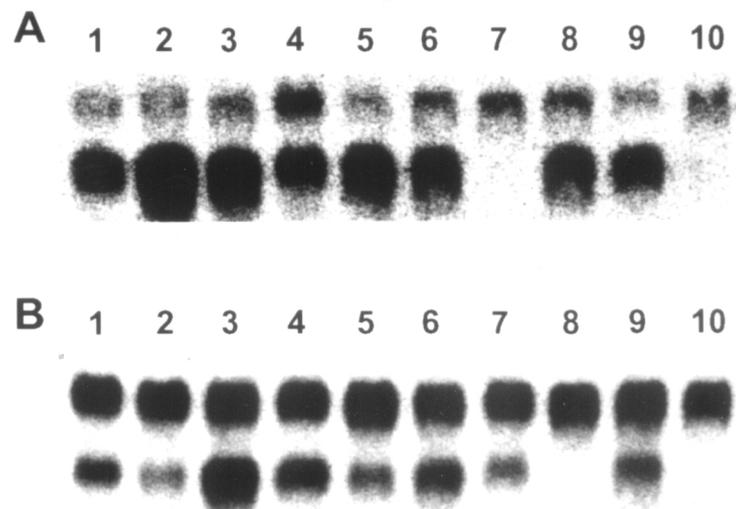


Abb. 25 Nachweis endogener und *antisense*-WD40-mRNA-Transkripte in Blättern (A) und Wurzeln (B) von adulten transgenen WD40-*antisense*-Pflanzen der F1-Generation. 30µg Gesamt-RNA aus Blättern und Wurzeln transgener (TGwd) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) wurden in 1,5%igen Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit dem radioaktiv markierten WD40-Fragment hybridisiert (vgl. 3.3.9). **(A)** Bahnen 1, 2: TGwd 7-3, TGwd 7-7; 3, 4: TGwd 16-2, TGwd 16-6; 5: TGwd 21-1; 6: TGwd 27-9; 7: WT1; 8: TGwd 39-3, 9: TGwd 48-6; 10: WT2. **(B)** Bahnen 1-10: wie (A) außer Bahn 7: TGwd 39-3; 8: WT1

Western-Blot-Experimente sollten klären, ob und wie der erhöhte Gehalt an endogenem WD40-Transkript die WD40-Proteinexpression in den transgenen Pflanzen beeinflusst. Von den transgenen F1-Pflanzen TGwd 7-7 und TGwd 16-6 mit deutlichem Überexpressionseffekt wurden Nachkommen auf kanamycinhaltigen $\frac{1}{4}$ MS-Medium angezogen und zwei Wochen nach Überführung ins Gewächshaus RNA-Expressionsanalysen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Je vier transgene F2-Pflanzen mit hoher endogener und *antisense*-WD40-mRNA-Expression und eine Wildtyp-Kontrollpflanze stellten das Versuchsmaterial für Proteinanalysen dar. In Analogie zu den *Northern-Blot*-Experimenten wurden Gesamtproteine der Mikrosomenfraktionen aus Blättern juveniler und adulter transgener Pflanzen isoliert (vgl. 3.3.8). Abb. 26A zeigt, daß nur die Nachkommen der F1-Pflanze TGwd 16-6 in der frühen Entwicklungsphase im Blattgewebe zum Teil deutlich (TGwd 16/6-1,2) mehr WD40-Protein exprimieren als der Wildtyp. Der WD40-Proteingehalt der TGwd 7-7-Nachkommen ist mit dem des Wildtyps vergleichbar oder sogar geringer (TGwd 7/7-1). Im adulten Entwicklungsstadium (Abb. 26B) ist nur noch in der Pflanze TGwd 16/6-1 eine leicht erhöhte WD40-Proteinexpression nachweisbar. Alle übrigen transgenen Pflanzen verzeichnen einen im Vergleich zum Wildtyp unveränderten oder etwas geringeren WD40-Proteingehalt. Diese Ergebnisse stimmen mit RNA-Analysen insoweit überein, daß ein Überexpressionseffekt fast ausschließlich im jungen Entwicklungsstadium der transgenen Pflanzen auftritt. Dabei kann ein erhöhter Gehalt an endogenem WD40-Transkript zur

Akkumulation des WD40-Proteins führen (TGwd16/6-Nachkommen) oder ohne Einfluß auf den WD40-Proteingehalt (TGwd7/7-Nachkommen) bleiben.

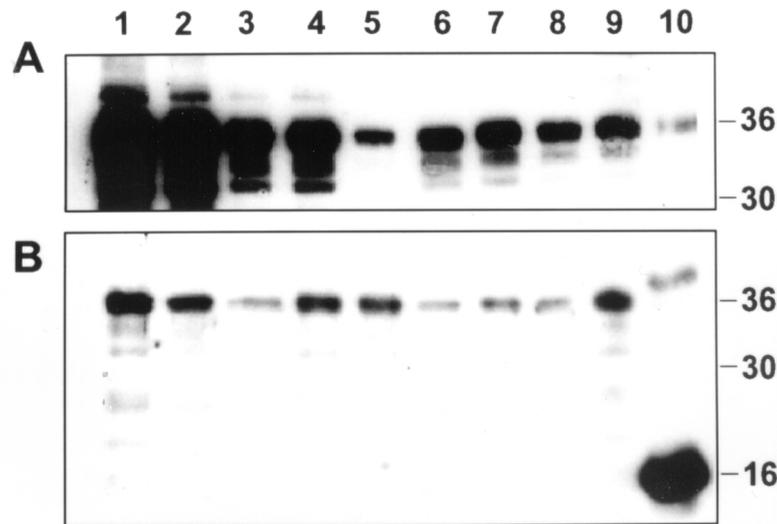


Abb. 26 Expression des WD40-Proteins im Blattgewebe junger (A) und adulter (B) transgener WD40-*antisense*-Pflanzen der F2-Generation. 20µg Gesamtprotein der Mikrosomenfraktion aus Blättern transgener (TGwd) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) sowie 0,5µg Gesamtprotein aus einer IPTG-induzierten WD40-Bakterienkultur wurden in 12,5%igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit dem anti-WD40-Antikörper (1:2000) und einem anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (1:10000) inkubiert. Der Peroxidasenachweis erfolgte mit dem ECL-System (Amersham). **(A)** Bahnen 1-4: TGwd 16/6-1, TGwd 16/6-2, TGwd 16/6-3, TGwd 16/6-4; 5-8: TGwd 7/7-1, TGwd 7/7-2, TGwd 7/7-4, TGwd 7/7-5; 9: WT; 10: WD40-Bakterienkultur (Positivkontrolle). **(B)** Bahnen 1-10: wie (A). Die Größen der Molekulargewichte sind rechts in kD angegeben

Charakterisierung der transgenen 35S-G α -as-Pflanzen

Von 54 regenerierten 35S-G α -as-Pflanzen konnten nach genomischer PCR mit den Primern P35S-60 und FSeqAs1 (vgl. 2.4) 40 transgene Pflanzen selektiert werden (Transformationsrate: 74%). Für den Nachweis der endogenen und *antisense*-G α -Transkripte mittels *Northern-Blot*-Experimenten wurde Gesamt-RNA aus Blättern juveniler transgener und Wildtyp-Pflanzen isoliert und mit einem radioaktiv markierten 1,3kb-G α -Fragment hybridisiert. Die Herstellung des 1,3kb-G α -Fragments erfolgte durch PCR-Amplifikation mit den Primern MP2 und PT7 von der α 2/4-cDNA und anschließende *Clal*-Spaltung. Abb. 27A zeigt die RNA-Expressionsanalysen von 10 transgenen 35S-G α -as-Pflanzen der F0-Generation. Alle transgenen Pflanzen besitzen einen hohen Gehalt an *antisense*-G α -mRNA sowie einen erhöhten Gehalt des mutmaßlichen endogenen G α -Transkripts. Aufgrund der geringen Abundanz der G α -mRNA konnte im Wildtyp kein endogenes G α -Transkript nachgewiesen werden. Durch Doppelmarkierung der G α -Sonde mit [α -³²P]-dATP und [α -³²P]-dCTP wurde die Sensitivität der Hybridisierung erhöht und dadurch der Nachweis der endogenen G α -mRNA auch im Wildtyp ermöglicht (Abb. 27B). In

transgenen Pflanzen, die *antisense*-G α -mRNA exprimieren, wurde neben dem endogenen G α -Transkript des Wildtyps ein zweites mutmaßliches G α -Transkript mit größerem Molekulargewicht und höherer Abundanz nachgewiesen (Abb. 27B, Bahnen 1-4).

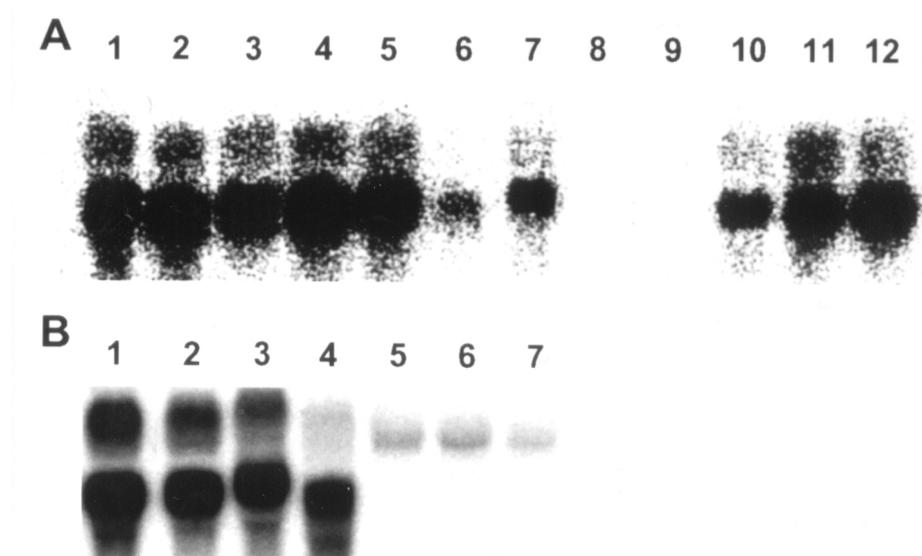


Abb. 27 Expression endogener und *antisense*-G α -mRNA-Transkripte im Blattgewebe junger transgener G α -*antisense*-Pflanzen der F0-Generation. 40 μ g Gesamt-RNA aus Blättern transgener (TG α) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) wurden in einem 1,5%igen Formaldehyd / Agarose-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten G α -Fragment hybridisiert (vgl. 3.3.9). **(A)** Hybridisierung mit G α -Fragment, das mit [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert wurde. Bahnen 1-7: TG α 3, TG α 4, TG α 5, TG α 6, TG α 8, TG α 9, TG α 14; 8, 9: WT1, WT2; 10-12: TG α 15, TG α 18, TG α 35. **(B)** Hybridisierung mit G α -Fragment, das mit [α - 32 P]-dCTP und [α - 32 P]-dATP radioaktiv markiert wurde. Bahnen 1-6: TG α 12, TG α 16, TG α 17, TG α 19, TG α 36. TG α 37; 7: WT

Insgesamt exprimierten 35 der 40 transgenen 35S-G α -as-Pflanzen der F0-Generation in der juvenilen Entwicklungsphase im Blattgewebe *antisense*-G α -mRNA. In allen Fällen wurde eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression der endogenen G α -mRNA beobachtet. Es waren keine phänotypischen Veränderungen an den transgenen Pflanzen zu erkennen. Eine transgene Pflanze mit reduziertem endogenen G α -mRNA-Gehalt konnte nicht gefunden werden. Von 8 transgenen F0-Pflanzen mit Überexpressionseffekt wurden nach Selbstbefruchtung die Segregationsverhältnisse unter Verwendung von 100 Tabaksamen auf kanamycinhaltigem $\frac{1}{4}$ MS-Medium ermittelt. Nur bei einer Pflanze konnte eine stabile Weitergabe des Transgens (80 Kan-resistente Nachkommen) festgestellt werden. Für die übrigen F0-Pflanzen wurden nur zwischen 21 und 36 Kan-resistente transgene Nachkommen ausgezählt. Die RNA-Expressionsanalysen an juvenilen transgenen Pflanzen der F1-Generation bestätigten die Ergebnisse der RNA-Analysen der F0-Generation (Daten nicht gezeigt). An 7 transgenen juvenilen F1-Pflanzen (mit G α -Überexpression) und einer Wildtyp-Kontrollpflanze wurden Proteinexpressionsanalysen mittels *Western-Blot* unter

Verwendung der Mikrosomenfraktionen aus Blättern vorgenommen (vgl. 3.3.8). Abb. 28 zeigt den Nachweis einer mutmaßlichen $G\alpha$ -Proteinbande bei etwa 54kDa im Wildtyp und in den transgenen Pflanzen. Während diese Bande im Wildtyp aufgrund der geringen Abundanz kaum sichtbar ist, verzeichnen alle transgenen Pflanzen ein starkes Signal und damit eine deutliche Überexpression des mutmaßlichen $G\alpha$ -Proteins. Unklar ist, ob es sich bei der markierten Polypeptidbande um ein mutmaßliches $G\alpha$ -Protein oder um ein anderes, an den anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörper bindendes Protein handelt. Mit Hilfe des anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörpers konnte im Wildtyp ein zweites, schwach markiertes Polypeptid mit mutmaßlichem Molekulargewicht von 48kDa nachgewiesen werden, das in keiner der transgenen Pflanzen zu finden ist.

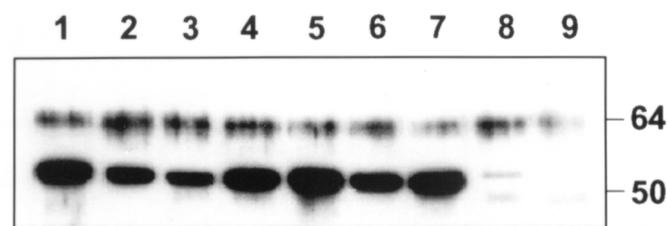


Abb. 28 Expression der $G\alpha$ im Blattgewebe junger transgener $G\alpha$ -*antisense*-Pflanzen der F1-Generation. 20 μ g Gesamtprotein der Mikrosomenfraktion aus Blättern transgener (TG α) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) sowie 1 μ g der unlöslichen Fraktion der Bakterienkultur (Positivkontrolle) wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit dem anti- $G\alpha$ -Thio-Antikörper (1:1000) und einem anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (1:10000) inkubiert. Der Peroxidasenachweis erfolgte mit dem ECL-System (Amersham). Bahn 1: TG α 4/1; 2: TG α 5/3; 3: TG α 8/1; 4: TG α 16/1; 5: TG α 17/1; 6: TG α 18/2; 7: TG α 37/1; 8: WT; 9: Tryptophan-induzierte $G\alpha$ -Thio-Bakterienkultur. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind rechts in kD angegeben

Charakterisierung der transgenen 35S- $G\beta$ -as-Pflanzen

An 57 von 65 auf Kanamycin regenerierten 35S- $G\beta$ -as-Pflanzen wurden nach Überführung ins Gewächshaus RNA-Expressionsanalysen vorgenommen. Alle *Northern-Blot*-Experimente erfolgten unter Anwendung eines radioaktiv markierten 840bp- $G\beta$ -Fragmentes, das mit Hilfe der Primer A/ZGB-sk2 und A/ZGB-as1 von der $G\beta$ -cDNA β 16/1 amplifiziert wurde (vgl. 2.4 und 3.3.3). Für die ersten Tests wurde Gesamt-RNA aus Blättern juveniler transgener und Wildtyp-Pflanzen isoliert und mit der $G\beta$ -Sonde hybridisiert. In nur 27 von 57 untersuchten 35S- $G\beta$ -as-Pflanzen der F0-Generation konnte ein *antisense*- $G\beta$ -Transkript, allerdings in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp enthielten *antisense*-RNA-exprimierende Pflanzen auch hier mehr oder weniger stark erhöhte endogene $G\beta$ -Transkriptmengen. Pflanzen, die keine *antisense*-RNA exprimierten, waren in ihrem endogenen $G\beta$ -Transkriptgehalt mit den Wildtyp-Kontrollen vergleichbar. Abb. 29 zeigt den Nachweis der endogenen und *antisense*- $G\beta$ -Transkripte im Blattgewebe von 9 transgenen 35S- $G\beta$ -as-Pflanzen der F0-Generation.

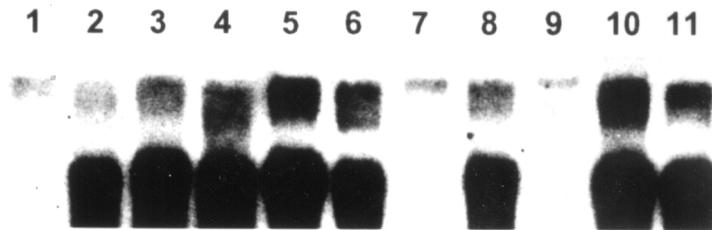


Abb. 29 Expression endogener und *antisense*-G β -mRNA-Transkripte im Blattgewebe juveniler transgener G β -*antisense*-Pflanzen der F0-Generation. 30 μ g Gesamt-RNA aus Blättern transgener (TG β as) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) wurden in einem 1,5%igen Formaldehyd / Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten G β -Fragment hybridisiert (vgl. 3.3.9). Bahnen 1-6: TG β as 1, TG β as 3, TG β as 4, TG β as 5, TG β as 9; 7: WT; 8-11: TG β as 14, TG β as 15, TG β as 16, TG β as 17

Transgene Pflanzen mit im Vergleich zum Wildtyp reduziertem endogenem G β -Transkriptgehalt wurden nicht gefunden. Von 10 transgenen F0-Pflanzen mit signifikantem Überexpressionseffekt wurden RNA-Expressionsanalysen auch im adulten Entwicklungsstadium durchgeführt. Sowohl im Blatt- als auch im Wurzelgewebe konnte ein hoher Anteil an *antisense*-G β -Transkript, aber auch ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Gehalt an endogener G β -mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings war dieser Überexpressionseffekt deutlich geringer ausgeprägt als im juvenilen Entwicklungsstadium der Pflanzen. Aufgrund der Schwierigkeiten beim immunologischen Nachweis des G β -Proteins in pflanzlichen Geweben (vgl. 3.3.8) wurde auf vergleichende Untersuchungen zur Proteinexpression verzichtet. Trotz des Überexpressionseffekts wiesen transgene Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen keine phänotypischen Besonderheiten oder Entwicklungsabnormalitäten auf. Desweiteren konnte durch Bestimmung der Segregationsverhältnisse bei den untersuchten transgenen F0-Pflanzen eine stabile Weitergabe des Transgens an die Nachkommen festgestellt werden. RNA-Expressionsanalysen an ausgewählten transgenen F1-Pflanzen bestätigten die Überexpression des endogenen G β -Transkripts auch in der Nachkommenschaft der F0-Generation (Daten nicht gezeigt).

3.3.10.4 Analyse der transgenen Kosuppressions-Pflanzen

Da durch Einsatz von *antisense*-Konstrukten für das WD40-Protein und die G α der Gehalt der korrespondierenden endogenen Transkripte nicht reduziert werden konnte, wurde für die G β parallel zum *antisense*-Ansatz (vgl. 3.3.10.3) ein Kosuppressionsversuch durchgeführt. Dabei sollte mittels *Northern-Blot*-Experimenten untersucht werden, ob die Transformation eines partiellen G β -Fragmentes in *sense*-Orientierung zur Reduktion des endogenen G β -Transkripts in transgenen Pflanzen führt.

Von 68 regenerierten 35S-G β -cs-Pflanzen konnten nur 56 nach Überführung in das Gewächshaus für RNA-Expressionsanalysen verwendet werden. Zur Vorselektion der transgenen Pflanzen, die die partielle *sense*-G β -mRNA exprimieren, wurde Gesamt-RNA aus Blättern juveniler transgener und Wildtyp-Pflanzen isoliert und mit der unter 3.3.10.3 beschriebenen G β -Sonde hybridisiert. 36 transgene Pflanzen akkumulierten das partielle *sense*-G β -Transkript in hohen Konzentrationen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten davon 30 Pflanzen einen erhöhten Gehalt an endogenem G β -Transkript. In den übrigen Pflanzen konnte kein partielles *sense*-Transkript, aber ein den Wildtyp-Kontrollen vergleichbarer endogener G β -Transkriptgehalt nachgewiesen werden. Transgene Pflanzen mit Reduktion des endogenen G β -mRNA-Gehalts wurden nicht identifiziert. Abb. 30 zeigt die Expression der endogenen und partiellen *sense*-G β -mRNA im Blattgewebe von 9 juvenilen Kosuppressions-Pflanzen der F₀-Generation.

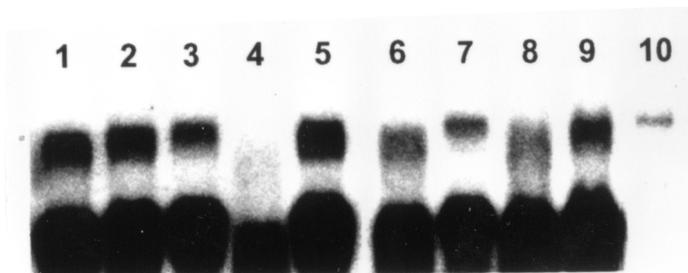


Abb. 30 Expression endogener und partieller *sense*-G β -mRNA-Transkripte im Blattgewebe junger transgener G β -Kosuppressions-Pflanzen der F₀-Generation. 30 μ g Gesamt-RNA aus Blättern transgener (TG β cs) und Wildtyp-*N. tabacum* SNN-Pflanzen (WT) wurden in einem 1,5%igen Formaldehyd/ Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem radioaktiv markierten G β -Fragment hybridisiert (vgl. 3.3.9). Bahnen 1-9: TG β cs 5, TG β cs 6, TG β cs 7, TG β cs 8, TG β cs 9, TG β cs 10, TG β cs 11, TG β cs 12, TG β cs 13; 10: WT

An 8 ausgewählten transgenen Pflanzen mit Überexpressionseffekt wurden RNA-Expressionsanalysen im adulten Entwicklungsstadium vorgenommen (Daten nicht gezeigt). 7 Pflanzen wiesen in Blatt- und Wurzelgewebe weiterhin einen hohen Gehalt an partiellem *sense*-Transkript bei gleichzeitig geringer Überexpression des endogenen G β -Transkripts auf. Bei der Pflanze TG β cs23 konnte weder im Blatt noch in der Wurzel partielle *sense*-mRNA nachgewiesen werden. Der Gehalt an endogenem Transkript in beiden Geweben war mit der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar. Offenbar wird in diesem Fall im adulten Entwicklungsstadium das ins Genom integrierte Transgen nicht mehr transkribiert oder die partielle *sense*-RNA vollständig abgebaut. Bei keiner transgenen Kosuppressions-Pflanze der F₀-Generation wurden phänotypische Besonderheiten oder Abnormalitäten in der Entwicklung festgestellt. Nach Ermittlung der Segregationsverhältnisse konnte bei allen transgenen Pflanzen der F₀-Generation eine stabile Weitergabe des Transgens festgestellt

werden. RNA-Expressionsanalysen an 10 ausgewählten F1-Nachkommen bestätigten den Überexpressionseffekt der F0-Generation (Daten nicht gezeigt).

Als Ergebnis der G β -*antisense*- und Kosuppressions-Versuche ist festzustellen, daß durch Transformation eines partiellen G β -Fragmentes weder in *antisense*- noch in *sense*-Orientierung eine Reduktion des endogenen G β -Transkriptgehalts erzielt werden konnte. Statt dessen verursachte die Expression der partiellen RNAs in beiden Fällen einen erhöhten Gehalt an endogener G β -mRNA. Dieser Effekt trat auch in *antisense*-Versuchen für die G α und das WD40-Protein ein. Überexpression betraf RNA- und in einigen Pflanzen auch Proteinniveau und konnte auch in der Nachkommenschaft nachgewiesen werden. Phänotypische Veränderungen wurden an transgenen Pflanzen nicht beobachtet.

4 Diskussion

DDRT-PCR und subtraktive Hybridisierung zur Isolierung differentiell exprimierter Gensequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten cDNA-Sequenzen differentiell exprimierter Gene während der frühen Phase der somatischen Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* isoliert und charakterisiert werden. Als methodische Ansätze wurden die DDRT („differential display reverse transcription“)-PCR-Technik und subtraktive Hybridisierung gewählt.

Mit Hilfe der DDRT-PCR-Technik werden durch Vergleiche der cDNA-Muster sowohl qualitative als auch quantitative Veränderungen der Genexpression in verschiedenen Zellstadien oder Geweben erfaßt. Vorteile dieser Methode sind: der geringe Einsatz von Startmaterial zur RNA-Isolierung, die schnelle mRNA-Analyse, der simultane Vergleich verschiedener Gewebe und der Nachweis von mRNAs für neue Mitglieder von Genfamilien, die bei subtraktiver Hybridisierung als doppelsträngige Moleküle verloren gehen. Methodische Erfahrungen mit radioaktiven und nichtradioaktiven DDRT-PCR-Ansätzen können wie folgt zusammengefaßt werden. Bei radioaktiven DDRT-PCR-Ansätzen bedingen geringe cDNA-Ausbeuten erneute Reamplifikationen für Klonierung und Sondenherstellung. Die durch Einsatz hochprozentiger PAA-Gele geringe Größe isolierbarer PCR-Produkte ($\leq 500\text{bp}$) kann die effiziente Markierung zur Sondenherstellung sowie die Identifizierung kodierender Sequenzbereiche verhindern. Sowohl cDNA-Ausbeuten als auch PCR-Fragmentgrößen ($\geq 2\text{kb}$) können in nichtradioaktiven DDRT-PCR-Versuchen durch Einsatz 1,5%iger EtBr / Agarosegele optimiert werden, jedoch erfordert die geringere Nachweissensitivität erhöhten Materialaufwand (RNA, dNTPs). In beiden DDRT-PCR-Ansätzen ist die Spezifität der isolierbaren PCR-Produkte von der Primerkombination abhängig. Die zur Darstellung aller mRNAs statistisch ermittelten 312 Primerkombinationen aus 12 dT₁₁₋₁₅VX-Primern und 26 10mer-Zufallsprimern (BAUER et al., 1993) erfordern hohen experimentellen, Material- und Kostenaufwand. Außerdem werden cDNAs ohne primerhomologe Sequenzbereiche nicht erfaßt. Der experimentelle Umfang limitiert die Anzahl der als Negativkontrollen zu verwendenden Gewebetypen. Deshalb werden auch solche cDNA-Sequenzen isoliert, die nicht nur in embryogenen Stadien, sondern auch in einigen nicht als Negativkontrollen eingesetzten Geweben hohe Transkriptgehalte aufweisen.

Durch subtraktive Hybridisierung werden nur solche Gene erfaßt, die ausschließlich in einem von zwei zu vergleichenden Zell- oder Gewebetypen exprimiert werden. Vorteile dieser Methode sind: hohe Sensitivität sowie Isolierung gewebespezifischer und seltener mRNAs, da der Hintergrund abundanter mRNAs (Haushalts-, repetitive Gene) in der subtrahierten Probe reduziert ist. Als methodische Nachteile sind der große Arbeitsaufwand sowie der Einsatz großer polyA-RNA-Mengen bei geringer cDNA-Ausbeute seltener RNA-

Spezies zu nennen, wobei letzteres durch PCR-Amplifikationsrunden kompensiert werden kann. Da subtraktive Hybridisierung eine kinetische Reaktion ist, werden in beiden Geweben vorkommende cDNAs nicht vollständig subtrahiert, weshalb auch cDNAs von im Zielgewebe 5-10fach angereicherten RNAs isoliert werden.

Alle mit beiden Methoden isolierten cDNA-Sequenzen wurden hinsichtlich der Spezifität ihrer zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster in *Northern-Blot*-Experimenten überprüft und durch Sequenzanalysen charakterisiert. Es konnten keine ausschließlich embryogenespezifischen cDNA-Klone isoliert werden. Die identifizierten Sequenzen repräsentierten essentielle Proteine (Transkriptions- und Translationsinitiationsfaktoren, GTP-bindende Proteine) von Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsprozessen, die in der Embryogenese verstärkt auftreten.

c41-3 (Kat41-3) - ein mutmaßlicher Transkriptionsfaktor

Unter Einsatz des DDRT-PCR-Fragments Kat41-3 als Sonde wurde der cDNA-Klon c41-3 aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien selektiert (vgl. 3.2.3.1). Datenbank-Homologiesuchen identifizierten das von c41-3 kodierte Protein (NPBTF3L) als homologe Pflanzensequenz des generellen Transkriptionsfaktors BTF3 (RNA-Polymerase B, Transkriptionsfaktor 3) mit geringer Aminosäuresequenzidentität (41-50%) zu BTF3-Sequenzen aus Tieren und der Hefe. Das *BTF3*-Gen des Human-Genoms kodiert zwei Proteine, BTF3a und BTF3b, die durch alternatives Spleißen entstehen (ZHENG et al., 1990). BTF3b, dem im Vergleich zu BTF3a 44 N-terminale Aminosäurereste fehlen, ist im Gegensatz zu BTF3a transkriptionsinaktiv und hat eine 3-4fach geringere Bindungsaffinität zu RNA-Polymerase II. Die ersten 44 N-terminalen Aminosäurereste sollten deshalb für die Transkriptionsaktivität von BTF3a unentbehrlich sein und die Bindung an RNA-Polymerase II beeinflussen (ZHENG et al., 1990). Da in der NPBTF3L-Sequenz die N-terminale Erweiterung fehlt, müßte auch NPBTF3L transkriptionsinaktiv sein. Allerdings sind die beiden BTF3-homologen Proteine BTT1 und EGD1 aus *S. cerevisiae* trotz fehlender N-terminaler Extension *in vivo* transkriptionsaktiv (PARTHUN et al., 1992; HU und RONNE, 1994). In den BTF3-Sequenzen einschließlich NPBTF3L wurden keine bekannten Sequenzmotive für DNA-Bindung oder Protein-Protein-Wechselwirkung (Homeodomäne, Zinkfinger-Motiv, Zipper-Domäne, Helix-Loop-Helix-Domäne) gefunden. Die N- bzw. C-terminalen Regionen sind stark hydrophil, entweder basisch oder sauer, die zentrale Region dagegen hydrophob. ZHENG et al. (1990) postulieren, daß BTF3a über einen Leucinreichen Bereich in der zentralen Region durch Bildung einer amphipathischen α -Helix mit RNA-Polymerase II oder anderen Transkriptionsfaktoren interagieren könnte. Allerdings unterscheidet sich der entsprechende Sequenzbereich in NPBTF3L deutlich von dem des BTF3a und enthält nur wenige hydrophobe Aminosäurereste. Hinsichtlich mutmaßlicher

Wechselwirkung mit anderen Proteinen kann deshalb nicht von BTF3a auf NPBTF3L geschlossen werden.

Die NPBTF3L-mRNA wird in Protoplasten und frühen Embryogenesestadien stark akkumuliert, ist jedoch in teilweise stark reduzierter Menge auch in späteren embryogenen Stadien und allen getesteten Geweben nachweisbar. Aus der ubiquitären Expression kann geschlußfolgert werden, daß NPBTF3L in *N. plumbaginifolia* offenbar als genereller Transkriptionsfaktor agiert. Ob die bevorzugte Akkumulation in frühen embryogenen Stadien auf spezifische Funktion von NPBTF3L hindeutet oder nur die erhöhte Transkriptionsaktivität in der frühen Embryogenese widerspiegelt, bleibt unklar. Die Funktionen BTF3-homologer Proteine sind offenbar vom jeweiligen Organismus abhängig. In Mensch (ZHENG et al., 1990) und Maus (DENG und BEHRINGER, 1995) wird BTF3 ubiquitär exprimiert und ist als positiver Kofaktor vermutlich essentieller Bestandteil der basalen Transkriptions-maschinerie. So führt Inaktivierung von BTF3 durch Insertionsmutagenese in Maus-Embryonen zur Lethalität. Dagegen zeigen Hefestämme nach Mutationen von *BTT1*, *EGD1* oder beiden Genen, daß BTF3 einerseits offenbar in Hefe nicht essentiell ist und andererseits für einige von RNA-Polymerase II transkribierte Gene als negativer Regulator agiert (HU und RONNE, 1994).

Funktion und Wirkungsweise von NPBTF3L in *N. plumbaginifolia* bleiben aufgrund der wenigen Daten spekulativ. Die Isolierung der cDNA-Sequenz und erste mRNA-Expressionsanalysen können nur Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen sein. Dabei könnten die Anwendung des Two-Hybrid-Systems, Mutagenese- oder *antisense*-Techniken Aufschluß über DNA- und Protein-Bindungseigenschaften sowie zur Funktion von NPBTF3L in der frühen Embryogenese liefern.

Bisher wurden wenige Transkriptionsfaktorgene mit spezifischer Funktion in der pflanzlichen Embryogenese identifiziert. Einige Produkte homeotischer Gene wie die Mitglieder der *Knotted*-Familie sind an der korrekten Bildung des Apikalmeristems bei *G. max*, *Z. mays* und *A. thaliana* beteiligt (MA et al., 1994; VOLLBRECHT et al., 1991; LONG et al., 1996). Weitere als Transkriptionsfaktoren identifizierte Genprodukte von *A. thaliana* sind in die Determination morphogenetischer Grenzen im frühen Embryo involviert (ATML1; LU et al., 1996), spezifisch für den Übergang vom globulären zum herzförmigen Embryostadium (PEI1; LI und THOMAS, 1998), beeinflussen Gefäßbildung und Initiation der Achse des frühen Embryos (MP; HARDKE und BERLETH, 1998) oder sind Hauptregulator für den Übergang von der vegetativen zur embryogenen Entwicklung (LEC1; LOTAN et al., 1998).

pNLA35 (NL35) - ein mutmaßlicher Translationsinitiationsfaktor

Der cDNA-Klon pNLA35 wurde mit Hilfe des DDRT-PCR-Fragmentes NL35 als Sonde aus einer λ ZAP Express™ Blatt-cDNA-Bank von *N. tabacum* isoliert (vgl. 3.2.3.3). Hohe DNA- und Protein-Sequenzhomologien in den überlappenden Sequenzbereichen von NL35 und pNLA35 ermöglichten Untersuchungen von mRNA-Expression und Histologie des pNLA35-

homologen Gens bzw. Proteins in *N. plumbaginifolia*. Das pNLA35-homologe Protein wird im *N. plumbaginifolia*-Genom von einem *single*- oder *low-copy*-Gen kodiert. Mit Ausnahme der Dauerkultur wird die korrespondierende mRNA in allen getesteten Zellen und Geweben von *N. plumbaginifolia* exprimiert, zeigte jedoch verstärkte Akkumulation in frühen embryogenen Stadien. Immunhistologische Untersuchungen weisen pNLA35-homologes Protein in Embryo und Endosperm nach. Während der Transition vom präglobulären Embryo zum Torpedostadium verlagert sich die Proteinakkumulation vom Embryo zum Endosperm. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Embryo- und Endospermzellen zeigen eine Lokalisierung des Proteins an Endomembransystemen im Zytoplasma und im Kern sowie in Speichervakuolen des Endosperms.

Datenbank-Homologiesuchen identifizierten das von pNLA35 kodierte Protein als mutmaßliche größte Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 (eIF3) aus *N. tabacum*. Obgleich an der Initiation der eukaryotischen Proteinsynthese mindestens 10 eIFs beteiligt sind (MERRICK und HERSHEY, 1996), wird eIF3 eine zentrale Rolle bei der Assemblierung des Initiationskomplexes zugeordnet. Durch Bindung an 40S ribosomale Untereinheiten (rUE) verhindert eIF3 die Reassoziierung von 40S und 60S rUEs, so daß die Anlagerung weiterer Initiationsfaktoren und RNA-Moleküle an „freie“ 40S rUEs ermöglicht wird. Die aus Säugern, Hefe und Weizenkeimen isolierten eIF3s sind 420-650kDa große Proteinkomplexe aus 8-11 Untereinheiten (BROWNLUEDI et al., 1982; NARANDA et al., 1994; CHECKLEY et al., 1981). Für die größte Untereinheit von eIF3 sind Sequenzen von *H. sapiens*, *M. musculus*, *C. elegans* und *S. cerevisiae* bekannt, zu denen die pNLA35-Proteinsequenz geringe Homologie ($\leq 35\%$) aufweist, da sich die Sequenzkonservierung weitestgehend auf die N-terminalen Regionen beschränkt. Innerhalb der Eukaryoten besteht für die Untereinheit Heterogenität in Sequenz und Molekulargewicht. Im Unterschied zu denen der anderen Organismen enthalten alle Säuger-Sequenzen im C-Terminus eine repetitive Domäne, über die eIF3 vermutlich mit repetitiven Elementen von eIF-4B interagieren soll (JOHNSON et al., 1997). In anderen Organismen, einschließlich *N. tabacum*, finden Wechselwirkungen von eIF3 mit eIF-4B vermutlich über andere Sequenzbereiche oder Untereinheiten statt. Trotz Diversität in Sequenzen, Anzahl und Größe der eIF3-Untereinheiten scheint deren Funktion zumindest zwischen Hefe und Säugern hochkonserviert, da komplementierbar, zu sein (NARANDA et al., 1994). Die größten eIF3-UEs aus Pflanzen weisen stark basische (pNLA35: 9,4; Weizen: >8), die aus Säugern eher saure pI-Werte auf (Mensch: 6,4; Kaninchen: 6,7). Für einige eIFs existieren in Pflanzen Isoformen, die von verschiedenen Genen kodiert werden (eIF-4F, eIF-iso4F; ALLEN et al., 1992, METZ et al., 1992). Weiterhin konnten GALLIE et al. (1997) zeigen, daß in Weizen basische Isoformen von eIF-4E bzw. eIF-iso4E nur in Embryonen und saure Isoformen nur in Stengeln und Wurzeln vorkommen. Ob auch für UEs von eIF3 in verschiedenen Geweben von *N. plumbaginifolia* verschiedene Isoformen existieren, ist nicht bekannt. Aus der *Southern*-Analyse ist nicht zweifelsfrei zu klären, ob für das pNLA35-homologe Protein

nur ein oder wenige hochhomologe Gene im *N. plumbaginifolia*-Genom vorliegen. Differente Isoformen könnten deshalb methodische Ursache für das Fehlen eines pNLA35-homologen Transkripts in der Dauerkultur sein. Die pNLA35-Sequenz enthält zahlreiche Phosphorylierungsstellen. Eine Regulation von eIF3 über Phosphorylierungen wurde bisher nicht nachgewiesen, wäre jedoch denkbar. Bekannt ist, daß in Weizen die Phosphorylierungen einiger eIFs entwicklungspezifisch reguliert werden und mit der Proteinsyntheseinduktion während der Keimung korrelieren (GALLIE et al., 1997). Für tierische Systeme wird eine Regulation von eIF4E, 4E-BP1 und eIF2B über MAPK-, Inositolphospholipid 3-Kinase- und teilweise über Proteinkinase C-Signalwege postuliert (KLEIJN et al., 1998). Die pNLA35-Sequenz enthält ein potentiell Kernlokalisierungssignal, dessen Funktionalität durch den Nachweis des pNLA35-homologen Proteins in Embryozellkernen bestätigt wird.

Die Induktion der Embryogenese (somatisch u./o. zygotisch) führt in Pflanzen und Tieren zur Auslösung von Signalwegen, in die erhöhte Proteinsynthesen eingeschlossen sein können. Die erhöhte Expression von pNLA35-homologer mRNA und Protein in embryogenen Zellen von *N. plumbaginifolia* könnte zum einen auf spezifisches Anschalten allgemeiner Translationsprozesse während der Embryogenese und zum anderen auf vorrangige Translation weniger embryogenesespezifischer mRNAs hinweisen. So konnte embryogenesespezifische Expression für den Translationsinitiationsfaktor eIF-4E in *Drosophila* und *Xenopus* nachgewiesen werden (HERNANDEZ et al., 1997; WAKIYAMA et al., 1995).

Np22c28 (NL28) - ein unbekanntes Protein

Der cDNA-Klon Np22c28 wurde nach Screening der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien mit dem DDRT-PCR-Fragment NL28 isoliert (vgl. 3.2.3.2). Er enthält einen N-terminal unvollständigen ORF, zu dem keine homologen Sequenzen auf DNA- bzw. Proteinebene in den Datenbanken gefunden wurden. *Southern*-Analysen legen nahe, daß das unbekannte Np22c28-Protein im *N. plumbaginifolia*-Genom von einem *single-copy*-Gen kodiert wird. Sowohl mRNA-Expressionsanalysen als auch immunhistologische Untersuchungen könnten auf eine Funktion in der frühen Embryogenese bis zur Ausbildung globulärer Stadien hinweisen. In späteren embryogenen Stadien akkumuliert das Protein verstärkt im Endosperm. Der immunochemische Nachweis des Proteins im *Western-Blot* ist problematisch, da sein mutmaßliches Molekulargewicht unbekannt ist. Der anti-NL28-Antikörper bindet vorrangig an eine Polypeptidbande von etwa 36-37kDa. Demnach dürfte der ORF des cDNA-Klons Np22c28 (36,8kDa) nahezu vollständig sein. Hohe Gehalte des mutmaßlichen Np22c28-Proteins weisen junge Blätter und Blüten auf. Die vorrangige Expression in jungen, nicht aber in mittel- oder alten Blättern könnte auf eine mögliche Beteiligung von Np22c28 an Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsprozessen hinweisen. Anhand potentieller Domänenstrukturen der abgeleiteten Np22c28-Proteinsequenz ist auf ein membranassoziiertes Glykoprotein unbekannter Funktion zu schließen, dessen Aktivität

durch Phosphorylierungen reguliert werden könnte. Demnach könnte Np22c28 in zellmembraneinschließende Signalwege der frühen Embryogenese sowie in Zellteilung und Differenzierung meristematischer Gewebe involviert sein. Da potentielle Domänenstrukturen in der Sequenz *in vivo* nicht zwangsläufig entsprechende posttranslationale Proteinmodifikationen bedingen, ist die weitere Charakterisierung (z.B. Phosphorylierungsstudien) von Np22c28 erforderlich. Mutagenese-, *antisense*- und Kosuppressions-Experimente könnten Aufschluß zur Funktion von Np22c28 in der frühen Embryogenese geben.

Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere GTP-bindende Proteine vermitteln extrazelluläre Signale, die von G-Proteingekoppelten Rezeptoren perzipiert werden, an intrazelluläre Effektoren. In einfachen Eukaryoten und Tieren sind G-Proteine regulativ an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt: in Säugern u. a. an metabolischer, hormoneller und Wachstumsfaktor-Regulation von Adenylatzyklase, Ionenkanälen und Phospholipasen (Übersichten bei GILMAN, 1987; SIMON et al., 1991) sowie an Zelldifferenzierung (WATKINS et al., 1992) und intrazellulärem Vesikeltransport (HIDALGO et al., 1995) und in Hefe, *Dictyostelium* bzw. *Drosophila* u. a. an Paarung (OBARA et al., 1991), multizellulärer Entwicklung (HADWIGER und FIRTEL, 1992) bzw. Embryogenese (PROVOST et al., 1988). G-Proteine bestehen aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Sie sind inaktiv im GDP-gebundenen heterotrimeren Zustand ($G\alpha\beta\gamma$ -GDP) und werden durch Rezeptor-katalysierten GDP-GTP-Austausch aktiviert. GTP-Bindung führt zur Dissoziation von $G\alpha$ -GTP, $G\beta\gamma$ und Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Effektoren durch $G\alpha$ -GTP und freie $G\beta\gamma$ -Dimere. Die GTPase-Aktivität der $G\alpha$, die GTP zu GDP hydrolysiert, rezykliert den Prozeß. In tierischen Organismen wurden für $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ zahlreiche Gene und deren Genprodukte charakterisiert. Dagegen stehen Untersuchungen pflanzlicher G-Proteine am Anfang. Bisher wurden nur wenige Gene isoliert. In pflanzlichen Systemen sind G-Proteine an der Signaltransduktion von Phytohormonen (ZAINA et al., 1990; BOSSEN et al., 1990), Blau- und Rotlicht (WARPEHA et al., 1991; BOWLER et al., 1994) sowie an der Regulation von Spaltöffnungsmechanismen (LI und ASSMANN, 1993) und Abwehrreaktionen (LEGENDRE et al., 1992) beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden cDNAs für eine $G\alpha$ und $G\beta$ aus embryogenen Stadien von *N. plumbaginifolia* isoliert sowie relativ hohe Expressionsaktivität der entsprechenden Gene in embryogenen Zellen nachgewiesen.

Der cDNA-Klon $\alpha 2/4$, der nach Screening der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien mit dem RT-PCR-Produkt PCR $\alpha 2$ -1 (vgl. 3.3.1.1) isoliert wurde, kodiert für eine $G\alpha$ von *N. plumbaginifolia* (NPGP $\alpha 1$; Anhang VI). 8 Kodonen stromaufwärts des mutmaßlichen Translationsinitiationskodons des NPGPA1-Gens befindet sich ein zweites Startkodon. Die Existenz zusätzlicher *in frame*-Startkodonen, 6 bis 10 Kodonen

stromaufwärts vom mutmaßlichen ORF entfernt, wurde auch für die Gene aus *L. esculentum* (*TGA1*; MA et al., 1991) und *O. sativa* (*RGA1*; ISHIKAWA et al., 1995) sowie für wenige Säuger-G α -Gene (STRATHMANN und SIMON, 1990) beschrieben. Einige pflanzliche G α -Gene wie *TGA1*, *RGA1* (SEO et al., 1995) und *GPA1* aus *A. thaliana* (MA et al., 1990) enthalten in den 5'-UTRs weiterhin einen oder mehrere kurze ORFs, deren *in vivo*-Translation bisher nicht nachgewiesen wurde. Das Vorkommen kurzer ORFs stromaufwärts von der proteinkodierenden Region ist untypisch, wurde aber auch an anderen pflanzlichen cDNAs (Mais-Glutaminsynthetase-Gen, SNUSTAD et al., 1988; Mais-*opaque-2*-Gen, SCHMIDT et al., 1990) sowie an Säuger-Oncogenen (KOZAK, 1987) und Hefegenen (*GCN4*, HINNEBUSCH, 1984; *CPA1*, WERNER et al., 1985) belegt. Bei den Hefegenen *GCN4* und *CPA1* sind „upstream“-ATGs für die Regulation der Translation erforderlich. Das Fehlen eines kurzen ORFs in der nur 63bp langen 5'-UTR des Klon $\alpha 2/4$ schließt eine generelle Existenz kurzer ORFs stromaufwärts vom *NPGPA1*-Gen nicht aus, da die 5'-UTR in Klon $\alpha 2/4$ vermutlich unvollständig ist. Die Isolierung korrespondierender genomischer Klone könnte Aufschluß über die 5'-UTR und mögliche kurze ORFs des *NPGPA1*-Gens geben.

Ein Aminosäuresequenzvergleich von NPGP $\alpha 1$ mit bekannten G α -Datenbank-Sequenzen ergab mit 75% (Monokotylen) bzw. 83-98% (Dikotylen) sehr hohe Homologien zu pflanzlichen G α s. Die Homologie zu tierischen G α s (Säuger, Invertebraten) lag generell unter 40%, wobei höhere Sequenzidentitäten ausschließlich auf essentielle Regionen beschränkt bleiben. Dabei sind, wie aus dem Proteinsequenzalignment (Anhang XII) ersichtlich, sowohl die GTP-Bindungsregionen (SIMON et al., 1991; NOEL et al., 1993, LAMBRIGHT et al., 1994) als auch die als Myristoylierungsort identifizierte N-terminale Sequenz MGXXXS (SIMON et al., 1991) hochkonserviert. Die Myristoylierung des N-terminalen Glycins aller pflanzlichen und vieler tierischer G α s ist eine irreversible kovalente Lipidmodifikation, die Membranverankerung und G $\beta\gamma$ -Bindung der G α begünstigt (CASEY, 1994). Alle pflanzlichen G α s enthalten im N-Terminus mehr Aminosäuren als die meisten Säuger-G α s. Computeranalysen legen nahe, daß der lange N-Terminus von GP $\alpha 1$ aus *A. thaliana* „coiled-coil“-Strukturen für Wechselwirkungen mit G $\beta\gamma$ ausbilden könnte (LUPAS et al., 1992). Von den drei als Effektor-Bindungsstelle identifizierten Regionen EBR 1-3 (NOEL et al., 1993, LAMBRIGHT et al., 1994; Anhang XII) weisen nur EBR 1+2 signifikante Sequenzhomologien unter allen G α s auf. Die Region EBR 3 ist zwar unter G α s höherer Pflanzen hochkonserviert, zeigt aber kaum Ähnlichkeiten zu der der Säuger-G α s. Daraus könnte folgen, daß Effektoren, die durch pflanzliche und tierische G-Proteine reguliert werden, teilweise übereinstimmen, aber auch different sein dürften. Die deutlichsten Sequenzunterschiede in einer essentiellen Region zwischen Pflanzen und Tieren sind in der Rezeptor-Bindungsregion erkennbar, die bei Säuger-G α s als eine etwa 40As-Sequenz am C-Terminus identifiziert wurde (NOEL et al., 1993, LAMBRIGHT et al., 1994). Allerdings variiert die entsprechende Region auch innerhalb der höheren Pflanzen. So ist sie in NPGP $\alpha 1$,

TG α 1, GP α 1 und PG α 1 (GBA1_PEA, Acc.-Nr.: O04278, MARSH und KAUFMANN, swissprot-Datenbank) hochkonserviert, zeigt jedoch in RG α 1 und SG α 1 (KIM et al., 1995) Abweichungen. Die Rezeptoren, mit denen G-Proteine interagieren, unterscheiden sich daher vermutlich nicht nur zwischen Pflanzen und Tieren, sondern auch innerhalb des Pflanzenreiches. In den Sequenzen von Säuger-G α s wurden spezifische Aminosäuren für die ADP-Ribosylierung durch Bindung an die bakteriellen Toxine Cholera toxin (CTX) und Pertussis toxin (PTX) identifiziert (Anhang XII; SIMON et al., 1991). Während ein spezifisches Arginin, das durch CTX modifiziert wird, in allen pflanzlichen G α s vorkommt, enthält keine der Pflanzensequenzen ein spezifisches Cystein im C-Terminus für die ADP-Ribosylierung durch PTX. Biochemische Studien weisen jedoch nach, daß ein durch Blaulicht aktiviertes GTP-bindendes Protein in der Plasmamembran etiolierter Erbsen als Substrat für die ADP-Ribosylierung durch CTX und PTX fungiert (WARPEHA et al., 1991). Außerdem wird ein G α -homologes Polypeptid aus der Sojabohne weder an Arginin noch an Cystein ADP-ribosyliert (LEGENDRE et al., 1992). Demzufolge dürften sich Orte der Modifikation durch PTX und zum Teil auch durch CTX von G α s höherer Pflanzen und Säugern unterscheiden.

NPGP α 1 wird in *N. plumbaginifolia* vermutlich von einem *single-copy*-Gen kodiert, worauf sowohl die *Southern*-Analyse (vgl. 3.3.6) als auch die Isolierung nur eines cDNA-Typs für die G α hinweisen. Alle bisher identifizierten pflanzlichen G α s werden von *single*- (MA et al., 1990, 1991) oder *low-copy*-Genen (ISHIKAWA et al., 1995, SEO et al., 1995; POULSEN et al., 1994; KIM et al., 1995; GOTOR et al., 1996) kodiert, die aufgrund der hohen Sequenzkonservierung in höheren Pflanzen einer Subfamilie zugeordnet werden können und vermutlich von einzigartiger funktioneller Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu werden Säuger-G α s von einer Multigenfamilie aus mindestens 17 Genen kodiert. Sie exprimieren, bedingt durch alternatives Spleißen, mindestens 20 distinkte Proteine, die in vier Subfamilien unterteilt werden (DAVIGNON et al., 1996).

Die Expressionsanalyse sowohl der NPGPA1-mRNA (vgl. 3.3.4) als auch des NPGP α 1-Proteins (vgl. 3.3.8) in verschiedenen Geweben und Embryogenesestadien von *N. plumbaginifolia* war aufgrund geringer Abundanz erschwert. Ein NPGPA1-Transkript konnte in allen untersuchten Geweben und Zellstadien nachgewiesen werden. Dabei besitzen Wurzeln, sehr frühe embryogene Stadien, die Dauerkultur, Stengel und Blüten die höchsten Transkriptgehalte. Beim Vergleich von NPGPA1-Transkriptmengen in frühen und späten Embryogenesestadien sowie jungen und alten Blättern ist eine Reduktion der NPGPA1-mRNA-Akkumulation in älteren Entwicklungsstadien bzw. Organen erkennbar. Mit Hilfe des anti-G α -Thio-Antikörpers (vgl. 3.3.7.2) konnte eine mutmaßliche ~48kDa NPGP α 1-Polypeptidbande von geringer Abundanz ausschließlich in der mikrosomalen Zellfraktion von Wurzeln, Stengeln und Blüten nachgewiesen werden (vgl. 3.3.8). In der Mikrosomenfraktion junger Blätter bindet der Antikörper allerdings bevorzugt an eine ~52kDa-Polypeptidbande, während die 48kDa-Polypeptidbande aufgrund geringer Abundanz in diesem Gewebe kaum nachweisbar ist. Es ist unklar, ob es sich bei den 48kDa- bzw. 52kDa-

Proteinbanden um NPGP α 1 oder verwandte Proteine handelt. Größenunterschiede zum erwarteten Molekulargewicht von 45kDa könnten durch posttranslationale Modifikationen verursacht sein. Diskrepanzen zwischen ubiquitärer NPGPA1-mRNA-Expression und dem Nachweis der ausschließlichen Gewebespezifität des Proteins im *Western-Blot* sind vermutlich auf ungenügende Sensitivität des immunochemischen Nachweises zurückzuführen und sollten nicht überbewertet werden. In den meisten Pflanzen wird eine ubiquitäre Expression der G α in allen untersuchten Geweben nachgewiesen. Die meisten der 17 Säuger-G α -Gene werden ebenfalls ubiquitär exprimiert, nur einige sind zellspezifisch (SIMON et al., 1991). Umfangreiche Analysen der SGA2-mRNA-Expression (GOTOR et al., 1996) sowie der GP α 1-Proteinexpression (WEISS et al., 1993) zeigen eine vorrangige Expression der G α in teilungsaktiven und schnell wachsenden Zellen sowie in vaskulärem Gewebe und Mesophyllzellen von *G. max* bzw. *A. thaliana*. In beiden Pflanzenarten nimmt der G α -Transkript- bzw. G α -Proteingehalt mit zunehmendem Alter der Zellen und Organe ab. Deshalb ist zu vermuten, daß die G α an Signalwegen von Wachstumsprozessen durch Zellteilung oder Zellelongation, Nährstofftransport oder -akkumulation und Zelldifferenzierung beteiligt sein könnte. Auch in tierischen Organismen sind G α s in Signalprozesse der Zellproliferation (POUYSEUR und SEUWEN, 1992) und des Glukosemetabolismus und -transports (GILMAN, 1987; HONNOR et al., 1992) involviert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung von NPGP α 1 in Embryo und Endosperm unreifer *N. plumbaginifolia*-Samen zeigen überwiegende Markierung von Plasma- und ER-Membranen sowie vereinzelte Signale im Kern. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des *Western-Blots* (Proteinnachweis ausschließlich in den Mikrosomenfraktionen) wird damit eine vorrangige Membranbindung der NPGP α 1 dokumentiert. Eine Akkumulation von NPGP α 1 in Speichervakuolen des Endosperms könnte als Reserveform für die Keimung des Embryos interpretiert werden. In Hafer-Aleuronprotoplasten sind vermutlich heterotrimere G-Proteine an der GA₃-Regulation von α -Amylase-Genexpression und -Sekretion beteiligt (JONES et al., 1998). In Karottenzellen ist ein G α -homologes Protein mit dem membranfreien Zytoskelett und der Kernmatrix assoziiert (DROBAK et al., 1995). WEISS et al. (1997) konnten eine zelluläre Lokalisierung von GP α 1 in Plasma- und ER-Membranen meristematischer Zellen von *A. thaliana* und Blumenkohl nachweisen. In Analogie zu tierischen G-Proteinen werden für GP α 1 Funktionen bei der Signalübermittlung an der Plasmamembran und bei der Regulation des Vesikeltransports zwischen Plasmamembran und ER postuliert. Desweiteren könnten Endomembran (ER)-assoziierte G α s extrazelluläre Signale wie membranpermeable Hormone nicht über aktivierte Transmembranrezeptoren, sondern über zytosolische oder ER-Rezeptoren vermitteln bzw. auf unbekannte Weise in die Regulation von ER-Funktionen wie Proteinsynthese und -modifikation eingeschlossen sein (WEISS et al., 1997).

In Blattscheiben- und Suspensionskulturtests (vgl. 3.3.5) wurde der Einfluß von Hormonen, Umwelt- und Streßfaktoren auf die NPGPA1-mRNA-Expression getestet. Eine direkte

Beteiligung von NPGP α 1 an hormon- oder streßinduzierten Signalwegen ist jedoch nicht durch mRNA-Bestimmung sondern nur durch Funktionsanalysen bzw. Inhibitoranalysen nachzuweisen. Der erhöhte NPGPA1-mRNA-Gehalt nach NES-Behandlung von Blattscheiben kann deshalb nur hinsichtlich der Regulierbarkeit der NPGP α 1-Menge durch hormoninduzierte Prozesse gewertet werden. Allerdings bleibt die NPGPA1-Transkriptmenge in den Auxin-Hungerkulturen nach NES-Zusatz unverändert oder wird sogar reduziert. Diese Unterschiede können zum einen durch unterschiedliche zelluläre Prozesse in ausdifferenziertem Gewebe und zellteilungsaktiven Kulturen und zum anderen durch unvollständige Ausverdünnung des Auxins in den Suspensionskulturen bedingt sein. Die Zugabe von Ca²⁺-Ionen hat eine geringe Reduktion der NPGPA1-Transkriptmenge in der Suspensionskultur zur Folge. Ob NPGP α 1 in Signalkaskaden agiert, die zur Öffnung von Ca²⁺-Kanälen und zu erhöhtem zytoplasmatischem Ca²⁺-Gehalt führen, kann in unserer Versuchsaufstellung nicht geklärt werden. Durch „patch-clamp“-Messungen an Plasmamembranen der Tomate konnten AHARON et al. (1998) zeigen, daß das rekombinant produzierte TGA1-Genprodukt erhöhte Ca²⁺-Kanalaktivitäten induziert. NPGP α 1 reagiert unter Streß mit mehr (Hitze, Salicylsäure) oder weniger (Verwundung, Kälte) drastischem Abbau oder Reduktion der Expression der mRNA. Lichtbehandlung im Dunkeln gehaltener Suspensionskulturen führt nicht zu Akkumulation des NPGPA1-Transkripts. Dagegen bewirkt Lichtbehandlung von 4 Wochen im Dunkeln gewachsenen adulten Reispflanzen erhöhte RGA1-mRNA-Expression in den Wurzeln (SEO et al., 1995).

Durch Einsatz des genomischen PCR-Produkts PCR β TA1 (vgl. 3.3.1.2) als Sonde wurde aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien der cDNA-Klon β 16/1 für eine G β aus *N. plumbaginifolia* kloniert (NPGP β 1, Anhang VII). In der 5'-UTR endet 2bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt des mutmaßlichen NPGPB1-Gens ein kurzer ORF, der für ein potentiell 5As-Peptid kodiert. Alle bisher identifizierten pflanzlichen G β -cDNAs enthalten in ihren 5'-UTRs kurze ORFs (5-6As), allerdings in unterschiedlicher Entfernung vom Translationsstart. In den G β -cDNAs aus *Solanum tuberosum* (Acc.-Nr.: X87837, PROVART et al., EMBL-Datenbank) bzw. *N. tabacum* (Acc.-Nr.: Z84820, LEIN und SAALBACH, EMBL-Datenbank) sind es 2bp bzw. 4bp, in denen aus *Zea mays* und *A. thaliana* (WEISS et al., 1994) bzw. aus *O. sativa* (ISHIKAWA et al., 1996) 65bp bzw. 55bp. Unbekannt ist, ob diese ORFs translatiert werden und welche Funktionen sie besitzen. Wie die NPGP α 1 weist die NPGP β 1-Proteinsequenz signifikante Homologien (78-98%) zu pflanzlichen G β s, jedoch deutlich geringere Sequenzähnlichkeiten (unter 50%) zu tierischen G β s auf. Sowohl zwischen Tieren und Pflanzen als auch innerhalb der höheren Pflanzen unterscheiden sich G β s hinsichtlich ihrer Aminosäureanzahl. Die G β s aus dikotylen Spezies (*N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *A. thaliana*) enthalten 377As, die aus monokotylen Spezies (*O. sativa*, *Z. mays*) 380As. Dabei ist die Sequenzhomologie der G β s innerhalb der Monokotylen bzw. Dikotylen höher als zwischen beiden Gruppen, so daß

pflanzliche G β s in zwei Subklassen unterteilt werden könnten. Pflanzen-G β s (MW: ~41kDa) sind etwa 40As länger als die meisten tierischen G β s (MW: 35-36kDa). Wie aus dem Proteinalignment (Anhang XIV) ersichtlich, verteilen sich diese Extra-Aminosäurereste in kleinen Gruppen über die gesamten Sequenzen. Sowohl der Grad an Sequenzidentität als auch die Verteilung von Extra-Aminosäureresten lassen den Schluß zu, daß die pflanzlichen G β s analog den G α s eine eigene Subfamilie repräsentieren. Es ist bekannt, daß das G β -homologe Hefe-STE4-Protein mit G α s, G γ s, Effektoren und Rezeptoren interagiert, die sich von denen der Säuger-G β s unterscheiden (WHITEWAY et al., 1989; LEBERER et al., 1992). Vermutlich können auch pflanzliche G β s mit anderen Effektoren oder Rezeptoren als die von Säugern oder Hefe wechselwirken. Alle G β s besitzen zwei Sequenzmotive, die auch in der NPGP β 1-Sequenz konserviert sind. So interagiert die N-terminale Region, die vermutlich „coiled-coil“-Strukturen bildet (LUPAS et al., 1992) mit G γ (BUBIS und KHORANA, 1990). Weiterhin enthalten alle bekannten G β s einschließlich NPG β 1 sieben Wiederholungen des sogenannten WD40-Motivs. Das WD40-Repeat besteht aus einem konservierten Kern von 23-41As und endet im allgemeinen C-terminal mit Trp-Asp (WD) (VAN DER VOORN und PLOEGH, 1992; NEER et al., 1994). Viele Proteine der WD40-Familie, der auch G β s zugeordnet werden, begünstigen makromolekulare Komplexbildung. Das G $\beta\gamma$ -Dimer ermöglicht G α -Assoziation mit Rezeptoren unter Ausbildung ternärer Rezeptor-G $\alpha\beta\gamma$ -Komplexe, die mit hoher Affinität Liganden binden (NEER, 1995).

Das *N. plumbaginifolia*-Genom (vgl. 3.3.6) besitzt wie das *O. sativa*-Genom (ISHIKAWA et al., 1996) nur wenige NPG β 1- bzw. RG β 1-Gene. Im *Southern-Blot* ergibt die Hybridisierung der β 16/1-Sonde mit DNA nach *Eco*RI-Spaltung 2 Signalbanden mehr als nach *Xba*I-Spaltung. Der Größenvergleich von genomischem PCR-Fragment PCR β TA1 (1,3kb) und korrespondierendem cDNA-Bereich (0,84kb) läßt die Existenz eines oder mehrerer Introns im *NPGPB1*-Gen vermuten. Demnach könnte ein *Eco*RI-Schnittort in möglichen Introns Ursache der zusätzlichen Hybridisierungsbanden sein. Die bisher charakterisierten Pflanzen-G β s AG β 1 bzw. ZG β 1 aus *A. thaliana* bzw. *Z. mays* werden von *single-copy*-Genen kodiert (WEISS et al., 1994), während bei Säugern mindestens fünf verschiedene G β -Gensequenzen identifiziert wurden (NEER, 1995).

Die NPGPB1-mRNA wird in allen getesteten Geweben und embryogenen Stadien konstitutiv und im Vergleich zur NPGPA1-mRNA mit höherer Abundanz exprimiert (vgl. 3.3.4). Da sich die gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen mRNA-Expressionsmuster von NPGP β 1 und NPGP α 1 unterscheiden, ist anzunehmen, daß beide Proteine auch in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind. Für die G β s aus *A. thaliana*, *Z. mays* und *O. sativa* wurden ebenfalls ubiquitäre mRNA-Expressionen in den getesteten Geweben nachgewiesen. Da sich jedoch die mRNA-Expressionsmuster von RG α 1 und RG β 1 ähneln, postulieren ISHIKAWA et al. (1995, 1996) eine kooperative Genexpression von G α und G β in *O. sativa*. Von Tieren ist bekannt, daß G $\beta\gamma$ -Dimere auch direkt mit Adenylatzyklase, PLC β , Calmodulin, PI $_3$ -Kinase, K $^{+}$ -, Na $^{+}$ -, und Ca $^{2+}$ -Kanälen und

anderen GTPasen (Rho, Rac, ARF) etc. interagieren (Übersichten bei CLAPHAM und NEER, 1993; HAMM, 1998).

Die Blattscheiben- und Suspensionskulturtests dokumentieren Unterschiede und Gemeinsamkeiten der mRNA-Expression von NPGP β 1 und NPGP α 1 unter Hormoneinfluß. Wie NPGP α 1 ist vermutlich auch die Regulation der NPGP β 1-Synthese auxinabhängig. Allerdings akkumuliert die NPGPB1-mRNA nicht nur im ausdifferenzierten Blattgewebe sondern im Gegensatz zur NPGPA1-mRNA auch in der zellteilungsaktiven Dauerkultur nach NES-Zusatz (vgl. 3.3.5). Weiterhin ist ein Anstieg der Transkriptmenge nach ABA-Behandlung der Blattscheiben nur bei NPGPB1 nachzuweisen. Im Vergleich zu frühen embryogenen Stadien weist die NPGPB1-mRNA in späteren Stadien höhere Expression auf. Ob NPGP β 1 durch Wechselwirkung mit ABA-induzierten Proteinen späte Embryogeneseprozesse beeinflußt, ist ungeklärt. Somatische Embryonen synthetisieren ABA und exprimieren ABA-induzierbare Gene. Zu prüfen ist, ob exogene ABA in embryogenen Zellkulturen zur Akkumulation von NPGPB1-mRNA und -Protein führt.

Immunochemisch wurde das mutmaßliche NPGP β 1-Polypeptid ausschließlich in den Mikrosomenfraktionen der embryogenen Stadien nachgewiesen (vgl. 3.3.8). In Übereinstimmung zum erhöhten mRNA-Gehalt enthalten spätere Stadien auch höhere Proteinmengen. Obwohl Protoplasten und Zellen am 10. Kulturtag relativ viel NPGPB1-mRNA akkumulieren, ist kein bzw. wenig Protein nachzuweisen. Ursachen könnten Translationshemmung oder Proteinabbau von NPGP β 1, bedingt durch Instabilität in den Kulturbedingungen oder beim Zelltransfer, in diesen Zellstadien sein. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung von NPGP β 1 in Embryo- und Endospermzellen (vgl. 3.3.10) zeigen bevorzugte Markierungen von Plasma- und ER-Membranen. Demnach liegt vermutlich auch NPGP β 1 überwiegend membranassoziiert vor, wobei die zahlreichen potentiellen N-Myristoylierungsstellen in der NPGPB1-Sequenz genutzt werden könnten. Aufgrund ähnlicher zellulärer Verteilungsmuster von NPGP α 1 und NPGP β 1 ist für einige membran-ingeschlossene Signalwege in Embryo- und Endospermzellen Wechselwirkung beider Proteine zu erwarten. Für die wenigen bisher charakterisierten pflanzlichen G β s liegen weder biochemische noch histologische Proteinanalysen vor.

Im Einklang mit Befunden zu pflanzlichen heterotrimeren G-Proteinen wurde aus *N. plumbaginifolia* nur je ein cDNA-Typ für G α und G β isoliert. Ubiquitäre Expression, zelluläre Lokalisierung und Hormontests lassen Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen (Auxinsignalkaskaden, Zellteilung, Sekretion) vermuten. Weiterhin ist anzunehmen, daß NPGP α 1 und NPGP β 1 in verschiedenen embryogenen Stadien und Geweben teilweise kooperativ, jedoch auch unabhängig agieren. In tierischen Organismen konstituieren heterotrimere G-Proteine Multigenfamilien (mindestens 17G α , 5G β , 12G γ in Säugern) mit mehr als 1000 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dabei eröffnen Wechselwirkungen verschiedener G α s mit variablen G β γ -Dimeren und unterschiedlichen Rezeptoren

zahlreiche Möglichkeiten für gewebe- und entwicklungsspezifische Signalkaskaden. In Pflanzen konnte bisher nur ein Typ $G\alpha$ und $G\beta$, aber keine $G\gamma$ und nur ein Rezeptor mit struktureller Ähnlichkeit zu tierischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (PLAKIDOU-DYMOCK et al., 1998) gefunden werden. Demnach sind vermutlich zusätzliche regulatorische Proteine an den zahlreichen G-Protein-gesteuerten zellulären Reaktionen in Pflanzen beteiligt. Allerdings ist die Existenz weiterer differenter G-Protein-Untereinheiten in Pflanzen nicht auszuschließen, da die Isolierung der bisher bekannten pflanzlichen $G\alpha$ - und $G\beta$ -cDNAs mittels PCR oder durch Screening von cDNA-Banken eine relativ hohe Sequenzkonservierung voraussetzte.

WD40-Proteine

Die WD40-Familie ist eine heterogene Gruppe von derzeit mehr als 140 eukaryotischen Proteinen, die alle das repetitive WD40-Sequenzmotiv, aber unterschiedlichste zelluläre Funktionen besitzen. Entsprechend Struktur (Anzahl, Lage und Konservierung der WD40-Repeats sowie Ähnlichkeiten in N- bzw. C-Termini) und Funktion werden WD40-Proteine in 6 Subfamilien unterteilt (NEER et al., 1994). Dazu zählen Proteine, die in Signaltransduktion (1), RNA-Prozessierung (2), Genregulation und Entwicklung (3), Vesikeltransport (4) sowie in die Regulation von Zytoskelett-Assemblierung und Zellzyklus (5) involviert sind bzw. unbekannte Funktionen (6) haben. Alle bisher funktionell charakterisierten WD40-Proteine haben offenbar regulatorische Aufgaben. Viele sind Hybridproteine mit C-terminalen WD40-Repeats und zusätzlichem N-terminalem strukturellem Motiv, andere sind durch Protein-Protein-Wechselwirkungen über die WD40-Repeats Bestandteil von Multiproteinkomplexen. Aus embryogenen Stadien von *N. plumbaginifolia* wurden zwei homologe cDNAs für ein WD40-Protein isoliert.

Beide cDNA-Klone β 13/2 und β 112/1 (NPGBLP1, NPGBLP2; Anhang VIII, IX) konnten unter Einsatz des DDRT-PCR-Fragmentes PCRKat7-2 (vgl. 3.3.1.3) aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien selektiert werden. Sie sind nicht identisch, zeigen aber im kodierenden Bereich auf DNA- und Proteinebene hohe Homologien. Offenbar kodieren für das *NPGBLP*-Genprodukt mindestens zwei verwandte Gene im *N. plumbaginifolia*-Genom. Diese Annahme bestätigen auch *Southern*-Experimente (vgl. 3.3.6). Die Genprodukte von NPGBLP1+2 zeigen signifikante Homologien (75-96%) zu den WD40-Proteinen ARCA, *Msgbl* bzw. RWD aus *N. tabacum*, *M. sativa* bzw. *O. sativa*, für die in den jeweiligen Genomen nur wenige verwandte Gene existieren (ISHIDA et al., 1993; MCKHANN et al., 1997; IWASAKI et al., 1995). Hinsichtlich Anzahl, Lage und teilweise Sequenzkonservierung der sieben WD40-Repeats ähneln obengenannte WD40-Proteine den $G\beta$ s, obgleich die Proteinsequenzhomologie zu $G\beta$ s nur bei 25-50% liegt. Innerhalb der WD40-Familie sind diese Proteine eher der RACK1-Gruppe zuzuordnen. RACK1 ist ein intrazellulärer Rezeptor für Proteinkinase C (PKC) aus Ratte (RON et al., 1994) mit

Homologien zu Proteinen in Mensch (REINER et al., 1993), Huhn (GUILLEMOT et al., 1989) und *Chlamydomonas* (SCHLOSS et al., 1988). Bisher wurde die Existenz von PKC in Pflanzen nicht zweifelsfrei nachgewiesen. Die zwei in RACK1 als PKC-Bindungsstelle identifizierten Regionen DVLSVAF bzw. DIINALCF sind entsprechenden Regionen in NPGBLP1/2 identisch bzw. ähnlich (vgl. Proteinalignment, Anhang XV). Weiterhin sprechen 67-68% Proteinsequenzidentität von NPGBLP1/2 und Pflanzenhomologa zu RACK1 sowie die ubiquitäre Verbreitung von RACK1-Homologa in Eukaryoten für universelle Funktionen in essentiellen zellulären Prozessen. Zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen sowie N-Myristoylierungsstellen in den NPGBLP1/2-Sequenzen weisen auf mögliche Beteiligung an membrangebundenen Signalwegen hin.

Die NPGBLP-mRNA wird in allen getesteten Geweben und Zellstadien konstitutiv exprimiert, allerdings mit Präferenz für embryogene Stadien und die zellteilungsaktive Dauerkultur (vgl. 3.3.4). In Blättern, die den geringsten NPGBLP-mRNA-Gehalt aufweisen, erfolgt altersabhängig eine drastische Reduktion der Transkriptmenge. Exogenes NES oder BA im Blattgewebe bzw. BA- und Ca^{2+} -Zusatz in der Dauerkultur bewirken NPGBLP-mRNA-Akkumulation (vgl. 3.3.6). Die BA- und NES-Abhängigkeit der NPGBLP-Expression sowie die große Transkriptmenge in zellteilungsaktiven Geweben lassen eine Beteiligung an hormoninduzierten Zellteilungsprozessen vermuten. Aufgrund der Ca^{2+} -Abhängigkeit der NPGBLP-Expression sowie der NPGBLP-Sequenzhomologie zu RACK1-homologen Proteinen ist anzunehmen, daß die Auslösung von Zellteilungsprozessen teilweise über den Phosphatidylinositol-Metabolismus erfolgen könnte. Desweiteren stimulieren Auxine und Zytokinin den Phosphatidylinositol-Metabolismus in pflanzlichen Zellkulturen (ETTLINGER und LEHLE, 1988; HANKE et al., 1990). Tierische RACK-Homologa binden mit Ca^{2+} -abhängiger PKC und Phospholipase C (DISATNIK et al., 1994) an Komponenten dieses Signalweges und vermitteln offenbar deren intrazelluläre Translokation (MOCHLY-ROSEN et al., 1995).

Allen bekannten Pflanzenhomologa von RACK1 (RWD, *Msgbl*, ARCA) fehlt die gewebe-spezifische mRNA-Expression. *ArcA* bzw. *Msgbl* werden am stärksten in teilungsaktiven Zellen bzw. nach zellteilungsinduzierender Hormongabe exprimiert. Hohe *ArcA*-Transkriptmengen sind in Wurzeln und nach Induktion von Zellteilungen durch 2,4D in Suspensionskulturen zu finden (ISHIDA et al., 1993). Trotz hoher Homologie von *ArcA* und NPGBLP reagieren beide Gene unterschiedlich auf Auxin- bzw. Zytokinin-Zusatz in Suspensionskulturen. Hinsichtlich des Auxineinflusses sind unterschiedliche *in vitro*-Kultivierung, Auxin-„Abhungering“ sowie Differenzen in der Wirkungsweise der Auxine (2,4D-*ArcA*; NES-NPGBLP) mögliche Ursachen. Im Unterschied zu NPGBLP ist *ArcA*, wie Hormontests und Promotoranalysen zeigen, ausschließlich auxinreguliert, während BA-Zusatz ohne Einfluß auf die Genexpression bleibt (ISHIDA et al., 1996). Dagegen induziert BA die *Msgbl*-Expression in Wurzeln von *M. sativa*. Wie NPGBLP reagiert *Msgbl* verschieden auf Auxin-Zusatz (2,4D) in intaktem Gewebe (ohne Einfluß) und Suspensionskultur (geringe Akkumulation). Bemerkenswert ist der hohe *Msgbl*-Transkriptgehalt in jungen

zellteilungsaktiven Embryonen, der jedoch bei Embryoreifung drastisch sinkt (MCKHANN et al., 1997). Aufgrund des hohen Transkriptgehalts in embryogenen Zellen und BA-Induktion der Expression kommt *NPGBLP* und *Msgbl* vermutlich ähnliche Bedeutung bei Zellteilungsprozessen in der Embryogenese zu.

In Übereinstimmung mit der ubiquitären mRNA-Expression konnten in *Western-Blot*-Experimenten (vgl. 3.3.8) zwei mutmaßliche NPGBLP-Polypeptide (36 bzw. 37kDa) in allen getesteten Geweben und embryogenen Stadien nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Abundanz beider Polypeptide in embryogenen Stadien und der Dauerkultur könnte Differenzen in der Funktion der Polypeptide widerspiegeln. Beide Polypeptide sind membrangebunden bzw. membranassoziiert, da sie ausschließlich in Mikrosomenfraktionen vorkommen.

Sar-homologes GTP-bindendes Protein

Unter Einsatz des PCR-Fragmentes PCR8Com (vgl. 3.3.1.4) als Sonde wurden zwei cDNA-Klone (3Sar, 50Sar; Anhänge VIII, IX) für Sar1-homologe Proteine aus der λ ZAP Express™ cDNA-Bank früher Embryogenesestadien isoliert und charakterisiert. Beide cDNA-Sequenzen sind im kodierenden Bereich auf DNA- und Proteinebene sehr homolog (80%, 92%). Aufgrund geringer Homologien in ihren 5'- bzw. 3'-UTRs ($\leq 40\%$) repräsentieren sie vermutlich zwei verwandte Gene für Sar1-homologe Proteine (NPSARGTP1+2) aus *N. plumbaginifolia* (vgl. 3.3.3.4). Im Unterschied zu den zahlreichen pflanzlichen und tierischen Genen der Rab/Ypt-Proteinfamilie wurden bisher für Sar1-homologe Proteine nur 1 (NAKANO und MURAMATSU, 1989; D'ENFERT et al., 1992; DAVIES, 1994) bzw. 2 Gene (SHEN et al., 1993; KUGE et al., 1994; KIM et al., 1997) in wenigen Eukaryoten identifiziert. NPSARGTP1+2 zeigen nicht nur zu Proteinen der Sar1-Familie aus Pflanzen, sondern auch zu denen aus Tieren und Hefe ($\cong 60\%$) hohe Aminosäuresequenzidentität. Diese hohe Sequenzkonservierung ist im Unterschied zu heterotrimeren G-Proteinen auch ein Merkmal anderer Subfamilien kleiner GTP-bindender Proteine und ermöglicht deren funktionelle Austauschbarkeit innerhalb der Eukaryoten. Andererseits liegt die Proteinhomologie von NPSARGTP1+2 zu den anderen Subfamilien mit Ausnahme der ARF-Familie ($\cong 60\%$) bei weniger als 30%. Signifikante Homologien beschränken sich auf die charakteristischen Sequenzmotive G1-G4 aller kleinen GTPasen (vgl. Proteinalignment, Anhang XVI). Diese funktionellen Domänen sind an GTP-Bindung und -Hydrolyse beteiligt (BOURNE et al., 1991). Nahe des C-Terminus enthalten NPSARGTP1+2 eine für alle Mitglieder der Sar1-Familie spezifische konservierte Peptidsequenz. Vermutlich erfüllt diese Domäne die Funktion der G5-Region anderer GTPasen oder begünstigt die Anlagerung von Sar1 an das ER (D'ENFERT et al., 1992). Allen Sar1-Homologa einschließlich NPSARGTP1+2 fehlen typische Signale für Lipidmodifikationen, welche Membranassoziation bzw. -verankerung sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen. Viele monomere GTPasen werden an einem konservierten C-terminalen Cysteinrest isoprenyliert (BOURNE et al., 1990),

während ARFs wie die G α s heterotrimerer G-Proteine an einem konservierten N-terminalen Glycinrest N-myristoyliert werden (KAHN et al., 1988). Es wird angenommen, daß die Membranassoziation von Sar1-Proteinen (NISHIKAWA und NAKANO, 1991) durch Wechselwirkungen mit dem integralen Membranprotein Sec12 und seinen Homologa gewährleistet wird (D'ENFERT et al., 1991).

Durch geringe Konzentration und partiellen Abbau der *N. plumbaginifolia*-DNA sind Aussagen über die Kopienzahl von NPGTPSAR1+2 im *N. plumbaginifolia*-Genom im *Southern-Blot* schwer zu treffen (vgl. 3.3.6). Hybridisierungen der 50Sar-spezifischen Sonde (vgl. 3.3.4) mit *N. tabacum*-DNA ergaben zahlreiche Banden, die für eine Sar1-Multigenfamilie sprechen, jedoch auch durch die Allotetraploidie des *N. tabacum*-Genoms erklärbar sind. *Southern*-Analysen mit 3'-UTR-spezifischen Sonden zeigten, daß jedes der beiden *Bsar1*-Gene vermutlich einer kleinen Multigenfamilie in *B. campestris* zugehörig ist (KIM et al., 1997). Demzufolge sollten an Vesikeltransportprozessen in Pflanzenzellen mehrere Sar1-Proteinisotypen beteiligt sein. Nicht völlig auszuschließen ist für *N. tabacum* bzw. *B. campestris*, daß einige Banden verwandte Gene monomerer GTPasen anderer Subfamilien repräsentieren.

Northern-Blot-Analysen wurden mit einer 50Sar-Sonde durchgeführt, die an mRNAs beider NPGTPSAR-Gene bindet. NPGTPSAR-mRNA konnte in allen Geweben und embryogenen Stadien mit vorrangiger Akkumulation in Blüten, alten Blättern, der Dauerkultur und späten embryogenen Stadien nachgewiesen werden (vgl. 3.3.4). Aufgrund der ubiquitären mRNA-Expression ist anzunehmen, daß NPGTPSAR1+2 essentielle Funktionen in Transportprozessen während der mittleren und späten Embryogenese und in differenten Geweben adulter Pflanzen besitzen. Ob dabei die mRNAs beider NPGTPSAR-Gene unterschiedliche Gewebe- oder Stadienspezifität ausprägen, ist in *Northern-Blot*-Analysen mit 3'-UTR-spezifischen Sonden zu prüfen. Übereinstimmend mit unseren Daten wurden auch für *AtSar1* (*A. thaliana*), *LeSar2* (*L. esculentum*) bzw. *Bsar1a+b* ubiquitäre mRNA-Expressionen nachgewiesen (BAR-PELED et al., 1995; DAVES, 1994; KIM et al., 1997). Da teilweise unterschiedliche Gewebepreferenzen zu erkennen sind, ist ein möglicher Hinweis auf spezifische Funktionen in den jeweiligen Pflanzen gegeben. Im Vergleich zu Blättern akkumulieren *AtSar1* und *LeSar2* mehr Transkript in Wurzeln, während der *AtSar1*-Transkriptgehalt mit zunehmendem Blattalter abnimmt. Dagegen exprimieren NPGTPSAR1+2 deutlich mehr mRNA in alten Blättern als in jüngeren Blättern bzw. Wurzeln. Für *Bsar1a+b* wurden gleiche Transkriptmengen in Blatt- und Wurzelgewebe ermittelt, wobei keine Unterschiede in den *Bsar1a+b*-mRNA-Expressionsmustern erhalten wurden (KIM et al., 1997). Im Gegensatz dazu werden *mSar1a* (ubiquitär) und *mSar1b* (gewebespezifisch) aus der Maus differentiell exprimiert, so daß für beide Genprodukte distinkte Funktionen postuliert wurden (SHEN et al., 1993).

Übereinstimmend mit *Northern*-Analysen konnte im *Western-Blot* die ubiquitäre Expression einer mutmaßlichen NPGTPSAR-Polypeptidbande gezeigt werden (vgl. 3.3.8). Die

vorrangige Lokalisierung der Sar1-Proteine in den Mikrosomenfraktionen läßt vermuten, daß NPGTPSAR überwiegend in membrangebundener bzw. -assoziierter Form vorliegt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen weisen eine zelluläre Lokalisierung von NPGTPSAR-Protein in Zytoplasma und Zellkernen von Embryozellen nach (vgl. 3.3.9). Allerdings ist die Embryomarkierung im Vergleich zur hohen Konzentration in Speichervakuolen des Endosperms gering. Geringe Konzentration und Sensitivität könnten demnach Ursachen für den fehlenden Nachweis der zytoplasmatisch löslichen Form von NPGTPSAR im *Western-Blot* sein. PAR-PELED und RAIKHEL (1997) konnten AtSAR1 in zytosolischen, Mikrosomen- und zellkernangereicherten Fraktionen von *A. thaliana*-Zellsuspensionen nachweisen. Auch in Hefe- und Säugerzellen liegt SAR1 teilweise zytosolisch und teilweise membrangebunden vor (NAKANO und MURAMATSU, 1989; KUGE et al., 1994).

Aus Blattscheibentests ist ersichtlich, daß BA- sowie ABA-Zusatz den NPGTPSAR-Transkriptgehalt im Blattgewebe erhöht (vgl. 3.3.5.1). Dabei könnte der Hormoneinfluß nicht direkt auf die Genexpression, sondern indirekt über nachfolgende zelluläre Prozesse (z.B. Zellproliferation und -elongation), die erhöhte Sekretion und Vesikeltransport erfordern, wirken. Erhöhte Expression nach ABA-Zusatz, hohe mRNA- und Proteingehalte in späten embryogenen Stadien sowie Proteinakkumulation im Endosperm lassen eine funktionelle Beteiligung von NPGTPSAR an ABA-induzierten Prozessen der späten Embryogenese vermuten. NPGTPSAR könnte in den Vesikeltransport des sekretorischen Stoffwechsels von Reserveproteinen involviert sein.

Niedrige Temperaturen verlangsamen oder hemmen den Proteintransport entlang des sekretorischen Stoffwechselweges einschließlich des Abschnitts vom ER zum Golgi-Apparat. In *A. thaliana* wurden nach Kältebehandlung erhöhte bzw. unveränderte *AtSar1*-mRNA-Gehalte in Blättern bzw. Wurzeln, jedoch reduzierte *AtSar1*-Proteingehalte in Zellsuspensionen ermittelt (BAR-PELED et al., 1995; BAR-PELED und RAIKHEL, 1997). Im Suspensionskulturtest verursacht Kältebehandlung keine Veränderungen der NPGTPSAR-mRNA-Expression (vgl. 3.3.5.2). Ob Kälteschock die mRNA- oder Proteinexpression von *NPGTPSAR* in anderen Geweben beeinflusst, wurde nicht geprüft.

Studien an Hefe- und Säugerzellen haben gezeigt, daß monomere und heterotrimere GTP-bindende Proteine regulatorische Funktionen beim Vesikeltransport zwischen intrazellulären Kompartimenten (ER, Golgi-Apparat, Vakuole, PM) besitzen (VERMA et al., 1994; HIDALGO et al., 1995). Am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Komplex sind im wesentlichen zwei Subfamilien monomerer GTPasen beteiligt. *ARF/Sar1*-Proteine stimulieren die Vesikelknospung vom ER (DONALDSON et al., 1992; OKA et al., 1991), während *Rab/Ypt*-Proteine Transport und Fusion der ER-abgeleiteten Vesikel mit dem Golgi-Apparat regulieren (SEGEV et al., 1988; ZERIAL und STENMARK, 1993). Für einige Komponenten des Vesikeltransports besteht ein hoher Grad an Konservierung innerhalb der Eukaryoten. So konnten Hefe-Proteine des ER->Golgi-Vesikeltransports in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten durch ihre Säuger-Counterparts funktionell ersetzt werden (WILSON et al., 1993;

CLARY et al., 1990). Da die Komplementation der Wachstumsdefekte von Hefe-Mutanten zur Isolierung zahlreicher pflanzlicher cDNAs für Proteine des ER->Golgi-Vesikeltransports führte (D'ENFERT et al., 1992), sind ähnliche Transportmechanismen in Pflanzen zu erwarten.

Versuche mit transgenen Pflanzen

Durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer können homologe Genfragmente (Transgene) in *antisense*- (*antisense*-Suppression) oder *sense*-Orientierung (Kosuppression) stabil in das Wirtsgenom von Pflanzen integriert werden. Dabei kann die exprimierte transgene *antisense*- oder *sense*-RNA durch Wechselwirkung mit der korrespondierenden endogenen RNA oder DNA die Expression des entsprechenden Genprodukts in den transgenen Pflanzen hemmen. Auftretende phänotypische Veränderungen in den Transformanten lassen Rückschlüsse über Funktionen von Gen und Genprodukt im pflanzlichen Organismus zu. Die Mechanismen der Geninaktivierung durch *antisense*-RNA sind bisher wenig verstanden (Übersicht bei BOURQUE, 1995). Es wird angenommen, daß *antisense*- und endogene RNA doppelsträngige Hybride bilden (KIM und WOLD, 1985), die mit der Prozessierung der mRNA, ihrem Transport aus dem Kern oder ihrer Translation im Zytoplasma interferieren (GREEN et al., 1986) bzw. durch Ribonukleasen abgebaut werden könnten. Eine weitere Form der Geninaktivierung ist die Kosuppression bzw. *sense*-Suppression durch Wechselwirkung zwischen homologen Genkopien (mehrere Transgenkopien, Transgen und Endogen). Es wird postuliert, daß der Mechanismus der Kosuppression auf Veränderungen der Chromatinkonfiguration (Hemmung der Transkriptionsinitiation), auf posttranskriptionellen Prozessen sowie auf DNA-Modifikationen (Basenmethylierungen) beruhen kann (Übersichten bei JORGENSEN, 1995; MATZKE und MATZKE, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen zur Funktionsanalyse von $G\alpha$, $G\beta$ und WD40-Protein durch *antisense*-Suppression und Kosuppression hergestellt. Dazu wurden Fragmente aus den kodierenden Regionen von *NPGPA1* ($G\alpha$), *NPGPB1* ($G\beta$) und *NPGBLP1* (WD40-Protein) unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in *antisense*- bzw. *sense* (nur *NPGPB1*) -Orientierung in das Genom von *N. tabacum*-Pflanzen integriert. Der Nachweis von *antisense*- bzw. partieller *sense*-RNA sowie die Vorselektion von transgenen Pflanzen mit reduziertem endogenen Transkriptgehalt erfolgte im juvenilen Entwicklungsstadium der Pflanzen. Nach Auswertung der *Northern-Blot*-Analysen aller transgenen 35S-WD40-as-, 35S- $G\alpha$ -as-, 35S- $G\beta$ -as- und 35S- $G\beta$ -cs-Pflanzen der F₀-Generationen wurde bei der Mehrzahl der Pflanzen (55-80%) eine hohe Expression der *antisense*- bzw. partiellen *sense*-RNA nachgewiesen. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle führte jedoch die Transgenexpression bei keiner Pflanze zu einem reduzierten Gehalt des korrespondierenden endogenen Transkripts. Stattdessen wurde bei der Mehrzahl der transgenen F₀-Pflanzen und auch bei ihren F₁- und F₂-Nachkommen ein signifikant erhöhter Gehalt des

endogenen Transkripts nachgewiesen. Ursachen für die fehlende Ausprägung eines *antisense*- bzw. Kosuppressionseffekts könnten zum einen die zur Geninaktivierung gewählten kodierenden Sequenzbereiche, zum anderen der verwendete CaMV 35S-Promotor sein. Beim Vergleich der Daten von zahlreichen *antisense*-Experimenten in Pflanzen, die in der Mehrzahl zur Reduktion der endogenen RNA-Gehalte führten, konnte keine allgemeine Übereinstimmung hinsichtlich der für den *antisense*-Effekt optimalen Sequenzregionen (5'-UTR, 3'-UTR, kodierende Bereiche) oder -längen festgestellt werden (BOURQUE, 1995). Für jedes zu inaktivierende Gen muß demnach das optimale *antisense*-Konstrukt auch unter Berücksichtigung von Promotorstärke, Gewebespezifität, Stabilität und Abundanz der *antisense*- und endogenen Transkripte empirisch ermittelt werden (TAKAYAMA und INOUE, 1990). Für zahlreiche *antisense*-Versuche in Pflanzen wurden starke Promotoren, überwiegend der CaMV 35S-Promotor, verwendet, da zumeist nur durch einen Überschuß an *antisense*-Transkripten ein *antisense*-Effekt erzielt werden kann (BOURQUE, 1995). Aufgrund ihrer ubiquitären Expression ist anzunehmen, daß $G\alpha$, $G\beta$ und das WD40-Protein in zahlreiche Prozesse der Pflanzenentwicklung involviert sind. Der generelle Ausfall der entsprechenden Proteinfunktionen infolge der durch den CaMV 35S-Promotor vermittelten ubiquitären Transgenexpression könnte zur Lethalität der betroffenen Pflanzen geführt haben. Pflanzen mit selektierbaren *antisense*- oder Kosuppressionseffekten sollten sich deshalb für diese Gene eher durch den Einsatz gewebespezifischer oder induzierbarer Promotoren erzielen lassen.

Für die von uns in allen *antisense*-Suppressions- und Kosuppressionsansätzen beobachtete Überexpression des endogenen Transkripts (infolge der Expression der *antisense*- oder partiellen *sense*-RNA) sind in der Literatur keine adäquaten Daten vorhanden. Vielleicht könnte die verstärkte Expression des endogenen Transkripts als Überlebensstrategie der transgenen Pflanzen zur Kompensation der lethalen *antisense*- oder Kosuppressionseffekte interpretiert werden. Dabei ist für die transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen diese Überlebensstrategie offenbar nur im juvenilen Entwicklungsstadium essentiell, da im Blattgewebe adulter Pflanzen keine Überexpression des endogenen Transkripts gefunden wurde. Einige Pflanzen wiesen im adulten Entwicklungsstadium eine Reduktion des endogenen WD40-Transkript- und teilweise auch des WD40-Proteingehalts auf. Offenbar können diese Pflanzen jedoch die Ausprägung des *antisense*-Effekts in der späten Entwicklungsphase ohne phänotypische Veränderungen tolerieren. Andererseits könnte die Überexpression der endogenen WD40-, $G\alpha$ - oder $G\beta$ -Transkripte in juvenilen transgenen Pflanzen zum Teil auch eine Streßreaktion, hervorgerufen durch die Anzucht auf kanamycinhaltigem Medium, sein. Es ist bekannt, daß Kanamycin die Pflanzenentwicklung beeinflusst. Durch Überführung der Pflanzen in Erdkultur kommt es zur Normalisierung des Stoffwechsels, so daß in der adulten Entwicklungsphase keine (35S-WD40-as-Pflanzen) bzw. nur noch geringe Überexpression (35S- $G\beta$ -as/cs-Pflanzen) der endogenen Transkripte stattfindet. Der Einfluß der *antisense*-RNA-Expression auf den endogenen Transkriptgehalt ist offenbar vom

Verhältnis von endogener zu *antisense*-Transkriptmenge abhängig und kann sich in verschiedenen Geweben der transgenen Pflanzen unterscheiden. In adulten transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen zeigt die *antisense*-RNA-Expression keine Auswirkungen auf den an sich hohen endogenen WD40-Transkriptgehalt in Wurzeln. In Blättern, die im Vergleich zu Wurzeln deutlich weniger endogenes WD40-Transkript exprimieren, führt dagegen die *antisense*-RNA-Expression bei einigen Pflanzen zur Reduktion des endogenen Transkriptgehalts. Aus vergleichenden RNA- und Proteinanalysen an juvenilen transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen ist weiterhin ersichtlich, daß ein erhöhter endogener WD40-Transkriptgehalt nicht nur zur Akkumulation des WD40-Proteins (TGwd 16/6-Nachkommen), sondern auch zu geringer Reduktion der WD40-Proteinmenge führen (TGwd 7/7-1) bzw. ohne Einfluß auf den nachweisbaren WD40-Proteingehalt bleiben kann (TGwd 7/7-2,4,5). Bei den TGwd 7-7-Nachkommen könnte die Wechselwirkung der zusätzlichen endogenen WD40-Transkripte mit der *antisense*-WD40-RNA die Translation hemmen. Die RNA- und Proteinexpressionsanalysen zu den transgenen 35S-G α -as-F0-Pflanzen lassen die Existenz von zwei G α -Isoformen in *N. tabacum* vermuten. In der Wildtyp-Kontrollpflanze wurden zwei mutmaßliche G α -Polypeptidbanden (48kDa, 54kDa) von geringer Abundanz, in den *antisense*-RNA-exprimierenden transgenen Pflanzen nur das 54kDa-Polypeptid, allerdings in hoher Abundanz nachgewiesen. Möglich wäre, daß der durch die *antisense*-RNA-Expression verursachte Ausfall der 48kDa-G α -Isoform in den transgenen Pflanzen durch erhöhte Expression der 54kDa-G α -Isoform kompensiert wird. Dafür spricht auch der Nachweis zweier mutmaßlicher endogener Transkripte und der deutlich höhere Gehalt des größeren der beiden Transkripte in den transgenen Pflanzen. Die Translation des kleineren Transkripts wird vermutlich durch Wechselwirkung mit der *antisense*-RNA verhindert. Allerdings bleibt ungeklärt, warum im Wildtyp nur das kleinere endogene Transkript, aber beide Polypeptidbanden mit gleicher Abundanz nachgewiesen wurden. Denkbar wäre, daß der Gehalt des größeren endogenen Transkripts im Wildtyp unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Bisher wurde aus *N. tabacum* nur ein cDNA-Typ für eine G α isoliert (Acc.-Nr.: Y08154, SAALBACH; EMBL-Datenbank). Mit Hilfe der transgenen Pflanzenversuche kann nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob die beiden in den *N. tabacum*-Wildtyp-Pflanzen nachgewiesenen Polypeptide zwei G α -Isoformen darstellen. Ebenso ist nicht gesichert, ob das in den transgenen Pflanzen gefundene größere Transkript ein zweites G α -Transkript ist.

Bei der Auswertung der RNA-Expressionsanalysen aller juvenilen transgenen F0-Pflanzen der vier Versuchsansätze konnte kein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Gehalt an *antisense*- bzw. partiellen *sense*-Transkripten und der korrespondierenden endogenen Transkriptmenge festgestellt werden. Diese Heterogenität in der Relation von *antisense*- zu endogenem Transkriptgehalt ist besonders für die F0-Generation der 35S-WD40-as-Pflanzen kennzeichnend. Die Ermittlung der Segregationsverhältnisse ergab bei 6 der 33 transgenen 35S-WD40-as-Pflanzen je 90 Kan-resistente Nachkommen, was einer

Integration von 2 Kopien des Transgens entsprechen würde (Daten nicht gezeigt). Trotz erhöhter Kopienzahl konnte bei diesen Pflanzen kein erhöhter Gehalt an *antisense*-RNA im Vergleich zu Pflanzen mit 1 Transgenkopie nachgewiesen werden. Die Heterogenität in den transgenen F₀-Generationen könnte durch Positionseffekte, Gendosiseffekte, aber auch durch Gewebekultureffekte und individuenabhängige Schwankungen verursacht worden sein. Auch in *antisense*-Experimenten zur Inaktivierung der Chalconsynthase in transgenen *Petunia*-Pflanzen konnten VAN DER KROL et al. (1988) zeigen, daß der Grad des *antisense*-Effekts innerhalb einer transgenen Pflanzenpopulation stark variiert. Es bestand weder eine Korrelation zwischen *antisense*-Kopienzahl und *antisense*-RNA-Gehalt, noch zwischen *antisense*-RNA-Gehalt und Grad der phänotypischen Hemmung (Blütenpigmentierung). Viele Pflanzen mit gleichem *antisense*-RNA-Gehalt wiesen deutliche Unterschiede in der Blütenpigmentierung auf. Dabei wurden extreme Phänotypen auch durch sehr geringe *antisense*-Transkriptmengen hervorgerufen (VAN DER KROL et al., 1988).

Individuenabhängige Schwankungen traten auch bei der Expression des endogenen WD40-Transkripts in den Wildtyp-Kontrollpflanzen für die 35S-WD40-as-F₀-Generation auf. Dadurch wird eine Quantifizierung der durch die Transgenexpression hervorgerufenen Veränderungen der endogenen Transkriptmengen in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Wildtypen erheblich erschwert. Deshalb sind für die Bewertung möglicher Suppressions- oder Überexpressionseffekte sowohl die Analyse einer größeren Anzahl transgener Pflanzen als auch Wildtyp-Kontrollpflanzen erforderlich.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Gene identifiziert und charakterisiert werden, die Induktion bzw. hohe Transkriptionsaktivität in der frühen Embryogeneseentwicklung von *N. plumbaginifolia* aufweisen. Aufgrund der physikalischen Unzugänglichkeit zygotischer Embryonen wurde alternativ ein *in vitro* Kultursystem zur Induktion somatischer Embryonen eingesetzt, um mittels differentieller Screening-Techniken (DDRT-PCR, subtraktive Hybridisierung) hoch abundante cDNA-Sequenzen aus frühen embryogenen Stadien zu isolieren.

Der cDNA-Klon c41-3 kodiert vermutlich ein dem generellen Transkriptionsfaktor BTF3 homologes Protein (NPBTF3L), dessen korrespondierende mRNA ubiquitär, aber mit Präferenz für frühe embryogene Stadien exprimiert wird.

Der cDNA-Klon pNLA35 kodiert vermutlich die größte Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 3 aus *N. tabacum*. In *N. plumbaginifolia* wurde ein homologes Transkript in embryogenen Stadien und Blättern sowie das entsprechende Protein in Embryo- (Kern, Zytoplasma) und Endospermzellen (Speichervakuolen, Zytoplasma) nachgewiesen.

DNA- und Proteinsequenz von cDNA-Klon Np22c28 zeigen keine Homologien zu bekannten Datenbank-Sequenzen. Immunhistologischer Proteinnachweis in Embryo und Endosperm sowie vorrangige mRNA-Akkumulation in frühen embryogenen Stadien deuten auf eine Funktion des Np22c28-Proteins in der Embryogenese bis zur Ausbildung globulärer Stadien hin.

Die cDNA-Klone β 13/2 und β 112/1 kodieren verwandte WD40-Proteine der RACK1-Subfamilie (NPGBLP1/2), die ubiquitär, aber mit Präferenz für embryogene und teilungsaktive Zellen exprimiert werden und vermutlich membranassoziiert vorliegen. Beide Proteine könnten in Zellteilungsprozesse involviert sein.

Die cDNA-Klone 3Sar und 50Sar wurden als verwandte Sar1-homologe kleine GTP-bindende Proteine (NPGTPSAR1,2) identifiziert. Beide Proteine werden ubiquitär exprimiert, sind überwiegend membranassoziiert und in Endospermzellen vorrangig in Speichervakuolen nachzuweisen. Vermutlich sind NPGTPSAR1+2 an Vesikeltransportprozessen nicht nur während der Embryogenese beteiligt.

Die cDNA-Klone α 2/4 bzw. β 16/1 kodieren für eine G-Protein- α - (NPGP α 1) bzw. β -Untereinheit (NPGP β 1). Ubiquitäre Expression, immunzytologischer Nachweis in Embryo- (überwiegend Membranen) und Endospermzellen sowie Hormontests lassen Funktionen von NPGP α 1 und NPGP β 1 in zahlreichen zellulären Prozessen (Auxinsignalkaskaden, Zellteilung, Sekretion) nicht nur in der Embryogenese vermuten. Da deren gewebe- und entwicklungsspezifische mRNA-Expressionsmuster Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufweisen, ist anzunehmen, daß beide Proteine sowohl kooperativ als auch unabhängig agieren.

Keine der isolierten Gensequenzen wird ausschließlich embryogenesespezifisch exprimiert. Alle identifizierten Sequenzen repräsentieren essentielle Proteine, die in Zellteilungs- und Zelldifferenzierungsprozesse involviert sein könnten und in der Embryogenese verstärkt auftreten.

In allen Versuchen mit transgenen *antisense*- und Kosuppressions-Pflanzen wurde statt reduzierter, erhöhte Expression der endogenen Transkripte für $G\alpha$, $G\beta$ oder WD40-Protein festgestellt. Diese Überexpressionseffekte konnten auch in nachfolgenden Pflanzengenerationen nachgewiesen werden, führten jedoch zu keinen phänotypischen Veränderungen.

6 Literaturverzeichnis

- ABDULLAH, R.; COCKING, E.C.; THOMPSON, J.A. (1986) Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technol.* **4**: 1087-1090.
- AHARON, G.S.; GELLI, A.; SNEDDEN, W.A.; BLUMWALD, E. (1998) Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by TG α 1, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue. *FEBS Lett.* **424**: 17-21.
- ALLEN, M.L.; METZ, A.M.; TIMMER, R.T.; RHOADS, R.E.; BROWNING, K.S. (1992) Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form of wheat protein synthesis initiation factor 4F. *J. Biol. Chem.* **267**: 23232-23236.
- ALTING-MEES, M.; HOENER, P.; ARDOUREL, D.; SORGE, J.A.; SHORT, J.M. (1992) New Lambda and phagemid vectors for prokaryotic and eukaryotic expression. *Strategies* **5**: 58-61.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- ARMITAGE, P.; WALDEN, R.; DRAPER, J. (1988) Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. In: *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. DRAPER, J.; SCOTT, R.; ARMITAGE, P.; WALDEN, R. (Eds.), The Alden Press, Oxford.
- BAR-PELED, M.; DA SILVA CONCELCÃO, A.; FRIGERIO, L.; RAIKHEL, N.V. (1995) Expression and regulation of *aERD2*, a gene encoding the KDEL receptor homolog in plants, and other genes encoding proteins involved in ER-Golgi vesicular trafficking. *Plant Cell* **7**: 667-676.
- BAR-PELED, M.; RAIKHEL, N.V. (1997) Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. *Plant Physiol.* **114**: 315-324.
- BAUER, D.; MULLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOF, P.; STRAUSS, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl. Acids Res.* **21**: 4272-4280.
- BERGFELD, R.; SPETH, V.; SCHOPFER, P. (1988) Reorientation of microfibrils and microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles during auxin-mediated growth. *Bot. Acta* **101**: 57-67.
- BLUM, W.; HINSCH, K.D.; SCHULTZ, G.; WEILER, E.W. (1988) Identification of GTP proteins in the plasma membrane of higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **156**: 954-959.
- BOND, U.; SCHLESINGER, M.J. (1987) Heat-shock proteins. *A. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- BORISJUK, N.; SITAILO, L.; ADLER, K.; MALYSHEVA, L.; TEWES, A.; BORISJUK, L.; MANTEUFFEL, R. (1998) Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta* **206**: 504-514.
- BOSSON, M.E.; KENDRICK, R.E.; VREDENBERG, W.J. (1990) The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated Ca^{2+} -dependent swelling of etiolated wheat protoplasts. *Physiol. Plant.* **80**: 55-62.
- BOURQUE, J.E. (1995) Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci.* **105**: 125-149.
- BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132.
- BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- BOWLER, C.; NEUHAUS, G.; YAMAGATA, H.; CHUA, N.-H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediated phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81.
- BRADFORD, M.M. (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-252.
- BROWN-LUEDDI, M.L.; MEYER, L.J.; MILBURN, S.C.; YAU, P.M.; CORBETT, S.; HERSHEY, J.W.B. (1982) Protein synthesis initiation factors from HeLa cells and rabbit reticulocytes are similar: comparison of protein structure, activities and immunochemical properties. *Biochemistry* **21**: 4202-4207.

- BUBIS, J.; KHORANA, H.C. (1990) Sites of interaction in the complex between β - and γ -subunits of transducin. *J. Biol. Chem.* **265**: 12995-12999.
- CASEY, P.J. (1994) Lipid modifications of G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 219-225.
- CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA PLACA, M. (1991) Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed Balb/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. *J. Immunol. Methods* **140**: 111-118.
- CHAUDHURY, A.M.; LETHAM, S.; CRAIG, S.; DENNIS, E.S. (1993) Amp1-a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *The Plant J.* **4**: 907-916.
- CHECKLEY, J.W.; COOLEY, L.; RAVEL, J.M. (1981) Characterization of initiation factor eIF-3 of wheat germ. *J. Biol. Chem.* **256**: 1582-1586.
- CHEN, E.J.; SEEBURG, P.S. (1985) Supercoiling sequencing: A simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170.
- CHURCH, G.M.; GILBERT, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.
- CIAPA, B.; WHITAKER, M. (1986) Two phases of inositol polyphosphate and diacylglycerol production at fertilisation. *FEBS Lett.* **195**: 347.
- CLAPHAM, D.E.; NEER, E.J. (1993) New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signaling. *Nature* **365**: 403-406.
- CLARY, D.O.; GRIFF, I.C.; ROTHMAN, J.E. (1990) SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**: 709-721.
- CODINA, J.; STENGEL, D.; WOO, S.L.; BIRNBAUMER, L. (1986) Beta-subunits of the human liver Gs/Gi signal-transducing proteins and those of bovine retinal rod cell transducin are identical. *FEBS Lett.* **207**: 187-192.
- COEN, E.S.; MEYEROWITZ, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-37.
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110.
- CYR, R.J.; BUSTOS, M.M.; GUILTINAN, M.J.; FOSKET, D.E. (1987) Developmental modulation of tubulin protein and mRNA levels during somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Planta* **171**: 365-376.
- DAVIES C. (1994) Cloning and characterization of a tomato GTPase-like gene related to yeast and *Arabidopsis* genes involved in vesicular transport. *Plant Mol. Biol.* **24**: 525-531.
- DAVIGNON, I.; BARNARD, M.; GAVRILOVA, O.; SWEET, K.; WILKIE, T.M. (1996) Gene structure of murine *Gna11* and *Gna15*: Tandemly duplicated Gq class G protein α subunit genes. *Genomics* **31**: 359-366.
- DEBLAERE, J.; BYTEBIER, B.; DE GREVE, H.; DEBOECK, F.; SCHELL, J.; VAN MONTAGO, M.; LEEMANS, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* **13**: 4777-4788.
- DE JONG, A.J.; CORDEWENER, J.; LOSCHIAVO, F.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; VAN KAMMERN, A.; DE VRIES, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4**: 425-433.
- DE JONG, A.J.; HEIDSTRA, R.; SPAINK, H.P.; HARTOG, M.V.; MEIJER, E.A.; HENDRIKS, T.; LOSCHIAVO, F.; TERZI, M.; BISSELING, T.; VAN KAMMERN, A.; DE VRIES, S.C. (1993) Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* **5**: 615-620.
- DE JONG, A.J.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. (1993) Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **22**: 367-377.

- D'ENFERT, C.; GENESSE, M.; GAILLARDIN, C. (1992) Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *EMBO J.* **11**: 4205-4211.
- D'ENFERT, C.; WUESTEHUBE, L.J.; LILA, T.; SCHEKMAN, R. (1991) Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J. Cell Biol.* **114**: 663-670.
- DENG, J.M.; BEHRINGER, R.R. (1995) An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res.* **4**: 264-269.
- DENHARDT, D.T. (1966) A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.
- DIJAK, M.; SMITH, D.L.; WILSON, T.J.; BROWN, D.C.W. (1986) Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Rep.* **5**: 468-470.
- DIJAK, M.; SIMMONDS, D.H. (1988) Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L.. *Plant Sci.* **58**: 183-191.
- DISATNIK, M.H.; HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S.M.; JONES, G.; CARPENTER, G.; MOCHLY-ROSEN, D. (1994) Phospholipase C-gamma binding to intracellular receptors for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 559-563.
- DONALDSON, J.G.; CASSEL, D.; KAHN, R.A.; KLAUSNER, R.D. (1992) ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding coatamer protein β -cop to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6408-6412.
- DROBAK, B.K.; FERGUSON, I.B. (1985) Release of Ca^{2+} from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **130**: 1241-1246.
- DROBAK, B.K.; WATKINS, P.A.C.; BUNNEY, T.D.; DOVE, S.K.; SHAW, P.J.; WHITE, I.R.; MILLNER, P.A. (1995) Association of multiple GTP-binding proteins with the plant cytoskeleton and nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **210**: 7-13.
- DUDITS, D.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analyses of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell. Sci.* **99**: 475-484.
- DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKO, L. (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. In THORPE, T.A. (Ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 267-308.
- DURE III, L.; CROUCH, M.; HARADA, J.; HO, T.-H.D.; MUNDY, J.; QUATRANO, R.S.; THOMAS, T.; SUNG, Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **12**: 475-486.
- ELLIS, R.J. (1990) Molecular chaperones: the plant connection. *Science* **250**: 954-959.
- EPEL, D. (1990) The initiation of development at fertilization. *Cell Differ. Dev.* **29**: 1-12.
- ETTLINGER, C.; LEHLE, L. (1988) Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* **331**: 176-178.
- FEILER, H.S.; JACOBS, T.W. (1990) Cell division in higher plants: a *cdc2* gene its 34-kDa-product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5397-5401.
- FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- FONG, H.W.; HURLEY, J.B.; HOPKINS, R.S.; MIAKE-LYE, R.; JOHNSON, M.S.; DOOLITTLE, R.F.; SIMON, M.I. (1986) Repetitive segmental structure of the transducin β subunit: Homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2162-2166.
- FUJIMURA, T.; KOMAMIME, A. (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* **64**: 162-164.
- GALLIE, D.R.; LE, H.; CALDWELL, C.; TANGUAY, R.L.; HOANG, N.X.; BROWNING, K.S. (1997) The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *J. Biol. Chem.* **272**: 1046-1053.

- GIBSON, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr viros genome. Ph.D. thesis: Cambridge University, England.
- GILMAN, A.G (1987) G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649.
- GIROUX, R.W.; PAULS, K.P. (1997) Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **33**: 393-404.
- GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* **56**: 149-160.
- GOTOR, C.; LAM, E.; CEJUDO, F.J.; ROMERO, L.C. (1996) Isolation and analysis of the soybean *SGA2* gene (cDNA), encoding a new member of the plant G-protein family of signal transducers. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1227-1234.
- GOTTESMANN, S.; HALPERN, E.; TRISLER, P. (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **148**: 265-273.
- GREEN, P.J.; PINES, O.; INOUE, M. (1986) The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 567-579.
- GUILLEMOT, F.; BILLAUT, A.; AUFRAY, C. (1989) Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4594-4598.
- GYÖRGYÉY, J.; GARTNER, A.; NEMETH, K.; MAGYAR, Z.; HIRT, H.; HEBERLE-BORS, E.; DUDITS, D. (1991) Alfalfa heat-shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**: 999-1007.
- HADWIGER, J.A.; FIRTEL, R.A. (1992) Analysis of G α 4, a G-protein subunit required for multicellular development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **6**: 38-49.
- HAMM, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**: 669-672.
- HANKE, D.E.; BIFFEN, M.; DAVIES, H. (1990) Phosphoinositides and plant growth substance action. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **44**: 193-205.
- HARA, E.; KATO, T.; NAKADA, S.; SEKIYA, S.; ODA, K. (1991) Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)₃₀-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucl. Acids Res.* **19**: 7097-7104.
- HARDKE, C.S.; BERLETH, T. (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**: 1405-1411.
- HATA, S.; KOUCHI, H.; SUSUKA, I.; ISHII, T. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* **10**: 2681-2688.
- HERNANDEZ, G.; DIEZ DEL CORRAL, R.; SANTOYO, J.; CAMPUZANO, S.; SIERRA, J.M. (1997) Localization, structure and expression of the gene for translation initiation factor *eIF-4E* from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 624-633.
- HIDALGO, J.; MUNIZ, M.; VELASCO, A. (1995) Trimeric G proteins regulate the cytosol-induced redistribution of Golgi enzymes into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **108**: 1805-1815.
- HINNEBUSCH, A.G. (1984) Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6442-6446.
- HIRAYAMA, T.; IMAJUKU, Y.; ANAI, T.; MATSUI, M.; OKA, A. (1991) Identification of two cell cycle-controlling *cdc2* gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **105**: 159-165.
- HIRT, H.; PAY, A.; GYÖRGYÉY, J.; BAKO, L.; NEMETH, K.; BÖGRE, L.; SCHWEYEN, R.H.; HEBERLE-BORS, E.; DUDITS, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34^{cdc2}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1636-1640.
- HOCHULI, E. (1990) Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbant. In: Genetic engineering, principles and methods. SETLOW, J.K. (Ed.), Plenum Press, New York, pp 87-98.

- HONNOR, R.C.; NAGHSHINEH, S.; CUSHMAN, S.W.; WOLFF, J.; SIMPSON, I.A.; LONDOS, C. (1992) Cholera and pertussis toxins modify regulation of glucose transport activity in rat adipose cell: Evidence for mediation of a cAMP-independent process by G-proteins. *Cell Signal*. **4**: 87-98.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231.
- HU, G.Z.; RONNE, H. (1994) Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **22**: 2740-2743.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23.
- ISHIDA, S.; TAKAHASHI, Y.; NAGATA, T. (1993) Isolation of a cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11152-11156.
- ISHIDA, S.; TAKAHASHI, Y.; NAGATA, T. (1996) The mode of expression and promoter analysis of the *arcA* gene, an auxin-regulated gene in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **37**: 439-448.
- ISHIKAWA, A.; TSUBOUCHI, H.; IWASAKI, Y.; ASAH, T. (1995) Molecular cloning and characterization of a cDNA for the alpha subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol.* **36**: 353-359.
- ISHIKAWA, A.; IWASAKI, Y.; ASAH, T. (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA for the β subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol.* **37**: 223-228.
- ITOH, H.; TOYAMA, R.; KOZASA, T.; TSUKAMOTO, T.; MATSUOKA, M.; KAZIRO, Y. (1988) Presence of three distinct molecular species of Gi protein alpha subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs. *J. Biol. Chem.* **263**: 6656-6664.
- IWASAKI, Y.; KOMANO, M.; ISHIKAWA, A.; SASAKI, T.; ASAH, T. (1995) Molecular cloning and characterization of a cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD40 repeat). *Plant Cell Physiol.* **36**: 505-510.
- JANKNECHT, R.; DE MARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R.A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H.G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8972-8976.
- JANSEN, M.A.K.; BOOIJ, H.; SCHEL, J.H.N.; DE VRIES, S.C. (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **9**: 221-223.
- JERPSETH, B.; GREENER, A.; SHORT, J.M.; VIOLA, J.; KRETZ, P.L. (1992) XL1-blue MRF' *E. coli* cells: McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR- derivative of XL1-blue cells. *Stratagies* **5**: 81-82.
- JOHNSON, K.R.; MERRICK, W.C.; ZOLL, W.L.; ZHU, Y. (1997) Identification of cDNA clones for the large subunit of eukaryotic translation initiation factor 3. *J. Biol. Chem.* **272**: 7106-7113.
- JONES, H.D.; SMITH, S.J.; DESIKAN, R.; PLAKIDOU-DYMOCK, S.; LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. (1998) Heterotrimeric G proteins are implicated in Gibberellin induction of α -amylase gene expression in wild oat aleurone. *The Plant Cell* **10**: 245-253.
- JORGENSEN, R.A. (1995) Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* **268**: 686-691.
- KAHN, R.A.; GODDARD, C.; NEWKIRK, M. (1988) Chemical and immunological characterization of the 21kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **263**: 8282-8287.
- KAWAHARA, R.; SUNABORI, S.; FUKUDA, H.; KOMAMIME, A. (1992) A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation factor 1 α in carrot. *Eur. J. Biochem.* **209**: 157-162.
- KIM, W.Y.; CHEONG, N.E.; LEE, D.; JE, D.Y.; BAHK, J.D.; CHO, M.J.; LEE, S.Y. (1995) Cloning and sequencing analysis of a full-length cDNA encoding a G protein alpha subunit, SGA1, from soybean. *Plant Physiol.* **108**: 1315-1316.
- KIM, W.Y.; CHEONG, N.E.; JE, D.Y.; KIM, M.G.; LIM, C.O.; BAHK, J.D.; CHO, M.J.; LEE, S.Y. (1997) The presence of a *Sar1* gene family in *Brassica campestris* that suppresses a yeast vesicular transport mutation *Sec12-1*. *Plant Mol. Biol.* **33**: 1025-1035.

- KIM, S.K.; WOLD, B.J. (1985) Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA. *Cell* **42**: 129-138.
- KLEIJN, M.; SCHEPER, G.C.; VOORMA, H.O.; THOMAS, A.A. (1998) Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem.* **253**: 531-544.
- KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. (1992) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28P**: 11-14.
- KOZAK, M. (1987) An analysis of the 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- KREUGER, M.; VAN HOLST, G.J. (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* **189**: 243-248.
- KUGE, O.; DASCHER, C.; ORCI, L.; ROWE, T.; AMHERDT, M.; PLUNTER, H.; AVAZZOLA, M.; TANIGAWA, J.E.; BALCH, W.E. (1994) Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J. Cell Biol.* **125**: 51-65.
- LAMBRIGHT, D.G.; NOEL, J.P.; HAMM, H.E.; SIGLER, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**: 621-628.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LEBERER, E.; DIGNARD, D.; HOUGAN, L.; THOMAS, D.Y.; WHITEWAY, M. (1992) Dominant-negative mutants of a yeast G-protein β subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *EMBO J.* **11**: 4804-4813.
- LEGENDRE, L.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst. *J. Biol. Chem.* **267**: 20140-20147.
- LEHLE, L. (1990) Phosphatidyl inositol metabolism and its role in signal transduction in growing plants. *Plant Mol. Biol.* **15**: 647-658.
- LI, W.; ASSMAN, S. (1993) Characterization of a G-protein-regulated outward K⁺ current in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 262-266.
- LI, Z.; THOMAS, T.L. (1998) *PEI1*, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 383-398.
- LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* **21**: 3269-3275.
- LINDSEY, K.; TOPPING, J.F. (1993) Embryogenesis: a question of pattern. *J. Exp. Bot.* **44**: 359-374.
- LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.H. (1993a) Proembryo culture: *in vitro* development of early globular-stage zygotic embryos from *Brassica juncea*. *The Plant J.* **3**: 291-300.
- LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.H. (1993b) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* **5**: 621-630.
- LLOYD, C.W. (1991) How does the cytoskeleton read the laws of geometry in aligning the division plane of plant cells. *Development* **91**: 55-65.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20.
- LONG, J.A.; MOAN, E.I.; MEDFORD, J.J.; BARTON, M.K. (1996) A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**: 66-69.
- LOTAN, T.; OHTO, M.-A.; YEE, K.M.; WEST, M.A.L.; LO, R.; KWONG, R.W.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R.L.; GOLDBERG, R.B.; HARADA, J.J. (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205.

- LU, P.; PORAT, R.; NADEAU, J.A.; O'NEILL, S.D. (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**: 2155-2168.
- LUPAS, A.N.; LUPAS, J.M.; STOCK, J.B. (1992) Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil. *FEBS Lett.* **314**: 105-108.
- LÜTCKE, H.A.; CHOW, K.C.; MICKEL, F.S.; MOSS, K.A.; KERN, H.F.; SCHEELE, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**: 43-48.
- MA, H.; YANOFSKY, M.F.; MEYEROWITZ, E.M. (1990) Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3821-3825.
- MA, H.; YANOFSKY, M.F.; HUANG, H. (1991) Isolation and sequence analysis of *TGA1* cDNAs encoding a tomato G protein α subunit. *Gene* **107**: 189-195.
- MA, H. (1994) GTP-binding proteins in plants: new members of an old family. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1611-1636.
- MA, H.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. (1994) Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max L.*) somatic embryo development. *Plant Mol. Biol.* **24**: 465-473.
- MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. (1985) Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Ann. Bot.* **56**: 619-630.
- MANTEUFFEL, R.; PRZYBYLSKA, J. (1987) Comparative study of seed proteins in the genus *Pisum*. XI Immunological relationships of the S2 albumin fractions. *Genet. Polon.* **28**: 81-88.
- MANTEUFFEL, R.; PANITZ, R. (1993) *In situ* localization of faba bean and oat legumin-type proteins in transgenic tobacco seeds by a highly sensitive immunological tissue print technique. *Plant Mol. Biol.* **22**: 1129-1134.
- MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? *Plant Physiol.* **107**: 679-685.
- MAYER, U.; TORRES RUIZ, R.A.; BERLETH, T.; MISERA, S.; JÜRGENS, G. (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* **353**: 402-407.
- MCKHANN, H.I.; FRUGIER, F.; PETROVICS, G.; COBA DE LA PENA, T.; JURKEVITCH, E.; BROWN, S.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A.; CRESPI, M. (1997) Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division. *Plant Mol. Biol.* **34**: 771-780.
- MEINKE, D.W. (1995) Molecular genetics of plant embryogenesis. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **46**: 369-394.
- MENCZEL, L.; NAGY, F.; KISS, Zs.R.; MALIGA, P. (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* **59**: 191-195.
- MERRICK, W.C.; HERSHEY, J.W.B. (1996) The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In HERSHEY, J.W.B.; MATHEWS, M.B.; SONENBERG, N. (Eds.) *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 31-69.
- METZ, A.M.; TIMMER, R.T.; BROWNING, K.S. (1992) Isolation and sequence of a cDNA encoding the cap binding protein of wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4F. *Nucl. Acids Res.* **20**: 4096.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1215.
- MOCHLY-ROSEN, D.; SMITH, B.L.; CHEN, C.H.; DISATNIK, M.-H.; ROLI, D. (1995) Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 596-600.
- MORENO, S.; NURSE, P. (1990) Substrates for p34^{cdc2} *in vivo* veritas?. *Cell* **61**: 549-551.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

- NAGY, J.J.; MALLIGA, P. (1976) Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. Z. Pflanzenphysiol. **78**: 453-455.
- NAKANO, A.; MURAMATSU, M. (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. J. Cell Biol. **109**: 2677-2691.
- NARANDA, T.; MACMILLEN, S.E.; HERSHEY, J.W.B. (1994) Purified yeast translational initiation factor eIF-3 is an RNA-binding protein complex that contains the PRT1 protein. J. Biol. Chem. **269**: 32286-32292.
- NEER, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell **80**: 249-257.
- NEER, E.J.; SCHMIDT, C.J.; NAMBUDRIPAD, R.; SMITH, T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature **371**: 297-300.
- NISHIKAWA, S.; NAKANO, A. (1991) The GTP-binding protein Sar1 is localized to the early compartment of the yeast secretory pathway. Biochem. Biophys. Acta **1093**: 135-143.
- NOEL, J.P.; HAMM, H.E.; SIGLER, P.B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP- γ S. Nature **366**: 654-662.
- NOMURA, K.; KOMAMIME, A. (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in carrot suspension cultures. Plant Physiol. **79**: 988-991.
- OBARA, T.; NAKAFUKU, M.; YAMAMOTO, M.; KAZIRO, Y. (1991) Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein α subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: Involvement in mating and sporulation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 5877-5881.
- OKA, T.; NISHIKAWA, S.; NAKANO, A. (1991) Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. J. Cell Biol. **114**: 671-679.
- PALME, K. (1992) Molecular analysis of plant signaling elements: the relevance of eukaryotic signal transduction models. Int. Rev. Cytol. **132**: 223-283.
- PANITZ, R.; MANTEUFFEL, R.; BÄUMLEIN, H.; WOBUS, U. (1997) Biphasic expression of a *Vicia faba* legumin B gene in developing seeds of transgenic tobacco. J. Plant Physiol. **150**: 115-126.
- PARTHUN, M.R.; MANGUS, D.A.; JAEHNIG, J.A. (1992) The *EGD1* product, a yeast homolog of human *BTF3*, may be involved in GAL4 DNA binding. Mol. Cell. Biol. **12**: 5683-5689.
- PLAKIDOU-DYMOCK, S.; DYMOCK, D.; HOOLEY, R. (1998) A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. Curr. Biol. **8**: 315-324.
- POOVAIAH, B.W.; REDDY, A.S.N.; MCFADDEN, J.J. (1987) Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol biphospholipids. Plant Physiol. **69**: 569-573.
- POULSEN, C.; MAI, X.M.; BORG, S. (1994) A *Lotus japonicus* cDNA encoding an alpha subunit of a heterotrimeric G-protein. Plant Physiol. **105**: 1453-1454.
- POUYSESEGUR, J.; SEUWEN, K. (1992) Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. Ann. Rev. Physiol. **54**: 195-210.
- PROVOST, N.M.; SOMERS, D.E.; HURLEY, J.B. (1988) A *Drosophila melanogaster* G protein α subunit gene is expressed primarily in embryos and pupae. J. Biol. Chem. **263**: 12070-12076.
- PUTNAM-EVANS, C.; HARMON, A.C.; CORMIER, M.J. (1990) Purification and characterization of a novel calcium-binding protein kinase from soybean. Biochemistry **29**: 2488-2495.
- RAO, K.S. (1996) Embryogenesis in flowering plants: Recent approaches and prospects. J. Biosci. **21**: 827-841.
- REINBOTHE, C.; TEWES, A.; REINBOTHE, S. (1992) Altered gene expression during somatic embryogenesis in *Nicotiana plumbagenifolia* and *Digitalis lanata*. Plant Science **82**: 47-58.
- REINER, O.; CARROZZO, R.; SHEM, Y.; WHNERT, M.; FAUSTINALLA, F.; DOBYNS, W.B.; CASKEY, C.T.; LEDBETTER, D.H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. Nature **364**: 717-721.

- RON, D.; CHEN, C.H.; CALDWELL, J.; JAMIESON, L.; ORR, E.; MOCHLY-ROSEN, D. (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the β subunit of G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 839-843.
- SAITO, K.; KANEKO, H.; YAMAZAKI, M.; YOSHIDA, M.; MURAKOSHI, I. (1990) Stable transfer and expression of chimeric genes in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using a Ri plasmid binary vector. Plant Cell Rep. **8**: 718-721.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor., New York.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- SCHAEFER, J. (1985) Regeneration in alfalfa tissue culture. Plant Physiol. **79**: 584-589.
- SCHLOSS, J.A. (1990) A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein β subunit-like polypeptide. Mol. Gen. Genet. **221**: 443-452.
- SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; AUKERMAN, M.J.; BURR, B. (1990) The maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a leucine zipper motif that binds to zein DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 46-50.
- SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. (1997) A leucin-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development **124**: 2049-2062.
- SEGEV, N.; MULHOLLAND, J.; BOTSTEIN, D. (1988) The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. Cell **52**: 915-924.
- SENGER, S. (1995) PCR-Klonierung und Charakterisierung in der Embryogenese aktiver Gene zur Untersuchung ihrer Expressionsmuster während der Protoplastendifferenzierung zu somatischen Embryonen. Diplomarbeit, Halle.
- SEO, H.; KIM, H.; JEONG, J.; LEE, S.; CHO, M.; BAHK, J. (1995) Molecular cloning and characterization of RGA1 encoding a G protein alpha subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36). Plant Mol. Biol. **27**: 1119-1131.
- SHELLHAMMER, J.; MEINKE, D. (1990) Arrested embryos from the *bio1* auxotroph of *Arabidopsis thaliana* contain reduced levels of biotin. Plant Phys. **93**: 1162-1167.
- SHEN, K.A.; HAMMOND, C.M.; MOORE, H.H. (1993) Molecular analysis of Sar1 related cDNAs from a mouse pituitary cell line. FEBS Lett. **335**: 380-385.
- SHEVELL, D.E.; LEU, W.-M.; GILLMOR, C.S.; XIA, G.; FELDMANN, K.A.; CHUA, N.-H. (1994) *EMB30* is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to *Sec7*. Cell **77**: 1051-1062.
- SHOEMAKER, R.C.; CHRISTOFFERSON, S.E.; GALBRAITH, D.W. (1987) Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. **6**: 12-15.
- SIMON, M.I.; STRATHMANN, M.P.; GAUTAM, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. Science **252**: 802-808.
- SMITH, D.E.; FISCHER, P.A. (1984) Identification, developmental regulation and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. J. Cell Biol. **99**: 20-28.
- SMITH, D.L.; KRIKORIAN, A.D. (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone free medium: evaluation of the effect of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Rep. **9**: 468-470.
- SMITH, M.W.; ITO, M.; YAMADA, T.; SUZUKI, T.; KOMAMIME, A. (1993) Isolation and characterization of a cDNA clone for plant nuclear antigen 21D7 associated with cell division. Plant Physiol. **101**: 809-817.
- SNUSTED, D.P.; HUNSPERGER, J.P.; CHERESKIN, B.M.; MESSING, J. (1988) Maize glutamine synthetase cDNAs: isolation by direct genetic selection in *Escherichia coli*. Genetics **120**: 1111-1124.

- SOKOLOV, B.P.; PROCKOP, D.J. (1994) A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4009-4015.
- SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; SMITH, J. (1958) Growth and organized development of cultured cells. Growth and division of suspended cells. *Am. J. Bot.* **45**: 693-703.
- STRATHMANN, M.; SIMON, M.I. (1990) G protein diversity: a distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9113-9117.
- STRATHMANN, M.; WILKIE, T.M.; SIMON, M.I. (1989) Diversity of the G-protein family: Sequences from five additional α subunits in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7407-7409.
- TAKAYAMA, K.M.; INOUE, M. (1990) Antisense RNA. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 155-184.
- TEWES, A.; MANTEUFFEL, R.; ADLER, K.; WEBER, E.; WOBUS, U. (1991) Long-term cultures of barley synthesize and correctly deposit seed storage proteins. *Plant Cell Rep.* **10**: 467-470.
- THAMBI, N.C.; QUAN, F.; WOLFGANG, W.J.; SPIEGEL, A.; FORTE, M. (1989) Immunological and molecular characterization of G0 alpha-like proteins in the *Drosophila* central nervous system. *J. Biol. Chem.* **264**: 18552-18560.
- THOMAS, T.L. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *The Plant Cell* **5**: 1401-1410.
- TÖPFER, R.; MAAS, C.; HÖRIGKE-GRANDPIERRE, C.; SCHELL, J.; STEINBISS, H.H. (1993) Expression vectors for high-level expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Methods in Enzymol.* **217**: 66-78.
- VAN DER KROL, A.R.; LENTING, P.E.; VEENSTRA, J.; VAN DER MEER, I.M.; KOES, R.E.; GERATS, A.G.M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. (1988) An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-869.
- VAN DER VOORN, L.; PLOEGH, H.L. (1992) The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* **307**: 131-134.
- VASIL, V.; REDWAY, F.; VASIL, I.K. (1990) Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bio/Technol.* **8**: 429-434.
- VERMA, D.P.S.; CHEON, C.-I.; HONG, Z. (1994) Small GTP-binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol.* **106**: 1-6.
- VERDE, F.; LABBE, J.C.; DOREE, M.; KARSENTI, E. (1990) Regulation of microtubule dynamic by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* **343**: 233-238.
- VOLLBRECHT, E.; VELT, B.; SINHA, N.; HAKES, S. (1991) The developmental gene *Knottet-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**: 241-243.
- WAKIYAMA, M.; SAIGOH, M.; SHIOKAWA, K.; MIURA, K.-I. (1995) mRNA encoding the translation initiation factor eIF-4E is expressed early in *Xenopus* embryogenesis. *FEBS Lett.* **360**: 191-193.
- WARPEHA, K.M.F.; HAMM, H.E.; RASENICK, M.M.; KAUFMAN, L.S. (1991) A blue-light-activated GTP-binding protein in the plasma membranes of etiolated peas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8925-8929.
- WATKINS, D.C.; JOHNSON, G.L.; MALBON, C.C. (1992) Regulation of the differentiation of teratocarcinoma cells into primitive endoderm by $G\alpha_{i2}$. *Science* **258**: 1373-1375.
- WEISS, C.A.; HUANG, H.; MA, H. (1993) Immunolocalization of the G protein α subunit encoded by the *GPA1* gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**: 1513-1528.
- WEISS, C.A.; GARNAAT, C.W.; MUKAI, K.; HU, Y.; MA, H. (1994) Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9554-9558.
- WEISS, C.A.; WHITE, E.; HUANG, H.; MA, H. (1997) The G protein α subunit (GP α 1) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of *Arabidopsis* and cauliflower. *FEBS Lett.* **407**: 361-367.

- WERNER, M.; FELLER, A.; PIERARD, A. (1985) Nucleotide sequence of yeast gene *CPA1* encoding the small subunit of arginine-pathway carbamoylphosphate synthetase: homology of the deduced amino acid sequence to other glutamine aminotransferases. *Eur. J. Biochem.* **146**: 371-381.
- WHITEWAY, M.; HOUGAN, L.; DIGNARD, D.; THOMAS, D.Y.; BELL, L.; SAARI, G.C.; GRANT, F.J.; O'HARA, P.; MACKAY, V.L. (1989) The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**: 467-477.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinate behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* **57**: 443-462.
- WILSON, D.; LEWIS, M.J.; PELHAM, H.R. (1993) pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**: 7465-7468.
- YARFITZ, S.; PROVOST, N.M.; HURLEY, J.B. (1988) Cloning of a *Drosophila melanogaster* guanine nucleotide regulatory protein beta-subunit gene and characterization of its expression during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7134-7138.
- YOSHIDA, K.T.; NAITO, S.; TAKEDA, G. (1994) cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD Primers. *Plant Cell Physiol.* **35**: 1003-1009.
- ZAINA, S.; REGGIANI, R.; BERTANI, A. (1990) Preliminary evidence for involvement of GTP-binding protein(s) in auxin signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile. *J. Plant Physiol.* **136**: 653-658.
- ZAMENHOF, P.J.; VILLAREJO, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of β -galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**: 171-178.
- ZERIAL, M.; STENMARK, H. (1993) Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Biol.* **5**: 613-620.
- ZHENG, X.M.; BLACK, D.; CHAMBON, P.; EGLY, J.M. (1990) Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* **344**: 556-559.
- ZIMMERMANN, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* **5**: 1411-1423.

7 Anhang

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons c41-3 (Acc.-Nr.: Y09106)

	1	<i>CTGCTGCCCTAGGGTTTTAGTTCTCTATTCTTCACAAAG</i>	38
39	ATGAATGTAGAAAAGCTACGCAAAATGGCCGGTTCGGTAAGGACTGGTGGTAAGGGAACC		98
	M N V E K L R K M A G S V R T G G K G T		
99	ATGCGAAGAAAGAAGAAGGCAGTTCACAAGACAACACTACAACAGATGACAAGAGACTTCAA		158
	M R R K K K A V H K T T T T D D K R L Q		
159	AGCACCCCTCAAAAAGAATAGGGGTGAATGCTATTCCCTGCTATTGAAGAGGTTAACATTTTT		218
	S T L K R I G V N A I P A I E E V N I F		
219	AAGGAGGATGTAGTTATCCAATTCATTAACCCCAAAGTTCAAGCCTCTATTGCTGCAAAC		278
	K E D V V I Q F I N P K V Q A S I A A N		
279	ACTTGGGTTGTTAGTGGTTCCCCTCAGACCAAGAAGTTGCAGGGATATTCTTCTCAAAT		338
	T W V V S G S P Q T K K L Q G Y S S S N		
339	TATTCACCAGTTGGGCCCGATAATTTGGAGAGTTTGAGAGAAGCTAGCAGAGCAGTTCCA		398
	Y S P V G P D N L E S L R E A S R A V P		
		---Kat41-3--->	
399	GAAAGCAGGGCACCTAGTGCTAACGGGGCGCCTGAAGGTGCTCCTGCACTGCAGGAGGAT		458
	E S R A P S A N G A P E G A P A L Q E D		
459	<u>GATGATGATGAGGTGCCGGAACCTCGTGGCTGGTCAAACCTTTGAAGCAGGCCGCTCAGAG</u>		518
	D D D E V P E L V A G Q T F E A G R S E		
519	<u>GAGCGTCACACTTCCTAAAATTTTAATTGAATTTTGTATCAACCCCTCCTCCGTCTCGAC</u>		578
	E R H T S -		
579	<u>GTTTTGAGATCCGTTTTAATTTAGTTGAGTGTCTATTTGATTTTGATTGTGACAACATAAA</u>		638
		<---Kat41-3---	
639	<u>AAATTCATCAAAATGGTTTTTGTAGT</u>	664	

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons Np22c28 (Acc.-Nr.: Y09105)

1	CCAGTTGTGATTCTGCAGTAGAGTACGATCTTGGGAGTGGAAGCTATGACGTTACTTGC	60
	P G C D S A V E Y D L G S G S Y D V T C	
61	TGTTGTTTCCTTCAGTTTTTGTGGAATTGTACAGAAGAGGCTCATCCGCCCGTGGACTGT	120
	C C S F S F C W N C T E E A H P P V D C	
121	GATACCGTGGCCAAATGGATTTTAAAAACAGTGCCGAGTCAGAAAACATGAATTGGATC	180
	D T V A K W I L K N S A E S E N M N W I	
181	TTGGCTAATTCCAAGCCCTGTCCGAAGTGCAAGCGGCCAATTGAGAAGAACCAAGGGTGT	240
	L A N S K P C P K C K R P I E K N Q G C	
241	ATGCACATGACTTGTACGCCACCATGTAAATTTGAGTTTTGCTGGTTATGTCTTGGTGGC	300
	M H M T C T P P C K F E F C W L C L G A	
301	TGGTCAGACCATGGTAAAAGGACTGGTGGATTTTATGCATGTAATCGCTATGAATCAGCA	360
	W S D H G E R T G G F Y A C N R Y E S A	
361	AAACAAGAGGGTGTGTATGATGAAGCCGAGAGAAGGAGAGAGATGGCCAAAACTCTCTG	420
	K Q E G V Y D E A E R R R E M A K N S L	
421	GAGAGATACACGCATTACTACGAACGCTGGGCAACCAACCAATCGTCGAGGCAAAAAGCA	480
	E R Y T H Y Y E R W A T N Q S S R Q K A	
481	ATGGCAGATCTGCATCAAATGCAAAGCTTTCATCTTAAAAAGCTTAGTGAAATACAGTGC	540
	M A D L H Q M Q T V H L E K L S E I Q C	
541	CAACCCGAGTCACAGTTGAAGTTCATTTTAGAATCCTGGCAACAGATAGTTGAATGTAGG	600
	Q P E S Q L K F I L E S W Q Q I V E C R	
	---NL28--->	
601	AGAGTGTTAAAAATGGACTTATGCATATGGATACTACCTACCCGAACATGAGCATGCAAAA	660
	R V L K W T Y A Y G Y Y L P E H E H A K	
661	AGGCAGTTTTTTGAGTACTTACAAGGTGAGGCAGAAGCTGGTTTAGAGAGGCTTCATCAA	720
	R Q F F E Y L Q G E A E A G L E R L H Q	
721	TGTGCTGAAAAGGAACTCCAACTTACCTTAATGCTACAGGACCGTCCAAGGATTTCAAT	780
	C A E K E L Q T Y L N A T G P S K D F N	
781	GATTTTCGTACGAAGCTCGCTGGTCTAACAAGTGTACCCGAAATTACTTTGAGAATCTG	840
	D F R T K L A G L T S V T R N Y F E N L	
841	GTTAGAGCACTGGAGAAATGGTCTTGCAGATGTGGATTCCCAAGGTGCTTGTAGTAAGGCA	900
	V R A L E N G L A D V D S Q G A C S K A	
901	CCCAGCTCAAAGAACGTAGCTGGGAGCAGCAAGGCCAAAGGAGGTGGTAGGGTAAGAGC	960
	P S S K N V A G S S K A K G G G R G K S	
961	TCCACTCGGACATGAGACTCAAGCGAATACTTGGATGACTATATACTGGGATTTTGTGGG	1020
	S T R T -	
1021	ATAATATGATGTTTCAGATGGGTATGTTAAAGATGGACTCACAAAGAGGCAAACGAGGGGTT	1080
1081	GATGATTCTCTAATTGAAGCCAATTGTACAGAGAACAGCATAGAGGTAAAAAGAGATCCCC	1140
1141	TGAAAATGAAGTTTGTCTTGTGCATCTTCAAGGAGAAACTAATGGTTTTTGTGTAAATA	1200
1201	GTCTGTGATAGTTAGGTGCAGGACTATCAACTCATCTTTTCAAGGGAAGTGGGCAGTGG	1260
1261	CTGCAAACATAACTGTGCTGTTGTTCTTACTGGTCACCTTGTGTATAAGGGTTCCTTGTGT	1320
	<---NL28---	
1321	GTATATAATTGTTATATGCTGCTTGT	1346

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons pNL35 (Acc.-Nr.: X79794)

	---NL35--->	
	1 <u>GCATCACAAGCATCGAAATCTACTGGTGAAGATTCTTGAA</u>	43
44	<u>ATGGCGACTTTTGCCAAACCTGAGAATGCTTTGAAGCGTGCTGAAGAGTTGATTACTGTT</u> M A T F A K <u>P E N A L K R A E E L I T V</u>	103
	Peptid 1	
104	<u>GGACAAAAGCAAGAAGCGCTGCAAGCACTTCATGATCTTATTACTTCAAGGAGGTATAGA</u> <u>G Q K Q E A</u> L Q A L H D L I T S R R Y R	163
164	<u>GCATGGCAAAAACTCTTGAAAGGATAATGTTCAAGTATGTAGAGCTATGTGTTGACATG</u> A W Q K T L E R I M F K Y V E L C V D M	223
224	<u>AGAAGGGGGAGGTTTGCCAAGGATGGCCTAATTCAATATCGTATAGTCTGTCTGAGCAAGTG</u> R R G R F A K D G L I Q Y R I V C Q Q V	283
	<---NL35---	
284	<u>AACATTAACCTCCTTAGAGGAGGTGATAAAGCATTTCATGCATTTAGCTACTGAGCGAGCT</u> N I N S L E E V I K H F M H L A T E R A	343
344	<u>GAACTGGCTCGCAATCAAGCACAGGCGTTGGAGGAAGCTCTGGATGTGGAGGACTTGAA</u> E L A R N Q A Q A L E E A L D V E D L E	403
404	<u>GCTGATAAAAGGCTGAAGATCTTATGTTGAGTTATGTTAGTGGGGAGAAAGGAAAAGAT</u> A D K R P E D L M L S Y V S G E K G K D	463
464	<u>AGATCTGATCGCGAGCTTGTCACTCCCTGGTTTAAGTTTTGTGGGAGACATATAGA</u> R S D R E L V T P W F K F L W E T Y R T	523
524	<u>GTTCTGGAGATCTTGCCTAACAACTCAAGATTGGAGGCTCTGTATGCCATGACAGCACAC</u> V L E I L R N N S R L E A L Y A M T A H	583
584	<u>CGAGCCTTTCAGTTCTGTAAGCAGTACAAACGTACAACAGAATTCGTCGTCTTTGTGAA</u> R A F Q F C K Q Y K R T T E F R R L C E	643
644	<u>ATCATCCGAATCATTTGGCAAATCTCAACAAGTATAGAGATCAGAGGGACCGCCTGAT</u> I I R N H L A N L N K Y R D Q R D R P D	703
704	<u>CTGTCTGCTCCAGAGAGCCTGCAATTGTATCTAGACACTAGATTTGAACAACCTGAAAGTT</u> L S A P E S L Q L Y L D T R F E Q L K V	763
764	<u>GCTACCGAACTGGGTCTTTGGCAGGAAGCTTTCCGTTCCATAGAAGACATATATGGATTG</u> A T E L G L W Q E A F R S I E D I Y G L	823
824	<u>ATGTGCATGGTTAAGAAAACCCCAAGGCGTCATTTGATGGTTGTTTACTATGGGAAGCTT</u> M C M V K K T P K A S L M V V Y Y G K L	883
884	<u>ACTGAGATATTTTGATGTCAATCATCTTTATCATGCTTATGCATGGCTCAAGCTT</u> T E I F W M S S N H L Y H A Y A W L K L	943
944	<u>TTCTCTTTCAGAAGAGTTTTAATAAAAAATTAAGCCAGAAGGATTTGCAGTTAATAGCA</u> F S L Q K S F N K N L S Q K D L Q L I A	1003
1004	<u>TCGTCTGTTGCTTAGCTGCACTTTCTGTGCCTCCTTATGATCAGTCGTATGGTGCATCT</u> S S V V L A A L S V P P Y D Q S Y G A S	1063
1064	<u>CATCTTGAGCTTGAAAATGAGAAGGAGAGGAGTTTGAGGGTGGCCAATCTAATAGGTTTT</u> H L E L E N E K E R S L R V A N L I G F	1123
1124	<u>GAAGTTGAACCCAAAGCCGAAAAACAGAGTAGCGCTCTCCCGATCATCACTTCTTTTCAGAG</u> E V E P K A E N R V A L S R S S L L S E	1183
1184	<u>TTGGTGTCCAAAGGTGTGATGTCTTGTGTCCACCAAGAAGTGAAGATCTTTATCATCTG</u> L V S K G V M S C V T Q E V K D L Y H L	1243
1244	<u>TTAGAAAATGAGTTTCTTCTTTGGATCTGGCACTGAAGGTGCAGCCCGTATTGAGCAAA</u> L E N E F L P L D L A L K V Q P V L S K	1303
1304	<u>ATATCAAAGCTTGGCGGTAAGCTGTCTTCAGTTTCTCAGTTCTGAAGTACAACCTGTCT</u> I S K L G G K L S S V S S V P E V Q L S	1363

1364	CAGTATGTTCTGCCTTGAAAACTTGCTACTCTGAGGTTGCTCCAGCAGGTCTCTCAG Q Y V P A L E K L A T L R L L Q Q V S Q	1423
1424	GTGTATCAGACAATTCAGATTGATAACATATCTAAGATGATCCCATTCTTTGACTTCACT V Y Q T I Q I D N I S K M I P F F D F T	1483
1484	GTTATTGAGAAGATATCAGTTGATGCGGTTAGACGTAATTTTCTAGCTATCAAAGTTGAT V I E K I S V D A V R R N F L A I K V D	1543
1544	CACATGAAGGGGCTGTCTTCTTTGGTAAACAGAGTATTGAGGCGGAAGGACTCCGGGATC H M K G L S S L V N R V L R R K D S G I	1603
1604	ATCTGTCTCTTTTTGGCTGAATCCCTTAGCAAGGCAAGGACAATGATTTATCCCCCAGCA I C L F L A E S L S K A R T M I Y P P A	1663
1664	AAGAAGGCTGCCAAGCTTGGGAAGCACTGTCTAATTTAGCGGAGATAGTGAGAAGGAG K K A A K L G E A L S N L A E I V E K <u>E</u>	1723
1724	CACAAGAGACTTCTTGCCCGAAGTCCATTATTGAGAAAACGCAAAGAGGAGCAAGAGCGT <u>H K R L L A R K S I I E K R K E E Q E R</u>	1783
	Peptid 2	
1784	TTACTCTTAGAAATGGAACGAGTGGAGGAAACAAAGAGGCGAGACGTACAAAAGATGACT L L L E M E R V E E T K R R D V Q K M T	1843
1844	GAAGAGGCTGAGCAAAGCGCATTGCTGCCGAGTATGAGCAAAGAAGGAACCAACGAATT E E A E Q K R I A A E Y E Q R R N Q R I	1903
1904	TTGAAGGAGATAGAGACCGAGAACTTGAAGAGGCCAAGCTTTGCTGCACGAAGCTGAA L K E I E D R E L E E A Q A L L H E A E	1963
1964	AAGCGCAGCAAGAGGAAGAAGAAGCCAGTCTTAGAGGGAGAAAAGATGACCAAAAAGGTG K R S K R K K K P V L E G E K M T K K V	2023
2024	ATCATGGAATTGGCGCTGAATGAAACAAGTGAAGAGAGAGGCAAGAAATGGAAAAGAAGTTG I M E L A L N E Q L R E R Q E M E K K L	2083
2084	CTCAAATTTGCTAAAAGTATGGATCATCTGGAGAGAGCTAAGAGAGAAGAAGCTGCACCT L K F A K S M D H L E R A K R E E A A P	2143
2144	CTTATTGAATCTGCATTTAAACAACGTTTAGCTGAAGAGGCAGCTCTTCATGAACGCGAG L I E S A F K Q R L A E E A A L H E R E	2203
2204	CAGCAGCAAGAGATTGAGCTCAGCAGACAACGACATGCTGGAGATTTAGAAGAGAAAAGG Q Q Q E I E L S R Q R H A G D L E E K R	2263
2264	AGGCTGGCACGCATGTTGGAGAACAAGAGAATTTTGCAAGAAAAAGTTGTCAGTAGCCGA R L A R M L E N K R I L Q E K V V S S R	2323
2324	GAAGCTGAATTCACTAGAATGAAACGGGAGAGACAGGAAAGGATCAGCCAGATAAATCAA E A E F T R M K R E R Q E R I S Q I I Q	2383
2384	TCAAGGAAGCAGGAGAGGGAAAGCTAGGAGGAAAATGATATTCTTCTGCGATCTGAGGAG S R K Q E R E A R R K M I F F L R S E E	2443
2444	GAGCGACAAAAGAGGTTGACAGGAAGAGGAGGAAGCCCGCAAACGTGAAGAGGCAGAGAGA E R Q K R L Q E E E E A R K R E E A E R	2503
2504	CGGAAGAAAGAGGAAGCTGAGCGGCAAGCCAAGTTAGATGAGATTGCAGAAAAGCAGAGG R K K E E A E R Q A K L D E I A E K Q R	2563
2564	CGGCGAATGCTAGAACTTGAAGAGAAAAGAAAACGGGAGAGAGAAGAGATCTTGCGTAAG R R M L E L E E K E K R E R E E I L R K	2623
2624	TCCACTGCTGTGCTGCCAAAGCCTGCTGAGCCTCCAACCTTGGGGCGCCCCGAGAACTT S T A V L P K P A E P P T L G R P A E L	2683
2684	GGTGGAGCTGCTCCAATTCCTGCTGCAGCAGCTACTGCACCTACTCTGGCCCTGGGAAA G G A A P I P A A A A T A P T P G P G K	2743
2744	TATGTTCTAAGCACTTACGAACAAAAATGGATGGTGCAGGCCAGGCGCCACCCCCTGAA Y V P K H L R T K M D G A G Q A P P P E	2803
2804	ACTGACAAGTGGGGCGGTGGAAGTAAGCCAGATGATCGACCATCATGGCGCGATGAACGA T D K W G G G S K P D D R P S W R D E R	2863

2864 AAGCCGCCTTCATTTGGTAGTGGCTCGAGGACCAGTTGGCCGGCTTCTAGGCGGTGAATG 2923
K P P S F G S G S R T S W P A S R R -

2924 GGTAAAGTCACTTATGAGTCGTGCAGTGGCTTATACCGGAGTCTTGCATCCTCGGCTTTT 2983
2984 TGGTTCCTGAAATTCAATTTGCTGTTTACCTTTTTTTGTGACTTTTACCTAATGTGTATC 3043
3044 GGAGTTTTATTTATTATGAGCTCAAGCATTCTTGACTAAGATATTTCTGCACGGTAT 3103
3104 GGAGAGGCTTGAAGTTTTTGACAGGTGATTGATGTTGAACTTTTTGTAAGCAAATAGCT 3163
3164 ACAGTTGCTATTATGTTCAACTTCTTTTTCTAGTGAAAGTGTAAGACGATGGCCTATA 3223
3224 TTATTTCTGTTGCTTATCATGTTAAAAA 3256

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons $\alpha 2/4$ (Acc.-Nr.: Z72389)

	1	AAA	3
4	TATTTGAGATCTCTAGCTTGACTATCACACAGGCCTATGCGCTGTGTGGTATTAGAAAAC		63
64	ATGGGCTTGTGTGCAGCAGAAAACAAAGGCTACAATCAAGCCGATGATGAGGAAAATACT		123
	M G L L C S R N K G Y N Q A D D E E N T		
	-Primer MP2 / PCRα2-1 -->		
124	CAGACTGCAGATATAGAAA GACGTATTGAGCAAGAAACAAAAGCGGACAAGCATATTCAG		183
	Q T A D I E R R I E Q E T K A D K H I Q		
184	<u>AAACTTCTTCTACTTGGTGCCGGAGATTCGGGGAAGTCCACTATTTTTAAGCAGATAAAA</u>		243
	K L L L L G A G D S G K S T I F K Q I K		
244	<u>CTTTGTTCAAACTGGCTTTGATGAAGCAGAGCTAAAGAACTATATCCCTGTCATTCAT</u>		303
	L L F Q T G F D E A E L K N Y I P V I H		
304	<u>GCCAATGTCTATCAGACAATAAAAGTATTACATGATGGGTCGAAGGAATTAGCTCAAAGT</u>		363
	A N V Y Q T I K V L H D G S K E L A Q S		
364	<u>GAATTAGAGGCCTCAAAGTATCTTCTATCAGCTGAAAATAAGGATATCGGCGAGAAGCTT</u>		423
	E L E A S K Y L L S A E N K D I G E K L		
424	<u>TCAGAAAATTGGAGGCAGGTTGGATTATCCTCACCTGACTAAGGATCTGGTGCAGGATATT</u>		483
	S E I G G R L D Y P H L T K D L V Q D I		
484	<u>GAAGCTCTTTGGAGAGATCCTGCTATTCAAGAACTATTTTACGTGGTAATGAGCTCCAG</u>		543
	E A L W R D P A I Q E T I L R G N E L Q		
544	<u>GTTCCAGATTGTGCCCATTTATTTTCATGGAAAACCTGCAGAGATTTTCTGATGTAATTAT</u>		603
	V P D C A H Y F M E N L Q R F S D V N Y		
604	<u>GTCCCATCAAAGGAGGATGTTCTTTTTGCCCGAATTCGAACAACCTGGTGTCTGTTGAAATA</u>		663
	V P S K E D V L F A R I R T T G V V E I		
664	<u>CAGTTCAGCCCAGTTGGAGAGAACAAAAAAGTGGAGAAGTATATAGGCTTTTTGATGTT</u>		723
	Q F S P V G E N K K S G E V Y R L F D V		
724	<u>GGAGTTCAGAGAAATGAGAGAAGAAAGTGGATTTCATCTATTTGAAGGTGTCACGGCAGTC</u>		783
	G G Q R N E R R K W I H L F E G V T A V		
784	<u>ATATTTTGTGCCGCTATTAGTGAGTACGATCAAACCTCTATTTGAGGATGAAAGAAAGAAC</u>		843
	I F C A A I S E Y D Q T L F E D E R K N		
844	<u>CGAATGATGGAGACCAAGGAACTCTTTGAGTGGGTCTTAAAGCAACCATGTTTTGAGAAA</u>		903
	R M M E T K E L F E W V L K Q P C F E K		
	←-- PCRα2-1 / Primer MP20-		
904	<u>ACTTCCTTCATGCTATTTCTCAACAAATTTGATATATTTGAGCAGAAGGCTCTGAAAGTG</u>		963
	T S F M L F L N K F D I F E Q K A L K V		
964	<u>CCTCTGAACGTCTGTGAGTGGTTTAAAGATTACCAACCAGTTTCAACAGGAAAACAAGAG</u>		1023
	P L N V C E W F K D Y Q P V S T G K Q E		
1024	<u>ATTGAGCATGCTTATGAGTTTGTAAAGAAAAAATTTGAGGAGTCATATTTCCAATGC ACT</u>		1083
	I E H A Y E F V K K K F E E S Y F Q C T		
1084	<u>GCACCAGATCGTGTGGACCGGTCTTTAAGATCTACAGAACCACAGCCCTTGATCAGAAG</u>		1143
	A P D R V D R V F K I Y R T T A L D Q K		
1144	<u>CTTGTTAAGAAGACTTTCAAACCTGGTAGATGAGACGCTGAGAAGGAGAAACCTTTTTGAA</u>		1203
	L V K K T F K L V D E T L R R R N L F E		
1204	<u>GCAGGTTTATTATGA AATTCTTTAAATTTTGGAACAGAAATGTTTCATACCCTGAAAGAA</u>		1263
	A G L L -		
1264	<u>GCATACAAGTGCGAGGTTCAAACACAGAAAAATAGGCTACTGGCGTATCATATCATATCC</u>		1324
1324	<u>AATTCCTACTATTTAAAGTTTTGTCAATGTTAGGCTCTAAGCACATATTTCTTTCTATAT</u>		1383
1384	<u>TCCTGGTGGTTGTATGTTGATTTACCGAGCACATGTTCCAAAACAAAAAATTGATATTC</u>		1443
1444	<u>AAGTATATTCGATCGATGTTTCATTTTGTGAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	1487	

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons β 16/1 (Acc.-Nr.: Y09513)

		1...ACT	3
4	CGCCACTGACTCAGCCCGACTCGTTCTCTCCTTTCTCTTCAGAAAAACCCTAATTTAA		63
64	TCAACGATTGTTCCACAATATTGAGATTTTCAGAAGAATTATGTTTGATTTTCCTTGAAA		123
124	ATG TCAGTGACAGAGCTGAAAGAGCGGCATATGGCCGCTACACAGACTGTAAATGATCTC		183
	M S V T E L K E R H M A A T Q T V N D L		
184	CGTAAAAAACTTAAGCAAAAGCGTCTCCAATTACTCGACACTGATGTTTCTGGATATGCA		243
	R E K L K Q K R L Q L L D T D V S G Y A		
244	AGGTCGCAAGGTAAAACTCCGGTCACCTTTGGCCCAACAGATCTTGTTTGTGTAGGATC		303
	R S Q G K T P V T F G P T D L V C C R I		
304	CTGCAAGGACACACTGGAAAGGTATATTCACTGGATTGGACTCCAGAAAAGAATCGTATA		363
	L Q G H T G K V Y S L D W T P E K N R I		
	-Primer -A/ZGBsk2 / PCRβTAl --->		
364	<u>GTCAGTGCATCCCAAGATGGCAGATTAATAGTGTGGAATGCTCTCACAAGCCAGAAAACC</u>		423
	V S A S Q D G R L I V W N A L T S Q K T		
424	<u>CATGCAATTAAGCTTCCATGTGCTTGGGTTATGACCTGCGCCTTCTCTCCTAGTGGGCAC</u>		483
	H A I K L P C A W V M T C A F S P S G H		
484	<u>TCTGTTCCTGTGGTGGCCTTGACAGTGTCTGCTCTATCTTCAACTTAAATTCACCAATC</u>		543
	S V A C G G L D S V C S I F N L N S P I		
544	<u>GATAAGGATGGGAACCATCCTGTATCAAGAATGCTTAGTGGGCATAAGGGTTATGTGTCT</u>		603
	D K D G N H P V S R M L S G H K G Y V S		
604	<u>TCCTGTCAAGTATGTTCCAGATGAGGATACTCACCTAATAACTAGTTCTGGTGATCAAACA</u>		663
	S C Q Y V P D E D T H L I T S S G D Q T		
664	<u>TGTGTCTTTGGGATATAACTACCGGTCTAAGAACTTCTGTCTTTGGAGGTGAGTTTCAA</u>		723
	C V L W D I T T G L R T S V F G G E F Q		
724	<u>TTCCGGGCACACCGCAGATGTACAAAGTGTCTCAATTAGTTTCATCAAACCCAGACTGTTT</u>		783
	F G H T A D V Q S V S I S S S N P R L F		
784	<u>GTATCTGGGTCTGTGACACAACCTGCTCGACTGTGGGACACCCGAGTTGCTAGTCGAGCT</u>		843
	V S G S C D T T A R L W D T R V A S R A		
844	<u>CAACGAACATTTTATTGTCTACGAGGGAGATGTTAATACTGTAAAGTTCTTCCCTGACGGT</u>		903
	Q R T F Y C H E G D V N T V K F F P D G		
904	<u>AATAGATTTGGAACCTGGTTCAGAGGATGGAACCTGCAGATTATTTGACATTAGGACTGGA</u>		963
	N R F G T G S E D G T C R L F D I R T G		
964	<u>CACCAGCTGCAAGTGTACTACCAGCCGCATGGTGATGGTGATATCCCTCATGTGACTTCC</u>		1023
	H Q L Q V Y Y Q P H G D G D I P H V T S		
1024	<u>ATGGCATTCTTCTATCTCAGGCCGTCTTCTCTTTGTGCGGTAATCAAATGGTGATTGTTAT</u>		1083
	M A F S I S G R L L F V R Y S N G D C Y		
1084	<u>GTGTGGGACACCCCTATTAGCAAAGTGGTCTTAAACTTGGGAGCAGTTCAAACTCTCAT</u>		1143
	V W D T L L A K V V L N L G A V Q N S H		
	<---PCRβTAl / Primer A/ZGBas1-		
1144	<u>GAAGGGCGAATAAGTTGCCTGGGACTGTCAGCTGATGGAAGCGCCTTATGTACAGGAAGT</u>		1203
	E G R I S C L G L S A D G S A L C T G S		
1204	TGGG ATACAAACCTGAAGATTTGGGCTTTTGGAGGGCACAGAAGTGTGATCT GAA TGATG		1263
	W D T N L K I W A F G G H R S V I -		
1264	AAACACCTCATTCTGTTAATTTAATTCCTTATCCCTCTACATTCTCATTTTCTTTTCATAGC		1323
1324	TAGCCTATTATTCGTGTTTCTTTGGCATGTGCATAACCTGTAGATCTCTTGTATTCCAG		1383
1384	TTAATATTCTCAGGCAGAGAAACCAAACCTGTTCCACTTGTGATCATATGAATCTGACAAA		1443
1444	TATTACTGTATCAGCACCAAGTTGTAAAGATAGCCTGTTTGTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA		1505

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons β 13/2 (Acc.-Nr.: Z72388)

14 *TCTTCTCCGCCTTCACAGCGAAACCGAGAGCAGCCACCCACCCACCTGCTCGACAAA* 13
 74 *ATGGCACAAGAATCACTAGTCTCCGCGGCACAATGAAAGCCACACCGATTGGGTTACA* 73
M A Q E S L V L R G T M K A H T D W V T
 134 *GCCATCGCCACCCCAATTGACAACCTCCGACATGATCGTTACTTCCCTCCAGGGACAAGTCC* 193
A I A T P I D N S D M I V T S S R D K S
 194 *CTAATCGTCTGGTCTCTCACAAAGGACGGCCACAATACGGTGTCCCCGCGCCGCTCTC* 253
L I V W S L T K D G P Q Y G V P R R R L
 254 *ACTGGCCACGGCCACTTCGTCCAGGATGTGTCCTTTCCCTCCGACGGTATGTTTGCTCTC* 313
T G H G H F V Q D V V L S S D G M F A L
-Primer Pdd04 / PCRKat7-2--->
 314 *TCTGGGTCCTGGGACGGTGAGCTTCGCCTTTGGGATCTTCAAGCTGGAACCACCGCTCGC* 373
S G S W D G E L R L W D L Q A G T T A R
 374 *CGTTTCGTCCGTCACACTAAGGATGTTCTGTCCGTTGCATTCTCCGTCGACAACCGTCAG* 433
R F V G H T K D V L S V A F S V D N R Q
 434 *ATCGTTTCCGCTTCCCCTGACAAATCCATCAAGCTGTGGAACACTCTCGGTGAATGCAAA* 493
I V S A S R D K S I K L W N T L G E C K
 494 *TATACCATTACAGGAGGGTGACTCGCATTCTGATTGGGTTTCATGTGTTTCAGCCCCG* 553
Y T I Q E G D S H S D W V S C V R F S P
 554 *AATACACTTCAGCCCACTATCGTTTCTGGATCCTGGGACCGTACTGTGAAAATCTGGAAC* 613
N T L Q P T I V S G S W D R T V K I W N
 614 *CTGACTAACTGTAAGCTGAGGTCCACTCTGGCTGGACACGCCGGCTACGTGAACACCGTG* 673
L T N C K L R S T L A G H A G Y V N T V
<--- PCRKat7-2 / Primer Pdd04-
 674 *GCAGTCTCTCCTGATGGTTCATTGTGTGCTAGTGGAGGCAAAGATGGTACTATTTTGCTT* 733
A V S P D G S L C A S G G K D G T I L L
 734 *TGGGATTTGGCTGAGGGGAAGAAGCTCTACTCGCTTGATGCTGGCTCTATCATTACGCG* 793
W D L A E G K K L Y S L D A G S I I H A
 794 *CTCTGCTTTAGTCTAACAGGTATTGGCTGTGTGCAGCTACTGAAACTAGCATTAAAGATT* 853
L C F S P N R Y W L C A A T E T S I K I
 854 *TGGGATTTGGAGAGCAAGAGCATTGTGGTGGATCTTAAAGTTGATCTCAAGCAAGAGAGT* 913
W D L E S K S I V V D L K V D L K Q E S
 914 *GAGATGGCTACTGAAGGAACACTGGCTCTGCCTGCAAAAACAAGATCATGTACTGCACC* 973
E M A T E G T T G S A C K N K I M Y C T
 974 *TGTTTGAGCTGGAGTGCTGATGGAAGCACGCTTTTTCAGCGGATACACAGACGGTTTGATT* 1033
C L S W S A D G S T L F S G Y T D G L I
 1034 *AGGGTTTGGGGTATTGGGCGTTATTAGGAGTTGCATTATTCGGCCATAGTCATTTAAAGA* 1093
R V W G I G R Y -
 1094 *CATTTAGATTTCTCTTGAAATGTTTGAAGAAGGATATCTGGATTCTCTTTGTTTCTCATG* 1153
 1154 *GTTTGGAGAGTTTGTGTTCCAATTTTGGGATTTTATTTAGTATTTTGTTACAAGCATC* 1213
 1214 *ATGTTGCTTATAAATCCAAGTTGCTTTGCATGGTCAAAAAAAAAAAAAA* **1261**

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons β 12/1 (Acc.-Nr.: Y09514)

1 CCACCACCTGTTTCGACAAA 19

20 **ATG**TCGCACGAATCACTAGTACTCCGTGGCACAATGAGGGCCACACTGACTGGGTCACA 79
M S H E S L V L R G T M R A H T D W V T

80 GCCATCGCCACCCCAGTTGACAACTCCGATATGATCGTCACATCCTCACGTGACAAATCC 139
A I A T P V D N S D M I V T S S R D K S

140 ATCATCGTTTGGTCACTCACGAAAGACGGGCCACAATACGGCGTCCCCGCCGCCGCCCTC 199
I I V W S L T K D G P Q Y G V P R R R L

200 ACAGCCATGGACACTTCGTTCAAGACGTTGTCTTTTCATCCGACGGCATGTTTCGCTCTT 259
T G H G H F V Q D V V L S S D G M F A L

-Primer Pdd04 / PCRKat7-2--->

260 **TCCGATCT**TGGGACGGTGAGCTCCGTTTGTGGGATCTTCAAGCTGGAACAACCGCCCGT 319
S G S W D G E L R L W D L Q A G T T A R

320 CGTTTCGTTGGACACACTAAGGATGTTTTGTCCGTAGCATTTCCTGCTGATAACCGTCAG 379
R F V G H T K D V L S V A F S A D N R Q

380 ATCGTGTACGATCCCGTGATAAGAGCATCAGGCTTTGGAACACTTTGGGTGAGTGTAAG 439
I V S A S R D K S I R L W N T L G E C K

440 TACATTATTCAGGACGGAGATTTCGCATTCTGATTGGGTCTCATGTGTTTCGTTTCAGCCCG 499
Y I I Q D G D S H S D W V S C V R F S P

500 AATAATCTTCAGCCAACTATCGTATCTGGGTCTGGGACAGGACTGTAAAAATATGGAAC 559
N N L Q P T I V S G S W D R T V K I W N

560 CTTACCAACTGTAAGCTCCGTGCTACGCTTGCTGGACACACTGGGTATGTGAATACCACT 619
L T N C K L R A T L A G H T G Y V N T T

<--- PCRKat7-2 / Primer Pdd04-

620 GCGGTGTCTCCTGATGGTTCTTTGTGTGCTAGTGGAGGAAAGGATGGAGTGATTTTGTTG 679
A V S P D G S L C A S G G K D G V I L L

680 TGGGATTTGGCTGAAGGGAAGAAGTTGTACTCGCTTGTGCTGAGTCGGGTTCTATTATTCACTCG 739
W D L A E G K K L Y S L E S G S I I H S

740 CTTTGTTTTAGCCCAAATAGGTATTGGTTGTGTGCTGCCACTGAGTCGAGTATTAAGATT 799
L C F S P N R Y W L C A A T E S S I K I

800 TGGGATTTGGAGAGCAAGACTATCGTGGATGATTTGAAAGTTGATCTGAAGCAAGAGAGT 859
W D L E S K T I V D D L K V D L K Q E S

860 GAAATGTCTGCTGAGGGAAGTCTTCTGGCAAAAACAAGGTCATATACTGTACTAGTTTG 919
E M S A E G T A S G K N K V I Y C T S L

920 GGCTGGAGTGCTGATGGTAGCACACTTTTCAGCGGATACACAGATGGCTTGATTAGAGTG 979
G W S A D G S T L F S G Y T D G L I R V

980 TGGGTATTGGCCGTTTT**TAG**GATAAAACATATAGCACCATTGGCCTGAATTT**CATTTA** 1039
W G I G R F -

1040 *GATGAAATCTAAAATGTTGGAAGAAGTATGTCGGATTCTCTGTGTTTTTCATGGCTGTGAG* 1099

1100 *GCCTTTTCTGTTACAGTTTTGGATTTTATTTACGCATGTTAAATTGGGTGTAGATCCAAG* 1159

1160 *AAGCTCTTTTGCCTAGTCTTATGAGTAAATTTATGCTTTCTTCTGTGTTTTTAAATCTTA* 1219

1220 *CAGATCTTCGACTTTGTTTATGATTTTATGAGGAGATATATATCTTTTTGAAAAAAAAAAAA* 1280

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons 3Sar (Acc.-Nr.: Y08423)

```

1      AGATCTGCTTTTGCAGAAAACTTAGAGTAGAATCCAGATCCAAGAAG 46
47    ATGTTTCTGTGGGATTGGTTCTATGGAGTTTTATCATCTCTAGGTTTTGTGGCAAAAGGAA 106
      M F L W D W F Y G V L S S L G L W Q K E
      ---PCR8Com--->
107   GCTAAGATCTTGTCTTAGGCCTTGACAATGCTGGCAAAACCACTCTTCTTCACATGCTC 166
      A K I L F L G L D N A G K T T L L H M L
167   AAAGATGAGAGGTTGGTTCAGCATCAGCCGACTCAGTATCCTACATCTGAAGAGTTGAGT 226
      K D E R L V Q H Q P T Q Y P T S E E L S
227   ATTGGGAAGATAAAGTTCAAAGCTTTTTGACTTGGGAGGTCATCAGATCGCTCGTCGGGTG 286
      I G K I K F K A F D L G G H Q I A R R V
287   TGGAAAGATTACTATGCTAAGGTTGATGCAGTTGTTTACCTAGTTGATGCATTTGACAAA 346
      W K D Y Y A K V D A V V Y L V D A F D K
347   GAGCGGTTTGCAGAGTCAAAGAAGGAATTAGATGCGCTTCTTTCTGATGAGGCCCTTTCT 406
      E R F A E S K K E L D A L L S D E A L S
407   ACTGTCCCTTCCTCATTTTGGGCAACAAGATAGACATACCATATGCTGCCTCAGAAGAT 466
      T V P F L I L G N K I D I P Y A A S E D
      <---PCR8Com---
467   GAATTGCGTTATCATCTTGGCTTGACCGGTGTCACTACTGGCAAGGGTAAGGCGAATCTT 526
      E L R Y H L G L T G V T T G K G K A N L
527   GCTGATTCTAGTGTTCGGCCTTTAGAGGTATTTATGTGTAGCATTGTACGGAAAATGGGT 586
      A D S S V R P L E V F M C S I V R K M G
587   TATGGCGATGGCTTTAAGTGGGTATCTCAATATATAAAGTAGGTTCCATTAGCAACGCCT 646
      Y G D G F K W V S Q Y I K -
647   GAGACGGTCAAGGAGATTGCATCACCGATATGTTGTAGATCTGCTAATTTTTCCCGCTTT 706
707   CTGAAAAGATGAAATATTGGGTTTTCTCAGATATATGTGCATATATTTTCGAACTGAGCAG 766
767   GTCTTTTGGTACCAATTTTGTACACTTAGCTGTCTATGTAGGTCGATGACAAGGTATTCC 826
827   TTATTTCTCTGTAATATTTAGTGTAGCCTTGAAATCGCCATCTACATATTCTTGACTTAA 886
887   ATTCATGCCTGTATTTGTTATCTCCCATTAGTTATATTATGAATTTATATTAAGTCAT 946
947   ACCTATCTTCGTTGTCTCTTAAAAAA 972

```

DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons 50Sar (Acc.-Nr.: Y08424)

1 CCTCTCTGGCGATAAAGTCTACCGATTGAGGAAGGA 37
 38 TTCTTCGTTGAATCCATCGGGAAAGAGCGATACCCTTTTGTTCTTATATTATTCGATCCA 97
 98 TCAAACACCTTTGTCTGTTTTCTTATATCTGTATCTTAGGGCTTGTAGTCAATAAAAAAGA 157
 158 **ATG**TTCTTGGTCGATTGGTTCTACGGAGTTCTCGCATCGCTTGGTCTGTGGCAGAAAGAG 217
 M F L V D W F Y G V L A S L G L W Q K E
 ---PCR8Com--->
 218 GCTAAGATCTTGTTTTTAGGCCTTGATAATGCCGGCAAAACTACCTTGCTTCATATGTTG 277
 A K I L F L G L D N A G K T T L L H M L
 278 AAAGACGAGAGATTGGTTCAACATCAGCCAACACAATACCCGACATCAGAGGAGCTTAGT 337
 K D E R L V Q H Q P T Q Y P T S E E L S
 338 ATCGGAAAAATTAAGTTCAAGGCATTTGACTTGGGTGGGCATCAGATTGCTCGTCGAGTG 397
 I G K I K F K A F D L G G H Q I A R R V
 398 TGAAAAGATTATTACGCTAAGGTGGATGCTGTTGTTTATCTGGTGGATGCCTATGACAAA 457
 W K D Y Y A K V D A V V Y L V D A Y D K
 458 GAAAGTTTGCAGAATCTAAGAAAGAGCTGGATGCTCTCCTCTCTGATGAGTCGTTGGCC 517
 E R F A E S K K E L D A L L S D E S L A
 518 ACTGTTCCTTTTCTTATACTTGGTAACAAGATAGACATCCCGTATGCTGCATCAGAAGAT 577
 T V P F L I L G N K I D I P Y A A S E D
 <---PCR8Com--->
 578 GAATTGCGTTACCAAATGGGGCTAACGGGCATCACAACCTGGCAAGGGAAAGGTAAACCTG 637
 E L R Y Q M G L T G I T T G K G K V N L
 638 GCGGAATCCAATGTTTCGTCGCCCTTGAGGTATTCATGTGCAGCATAGTCCGCCAAAATGGG 697
 A E S N V R P L E V F M C S I V R Q N G
 698 ATTATGGCGAAAGGCTTCAAATGGGTCTCTCAATACATTAATA**TAA**CAGATCTAGAAAGTG 757
 I M A K G F K W V S Q Y I K -
 758 AGATATTGTCATTCTGTTTTGCTTATGCTTTTGTACTGGATATGAGTTGGAAAGTCTGTT 817
 818 TGAAAGCACTGTAGATTATGCTTCTTGTCTTAGCTTTCTAGGAATATGGTGAACGAAA 877
 878 GGATGTTCAAGATTGCTTTGTTACATAACAAAATGATTTAGCGAAACTCTCAACCATAAT 937
 938 TCCCATCTCTAGAAGTGTGCTATTTTTGTTCAATTGTAAAGCAAAATCACAAAAGTTTGG 997
 998 ACATACGTCCTTCATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1023

Aminosäuresequenzalignement von NPGPA1 mit pflanzlichen und tierischen Gαs

	Myristoylierung	A	
	MGXXXS	LLLLGXXXSGKSTXXXQ	
NPGPA1	MGLLCSRNGKYNQADDEENTQTADIERRIE-QETKADKHIQKLLLLGAG DSGKST IFKQIKLLFQTGFDE		69
LEGPA1	MGSLCSRNGKYSQADDEENTQTAEIERRIE-QETKAEKHIQKLLLLGAG DSGKSTIFKQIKLLFQTGFDE		69
PSGPA1	MGLLCSKSNRYNDAKAEENAQTAEIERRIEL-ETKAEKHIRKLLLLGAG ESGKSTIFKQIKLLFQTGFDE		69
GMGPA1	MGLVCSRSRRFREAHAENAQDAEIERRIEL-ETKAEKHIQKLLLLGAG ESGRSTIFKQIKLLFQTGFNE		69
ATGPA1	MGLLCSRSRHHTE-DTDENTQAAEIERRIE-QEAKAEKHIRKLLLLGAG ESGKSTIFKQIKLLFQTGFDE		68
OSGPA1	MGSSCSRSHSLSEAEETTKNAKSADIDRRI-LQETKAEQHIKLLLLGAG ESGKSTIFKQIKLLFQTGFDE		69
HUMGi	MGCTLS-----AEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEV-KLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSE		63
DMGo	MGCAQS-----AEERAAAARSRLIERNLKEDGIQAAKDI-KLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHESGFTA		63
	βγ..BR	GTP (1)	
NPGPA1	AELKNYIPVIHANVYQTIKVLHDGSKELAQSELEASKYLLSAENKDIGEKLSEIGGRLDYPHLTKDLVQD		139
LEGPA1	EELKNYIPVIHANVYQTKILHDGSKELAQNELEASKYLLSAENKEIGEKLSEIGGRLDYPHLTKDLVQD		139
PSGPA1	AELKSYLPVVHANVYQTIKLLHDGSKEFAQNVDVFSKYVISTENKDIGEKLSEIGGRLDYPRLTKELAQE		139
GMGPA1	AELKSYIPVVHANVYQTIKVLQDGSKELAQNDFDSSKYVISNENQDIGQKLSEIGGTLVYPRLTKELAQE		139
ATGPA1	GELKSYVPIHANVYQTIKLLHDGTKEFAQNETDSAKYMLSSESIAIGEKLSEIGGRLDYPRLTKDIAEG		138
OSGPA1	AELRSYTSVIHANVYQTIKILYEGAKELSQVESDSSKYVISPDNQEIGEKLSIDIDGRLDYPLLNKELVLD		139
HUMGi	DECKQYKVVVYSNTIQSI IAI --- IRAMGRLIKIDFGEAARADDARQL --- FVLGSAEEG-VMTPELAGV		126
DMGo	EDFKQYRPVVYSNTIQSLVAI --- LRAMP T L S I Q Y S N N E R E S D A K M V --- F D V C Q R M H D T E P F S E E L L A A		127
		CTX	
NPGPA1	IEALWRDPAIQETILRGNELQVP DCAHYFMENLQRFSDVNYVPSKEDVLFARIR TTGTVVEIQFSPVGENK		209
LEGPA1	IEALWKDPAIQETLLRGNELQVPDCAHYFMENLERFSDVHYIPTKEDVLFARIRTTGTVVEIQFSPVGENK		209
PSGPA1	IESIWKDAAIQETYARGNELQVPDCTHYFMENLQRLSDANYVPTKEDVLLARVVRTTGTVVEIQFSPVGENK		209
GMGPA1	IETMWEDAAIQETYARGNELQVPDCAHYFMENLERLSDANYVPTKEDFLYARVVRTTGTVVEIQFSPVGENK		209
ATGPA1	IETLWKDPAIQETCARGNELQVPDCTKYL MENLKR L S D I N Y I P T K E D V L Y A R V R T T G V V E I Q F S P V G E N K		208
OSGPA1	VKRLWQDPAIQETYLRGSI L Q L P D C A Q Y F M E N L D R L A E A G Y V P T K E D V L Y A R V R T N G V V Q I Q F S P V G E N K		209
HUMGi	IKRLWRDGGVQACFSRSREYQLNDSASYLNDLDRISQSNIPTQQDVLRT RVKTTGIVETHFT -----		190
DMGo	MKRLWQDAGVQECFSRSREYQLNDSAKYFLDDLRLGAKDYQPTEQDILRT RVKTTGIVEVHFS -----		191
	GTP (2)	GTP (3)	
	C		
	DVGGQR		
NPGPA1	KSGEVYRLFVDV GGQR NERRKWIHLFEGVTAVIFCAAISEYDQTLF EDERKNRMMETKELFEWVLKQPCFE		279
LEGPA1	KSGEVYRLFVDVGGQRNERRKWIHLFEGVTAVIFCAAISEYDQTLF EDERKNRMMETKELFEWVLKQPCFE		279
PSGPA1	KSGEVYRLFVDVGGQRNERRKWIHLFEGVSAVIFCVAISEYDQTLF EDENKNRMMETKELFEWVLKQ-CFE		278
GMGPA1	RSGEVYRLFVDVGGQRNERRKWIHLFEGVTAVIFCSAISEYDQTL YEDENKNRMMETKELFEWVLRQPCFE		279
ATGPA1	KSGEVYRLFVDVGGQRNERRKWIHLFEGVTAVIFCAAISEYDQTL FEDEQKNRMMETKELFDWVLKQPCFE		278
OSGPA1	RGGEVYRLYDVGQRNERRKWIHLFEGVNAVIFCAAISEYDQML FEDETKNRMMETKELFDWVLKQRCFE		279
HUMGi	FKDLYFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVT A I F C V A L S D Y D L V L A E D E E M N R M H E S M K L F D S I C N N K W F T		260
DMGo	FKNLNFKLFDVGGQRSEKRWIHC F E D V T A I F C V A M S E Y D Q V L H E D E T T N R M Q E S L K L F D S I C N N K W F T		261
	GTP (4)	EBR (1)	EBR (2)
	G		
	LFLNKXD		
NPGPA1	<u>KTSFMLFLNKFDIFEQKALKVPLNVCEWFK-DYQPVSTGKQEI</u> EHAYEFVKKKFEESYFQCTAPDRVDRV		348
LEGPA1	<u>KTSFMLFLNKFDIFEQKVPKVPLNACEWFK-DYQSVSTGKQEI</u> EHAYEFVKKKFEESYFQCTAPDRVDRV		348
PSGPA1	<u>KTSFMLFLNKFDIFEKKILDVPLNVCEWFK-DYQPVSTGKQEI</u> EHAYEFVKKKFEESYFQSTAPDSVDRV		347
GMGPA1	<u>KTSFMLFLNKFDIFEKKVLNVPLNVCEWFKHDYQPVSTGKQEI</u> EHAYEFVKKKFEELYFQSTAPDCVDRV		349
ATGPA1	<u>KTSFMLFLNKFDIFEKKVLDVPLNVCEWFR-DYQPVSSGKQEI</u> EHAYEFVKKKFEELYQNTAPDRVDRV		346
OSGPA1	<u>KTSFILFLNKFDIFEKKIQKVP L S V C E W F K - D Y Q P I A P G K Q E V E H A Y E F V K K K F E E L Y F Q S S K P D R V D R V</u>		348
HUMGi	ETSII L F L N K K D L F E E K I K R S P L T I C -- Y P - E Y --- T G S N T Y E E A A A Y I Q C Q F E D L N R R K D T K E --- I		319
DMGo	DTSII L F L N K K D L F E E K I R S P L T I C -- F P - E Y --- T G G Q E Y G E A A A Y I Q A Q F E A - K N K S T S K E --- I		319
	EBR (2)	GTP (5)	EBR (3)

	I		
	TXAXDT	PTX	
NPGPA1	<u>FKIYRT</u> TALD <u>QKLVKKT</u> FKLVDETLRRRNLF <u>EAGLL</u>		384
LEGPA1	FKIYRTTALDQKLVKKT <u>FKLVDETLRRRNLF</u> <u>EAGLL</u>		384
PSGPA1	FKIYRTTALDQKVVKKT <u>FKLVDETLRRRNLF</u> <u>EAGLL</u>		383
GMGPA1	FKIYQATAPDQKLVKKT <u>FKLGDETLRRRNPLE</u> <u>EAGLL</u>		385
ATGPA1	FKIYRTTALDQKLVKKT <u>FKLVDETLRRRNLE</u> <u>EAGLL</u>		382
OSGPA1	FKIYRTTALDQKLVKKT <u>FKLIDESMRRSR</u> --EGT--		380
HUMGi	YTHF-TCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKE <u>CGLL</u>		354
DMGo	YCHM-TCATDTNNIQFVFDVAVTDVVIANNLRG <u>CGLL</u>		354
	GTP (6)	<u>RBR</u>	

A, C, G, I = GTP-Bindungsstelle; **CTX, PTX** = ADP-Ribosylierungsstelle für Cholera-toxin, Pertussis-toxin (SIMON et al., 1991)

GTP (1)-(6) = GTP-Bindungsregionen; $\beta\gamma$ -BR = $G\beta\gamma$ -Bindungsregion; EBR (1)-(3) = Effektor-Bindungsregionen; RBR = Rezeptor-Bindungsregion (NOEL et al., 1993; LAMBRIGHT et al., 1994)

NPGPA1, Z72389; LEGPA1 = GBA1_LYCES, P26981; PSGPA1 = GBA1_PEA, O04278; GMGPA1 = GBA1_SOYBN, P49084; ATGPA1 = GBA1_ARATH, P18064; OSGPA1 = GBA1_ORYSA, P49083; HUMGi = GBAK_HUMAN, P08754; DMGo = GB01_DROME, P16378

Aminosäuresequenzalignment von NPGBL1 und NPGBL2 mit pflanzlichen und tierischen WD40-Proteinen

NPGBLP1	MA--QESLVL RGT MKAHTD VVTAIATPIDN-SDMIVTSSRDKSLIVWSLTK-----DGPQYGVPRR	58
NPGBLP2	MS--HESLVL RGT MRAHTD VVTAIATPVDN-SDMIVTSSRDKSIIVWSLTK-----DGPQYGVPRR	58
NTARCA	MS--QESLVL RGT MRAHTD VVTAIATAVDN-SDMIVTSSRDKSIIVWSITK-----DGPQYGVPRR	58
MSGBL	MA---EGLVLRGT MRAHTD VVTAIATPIDN-SDMIVTASRDKSIILWHLTK-----EDKTYGVPRR	57
RWD	MAGA QESLVL LAGVMHGHNDVVTAIATPIDN-SPFIVSSSRDKSLLVWDLTNPVQNVGEGAGASEYGVPF	69
CBLP	MA---ETLTLRATLKGHTN VVTAIATPLDPSNTLLSASRDKSVLWELER-----SESNYGYARK	58
RACK1	MT---EQMTLRGT LKGHTN VVTAIATTPQ-FPDMILSASRDKTIIMWKLTR-----DETNYGIPQR	57
WD40	R GH D WD R	

PKC I

NPGBLP1	RLTGHGHFVQDVVLS SDGMFALSGSWDGELRLWDLQAGTTARFVGH TKDVL SVAFSVDNRQIVSASRDK	128
NPGBLP2	RLTGHGHFVQDVVLS SDGMFALSGSWDGELRLWDLQAGTTARFVGH TKDVL SVAFSADNRQIVSASRDK	128
NTARCA	RLTGHGHFVQDVVLS SDGMFALSGSWDGELRLWDLQAGTTARFVGH TKDVL SVAFSVDNRQIVSASRDK	128
MSGBL	RLTGHSHFVQDVVLS SDGQFALSGSWDGELRLWDLNAGTSARRFVGH TKDVL SVAFSIDNRQIVSASRDK	127
RWD	RLTGHSHFVQDVVLS SDGQFALSGSWDGELRLWDLSTGVTTRRFVGH DKDVL SVAFSVDNRQIVSASRDR	139
CBLP	ALRGHSHFVQDVVLS SDGQFCLTGSWDGTLRLWDLNTGTTTRRFVGH TKDVL SVAFSVDNRQIVSGSRDK	128
RACK1	ALRGHSHFVSDVVIS SDGQFALSGSWDGTLRLWDLTTGTTTRRFVGH TKDVL SVAFSSDNRQIVSGSRDK	127
WD40	GH D WD R GH D	

NPGBLP1	SIKLWNTLGECKYTI-QE---GDSHSDWVSCVRFSPNTLQPTIVSGSWDR TVKIWNLTNCKLRSTLAGHA	194
NPGBLP2	SIRLWNTLGECKYII-QD---GDSHSDWVSCVRFSPNNLQPTIVSGSWDR TVKIWNLTNCKLRATLAGHT	194
NTARCA	SIRLWNTLGECKYTI-QD---GDSHSDWVSCVRFSPNNLQPTIVSGSWDR TVKIWNLTNCKLRRLTLAGHT	194
MSGBL	TIKLWNTLGECKYTI-QD---GDAHSDWVSCVRFSPSTPQPTIVSASWDR TVKVVWNLNCKLRNTLAGHS	193
RWD	TIKLWNTLGECKYTI GGD LGGGEGHNGWVSCVRFSPNTFQPTIVSGSWDR TVKVVWNLNCKLRNLEGHG	209
CBLP	TIKLWNTLGECKYTIGEP----EGHTEWVSCVRFSPMTNPIIVSGGWDKMKVWNLNCKLRKNNLVGHH	194
RACK1	TIKLWNTLGVCKYTVQD----ESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWNLNCKLRKTNHIGHT	192
WD40	WD [GH D WD R GH	

PKC II

NPGBLP1	GYVNTVAVSPDGSLCASGGKDG TILLWDLAEGKKLYSLDAGS ITHALCFSPNRYWLCAATETS IKIWDLE	264
NPGBLP2	GYVNTTAVSPDGSLCASGGKDG VILLWDLAEGKKLYSLES GS ITHSLCFSPNRYWLCAATESS IKIWDLE	264
NTARCA	GYVNTPAVSPDGSLCASGGKDG VILLWDLAEGKKLYSLES GS ITHSLCFSPNRYWLCAATESS IKIWDLE	264
MSGBL	GYVNTVAVSPDGSLCASGGKDG VILLWDLAEGKRLYSLDAGS ITHALCFSPNRYWLCAATESS IKIWDLE	263
RWD	GYVNAVAVSPDGSLCASGGKDG VTLWDLAEGKRLYSLDAGS ITHSLCFSPNRYWLCAATQDS IKIWDLE	279
CBLP	GYVNTVTVSPDGSLCASG-KDGIAMLWDLAEGKRLYSLDAGDV ITHALCFSPNRYWLCAATQSS IKIWDLE	264
RACK1	GYLNTVTVSPDGSLCASGGKDG QAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCAATGPS IKIWDLE	262
WD40	D WD R WD	

NPGBLP1	SKSIVVDLKVLDLQSESE MATEGTTGSACKNKIMYCTCLSWSADGSTLFSGYTDGLIRVWGIGRY----	328
NPGBLP2	SKTIVDDLKVLDLQSESE MSAEGTASG--KNKVIYCTSLGWSADGSTLFSGYTDGLIRVWIGIRF----	326
NTARCA	SKSIVDDLKVLDLQSESE MSSEGTASG--KNKVIYCTSLSWSADGSTLFSGYTDGLIRVWIGIDRY----	326
MSGBL	SKSIVEDLKVLDLQTEADAA IGGDTT--KKKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDG VVRVWIGIRY----	325
RWD	SKHIVQDLKPEI-----PVSKNQMLYCTSLNWSADGSTLYAGYTDGTIRIYKISGFSYAG	334
CBLP	SKSIVDDL RPEFN-----ITSKKAQVPYCVSLAWSADGSTLYSGYTDGQIRVWAVGHSL---	317
RACK1	GKIMVDELKQEVI-----STSSKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVWQVTIGT--R	317
WD40	R D WD	

WD40 WD40-Repeats, die N-terminal Arginin (**R**) und/oder Glycin-Histidin (**GH**) und C-terminal Tryptophan-Aspararinsäure (**WD**) enthalten (FONG et al., 1986; VAN DER VOORN und PLOEGH, 1992). Der Beginn des vierten WD40-Repeats ist mit einem „[“, markiert, da der entsprechende Argininrest fehlt.

PKC I, II Bindungsregionen für Proteinkinase C

NPGBLP1, Z72388; NPGBLP2 = GBLP_NICPL, P93340; NTARCA = GBLP_TOBAC, P49026; MSGBL = GBLP_MEDSA, O24076; RWD = GBLP_ORYSA, P49027; CBLP = GBLP_CHLRE, P25387; RACK1 - A36986

Aminosäuresequenzalignment von NPSARGTP1 und NPSARGTP2 mit pflanzlichen und tierischen Sar-homologen GTP-bindenden Proteinen

	<u>G1</u>	<u>G2</u>	
NPSAR2	M---F---LWDWFGVLSLGLWQKEAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKDERLVQHQPPTQYPTSEELSIGKI		64
ATSAR1	M---F---LFDWFGILASLGLWQKEAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKDERLVQHQPPTQHPPTSEELSIGKI		64
BSAR1B	M---F---LFDWFGILASLGLWQKEAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKDERLVQHQPPTQHPPTSEELSIGKI		64
NPSAR1	M---F---LVDWFGVLSLGLWQKEAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKDERLVQHQPPTQYPTSEELSIGKI		64
LESAR2	M---F---LVDWFGVLSLGLWQKDAKILFLGLDNAGKTTLLHMLKDERLVQHQPPTQYPTSEELSIGNI		64
SCSAR1	M---AGWDIFGWFRDVLASLGLWNKHGKLLFLGLDNAGKTTLLHMLKNDRLATLQPTWHPTSEELAIGNI		67
MSAR1	MSFIFEW-IYNGFSSVLQFLGLYKKSGLVFLGLDNAGKTTLLQMLKDDRLGQHVPTLHPTSEELTIAGM		69
	<u>G3</u>	<u>G4</u>	
NPSAR2	KFKAFDLGGHQIARRVWKDYAKVDVVYLVDADFKERFAESKKELDALLSDEALSTVPFLILGNKIDIP		134
ATSAR1	KFKAFDLGGHQIARRVWKDYAKVDVVYLVDAYDKERFAESKRELDALLSDEALATVPFLILGNKIDIP		134
BSAR1B	KFKAFDLGGHQIARRVWKDYAKVDVVYLVDAYDKERFSESKKELDALLSDDALATVPFLILGNKIDNP		134
NPSAR1	KFKAFDLGGHQIARRVWKDYAKVDVVYLVDAYDKERFAESKKELDALLSDESATVPFLILGNKIDIP		134
LESAR2	KFKAFDLGGHQIARRVWRDYAKVDVVYLVDANDRERFPEAKKELDGLSDESNTVPFLILGNKIDIP		134
SCSAR1	KFTTFDLGGHIQARRLWKDYFPEVNGIVFLVDAADPERFDEARVELDALFNIAELKDVFPVILGNKIDAP		138
MSAR1	TFTTFDLGGHEQARRVWKNYLPAINGIVFLVDCADHSRLMESKVELNALMTDETISNVPILILGNKIDRT		139
<u>Sar1-spezifische Region</u>			
NPSAR2	YAASEDELRYHLGLTGVTGKGNLA--DSSVRPLEVFMCSIVRKMGY-GDGFKWSQYIK		193
ATSAR1	YAASEDELRYHLGLTNFTTGKGVTL--GDSGVRPLEVFMCSIVRKMGY-GEGFKWSQYIN		193
BSAR1B	YAASEDELRYHLGLTNFTTGKGVTTAGGDSGVRPLEVFMCSIVRKMGY-GEGFKWSQYIN		195
NPSAR1	YAASEDELRYQMGLTGITGKGNLA--ESNVRPLEVFMCSIVRQNGIMAKGFKWSQYIK		194
LESAR2	YAASEDELRYHLGLTGVTGKGNINLAGTN--VRPIEVFMCSIVRKMGY-GEGFKWSQYIK		193
SCSAR1	NAVSEAEALRSALGLLN-TTG-----SQRIEQRPVEVFMCSVVMRNGY-LEAFQWLSQYI-		190
MSAR1	DAISEEKLREIKGLYQTTGKGNVTLK--ELNARPMEVFMCSVLKRQGY-GEGFRWLSQYID		198

G1-4 GTP-Bindungsdomänen

NPSAR2 = NPSARGTP2, Y08423; ATSAR1 = SAR1A_ARATH, O04834; BSAR1B= SARB_BRACM, O04267; NPSAR1 = NPSARGTP1, Y08424; LESAR2 = SAR2_LYCES, P52884; SCSAR1 = SAR1_YEAST, P20606; MSAR1 = SARA_MOUSE, P36536

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Serologie am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

Mein besonderer Dank gilt der Leiterin der Arbeitsgruppe Serologie, Frau Dr. Renate Manteuffel, für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich danke ich Frau Andrea Ripala für die exzellente technische Assistenz bei der Analyse der transgenen Pflanzen. Frau Monika Gottowick und Frau Helga Rudolph danke ich für die Unterstützung bei den *Western-Blot*-Experimenten. Bei Herrn Dr. Nikolai Borisjuk, Herrn Dr. Leonid Sitailo und Frau Dr. Ljudmilla Malysheva bedanke ich mich für die nutzbringende Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Klone NL28 und NL35. Für die beständige Bereitstellung von Zellkulturmaterial danke ich Frau Dr. Annegret Tewes und Frau Sabine Skiebe. Den Mitarbeitern der Gärtnerei, insbesondere Herrn Hellmuth Fromme und Frau Martina Maier, danke ich für die Hilfe bei der Betreuung der transgenen Pflanzen im Gewächshaus. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Klaus Adler für die elektronen-mikroskopischen Untersuchungen und Frau Ulrike Gresch für die Antikörperproduktion. Für zahlreiche Anregungen und wissenschaftliche Diskussionen bedanke ich mich insbesondere bei Frau Dr. Winfriede Weschke, aber auch bei Frau Dr. Ulrike Fiedler, Herrn Dr. Thomas Wohlfarth und Herrn Dr. Markus Ebneith. Mein Dank gilt auch Frau Susanne König und Herrn Dr. Andreas Polley für die Sequenzierungen, Frau Rose-Marie Gillandt für die Oligonukleotidsynthesen und Herrn Dr. Christian Horstmann für die N-terminale Proteinsequenzierung sowie Frau Heike Ernst und Frau Birgit Schäfer für die fotografischen Arbeiten. Außerdem gilt mein uneingeschränkter Dank auch allen anderen, namentlich nicht erwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Serologie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinem Freund Jörg Fuchs für ihre Rücksicht und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 26.02. 1999

Catrin Kaydamov

Lebenslauf

Name	Catrin Kaydamov
Geburtstag	08.09.1968
Geburtsort	Halle / Saale
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1975-1985	Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Halle mit Abschluß der 10. Klasse
1985-1987	Besuch der Erweiterten Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Halle mit Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife
Studienzeiten	
1987-1992	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung Biologie, Spezialisierungsrichtung Genetik
1991-1992	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie in Halle unter Anleitung von Herrn Dr. Belter
1992-1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben
Okt. 1992- Sept. 1993	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Bakteriengenetik unter Anleitung von Herrn Dr. Hofemeister
Okt. 1993- Juni 1998	Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe Serologie unter Anleitung von Frau Dr. Manteuffel
seit Juli 1998	arbeitslos

Halle, den 26.02.1999

Catrin Kaydamov