

**Funktionelle Charakterisierung von Eizell-aktiven RKD-Faktoren
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von

Maria Mildner geb. Michael
geboren am 19. August 1981 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Wobus
2. Prof. Dr. Gunter Reuter
3. Prof. Dr. Holger Puchta

Halle (Saale), 27. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.	Sexuelle Fortpflanzung <i>versus</i> Apomixis	1
1.1.1	Die Entwicklung des weiblichen Gametophyten und Befruchtung	1
1.1.2	Apomiktische Entwicklung der Gametophyten	3
1.2.	Genetische Analyse des weiblichen Gametophyten.....	5
1.2.1	Identifizierung von entwicklungsspezifischen Faktoren.....	5
1.2.2	Zellspezifität im weiblichen Gametophyten.....	6
1.2.3	Expressionsanalysen.....	8
1.3	Transkriptionelle Genregulation im weiblichen Gametophyten	8
1.4	Die RWP-RK-Familie in Pflanzen	11
1.4.1	Identifizierung von RWP-RK-Faktoren	11
1.4.2	RKD in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.5	Zielstellung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Enzyme	14
2.1.3	Antikörper	14
2.1.4	Organismen	14
2.1.4.1	Bakterien	14
2.1.4.2	Hefen	15
2.1.4.3	Pflanzen	16
2.1.5	Plasmide	16
2.1.5.1	<i>E.coli</i> Vektoren und Provektoren	16
2.1.5.2	Hefeplasmide.....	17
2.1.6	Oligonukleotide	17
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Klonierungsmethoden	17
2.2.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	18
2.2.3	Amplifikation vom 5'-cDNA-Enden.....	18
2.2.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Hefe.....	18
2.2.5	Aufzucht und Transformation von <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen	19
2.2.6	Transformation in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten und GUS-Messung	19
2.2.7	Induktionsexperimente mit transgenen <i>Arabidopsis</i> <i>RKD::GR</i> -Linien.....	20
2.2.8	Histologische Analysen von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	20
2.2.9	Genomische DNA-Isolierung und Southern-Blot-Analyse.....	22
2.2.10	Makroarray-Hybridisierung	22
2.2.11	ChIP-chip-Experimente.....	23
2.2.11.1	Chromatinisolierung.....	23
2.2.11.2	Chromatin-Immunopräzipitation.....	23
2.2.11.3	Amplifizierung, Markierung und Hybridisierung der Chromatinproben.....	24
2.2.11.4	Bioinformatische Analyse.....	24
2.2.12	Heterologe Expressionssysteme zur Produktion von Proteinen.....	25
2.2.12.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> , Aufreinigung und MALDI-TOF-Analyse.....	25
2.2.12.2	Proteinexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	25
2.2.13	SDS-PAGE und Western Blot-Analyse	26
2.2.14	BiFC-Assay	26

2.2.15 Hefe-Zwei-Hybrid-System	27
2.2.15.1 Pistill-cDNA-Bank	27
2.2.15.2 Zwei-Hybrid-Analyse mit der Pistill-cDNA-Bank	27
2.2.15.3 Zwei-Hybrid-Analyse mit einer Eizell-cDNA-Bibliothek	27
2.2.15.4 DNA-Isolierung aus Hefe	28
2.2.15.5 Proteinextrakt aus Hefe	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Analyse der spezifischen Aktivität des <i>AtRKD2</i> -Promotors	29
3.1.1 Überprüfung der <i>AtRKD2</i> -Promotoraktivität	29
3.1.2 Mutationsanalyse der <i>AtRKD2</i> -Promotorregion	30
3.1.3 Bestimmung des <i>AtRKD2</i> -Transkriptionsstartpunkts	37
3.1.4 Sequenzvergleich der <i>cis</i> -regulatorischen <i>AtRKD2</i> -Region	37
3.2 Rekombinante Proteinexpression	39
3.2.1. Proteinexpression in <i>E. coli</i>	39
3.2.2. Rekombinante Proteinexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	43
3.3 Protein-Protein-Interaktionen	44
3.3.1 Untersuchungen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	44
3.3.1.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus <i>Arabidopsis</i> -Pistillen	44
3.3.1.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit der Pistill-cDNA-Bank aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.3.1.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer Eizell-cDNA-Bank	51
3.3.2 Versuch zur Bestätigung von gefundenen Protein-Protein-Interaktionen	54
3.3.3 Untersuchungen zu möglichen Proteininteraktionen innerhalb der <i>AtRKD</i> -Familie	56
3.4 Anwendung des Glucocorticoid-induzierbaren System auf <i>AtRKD</i>	58
3.4.1 Phänotypen der <i>AtRKD</i> -exprimierenden Pflanzen	60
3.4.2 Histologische Analyse der induzierten <i>AtRKD::GR</i> -Pflanzen	64
3.4.2.1 Kontinuierliche DEX-Induktion führt zur Repression meristemaler Auxinmaxima	68
3.4.2.2 Kontinuierliche DEX-Induktion beeinträchtigt nicht die Promotoraktivität von <i>ATML1</i>	70
3.4.2.3 <i>CLV3</i> und <i>WUS</i> sind in den lateralen Sprossmeristemen vom <i>AtRKD::GR</i> -Pflanzen aktiv	71
3.5 ChIP-chip-Analyse des <i>AtRKD2</i> -Proteins	75
4 Diskussion	80
4.1 Eine <i>cis</i> -regulatorische Region ist bestimmend für die Eizell-Aktivität von <i>AtRKD2</i> ..	80
4.2 <i>AtRKD</i> -Faktoren und ihre mögliche Funktionen als Protein-Interaktionspartner	84
4.3 <i>AtRKD</i> beeinflusst das apikale Sprosswachstum	87
4.4 Identifizierung putativer <i>AtRKD2</i> -Zielgene durch ChIP-chip-Analysen	90
4.5 Ausblick	94
5 Zusammenfassung	95
6 Summary	98
7 Literaturverzeichnis	101
8 Anhang	118

Verwendete Abkürzungen

AD	Transkriptions-aktivierende Domäne
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP/ NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumsalz
BD	DNA-bindende Domäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus
cDNA	komplementäre DNA
ChIP-chip	Chromatin-Immunopräzipitation <i>on chip</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
Cr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
DEX	Dexamethason
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FG	<i>female gametophyte</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GUS	β-Glucuronidase
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	molar, mol/ l
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RKD	RWP-RK-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
SAM	Hauptsprossmeristem, <i>shoot apical meristem</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
Ta	<i>Triticum aestivum</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Der Lebenszyklus von Pflanzen ist in der Regel durch zwei alternierende Generationen gekennzeichnet: der Generation des Gametophyten und der Generation des Sporophyten. Sporophyten bilden meiotisch reduzierte Mikro- und / oder Makrosporen aus. Aus den Sporen entwickeln sich durch Differenzierung Gametophyten, die wiederum Gameten erzeugen. Nach der Verschmelzung der Gameten, Eizelle und Spermium, entsteht eine Zygote, die den Beginn der neuen sporophytischen Generation darstellt und damit einen Lebenszyklus vollendet.

Bereits 1851 entdeckte Wilhelm Hofmeister den Generationswechsel der Samenpflanzen und deren phylogenetische Beziehung zu den Moosen und Farnen (Hofmeister, 1851). Dabei wurde deutlich, dass es bei den höheren Pflanzen eine Tendenz zur Reduzierung des Gametophyten auf wenige Zellen gibt. Während beispielweise bei Laubmoosen die grüne Moospflanze mit den endständigen Fortpflanzungsorganen den Gametophyten darstellt, ist bei isosporen Farnen der Gametophyt nicht mehr als ein autotroph lebendes Prothalliumgewebe. Die Samenpflanzen weisen nur noch wenige gametophytische Zellen auf, die frei auf einer Samenschuppe liegen (Gymnospermen) oder in das umgebende sporophytische Gewebe eingebettet sind (Angiospermen).

Bei Angiospermen entwickelt sich der männliche Gametophyt in der Anthere und besteht aus einer vegetativen Zelle sowie zwei Spermazellen. Der mehrzellige weibliche Gametophyt ist in das Ovulum eingebettet. Die Ovula bestehen aus einer Stielzone (Funiculus), aus meist zwei Hüllen (Integumenten) sowie dem von Integumenten eingeschlossenen Megasporangium (Nucellus). Der Übergangsbereich von Funiculus zu Nucellus wird als Chalaza und die am polaren Ende liegende Öffnung zwischen den Integumenten wird als Mikropyle bezeichnet.

1.1. Sexuelle Fortpflanzung *versus* Apomixis

1.1.1 Die Entwicklung des weiblichen Gametophyten und Befruchtung

Der weibliche Gametophyt spielt nachweislich eine wichtige Rolle während der sexuellen Fortpflanzung von Angiospermen. So wird nach der Bestäubung der einwachsende Pollenschlauch durch Signale der Ovula zu der Mikropyle gelenkt (Higashiyama et al., 2003; Johnson und Preuss, 2002). Während der doppelten Befruchtung, die ein charakteristisches Merkmal der sexuellen Fortpflanzung von Angiospermen darstellt, leiten Komponenten des Cytoskeletts die Spermien zur Ei- und Zentralzelle (Lord und Russell, 2002).

Die weibliche Gametophytenentwicklung bei Angiospermen beginnt mit der Auskeimung der aus der Megasporogenese hervorgegangenen meiotisch reduzierten, funktionalen Megaspore (Megagametogenese). Beide Phasen, Megasporogenese und Megagametogenese, können aufgrund von Variationen wie beispielsweise in der Anzahl mitotischer Teilungen und Anzahl der Kernverschmelzungen differenziert ablaufen. Am häufigsten ist der *Polygonum*-Typ der Gametophytenentwicklung, welcher bei ungefähr 70 % aller untersuchten Blütenpflanzen, einschließlich der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, vorkommt (Huang und Russell, 1992). Im Folgenden werden die Entwicklungsstadien des weiblichen Gametophyten vom *Arabidopsis Polygonum*-Typ beschrieben (Abb. 1-1).

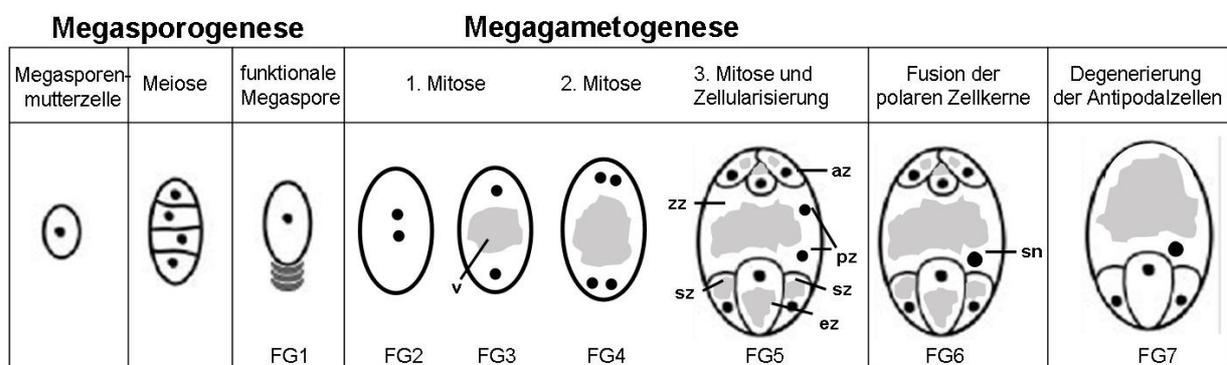


Abb. 1-1: Entwicklungsstadien des weiblichen Gametophyten bei *Arabidopsis thaliana*

Die Megasporogenese umfasst die meiotische Entwicklung der Megasporenmutterzelle bis hin zur funktionalen Megaspore. In der Megagametogenese entstehen und differenzieren die Gametenzellen. Die Einteilung der Stadien FG1 - FG7 (*female gametophyte*) erfolgte nach Christensen et al. (1997). Die Abbildung wurde nach Yadegari und Drews (2004) modifiziert. Abkürzungen: az Antipodenzellen, ez Eizelle, pz Polarzellkerne, sn sekundärer Nukleus, sz Synergidzelle, v Vakuole, zz Zentralzelle.

Aus einer hypodermalen Zelle des Nucellus geht durch Wachstum und Differenzierung die Megasporenmutterzelle hervor. Aus der diploiden Megasporenmutterzelle entstehen durch Meiose vier haploide Megasporen, wovon drei Megasporen einen programmierten Zelltod sterben. Mit der Weiterentwicklung der funktionalen Megaspore beginnt die zweite Entwicklungsphase des weiblichen Gametophyten. Die Megagametogenese ist charakterisiert durch drei haploide mitotische Teilungen, aus denen acht Zellkerne hervorgehen. Nach dem Zellularisierungsprozess besteht der reife Embryosack aus sieben Zellen: die Eizelle umgeben von zwei Synergiden, drei Antipoden und die Zentralzelle, in der zwei Kerne zu einem diploiden Zellkern verschmolzen sind.

Nachdem ein Pollenkorn durch Bestäubung auf die Narbe (Stigma) der Blüte gelangt ist, bildet der männliche Gametophyt einen Pollenschlauch aus. Dieser wächst nach dem

Erreichen eines Ovulums entlang des Funikulus durch die Mikropyle in den Embryosack hinein. Kurz vor dem oder bei dem Erreichen einer Synergide stirbt der Pollenschlauch einen programmierten Zelltod (Faure et al., 2002) und sein Inhalt ergießt sich in das Cytoplasma der degenerierten Synergide. Der Pollenschlauchkern degeneriert und die zwei Spermazellen bzw. ihre Kerne diffundieren in den interzellulären Raum zwischen den Plasmamembranen von Ei- und Zentralzelle. Während der doppelten Befruchtung verschmelzen die zwei Spermazellen unabhängig voneinander mit der haploiden Eizelle und mit der diploiden Zentralzelle, aus denen jeweils der diploide Embryo und das triploide Endosperm entstehen.

1.1.2 Apomiktische Entwicklung der Gametophyten

Die meisten Blütenpflanzen vermehren sich durch Kreuzung und / oder Selbstung sexuell weiter, wobei durch Meiose und Befruchtung individuelle Nachkommen mit verschiedenen Genotypen entstehen. Angiospermen können sich aber auch durch asexuelle Samenbildung (Apomixis) vermehren, bei der die Nachkommen genetisch identische Klone der Mutterpflanzen sind. Apomixis wurde bei 400 Arten aus mehr als 40 Pflanzenfamilien beobachtet (Carman, 1997) und findet in den Ovula von Blütenpflanzen statt.

Zwei grundlegende Mechanismen werden in der apomiktischen Reproduktion beschrieben. (I) Wenn sich Embryonen direkt aus dem Nucellus oder den Integumenten entwickeln (z. B. Gattung *Citrus*), ohne dass eine Embryosackentwicklung stattfindet, dann wird dieser Prozess als adventive Embryonie oder sporophytische Apomixis bezeichnet. (II) Die Entstehung von unreduzierten Embryosäcken aus apomiktischen Initialzellen der Ovula ist charakteristisch für die gametophytische Apomixis (Abb. 1-2). Dabei wird zwischen zwei Zelltypen, aus denen sich der unreduzierte Embryosack entwickelt, unterschieden. In diplosporen Apomikten wie *Boechera* ist die Initialzelle die Megasporenmutterzelle oder eine Zelle an der gleichen Position. In aposporen Apomikten wie *Hypericum* und *Hieracium* entstehen aus einer oder mehreren somatischen Zellen der Ovula (Aposporinialzellen) unreduzierte Embryosäcke. Aufgrund von Variationen in der Anzahl mitotischer Teilungen, der Einbeziehung meiotischer Teilschritte und der Gestalt des Embryosacks gibt es weitere Kategorisierungen für diplospore und apospore Apomikten (Crane et al., 2001; Albertini et al., 2010).

Zusammenfassend ist die apomiktische Vermehrung das Ergebnis komplexer Entwicklungsprozesse mit drei möglichen Hauptkomponenten: (I) die Vermeidung meiotischer Teilungen während der Embryosackentwicklung (Apomeiose), (II) der spontane befruchtungsunabhängige Beginn der Embryogenese (Parthogenese) und (III) die autonome (befruchtungsunabhängig) oder pseudogame (befruchtungsabhängig) Entwicklung des

Endosperms (Koltunow, 1993; Bicknell und Koltunow, 2004). Während apomiktische Pflanzen (z. B. *Taraxacum*, *Hieracium*) mit autonomer Endospermentwicklung die Befruchtung der Zentralzelle nicht benötigen, hängt die pseudogame Endospermentwicklung (z. B. *Poa pratensis*, *Hypericum*) von der Befruchtung der Zentralzelle ab. Apomixis kann sowohl bei aposporen Arten (z. B. *Ranunculus auricomus*) als auch bei Arten mit adventiver Embryonie fakultativ auftreten, d.h. es werden parallel sexuell und asexuell Embryonen gebildet. Im Gegensatz dazu sind diplospore Arten meist obligat apomiktisch.

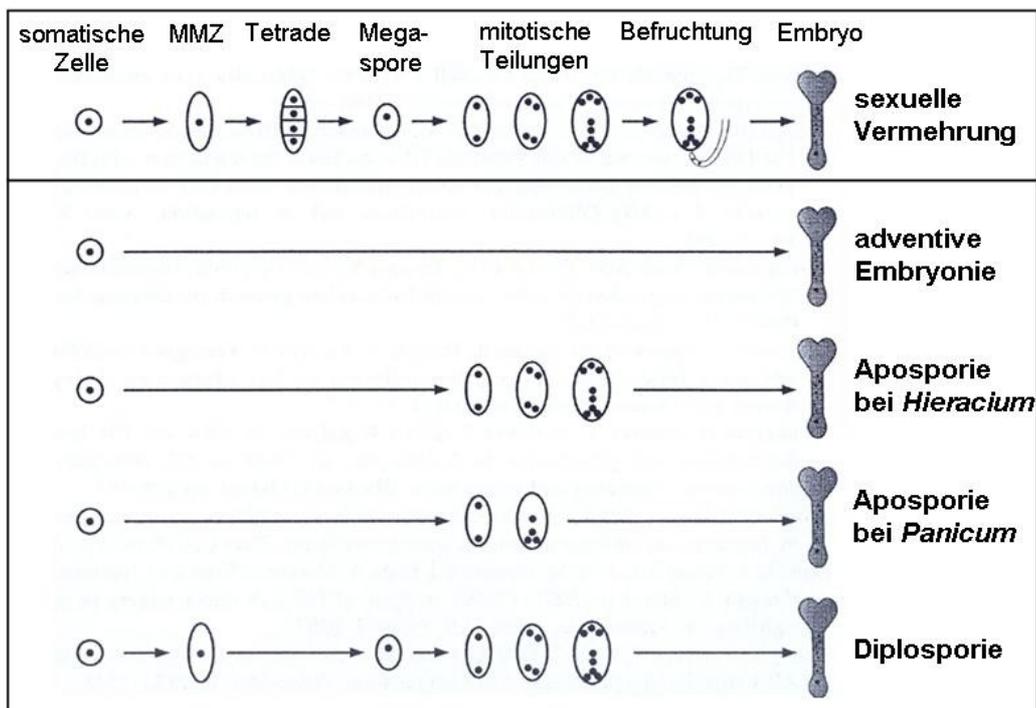


Abb. 1-2: Variationen in der weiblichen Gametophytenentwicklung bei Apomikten

Zum Vergleich der Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der weiblichen Gametophytenentwicklung ist die sexuelle Entwicklung nach dem *Polygonum*-Typ schematisch dargestellt. Variationen in der Apomixis treten durch unter anderem durch fehlende Meiose und verkürzte mitotische Teilungsschritte auf. Auch ist entscheidend, ob sich der Embryosack aus Archesporezellen bzw. der Megasporenmutterzelle (MMZ) entwickelt. Modifiziert nach Albertini et al. (2010).

Die gesammelten Daten von verschiedenen apomiktischen Pflanzenarten wie *Hieracium* ssp. *P. Pratensis* und *Tripsacum dactyloides* lassen vermuten, dass die gametophytische Apomixis von der Missexpression von Genen abhängt, die in der weiblichen Gametophytenentwicklung eine Rolle spielen (Tucker et al., 2003; Albertini et al., 2004). Über Gene, die Unterschiede in der zellspezifischen und entwicklungsabhängigen Expression zwischen Apomikten und ihren sexuellen Verwandten aufweisen, wurde berichtet (Pessino et al., 2001; Rodrigues et al., 2003; Chen et al., 2005; Sharbel et al., 2009). Es wird davon ausgegangen, dass die Deregulierung des sexuellen Fortpflanzungsprogramms zu Veränderungen in der

Zellentwicklung und damit zur Entstehung von Apomixis führt (Bicknell und Koltunow, 2004). Variationen in der Apomixis könnten durch die unterschiedliche Deregulation der molekularen Prozesse in der sexuellen Fortpflanzung entstanden sein (Koltunow und Grossniklaus, 2003).

Apomixis kann als ein Prozess der klonalen Vermehrung von Nachkommen durch Samenenwicklung verstanden werden. Diese Art asexuelle Vermehrung hat viele wichtige Vorteile für die Pflanzenzüchtung, besonders für die Fixierung von Hybrideffekten. Allerdings gibt es unter den landwirtschaftlich wichtigen Getreiden keine Arten, die sich apomiktisch vermehren. Auch haben mit wenigen Ausnahmen (z. B. *Tripsacum* und Mais) die apomiktischen Pflanzen keine landwirtschaftlich wichtige Verwandte (Bicknell und Koltunow, 2004; Albertini et al., 2005). Die Manipulation von regulierenden Faktoren der sexuellen Reproduktion stellt eine Möglichkeit dar, sich apomiktisch entwickelnde Embryonen in Kulturpflanzen zu produzieren (Yang et al., 2005). Die molekularen Prozesse über die Entwicklung des weiblichen Gametophyten sind bislang wenig verstanden. Genetische Analysen helfen, spezifisch regulierte Gene zu identifizieren und deren Bedeutung in der weiblichen Gametophytenentwicklung zu erkennen.

1.2. Genetische Analyse des weiblichen Gametophyten

Mit Mutagenese-Experimenten wurden sporophytische und gametophytische Mutanten vorwiegend in *Arabidopsis thaliana* produziert. Sporophytische Mutationen beeinflussen die Megasporenmutterzellen-Entwicklung, die Meiose und die von dem umgebenden sporophytischen Gewebe abhängigen gametophytischen Entwicklungsschritte wie z. B. die Polarisierung des weiblichen Gametophyten (Chaudhury et al., 1998; Gasser et al., 1998; Grossniklaus und Schneitz, 1998; Schneitz et al., 1998; Schneitz, 1999). Gametophytische Mutationen wirken sich auf die Entwicklung der haploiden Megaspore bis zum funktionalen weiblichen Embryosack, das Pollenschlauchwachstum, die Befruchtung und maternale Kontrolle der Samenenwicklung aus. Mit diesen Mutanten wurden Gene identifiziert, die für die Megagametogenese und frühe Embryogenese erforderlich sind (Christensen et al., 2002; Drews et al., 1998; Pagnussat et al., 2005; Yang und Sundaresan, 2000).

1.2.1 Identifizierung von entwicklungsspezifischen Faktoren

Funktionelle Charakterisierungen von Genen, die für die Entwicklung des weiblichen Gametophyten von Bedeutung sind, wurden zumeist in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Im

folgenden Abschnitt sind Faktoren beschrieben, welche einzelne Stadien der Gametophytenentwicklung beeinflussen.

Mit SPOROCTELESS (SPL)/ NOZZLE (NZZ) wurde ein Faktor identifiziert, der für die Initiation der Sporogenese in den weiblichen Blütenorganen erforderlich ist (Schieffthaler et al., 1999; Yang et al., 1999). Die Mutationen von MULTIPLE ARCHESPORIAL CELLS 1 (MAC1, Mais, Sheridan et al., 1996) und MULTIPLE SPOROCTE (MSP1, Reis, Nonomura et al., 2003) führte zu einer Entwicklung von mehreren Archesporozellen, was auf eine Funktion in der Zellspezifizierung hinweist.

Faktoren, die zu Beginn und während der Meiose der Megasporenmutterzelle eine Rolle spielen, sind unter anderem: AMEIOCTIC 1 (AM1, Mais, Pawlowskia et al., 2009), ANAPHASE PROMOTING COMPLEX-2 (Capron et al., 2003), NOMECA (Kwee und Sundaresan, 2003), PROLIFERA (Springer et al., 1995) und SWITCH1/ DYAD (SWI1/ DYAD, Mercier et al., 2003; Siddiqi et al., 2000).

Die Megagametogenese wird beeinflusst von Faktoren wie ARABINOGALACTAN PROTEIN 18 (AGP 18, Acosta-Garcia und Vielle-Calzada, 2004), CHROMATIN-REMODELING FACTOR11 (CHR11, Huanca-Mamani et al., 2005), INDETERMINANT GAMETOPHYTE 1 (IG1, Mais, Evans, 2007), MATERNAL GAMETOPHYTIC BASELESS 1 (Mais, Gutierrez-Marcos et al., 2006), RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR, Ebel et al., 2004) und SLOW WALKER 1 (SWA1, Shi et al., 2005).

Für den Vorgang der Befruchtung sind unter anderem folgende Faktoren von Bedeutung: AGAMOUS-LIKE 80 (AGL80, Portereiko et al., 2006), FERONIA (FER, Escobar-Retsrepo et al., 2007), MYB98 (Kasahara et al., 2005), GAMETOPHYTIC FACTOR 2, (GFA, Yang und Sundaresan, 2000; Christensen et al., 2002) und SIRENE (SRN, Rotman et al., 2003).

Die Kontrolle der Endospermibildung und Samenentwicklung erfolgt durch maternale Faktoren wie DEMETER (DME, Choi et al., 2002; Gehring et al., 2006), der Klasse der FERTILISATION INDEPENDENT SEED (FIS) Faktoren, FIS-ähnliche Faktoren (Grossniklaus et al., 1998; Guitton und Berger, 2005; Luo et al., 2000; Ohad et al., 1999) und dem Faktor FWA (Kinoshita et al., 2004).

1.2.2 Zellspezifität im weiblichen Gametophyten

Auch die molekularen Prozesse, die zur Spezifizierung der gametophytischen Zellen führen, sind bisher wenig verstanden. Die gametophytischen Zellen haben eine festgelegte Position im Embryosack. Die Antipoden sind am chalazalen Ende des Embryosacks und der Eiapparat (Eizelle und Synergiden) entgegengesetzt an der Mikropyle positioniert. Während die

Zellkerne der Synergiden und der Antipoden in Richtung der Mikropyle lokalisiert sind, ist der Zellkern der Eizelle in Richtung Chalaza ausgerichtet. Die entgegengesetzte Polarität der Zentralzelle und Eizelle bringt ihre Zellkerne in eine räumliche Nähe, was möglicherweise deren Fusion mit den zwei Spermien während der doppelten Befruchtung erleichtert. Es wird vermutet, dass die Position der Zellkerne innerhalb des weiblichen Gametophyten wichtig für die Zellspezifizierung ist (Moore et al., 1997; Pagnussat et al., 2007). Einige Studien unterstützen diese Annahme. In der Mais-Mutante *indeterminate gametophyte 1 (ig1)* wurden zusätzliche mitotische Teilungen während der Megagametogenese beobachtet, was zu einer Entwicklung von mehreren Ei- und Zentralzellen führte (Evans et al., 2007). Die Zellspezifizierung zu Ei- oder Zentralzelle hing von der relativen Position im Embryosack ab. In Mais sind kleine Ubiquitin-ähnlichen Proteine (diSUMO) an der Segregation und Positionierung der Zellkerne während der weiblichen Gametophytenentwicklung beteiligt (Srilungham et al., 2010).

Der Nachweis eines Auxingradienten in dem sich entwickelnden weiblichen Gametophyten in *Arabidopsis thaliana* führte zu der Vermutung, dass das Hormon Auxin an dem Prozess der Zelldifferenzierung beteiligt ist (Pagnussat et al., 2009). Vor Beginn der Zellularisierung des Embryosacks bildet sich ein Auxingradient mit einer hohen Konzentration am mikropylaren Ende und einer niedrigen Konzentration hin zum chalazalen Ende aus. Spezifische Auxinkonzentrationen könnten die Position und Spezifizierung der Zellen im weiblichen Gametophyten bestimmen. Allerdings bleibt zu klären, ob Auxin von den gametophytischen Zellen oder durch das umgebende sporophytische Gewebe produziert wird.

In *Arabidopsis thaliana* wurden Faktoren identifiziert, die an der Spezifizierung der gametophytischen Zellen beteiligt sind. Dazu gehören die *Splicing*-Faktoren LACHESIS (LIS), CLOTHO (CLO)/ GFA1 und ATROPUS (ATO) (Cury et al., 2007; Gross-Hardt et al., 2007; Moll et al., 2008). Die Mutation dieser Faktoren führte zur Aktivierung von Eizell-spezifischen Promotor-Reportergen-Konstrukten (Markern) in den Synergiden und zur Aktivierung von Zentralzell-spezifischen Markern in den Antipoden. Außerdem zeigten die Mutanten *clo* und *ato* eine Aktivierung von Eizell-spezifischen Markern in der Zentralzelle, was zu der Annahme führt, dass alle gametophytische Zellen die gleiche Fähigkeit besitzen, eine bestimmte Zellspezifität zu erlangen (Gross-Hardt et al., 2007). Es wird auch vermutet, dass eine Kommunikation einerseits zwischen Eizelle und Zentralzelle sowie andererseits zu den Synergiden und Antipoden existiert, die zur Erhaltung der Zellspezifität von Synergiden und Antipoden führen. In der Mutante *eostre* führte die ektopische Expression des Homeodomänen-Faktors BLH1 zur Entwicklung einer zusätzlichen Eizelle anstelle einer

Synergide (Pagnussat et al., 2007). BLH1 konnte aber noch nicht im Embryosacks des Wildtyps nachgewiesen werden und die Funktion des Faktors in der Spezifizierung der gametophytischen Zellen bleibt vorerst noch unklar.

1.2.3 Expressionsanalysen

Neben der funktionellen Charakterisierung einzelner Gene wurden vergleichende Expressionsanalysen durchgeführt, in denen die Genexpression zwischen Wildtyp- und Mutanten-Ovula verglichen wurde. Mit dieser Methode wurden Hunderte von Kandidatengenen in *Arabidopsis thaliana* (Jones-Rhoades et al., 2007; Johnston et al., 2007; Steffen et al., 2007; Yu et al., 2005) und Tabak (Ning et al., 2006) entdeckt, die im weiblichen Gametophyten aktiv sind. Die Isolierung von einzelnen gametophytischen Zellen des weiblichen Gametophyten ermöglichte es, zellspezifische cDNA-Bibliotheken unter anderem von Mais (Yang et al., 2006) und Weizen (Kumlehn et al., 2001; Sprunck et al., 2005) zu generieren.

1.3 Transkriptionelle Genregulation im weiblichen Gametophyten

Alle sporophytischen und gametophytischen Entwicklungs- sowie Differenzierungsprozesse basieren auf differentieller Genexpression. Die räumlich und zeitlich präzise Regulation der Genexpression erfolgt durch Kontrollmechanismen, die auf verschiedenen Ebenen wie bei der Transkription der DNA, der Prozessierung der mRNA, Translation, Modifikation der Proteine, Proteintransport, Proteinabbau und bei dynamischen Veränderungen der Chromatinstruktur wirken. Dabei kommt der Kontrolle der Transkriptionsrate eine wichtige Bedeutung für die gewebespezifische und entwicklungsabhängige Genexpression zu.

Für die Transkriptionsregulation ist die Promotorregion eines Gens entscheidend. Die Promotorregion weist kurze DNA-Sequenzen (*cis*-Elemente) auf, die als Erkennungssequenzen für die Bindung von Proteinen (*trans*-Faktoren, Transkriptionsfaktoren) dienen. Der basale Promotor, der sich in der Regel um -35 bp bis um +35 bp um die Position +1 des Transkriptionsstarts befindet (Smale, 2001), bildet die Erkennungsstelle für generelle Transkriptionsfaktoren (GTF) und die RNA-Polymerase II. Die Aktivität des Transkriptionsinitiationskomplexes (GTF und RNA-Polymerase II) wird durch die spezifische Bindung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren an *cis*-Elemente beeinflusst, die bis zu 100 bp (proximal) und in größeren Distanzen (distal) von dem Transkriptionsstart entfernt sind. Die regulatorischen Elemente können eine Verstärkung

(*Enhancer*) oder Unterdrückung (*Silencer*) der Genexpression bewirken. Grundsätzlich werden regulatorische Transkriptionsfaktoren als Proteine definiert, die eine sequenzspezifische DNA-Bindung aufweisen und die Gentranskription beeinflussen (Riechmann, 2002). Diese Transkriptionsfaktoren werden gewöhnlich gewebespezifisch so wie entwicklungsabhängig exprimiert. Die Transkriptionsregulation erfolgt meistens durch eine Bindung der regulatorischen Transkriptionsfaktoren an genspezifische *cis*-Elemente und die anschließende Interaktion des gebundenen Proteins direkt oder über Adaptorproteine mit dem Transkriptionsinitiationskomplex als auch mit Chromatin-modifizierenden Komplexen (Riechmann, 2002).

Über *cis*-Elemente, die die Regulation von weiblichen Gametophyt-spezifischen Genen steuern, ist bislang wenig veröffentlicht. Eine Methode zur Identifizierung unbekannter regulatorischer Promotorregionen ist die Herstellung von *Enhancer-Trap*-Linien in *Arabidopsis thaliana* (Grossniklaus et al., 2003). Das Prinzip ermöglicht die zufällige Integration von Transposonelementen gekoppelt an ein Reportergen und einen Minimalpromotor in proximale Genregionen, was zur Aktivierung des Minimalpromotors und damit zur entwicklungsabhängigen als auch gewebespezifischen Expression des Reportergens führen kann. Yang et al. (2005) identifizierten auf diese Weise ein 77 bp langes *EASE*-Element (*egg apparatus-specific enhancer*) in der Linie ET253, das eine spezifische Reportergenaktivität im Eiapparat bewirkt. Interessanterweise zeigten die zu der Region benachbarten Gene keine Eiapparat-spezifischen Expressionsmuster. Die durch das *EASE*-Element regulierte Genregion konnte bislang nicht identifiziert werden (Yang et al., 2005).

Eine andere Methode sind Bindungsstudien von regulatorischen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MYB DOMAIN Protein 98 (MYB98). Der Transkriptionsfaktor MYB98 ist in den Zellkernen der Synergiden lokalisiert und reguliert vermutlich Gene, die in der Pollenschlauchführung und in der Ausbildung des Filiformapparats aktiv sind (Kasahara et al., 2005; Punwani et al., 2007). Das Protein zeigte *in vitro* eine Bindung an die spezifische DNA-Sequenz GTAACNT (Punwani et al., 2007). Dieses *cis*-Element ist unter anderem in den Promotoren der Gene *DD11* und *DD18* (*downregulated in dif1*, DD) zu finden und reguliert deren transkriptionelle Aktivität in den Synergiden (Punwani et al., 2008; Steffen et al., 2007). Die Synergid-spezifische Aktivität von weiteren Genen wie *DD2* wird durch das in der Promotorregion lokalisierte *cis*-Element AACGT reguliert (Punwani et al., 2008). Dieses Motiv ist eine typische Bindungsstelle für bZIP-Transkriptionsfaktoren (Jakoby et al., 2002),

was auf einen bZIP-Faktor als Regulator und eine indirekte Regulation durch MYB98 hinweist.

Neben MYB98 wurden weitere Gene funktionell in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert, die mutmaßlich regulierende Funktionen während der weiblichen Gametophytenentwicklung aufweisen. Dazu gehören die Faktoren AGAMOUS-LIKE 23, 61 und 80 (AGL), welche der Klasse der MADS-Box I-Faktoren zugeordnet werden. *AGL80* und *AGL61* werden ausschließlich in der Zentralzelle exprimiert. Die Mutation beider Gene führte zu ähnlichen Resultaten: in den Mutanten ließen sich keine Zentralzellen-spezifische Marker nachweisen und es wurden keine Befruchtung der Zentralzelle bzw. kein Endospermwachstum beobachtet (Bemer et al., 2008; Portereiko et al., 2006). Da die Gene *AGL80* und *AGL61* nur im reifen Embryosack exprimiert werden, wird eine Funktion in der Regulierung der Zellspezifität der Zentralzelle vermutet. Hierbei ist *AGL61* wahrscheinlich ein Interaktionspartner von *AGL80* (Steffen et al., 2008). Das Heterodimer *AGL61-AGL80* aktiviert möglicherweise die Transkription der Gene *DEMETER*, *DD46* und reprimiert die Transkription der Gene *DD1*, *DD3* in der Zentralzelle. Ein anderer MADS-Box-Faktor *AGL23* beeinflusst den Beginn der Megagametogenese (Colombo et al., 2008). In *agl23* Mutanten konnte sich die funktionale Megaspore nicht weiter entwickeln. Die genaue Rolle des Proteins in der Megasporogenese muss noch aufgeklärt werden (Colombo et al., 2008).

Der Faktor *VERDANDI* wird der B3-Domänen-Familie zugeordnet (Matias-Hernandez et al., 2010). Die Mutation von *VERDANDI* führte zum teilweisen Verlust der Zellspezifität von den Synergiden und Antipoden. In den Mutanten wurde ein Pollenschlauchwachstum in die Synergiden beobachtet, aber es erfolgte keine Befruchtung. Auch die Funktion von *VERDANDI* muss noch geklärt werden (Matias-Hernandez et al., 2010).

Weiterhin beschreiben Wang et al. (2010) 17 Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und im Embryosack transkriptionell aktiv sind. Von diesen Genen zeigten 10 eine spezifische Promotor-GFP-Aktivität in den Antipoden (*NAC95*, At5g56200, *ARF15*, *ZFP6*, At2g22750, At5g01380), in der Eizelle (*ABI4*, *WOX8*) und in der Zentralzelle (At5g27880, At5g50490) des reifen Embryosacks. Um Rückschlüsse auf die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des weiblichen Gametophyten ziehen zu können, sind funktionelle Analysen erforderlich.

1.4 Die RWP-RK-Familie in Pflanzen

1.4.1 Identifizierung von RWP-RK-Faktoren

Die RWP-RK-Domäne wurde ursprünglich als Teil einer konservierten Region in der Proteinstruktur des NODULE INCEPTION Proteins (NIN) aus *Lotus japonicus*, das für die Bildung von Wurzelnodulen erforderlich ist, identifiziert (Schauser et al., 1999). Die Region wurde nach der konservierten Aminosäureabfolge in der Konsensussequenz benannt. Homologe Gene wurden durch Sequenzvergleich in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* gefunden (Schauser et al., 2005). Strukturvorhersagen zu den RWP-RK-Proteinen führten zu der Vermutung, dass die Faktoren sowohl an DNA als auch an Proteine binden können (Schauser et al., 1999). Aufgrund von Sequenzunterschieden in der konservierten Domäne und der Länge der Proteine wurde die RWP-RK-Familie in die Subfamilien NIN-like PROTEIN (NLP) und RWP-RK DOMAIN PROTEIN (RKD) unterteilt.

NLP-Proteine weisen eine zusätzliche PB1-Domäne auf. Die PB1-Domäne ist für Protein-Protein-Interaktionen bedeutend und wurde auch in tierischen Proteinen wie dem Transmembranrezeptor NOTCH aus *Drosophila* identifiziert (Ponting et al., 2002; Schroeter et al., 1998). In höheren Pflanzen wurden Mitglieder der NLP-Subfamilie bisher nur in *Lotus japonicus* (Schauser et al., 1999), *Pisum sativum* (Borisov et al., 2003) sowie *Medicago truncatula* (Marsh et al., 2007) funktionell charakterisiert. Die identifizierten NLP-Proteine sind an der Ausbildung von Wurzelnodulen beteiligt.

Sequenzvergleiche auf Grundlage der konservierten Domäne zeigten, dass RKD-Faktoren in pflanzlichen Organismen vorkommen und im Gegensatz zu NLP-Faktoren keine Homologien zu tierischen Proteinen zeigen (D. Koszegi, unveröffentlichte Daten). Eine strukturelle Ähnlichkeit zu den RKD-Faktoren in höheren Pflanzen weist das Protein MINUS DOMINANCE (MID) von *Chlamydomonas reinhardtii* auf (Schauser et al., 1999). MID bestimmt die Entwicklung von *minus*-Gameten während der Gametogenese durch Kontrolle der Expression *minus*-spezifischer Gene und Repression der Expression *plus*-spezifischer Gene (Ferris und Goodenough, 1997; Goodenough et al., 2007). Das Protein ist für die Gametendifferenzierung in *Chlamydomonas reinhardtii* entscheidend (Ferris und Goodenough, 1997). Interessant ist, dass ein Stickstoffmangel, der notwendig für die Nodulenbildung bei Leguminosen ist, auch eine Voraussetzung für die Expression des *MID*-Gens darstellt.

In *Pleodorina starrii* wurde ein RKD-ähnliches Gen identifiziert (Nozaki et al., 2006). Das Protein wird in Zellkernen von Spermien synthetisiert, was auf eine Funktion in der männlichen Gametogenese hinweist. Auch hier ist Stickstoffmangel entscheidend für die Proteinsynthese.

In Weizen führte der Sequenzvergleich Eizell-spezifischer Sequenzen einer cDNA-Bibliothek aus Eizellen (Kumlehn et al., 2001) gegen EST-Sequenzen von monokotylen Pflanzen zur Identifizierung und Isolierung von *TaRKD1* und *TaRKD2* (Koszegi, 2008). Diese *TaRKD*-Gene werden im Eiapparat des reifen Embryosacks sowie in der Zygote exprimiert.

1.4.2 RKD in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis thaliana* wurden 9 Mitglieder der NLP-Subfamilie und 5 Mitglieder der RKD-Subfamilie identifiziert (Schauser et al., 2005), welche als AtRKD1 (At1g18790), AtRKD2 (At1g74480), AtRKD3 (At5g66990), AtRKD4 (At5g53040) und AtRKD5 (At4g35590) bezeichnet werden. Die *AtRKD*-Gene kodieren für kleine Proteine (256 bis 370 Aminosäuren), die das RWP-RK-Motiv und eine putative Zipper-ähnliche Region gemeinsam haben (Abb. 1-3).

		↓	↓	↓	↓					
AtRKD1	VSKT	LSKETI	SL	YFYMPITQ	AAARELNI	GLTLLK	KRCRELGI	KRWP	PHRKLMSL	LQKL
AtRKD2	APTT	LSKETV	SP	YFYMPITQ	AAIALNVGLT	LLKRR	CRELGI	RRWP	PHRKLMSL	NLTL
AtRKD3	VINNM	SREMMKQ	YFYMPITKA	AAKELNI	GVTL	LLKKR	CRELGI	PRWP	PHRKLTL	SLNAL
AtRKD4	RQDK	LEMSEIKQ	FF	DRPIMKAA	KELNVGLT	TVLKKR	CRELGI	YRWP	PHRKLKLS	LNSL
AtRKD5	HVAEL	SLEELSKY	YFDL	TIVEASRNL	KVGLTV	LKKK	CREFGI	PRWP	PHRKI	KSLDCL
CrMID	KKADL	TLHDISA	FF	HLPVKA	AASCLGVSQ	TYLKI	LCRR	LGIDR	WPYRK	VASVKKH
TaRKD1	SLDH	IGFEEELRT	YFYMPITKA	AAREMNVGLT	TVLKKR	CRELGI	VARWP	PHRKMKS	LRSL	
TaRKD2	SLDH	IGFEEELRT	YFYMPITKA	AAREMNVGLT	TVLKKR	CRELGI	VARWP	PHRKMKS	LRSL	
Consensus	L	LS	EEIS	YFYMPITKA	AARELNVGLT	TVLKKR	CRELGI	RWP	PHRKLKLS	LNSL

Abb. 1-3: Sequenzvergleich der konservierten RWP-RK-Domäne von RKD-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* und *Triticum aestivum* mit dem *Chlamydomonas* MID-Protein

Aminosäuren, die identisch zwischen RKD-Proteinen und MID sind, werden mit gelbem Hintergrund dargestellt. Konservierte Aminosäuresequenzen sind blau unterlegt bzw. ähnliche Aminosäuresequenzen sind grün unterlegt. In der putativen Zipper-ähnlichen Domäne sind durch Pfeile die Positionen der hydrophoben Aminosäuren an jeder 7. Stelle gekennzeichnet. At *Arabidopsis thaliana*, Cr *Chlamydomonas reinhardtii*, Ta *Triticum aestivum*

Untersuchungen zur *AtRKD*-Subfamilie durch Koszegi (2008) zeigten, dass Transkripte von *AtRKD1-4* ausschließlich in Blüten nachweisbar sind und *AtRKD1* sowie *AtRKD2* Eiapparat- bzw. Eizell-spezifisch im weiblichen Gametophyten exprimiert werden. Transkripte von *AtRKD5* wurden auch im Stängel, Schoten und Wurzeln von *Arabidopsis*-Pflanzen detektiert. Die Hypothese, dass RWP-RK-Proteine als regulatorische Faktoren wirken (Schauser et al., 1999), wird durch den Nachweis der Lokalisierung von AtRKD-Faktoren im Zellkern

(Koszegi, 2008) unterstützt. Die ektopische Missexpression von *AtRKD1* und *AtRKD2* führte zur Kallus-ähnlichen Gewebeentwicklung bei der Samenkeimung. In den *AtRKD1*- und *AtRKD2*-überexprimierenden Geweben ließen sich Gametophyt-exprimierte Gene nachweisen. Insgesamt geben die Daten Anlass zur Vermutung, dass RKD-Faktoren an der Differenzierung der Eizelle während der Gametogenese des weiblichen Gametophyten beteiligt sind (D. Koszegi, unveröffentlichte Daten).

Die Eizell-spezifische Aktivität der RKD-Faktoren eröffnet die Möglichkeit, sie für die Manipulation parthenogenetischer Vorgänge einzusetzen. Dazu ist jedoch eine tiefere eingehende Charakterisierung der RKD-Faktoren notwendig.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Identifizierung und erste Charakterisierung von Mitgliedern der RKD-Familie in *Triticum aestivum* und *Arabidopsis thaliana* führten zu der Annahme, dass RKD-Faktoren wichtige Regulatoren in der Eizell-Differenzierung bei Angiospermen darstellen. Ihre molekularen Funktionen sind immer noch weitgehend unbekannt. Die Lokalisation im Zellkern sowie ihre Domänenstruktur weisen darauf hin, dass es sich um Transkriptionsfaktoren handeln könnte, die mit Proteinen interagieren und sequenzspezifisch an DNA binden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur funktionellen Charakterisierung von RKD-Faktoren in *Arabidopsis thaliana* zu liefern. Dazu wurde nach möglichen Interaktionspartnern sowie nach Zielgenen der putativen Transkriptionsfaktoren gesucht. Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, wie die Gametophyt-spezifische Regulation von *AtRKD*-Genpromotoren erfolgen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammen, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Difco Laboratories (Detroit/ Michigan, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), Roche (Basel, Schweiz), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Schütt GmbH (Göttingen, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland).

Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 2001) angesetzt.

2.1.2 Enzyme

Im folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Enzyme aufgeführt.

Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

New England BioLabs GmbH (Schwalbach, Deutschland)

MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.1.3 Antikörper

<u>erster spezifischer Antikörper</u>	<u>eingesetzte Verdünnung</u>
Anti-Polyhistidin (Sigma H1029)	1:3000
Anti-GFP (Roche 11814460001)	1:4000
Anti-Myc (U. Conrad, IPK)	1:50
<u>zweiter spezifischer Antikörper</u>	<u>eingesetzte Verdünnung</u>
Alkalische Phosphatase (Sigma A3562)	1:1000
Peroxidase (Sigma A9044)	1:10000

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Bakterien

Folgende *Escherichia coli* Stämme wurden in den Experimenten verwendet. Zur Vermehrung von Gateway-Vektoren wurde der Stamm DB3.1 verwendet. Die Stämme DH5 α und XL1blueMRF⁻ dienen zur Klonierung von in Vektoren ligierten Fragmenten. In dem Stamm

XLOLR wurden ausgeschnittene Phagemide für die Herstellung einer Pistill-cDNA-Bank vermehrt. Zur Proteinexpression in *E. coli* wurde der Stamm M15 verwendet.

DB3.1	F ⁻ , gyrA462, endA1, Δ(sr1-recA), mcrB, mrr hsdS20(rB -, mB-), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2 rpsL20(Smr), xyl5, Δleu, mt11	Invitrogen, USA
DH5α	F ⁻ , end A1, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), gyrA96, relA1, supE44, L ⁻ , recA1, 80dlacZM15, Δ(lacZYAargF) U196	Hanahan, 1983
XL1blue MRF ⁺	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1. supE44 thi-1, recA1, gyrA9, relA1, lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Kanada
XLOLR	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi-1, recA1,gyrA96, relA1, lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] Su ⁻ (<i>nonsuppressing</i>), λR	Stratagene, Kanada
M15 [pREP4]	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen, Deutschland

Zur Pflanzentransformation wurden folgende *Agrobacterium tumefaciens* Stämme verwendet.

pGV2260 Deblaere et al., 1985

pGV3101 Koncz und Schell, 1986
(pMP90)

2.1.4.2 Hefen

Basierend auf dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde mit zwei Protokollen und folgenden Hefestämmen gearbeitet: YRG-2 (Stratagene, Kanada) sowie A109 und Y187 (Clontech, USA). Eine wichtige Eigenschaft ist die Auxotrophie der Stämme für Tryptophan, Leucin, Histidin und bei A109 zudem für Adenin. Ein weiteres Reportergen ist *lacZ*.

YRG-2	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::UASGAL1- TATA, GAL1-HIS3, URA3::UASGAL4 17mers(x3)- TATACYC1-lacZ	Callahan et al., 1995
A109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4D, gal80D, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UASGAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS- MEL1TATA-lacZ	James et al., 1996
Y187	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4D, met ⁻ , gal80D, URA3::GAL1UAS- GAL1TATAlacZ	Harper et al., 1993

2.1.4.3 Pflanzen

Die Untersuchungen und Transformationen wurden an Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* Typ Columbia-0 (Col0) und Suspensionkulturen Typ C24 durchgeführt. Weiterhin wurden für transiente Proteinexpressionen Tabakpflanzen *Nicotiana benthamiana* verwendet.

2.1.5 Plasmide

2.1.5.1 *E.coli* Vektoren und Provektoren

Klonierungen und die Vermehrung von Konstrukten sowie Expression von Proteinen wurden mit folgende Vektoren durchgeführt.

pDONR201	Gateway Donorvektor	Invitrogen, USA
pDONR223	Gateway Donorvektor	Invitrogen, USA
pDONR207	Gateway Donorvektor	Invitrogen, USA
pDONRzeo	Gateway Donorvektor	Invitrogen, USA
p35S-GAD-GW	Gateway Donorvektor, kodiert für GAL4-aktivierende Domäne	Ehlert et al., 2006
p35S-GBD-GW	Gateway Donorvektor, kodiert für Bindedomäne des GAL4-Proteins	Ehlert et al., 2006
p35S-HA-GW	Gateway Donorvektor mit N-terminaler HA-Fusion	Ehlert et al., 2006
pGAL4-UAS-GUS	Vektor mit GAL4-Bindestellen, kodiert für die β -Glucuronidase	Ehlert et al., 2006
p35S-SPYCE-GW	Gateway Binärvektor, kodiert für den C-terminalen Part des Gens <i>GFP</i>	Walter et al., 2004
p35S-SPYNE-GW	Gateway Binärvektor, kodiert für den N-terminalen Part des Gens <i>GFP</i>	Walter et al., 2004
p35S::R1R2:: Δ GR	Gateway Binärvektor mit kodierender Sequenz für die GR-Domäne	Baudry et al., 2004
pKGWFS7,0	Gateway Binärvektor, kodiert für das chimäre Reporter gen <i>eGFP-GUS</i>	Karimi et al., 2002
pCR2.1	Klonierungsvektor	Invitrogen, USA
pQE30	Vektor zur Proteinexpression mit N-terminaler HIS ₍₆₎ -Fusion	Qiagen, Deutschland
pQE60	Vektor zur Proteinexpression mit C-terminaler HIS ₍₆₎ -Fusion	Qiagen, Deutschland
pICH-M-10990	5'-Provektor für Proteinexpression mit N-terminaler HIS ₍₆₎ -Fusion	Zimmermann et al., 2009
pICH10570	3'-Provektor für Proteinexpression	Icon Genetics, Deutschland
pICH14011	Vektor mit kodierender Sequenz für die DNA-Integrase	Icon Genetics, Deutschland

2.1.5.2 Hefepasmide

Zur Expression von Fusionsproteinen mit der aktivierenden oder DNA-bindenden Domäne des GAL4-Proteins wurden verschiedene Vektoren für die Durchführung der zwei Protokolle verwendet.

Protokoll der Firma Stratagene (Kanada)

pBD-GAL4cam	Binärer Vektor zur Expression von Proteinen mit Fusion an die DNA-bindende Domäne des GAL4-Faktors
pGAL4	Positivkontrolle des Hefe-Zwei-Hybridsystems, kodiert für den GAL4-Transkriptionsfaktor
pBD-WT	Positivkontrolle, kodiert für Fusionsprotein C-Fragment lambda C-Repressor und der GAL4-DNA bindenden Domäne
pAD-WT	Positivkontrolle, kodiert für Fusionsprotein C-Fragment lambda C-Repressor und der GAL4-aktivierenden Domäne
pLaminC	Negativkontrolle, kodiert für Fusionsprotein LaminC (Mensch) und der GAL4-DNA bindenden Domäne

Protokoll der Firma Clontech (USA)

pGADT7	Binärer Vektor zu Expression von Proteinen als Fusion mit der aktivierenden Domäne des GAL4-Faktors
pGBKT7	Binärer Vektor zu Expression von Proteinen als Fusion mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Faktors
pGBKT7-53	Positivkontrolle, kodiert für Fusionsprotein zwischen p53 (Maus) und der GAL4-DNA bindenden Domäne
pGADT7-T	Positivkontrolle, kodiert für Fusionsprotein zwischen SV40 T-Antigen und der Gal4 aktivierenden Domäne
pGBKT7-Lam	Negativkontrolle, kodiert für Fusionsprotein zwischen Lamin C (Mensch) und der DNA-bindenden Domäne von GAL4

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Deutschland) sowie von der Firma Invitrogen (Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang A aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungsmethoden

Für die Klonierungsarbeiten wurden Standardtechniken (Ligation, Restriktionsverdau, PCR, Gelelektrophorese nach Sambrook et al., 2001) und die GATEWAYTM-Methode (Invitrogen,

USA) angewendet. Rekombinante Plasmide wurden mit dem DNA-Isolierungskit (Fermentas, Deutschland) isoliert und Fragmente aus dem Agarosegel mit dem QIAquick[®] Gelextraktionskit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt.

2.2.2 Quantitative *real-time* PCR

Aus Pflanzenmaterial wurde Gesamt-RNA isoliert (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Deutschland). 1-2 µg der Gesamt-RNA wurden in cDNA umgeschrieben (Revert Aid[™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Litauen). Pro PCR-Reaktion (10 µl) wurden 5µl Master-Mix (SYBR *green master mix reagent*, Applied Biosystems, USA) und 0,5 µM Primerpaare eingesetzt (Czechowski et al., 2004). Zur Durchführung der quantitativen *real-time* PCR wurde das Gerät ABI PRISM 7900 HAT qRT-PCR (Applied Biosystems, USA) verwendet.

2.2.3 Amplifikation vom 5'-cDNA-Enden

Um die Größe der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von *AtRKD2* zu bestimmen, wurde aus *Arabidopsis*-Blüten Gesamt-RNA isoliert. Nach der mRNA-Isolierung (Dynabeads mRNA direct Kit, Dynal Biotech, Deutschland) erfolgte eine cDNA-Synthese gemäß dem SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA). Die Amplifizierung der 5'-UTR wurde mit einem genspezifischen Primer AtRDK2_475rev (Anhang A) und dem Kit-spezifischen 5' PCR Primer II A durchgeführt. Die amplifizierten Banden wurden aus dem Agarosegel isoliert, in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen, USA) ligiert und in *E. coli* transformiert.

2.2.4 Transformation von *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* und Hefe

Plasmide wurden mit der Hitzeschock-Methode (Cohen et al., 1972) in *E. coli* transferiert. Der Hitzeschock wurde für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Nach der Zugabe von 700 µl SOC-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefe, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 0,4 % Glucose) wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C geschüttelt, auf LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, pH 7,0) mit dem entsprechenden Zusatz an Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde mit der Gefrier-Tau-Methode (Höfgen und Willmitzer, 1988) durchgeführt. Nach der Zugabe von 1 ml YEB-Medium (0,5 % Bakto-Fleischextrakt, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % Pepton, 5 % Saccharose, 2 mM MgSO₄, 1,5

% Agar) wurden die Zellen 3 bis 4 Stunden bei 28°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf YEB-Medium mit 50 µg/ ml Rifampicin sowie dem entsprechenden Zusatz an Antibiotika ausgestrichen und für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

Hefetransformationen erfolgten nach der LiAc-Methode von Gietz und Woods (2002). Die Transformanten wurden auf entsprechenden Minimalmedium (SD-Medium, 0,67 % *Bacto-yeast nitrogen base*, 2 % Glucose, 2 % Baktoagar) ohne Leucin (0,01 %) und / oder Tryptophan (0,002 %) ausgestrichen. Zur Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen fehlten dem Medium zusätzlich Histidin (0,002 %) bzw. Histidin und Adenin (0,02 %).

2.2.5 Aufzucht und Transformation von *Arabidopsis*- Pflanzen

Die Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen bei 23°C (16 h Licht, 8 h Dunkelheit). Von den Blütenständen 6 Wochen alter Pflanzen wurden ausgebildete Schoten und offene Blüten entfernt. Agrobakterienkulturen (Stamm pGV2260) wurden bis zu einer Bakteriendichte $OD_{600} > 2,0$ angezogen und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde im Infektionsmedium (0,3 % MS-Salze, 0,5 % Saccharose, 0,04 % Silwet L-77, pH 5,7), welches 1 % Vitaminlösung enthält (0,01 % Thiamin-HCl, 5 % Pyridoxin-HCl, 0,005 % Nicotinsäure, 5 % MES, 1 % Inosit), resuspendiert und auf eine Dichte von $OD_{600} = 0,8$ verdünnt. Transformationen erfolgten mit der Floral-Dip-Technik (Clough und Bent, 1998). Die Pflanzen wurden liegend in abgedeckten Schalen bei hoher Luftfeuchte für 24 h inkubiert, in den Lichtraum zurückgestellt und bis zur Samenreife aufgezogen.

Für *in vitro* Kulturen wurden *Arabidopsis*-Samen oberflächensterilisiert. Dazu wurde das Saatgut für 2 Minuten in 70 % Ethanol und 10 Minuten in 5 % NaOCl behandelt. Nach mehrmaligen Waschschritten mit H₂O (2x2 min, 1x5 min, 3x10 min) wurden die Samen auf MS-Medium (4,6 % MS, 1 % Saccharose, 10 ml Vitaminlösung, 0,8 % Agar, pH 5,8) mit dem entsprechenden Zusatz an Antibiotika ausgelegt (Murashige und Skoog, 1962). Nach zwei Wochen Selektion wurden die überlebenden Pflanzen auf Erde umgesetzt, aufgezogen und das Saatgut geerntet.

2.2.6 Transformation in *Arabidopsis*-Protoplasten und GUS-Messung

Embryonale *Arabidopsis*-Suspensionskulturen wurden für die Herstellung von Protoplasten verwendet. Zur Freisetzung der Protoplasten wurden die Zellen mit 1,8 % Cellulase R10 und 0,9 % Macerozym R10 (Duchefa, Niederlande) sowie 0,8 M Saccharose im K3-Medium (Nagy und Maliga, 1976) über Nacht bei 22°C inkubiert. Freigesetzte Protoplasten wurden durch ein 80 µ-Sieb filtriert, zweimal mit W5-Lösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl, 5,4 mM

KCl, 0,1 % Glucose, pH 5,6) und zweimal mit MgMannit-Lösung (0,45 M Mannitol, 15 mM MgCl, 0,1 % MES, pH 5,6) gewaschen. Die Protoplastendichte wurde mittels der Thomakammer bestimmt und auf 3×10^6 Protoplasten / ml MgMannitlösung eingestellt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurde ein Hitzeschock für 5 Minuten im 42°C warmen Wasserbad durchgeführt. Pro Transformationsansatz wurden 10 µg DNA und 160 µg Kalbsthymus-DNA (Invitrogen, USA) mit 330 µl der Protoplastensuspension gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl PEG6000-Lösung (0,1 M Ca(NO₃)₂, 0,4 M Mannitol, 40 % PEG6000, pH 6,5) wurden die Proben für 20 Minuten bei RT inkubiert und in 4 ml Nährlösung (250 ml K3-Medium, 0,4 M Mannitol, 3 % Saccharose, pH 5,8, 1 mg·l⁻¹ Benzylaminopurin, 2 mg·l⁻¹ α-Naphtylelessigsäure, 1 mg·l⁻¹ 2,4-D) verdünnt. Die Proben wurden im Dunkeln 24 bis 48 Stunden bei 22°C inkubiert. Die GUS-Aktivität wurde mit einem *chemiluminescence*-Assay (Tropix GUS light Kit, Applied Biosystems, USA) am Luminometer (Lumat LB9501, Berthold, Deutschland) bestimmt. Jedes Experiment wurde dreimal unter Verwendung unabhängiger Plasmidpräparationen und Zellkulturen durchgeführt. Von den ermittelten GUS-Aktivitätswerten wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet und durch 10⁵ dividiert (relative GUS-Aktivität).

2.2.7 Induktionsexperimente mit transgenen *Arabidopsis* RKD::*GR*-Linien

Für die Langzeit-Induktion wurden transgene Samen und Wildtyp-Samen (Col-0) auf MS-Medium, das entsprechend Dexamethason (DEX) mit einer Endkonzentration von 10 µM enthält (Induktionsmedium), und zur Kontrolle auf MS-Medium mit der äquivalenten Menge an Ethanol (Kontrollmedium) ausgelegt. Dem Kontrollmedium wurde eine Endkonzentration von 0,1 % Ethanol zugegeben, da Ethanol das Lösungsmittel für DEX ist. Für Kurzzeit-Induktionen wurden zwei Wochen alte Pflanzen in flüssiges MS-Medium mit entsprechenden DEX- und Ethanolkonzentrationen (10 µM bzw. 0,1 % Endkonzentration) überführt und unter langsamen Schütteln im Lichtraum inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Histologische Analysen von *Arabidopsis*-Pflanzen

Für den Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde eine GUS-Stammlösung (30 mM Na₃PO₄, 10 mM EDTA, 0,01 % Triton X-100, 0,1 mg/ ml Chloramphenicol, pH 7,0) hergestellt. Die präparierten Pflanzengewebe wurden mit frisch angesetzter GUS-Färbelösung (10 ml GUS-Stammlösung, 2 mM Kalium-Ferrocyanid, 2 mM Kalium-Ferricyanid, 10 mg X-Gluc) überschichtet. Nach 10 min Vakuuminfiltration wurden

die Proben bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die GUS-Färbelösung entfernt und 75 % Ethanol zugegeben. GUS-Färbungen wurden mit dem Lichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss, Deutschland) untersucht. Die „en block“ Methode erwies sich als sehr hilfreich bei der schnelle Bestimmung der GUS-Färbung. Der Keimling wurde als ganze Pflanze oder ohne Wurzel für 15 Minuten in H₂O inkubiert. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die rehydrierten Proben in einem Tropfen Hoyers Lösung (auf 5 ml H₂O 3g Gum Arabicum, 2 ml 100 % Glycerin und 20 g Chloralhydrat) auf einem Objektträger gebracht und mit einem Deckglass verschlossen.

Für eine genauere Lokalisierung der GUS-Färbung wurden die Proben in Kunstharz eingebettet und Dünnschnitte angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die in 75 % Ethanol aufbewahrten Proben zuerst mit 90 % und 100 % Ethanol vollständig entwässert und anschließend stufenweise mit 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Spurr infiltriert. Die Spurr-Infiltration erfolgte entweder nach Standardvorschrift bei Zimmertemperatur oder mit Hilfe einer Spezialmikrowelle (siehe Anhang D). Nach der Polymerisation des Harzes in einem Ofen bei 70°C wurden am Mikrotom (Reichert-Jung Ultracut S, Leica, Österreich) Semidünnschnitte angefertigt. Fertige Schnitten wurden in einem Tropfen filtrierten Krystalviolett (0,0004 %) auf einem Deckglas bei 80°C eingebacken und gleichzeitig gefärbt. Frischproben wurden chemisch mit 0,5 % Glutaraldehyd sowie 2 % Formaldehyd in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 und 0,05 % Triton X-100 fixiert. Die Inkubationszeit betrug entweder zwei Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 5°C. Nach drei Waschschrritten mit Phosphatpuffer wurde die Proben wie oben beschrieben entwässert, in Spurr eingebettet, geschnitten und gefärbt.

Die Lokalisation von syntetisierten GFP-Konstrukten in Frischpräparaten wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Deutschland) untersucht. GFP (E_{max} 512 nm) wurde mit einer Laser-Linie von 488 nm angeregt und die Emission mit einem Bandpass-Filter von 505-530 nm gemessen. Die Authentizität des Fluoreszenzsignals wurde durch eine photospektrometrische Analyse mit dem Meta-Detektor bestätigt. Für die Darstellung von Chlorophyll wurde die Probe mit einer Laser-Linie von 488 nm angeregt und die rote Autofluoreszenz von Chlorophyll (E_{max} ~ 680 nm, Longpass-Filter 650 nm) gemessen. Für eine bessere Qualität der Bilder und eine genauere Lokalisierung des GFP-Signals wurden bei der Untersuchung von Samenanlagen die Stempel geöffnet und die Ovula isoliert. Bei den Studien am apikalen Sprossmeristem wurden die Proben zuerst in 4 % Agarose eingebettet und anschließend mit einem Vibratom (Leica, Germany) 70-90 µm dicke Schnitte hergestellt.

2.2.9 Genomische DNA-Isolierung und Southern-Blot-Analyse

Aus dem Blattmaterial von transgenen *Arabidopsis*-Linien wurde genomische DNA nach der Phenol-Chloroform-Methode isoliert und in 4 µg Rnase/ ml H₂O gelöst. Für die Southern-Blot-Analyse wurden 3 µg genomische DNA über Nacht verdaut. Die Proben wurden elektrophoretisch in 1 % TAE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde 5 Minuten in Depurinierungslösung (250 mM HCl), zweimal 15 Minuten in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und zweimal 15 Minuten in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,5) unter langsamem Schütteln inkubiert. Über Nacht erfolgte der Transfer der DNA-Banden auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall, USA) in 20xSSC-Lösung (3 M NaCl, 0,35 M Na₃Citrat). Unter Verwendung von [³²P]-dCTP wurden sequenzspezifische Proben mit dem Rediprime labelling Kit (GE Healthcare, USA) markiert und über G50 Probequant-Säulen (Amersham, USA) aufgereinigt. Über Nacht erfolgte die Hybridisierung der Membran in Churchlösung (0,5 M Na₃PO₄, 2mM EDTA, 1 % BSA, 7 % SDS, pH 7,2) bei 65 °C. Die Membran wurde dreimal 30 Minuten mit einer 65°C warmen Waschlösung (40 mM Na₃PO₄ pH 7,0, 2 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS) gewaschen. Mit Phosphorimager Screens (Bio-Rad, CA, USA) wurden Signale am Molecular Imager FX (Bio-Rad, USA) detektiert.

2.2.10 Makroarray-Hybridisierung

Hybridisierungsexperimente wurden von Andreas Czihal (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK) durchgeführt. Nach der mRNA-Isolierung (Dynabeads mRNA direct Kit, DYNAL Biotech, Deutschland) aus Pflanzen wurde die Erststrang-cDNA-Synthese unter Verwendung der reversen Transkriptase (AMV reverse Transkriptase, Promega, Deutschland) durchgeführt. Die radioaktive Markierung der Proben mit [³³P]-dCTP erfolgte mit dem RediprimeTM II DNA Labelling Kit. Die Hybridisierungen in Churchlösung (0,5 M Na₃PO₄, 2 mM EDTA, 1 % BSA, 7 % SDS, pH 7,2) wurden über Nacht bei 65 °C durchgeführt. Folgende Lösungen wurden zum Waschen der Membran verwendet: 2xSSC mit 0,1 % SDS für zweimal 15 Minuten, 1xSSC mit 0,1 % SDS für zweimal 15 Minuten und 0,5xSSC mit 0,1 % SDS für zweimal 15 Minuten. Zur Detektion von Signalen wurden Phosphorimager Screens (Bio-Rad, USA) eingesetzt.

2.2.11 ChIP-chip-Experimente

2.2.11.1 Chromatinisolierung

Jeweils 1 g *AtRKD2::GFP*-überexprimierendes Gewebe wurde in 10 ml PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) mit 1 % Formaldehyd für 15 min und nach der Zugabe von 1 % Glycin für weitere 10 min vakuumfiltriert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Das Probenmaterial wurde mehrmals mit TBS-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen, in 5 ml CISP-Puffer (15 mM Tris-HCL, 2 mM EDTA, 0,5 mM Spermin, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 15 mM Mercaptoethanol, 0,1 % Triton-X100) resuspendiert und mit dem Potter-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch ein 50 µ-Filter gerührt (Celltrix, Partec, Deutschland) und der Durchfluss 20 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in P1-Puffer (50 mM Hepes, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X100, 0,1 % DOC, pH 7,5) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 12 Minuten bei 12800 g. Das Pellet wurde in 500 µl IP-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100, pH 7,9) resuspendiert und die Suspension wiederum für 12 Minuten bei 12800 g zentrifugiert. Zur Fragmentierung der DNA in ungefähr 500 bp große Fragmente wurde das Pellet in 300 µl IP-Puffer resuspendiert und dreimal 5 Minuten mit abwechselnd 5 sec Pause sowie 5 sec Beschallung im Ultraschallbad (4,5 Watt Beschallung) behandelt. Die Probe wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und für 12 Minuten bei 12800 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Chromatinausbeute wurden 50 µl Aliquots über Nacht bei 65°C inkubiert und mit einem PCR-Aufreinigungs-kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop-Spektrophotometer 1000 (Nano-Drop Technologies, Deutschland).

2.2.11.2 Chromatin-Immunopräzipitation

Vor jeder Immunopräzipitation wurden 30 µl Kontrollprobe (Input) der Chromatin-Lösung entnommen. Pro Ansatz wurden 10 µg Chromatin eingesetzt. Die Probe wurde in IP-Puffer versetzt mit 0,1 % DOC-Lösung, 2 µg GFP-Maus-Antikörper und 30 µl Protein A-Dynabeads (Dynal Biotech, Norwegen) gemischt und unter ständigem Rotieren für 4 h bei 4°C inkubiert. Folgende Puffer wurden zum Waschen der Probe verwendet: einmal IP-Puffer, einmal Waschpuffer 1 (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5), einmal Waschpuffer 2 (50 mM Tris, 0,5 M LiCl, 0,5 % NP40, pH 7,5), einmal Waschpuffer 3 (50 mM Tris, 0,5 M LiCl, 1 mM EDTA, 1

% NP40, 0,7 % DOC, pH 7,5) und zweimal TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Für die Elution wurden 100 µl Elutionspuffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 % SDS, pH 7,5) zugegeben, die Probe für 15 min bei 65°C erwärmt und am Magnet Protein-DNA-Komplexe von den Dynabeads abgetrennt. Nach der Zugabe von 0,2 M NaCl (Endkonzentration) erfolgten eine Inkubation bei 65° über Nacht und eine Aufreinigung mit dem PCR-Aufreinigungskit (Qiagen, Deutschland). Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde am Nanodrop-Fluoreszenz-Spektrophotometer 3000 (Nano-Drop Technologies, Deutschland) ermittelt.

2.2.11.3 Amplifizierung, Markierung und Hybridisierung der Chromatinproben

Je Reaktionsansatz wurden 1,5 ng Probe mit 5U Klenow-Polymerase (Fermentas, Litauen) verwendet. Die Ligation erfolgte mit 75 pmol Adapterprimern (oJW102, oJW103) und 15U T4-Ligase für 4 h bei 16°C. Durch Erwärmung der Probe für 10 min bei 65°C wurde die Ligationsreaktion gestoppt. Chromatinfragmente wurden aufgereinigt (PCR-Aufreinigungskit Qiagen, Deutschland) und anschließend bei 40 Zyklen (95°C für 30 sec, 60°C für 60 sec, 72°C für 60 sec) unter Verwendung von 10 µM oJW102 als einzigen Primer amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte (PCR-Aufreinigungskit Qiagen, Deutschland) wurde die DNA-Konzentration am Nanodrop-Spektrophotometer 1000 bestimmt. Für die Herstellung von Cy3- (IP-Probe) und Cy5- (Input-Probe) markierten Chromatinfragmenten wurde das Genomic DNA labeling Kit Plus (Agilent Technologies, USA) verwendet. Die Hybridisierung der Proben auf *whole genome* Agilent-Filter (244K), die das *Arabidopsis*-Genom repräsentieren, erfolgte durch die Firma Biolabs (Berlin). Über eine spezielle Agilent Software wurden die Daten prozessiert.

2.2.11.4 Bioinformatische Analyse

Die Normalisierung der Daten und statistische Analyse wurden durch Michael Seifert (IPK) durchgeführt. Die Daten aus den 3 biologischen unabhängigen Experimente wurden unabhängig voneinander normalisiert (Quantils-Normalisierung, Bolstad et al., 2003). Die log₂-Hybridisierungsintensitäten wurden für jedes Experiment kalkuliert und die Intensitätswerte der Inputproben von den Chip-Proben abgezogen. Für die Identifizierung intergenischer Bindungsregionen von AtRKD2 wurde das Hidden-Markov-Modell (HMM) angewendet (Seifert et al., 2009).

2.2.12 Heterologe Expressionssysteme zur Produktion von Proteinen

2.2.12.1 Proteinexpression in *E. coli*, Aufreinigung und MALDI-TOF-Analyse

Die kodierenden Sequenzen von *AtRKD1* und *AtRKD2* (ohne Start- und Stopkodon) wurden an den Schnittstellen *Bam*HI / *Sal*I in den pQE30-Vektor und an den Schnittstellen *Nco*I / *Bam*HI in den pQE60-Vektor (Qiagen, Deutschland) ligiert. Zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* (Stamm M15) wurden Bakterienkulturen in LB-Medium mit 25 µg/ ml Kanamycin und 100 µg/ ml Ampicillin bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ angezogen. Eine Induktion der rekombinanten Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen bei 5000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, in einer Pufferlösung (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen und als Pellet bei -80°C eingefroren.

Die Proteinaufreinigung erfolgte unter nativen und denaturierenden Bedingungen (vgl. QIAexpressionist *handbook*, Qiagen, Deutschland).

Die MALDI-TOF-Analyse erfolgte in Kooperation mit Andrea Matros (IPK). Das Acrylamid-Gel wurde in einer 10 mM $NH_4(CO_3)_2$ -Lösung, die 50 % Acetonitril enthält, gewaschen. Die Proteinbanden (1-2 mm dick) wurden ausgestochen, getrocknet und mit 7,5 µl Trypsinlösung (0,5 ng/ µl Trypsin, 5 mM $NH_4(CO_3)_2$, 5 % Acetonitril) für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 % TFA wurden die Proben über Nacht bei 5°C inkubiert. Für die MALDI-TOF-Analyse wurden 2 µl Matrixlösung (100 µl 20 mg/ ml α -Cyano, 350 µl Acetonitril, 45 µl H_2O , 5 µl 10 % TFA) mit 1 µl Probe gemischt und auf dem Target (Edelmetall) luftgetrocknet.

2.2.12.2 Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana*

Ein virales Vektorsystem (MagnICON-Vektoren, Icon Genetics, Deutschland) wurden für die transiente Expression in Tabakblättern eingesetzt. Dazu gehören die Plasmide pICH10990, pICH10570 und pICH14011. Der Provektor pICH10990 wurde in einer modifizierten Form verwendet (Zimmermann et al., 2009). Das Konstrukt pICHM-10990 enthält eine zusätzlich eingefügte DNA-Sequenz, die für einen Poly-HIS-Tag kodiert. An den Enzymschnittstellen *Bam*HI / *Bsa*I im Vektor pICHM-10990 wurde die kodierende Sequenz von *AtRKD2cds* eingefügt. Das resultierende Konstrukt pICHM-10990-*AtRKD2cds* wurde für die Transformation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 verwendet. Die Bakteriensuspension wurde im gleichen Verhältnis mit zwei transformierten Agrobakteriensuspensionen, die jeweils die Plasmide pICH10570 und pICH14011 aufweisen,

gemischt und in die Blätter 3 bis 5 Wochen alter Tabakpflanzen injiziert. Der Vektor 14011 kodiert für eine DNA-Integrase. Die DNA-Integrase linearisiert an der Stelle attP den 3'-Provektor 10570 und fügt die linearisierte Sequenz an der Schnittstelle attB des 3'-Provektors pICHM-10990-AtRKD2cds ein. Daraus resultierte eine konstitutive zytosolische Expression von *AtRKD2*.

2.2.13 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 10 % - oder 12,5 % -SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Alle Proteinbanden wurden mit einer Coomassieblau-Lösung (0,1 % Coomassie blau, 20 % Methanol, 10 % Essigsäure) angefärbt. Zur Detektion spezifischer Proteinbanden wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0,45µm, GE Healthcare, USA) in Transferpuffer (0,25 M Tris, 0,1 % SDS, 0,192 M Glycine, 20 % Methanol) geblottet.

Die Membran wurde in 5 % Marvelmilch (5 % Milchpulver, 20 mM Tris, 0,12 M NaCl, pH 7,8) abgesättigt, zwei Stunden mit dem ersten Antikörper unter leichtem Schütteln inkubiert und dreimal 5 Minuten mit 0,5 % Marvelmilch gewaschen. Anschließend erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit dem zweiten Antikörper. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 % Marvelmilch, einmal Waschen mit 1xMarvelpuffer (20 mM Tris, 0,12 M NaCl, pH 7,8) einem Waschschrift mit PBS-Puffer (2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) wurde die Membran entweder gefärbt oder auf einem Film gelegt. Für die Detektion der spezifisch gebundenen alkalischen Phosphatase wurde eine BCIP/ NBT-Lösung (50 mg/ ml BCIP, 75 mg/ ml NBT, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl, pH 9,5) verwendet. Zum Nachweis des sekundär gebundenen Antikörpers Anti-Maus-POD-Konjugat wurde ein ECL-Kit (GE Healthcare, USA) mit dem Hyperfilm (GE Healthcare, USA) eingesetzt.

2.2.14 BiFC-Assay

Das BiFC-Assay wurde gemäß dem Protokoll nach Schütze et al. (2009) durchgeführt. Transformierte Agrobakteriensuspensionen mit einer Dichte OD₆₀₀=0,8 (Stamm pGV3101 / pMP90) wurden in einem gleichen Verhältnis gemischt und eine mit dem p19-Plasmid (pBin61-p19, Voinnet et al., 2003) transformierte Agrobakteriensuspension in einem Verhältnis 0,3 : 0,8 hinzugefügt. Die Unterseiten der Blätter 3 bis 5 Wochen alter *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden vorsichtig angeritzt und die Suspension in die Epidermisschicht injiziert. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation unter Langtagbedingungen (tagsüber 21°C, nachts 19°C) erfolgte die Analyse der epidermalen Blatzellen am Mikroskop (CLSM 510 Meta, Carl Zeiss, Deutschland).

2.2.15 Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.2.15.1 Pistill-cDNA-Bank

Zur Herstellung einer cDNA-Bank aus *Arabidopsis*-Pistillen wurden das HybriZAP-2.1 XR cDNA Synthesis Kit und das Library Construction Kit verwendet (Stratagene, Kanada). Von den geschlossenen Blüten der *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Typ Columbia-0) wurden die Stempel freigelegt und der restliche Blütenstand entfernt. Pro Pflanze wurden 3 bis 4 Blüten präpariert. Nach zwei Tagen Inkubation unter Langtagbedingungen wurden die Stempel geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach Anweisungen des Dynabead-Protokoll (Qiagen, Deutschland) wurde Pistill-mRNA isoliert. Abweichend vom Stratagene-Protokoll wurde für die Kontrolle der cDNA-Erststrangsynthese 1µl [α^{32} -P]-dCTP eingesetzt. Aliquots der cDNA-Bank wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.15.2 Zwei-Hybrid-Analyse mit der Pistill-cDNA-Bank

Die kodierende Sequenz von *AtRKD1* (*AtRKD1cds*) wurde an den Schnittstellen *EcoRI* / *Sall* in den linearisierten Vektor pBDGAL4cam ligiert. Transformationen in den Hefestamm YRG-2 und die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit 40µg Pistill-cDNA erfolgten unter den Bedingungen wie im Protokoll von Stratagene beschrieben. Die Hefezellen wurden auf SD-Medium -Leu/-Trp/-His (3xDO) ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert.

Zum Nachweis der *lacZ*-Aktivität (X-Gal-Assay) wurde eine X-Gal-Lösung hergestellt. Für diesen Zweck wurden 100 ml Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7,0) 1,67 ml X-Gal-Stammlösung (20 mg/ ml in *N, N*-Dimethylformamid DMF) und 0,27 ml β -Mercaptoethanol zugefügt. Filterpapier wurde für 1 min auf die Hefekolonien gelegt und danach sofort für 10 sec in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde das Filterpapier auf mit 4,5 ml der X-Gal-Lösung durchtränkten Filterpapier gelegt und für maximal 8 h bei 30°C inkubiert.

Die Amplifizierung der cDNA-Fragmente erfolgte mit den Primern pADGAL2.1for und pADGAL2.1rev für 35 Zyklen (95°C für 30 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 120 sec).

2.2.15.3 Zwei-Hybrid-Analyse mit einer Eizell-cDNA-Bibliothek

Die Zwei-Hybrid-Analysen erfolgte in Kooperation mit Prof. Thomas Dresselhaus (Universität Regensburg). Es wurde eine Eizell- cDNA-Bank zur Verfügung gestellt, die aus 50 isolierten Eizellen von *Arabidopsis thaliana* produziert worden war (L. Soljic und S.

Rademacher). *AtRKD1cds* und *AtRKD2cds* wurden an den Schnittstellen *EcoRI* / *SalI* in den linearisierten Vektor pGBKT7 ligiert. Die Hefepaarungen erfolgten nach Anweisung des Clontech-Protokolls (Matchmaker library construction and screening kits user manual, Clontech, USA).

Positive Klone wurden in je 50 µl H₂O resuspendiert, mit Stempelplatten einmal auf 3xDO, zweimal auf SD-Medium -Leu/-Trp/-His/-Ade (4xDO) ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Selektion wurde mehrmals durchgeführt. Für den X-Gal-Assay wurde 1 % Baktoagar in 20 ml ddH₂O erhitzt und auf 60°C abgekühlt. Auf 4xDO-Medium gewachsene Hefeklone wurden mit einer Mischung von 20 ml 1 M Na₃PO₄ (pH 7,0), 2,4 ml *N,N*-Dimethylformamid (DMF), 200 µl 20 % SDS, 400 µl X-Gal-Stammlösung (20 mg/ml in Dimethylformamid) und der Baktoragar-Lösung überschichtet und über Nacht bei 30°C inkubiert.

Die cDNA-Fragmente wurden mit den Primern pGADT7for und pGADT7rev bei 35 Zyklen (94°C für 30 sec, 55°C für 30 sec, 72°C für 90 sec) amplifiziert.

2.2.15.4 DNA-Isolierung aus Hefe

Für die DNA-Isolierung aus Hefe wurde eine 3 ml Flüssigkultur 30 sec zentrifugiert und das Pellet in 200 µl Hefelysepuffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % SDS, 2 % Triton X-100, pH 8,0) aufgenommen. Nach Zugabe von je zwei Metallkugeln und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Gemisch 27:24:1) wurden die Hefezellen durch Vortexen aufgeschlossen und wiederum zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 96 % Ethanol ausgefällt und zentrifugiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

2.2.15.5 Proteinextrakt aus Hefe

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurde zunächst eine 10 ml Übernacht-Kultur in entsprechendem Selektionsmedium mit 50 ml YPD-Kultur angeimpft, bei einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 abzentrifugiert, mit eiskaltem H₂O gewaschen und das Pellet bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden in 60°C warmen TCA-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 8, 8 M Harnstoff, 0,1 mM EDTA, 5 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 5 µg/ml Pepstatin A, 1,5 µM Leupeptin, 7,25 mM Benzamidin, 18,5 µg/ml Aprotinin, 0,01742 % PMSF) aufgenommen und durch Vortexen mit 80 µl Glasperlen (425-600 µm, Sigma G-8772) aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für die Western-Blot-Analyse verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der spezifischen Aktivität des *AtRKD2*-Promotors

Über *cis*-Elemente, die regulatorische Funktionen zur Transkription von Embryosack-spezifischen Genen in *Arabidopsis thaliana* aufweisen, ist bisher wenig bekannt. Die bioinformatische Analyse der Promotoren der Gene *AtRKD 1*, *2* und *4*, deren Transkripte im Eiapparat (Eizelle und Synergiden) nachweisbar sind (Koszegi, 2008), führte zu der Identifizierung einer 9 bp langen übereinstimmenden DNA-Region (CoMo-Finder, M. Mohr, IPK). Diese Sequenz wurde auch in dem Promotor des Eizell-spezifisch exprimierten Gens *DD45* (At2g21740; Steffen et al., 2007) detektiert. Es wurde vermutet, dass das Nonamer ein putatives *cis*-regulatorisches Element darstellt. Um die Funktion der 9 bp langen DNA-Region aufzuklären, wurde das Gen *AtRKD2* für Mutationsanalysen ausgewählt.

3.1.1 Überprüfung der *AtRKD2*-Promotoraktivität

Die 522 bp lange intergenische Region oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons wurde isoliert, in den *Gateway*-Vektor pKGWFS7,0 (Karimi, 2002) kloniert und stabil in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen transformiert. Zur Vereinfachung wird die intergenische Region im Folgenden als „Promotorregion“ bezeichnet. Der Vektor pKGWFS7,0 enthält ein chimäres Reportergenkonstrukt, das aus den kodierenden Sequenzen der Gene *uidA* (*GUS*, Jefferson et al., 1987) und *eGFP* (Chalfie et al., 1994) besteht (vgl. Abb. 3-2 A). In Folge dessen kann die Aktivität des Promotors sowohl durch Fluoreszenzmessungen (GFP-Aktivität) wie auch durch Messung von Enzymaktivitäten (GUS-Aktivität) ermittelt werden.

Um die Funktionalität des Konstrukts zu testen, wurden verschiedene Organe transgener *Arabidopsis*-Pflanzen auf die Expression des chimären Reportergens überprüft (Abb. 3-1). Eine Aktivität des *AtRKD2*-Promotors wurde weder im Blatt noch im Spross oder in den Antheren beobachtet (Abb. 3-1 A-D). Auch in jüngeren Blüten konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Erst ab den Blütenstadien 12 und 13 (Smyth et al., 1990) lässt sich eine Promotor-Aktivität in den reifen Ovula feststellen (Abb. 3-1 E, F).

Nähere Untersuchungen zeigten, dass der *AtRKD2*-Promotor spezifisch die Expression des chimärischen Reportergens in der Eizelle des reifen Embryosacks reguliert (Abb. 3-1 G, H). Daher ist der Vektor pKGWFS7,0 für Mutationsanalysen der *AtRKD2*-Promotorregion geeignet.

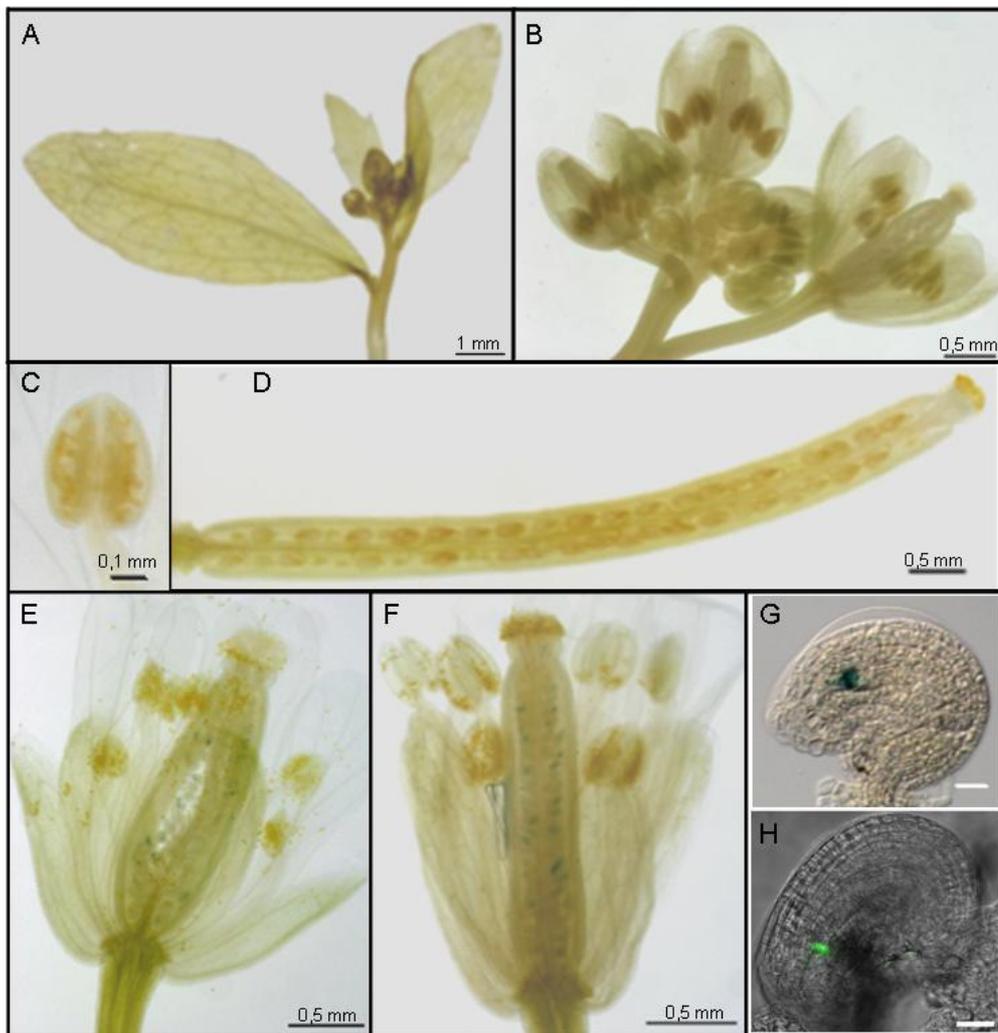


Abb. 3-1: Nachweis der *AtRKD2*-Promotoraktivität in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen
 Analysen durch Messung der GUS-Aktivität zeigten eine fehlende Promotoraktivität in Blättern (A), Blütenknospen der Entwicklungsstadien 4-10 (nach Smyth et al., 1990; B), Antheren (C) und älteren Schoten (D) auf. Erste punktförmige GUS-Färbungen sind sichtbar in Blüten der Stadien 12 (E) und 13 (F). Nähere Analysen der isolierten Ovula weisen auf eine *AtRKD2*-Promotoraktivität beschränkt auf einen kleinen Bereich des Eiapparats, der Eizelle, hin: (G) GUS-Färbung, (H) GFP-Nachweis. Die Balkenlänge in den Bildern (G) und (H) entspricht 20 µm.

3.1.2. Mutationsanalyse der *AtRKD2*-Promotorregion

Ausgehend vom 5'-Ende des *AtRKD2*-Promotors wurden fünf Deletionskonstrukte D404, D305, D214, D197 und D104 hergestellt (Abb. 3-2). Die Konstrukte D404, D305 und D214 enthalten das putative *cis*-Motiv. In den Konstrukten D197 und D104 ist diese 9 bp lange Region deletiert. Zusätzlich wurde in der *AtRKD2*-Promotorregion die Nonamer-Sequenz durch den Einbau der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI mutiert. Die Konstrukte wurden mittels *Gateway*-Klonierung in den getesteten Vektor pKGWFS7,0 (siehe Kap. 3.1.1)

kloniert und stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Saatgut der T₀-Generation wurde auf Kanamycin-haltigem Selektionsmedium ausgelegt und die selektierten Pflanzen mit PCR-Analysen auf das Vorhandensein des chimären Reportergens getestet.

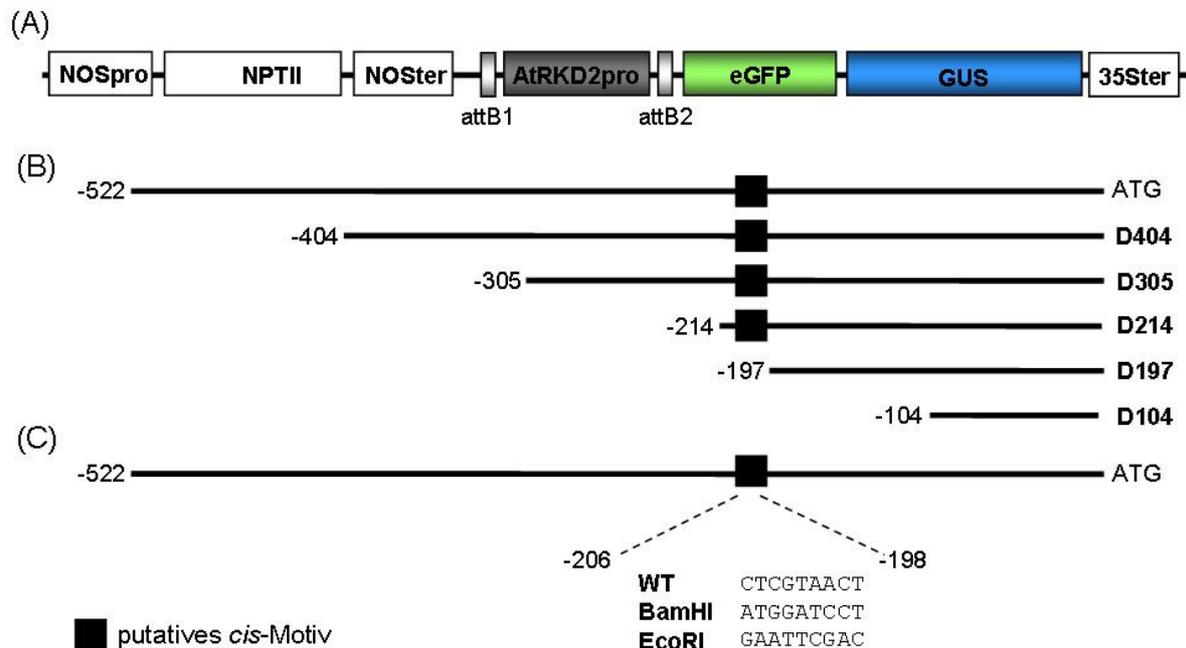


Abb. 3-2: Schematische Darstellung von Mutationskonstrukten der *AtRKD2*-Promotorregion

(A) Für Deletions- und Mutationsanalysen wurde der *Gateway*-Vektor pKGWFS7,0 (Karimi et al., 2002) eingesetzt. (B) Ausgehend vom 5'-Ende der 522 bp Promotorregion und unter Berücksichtigung des putativen *cis*-Motivs wurden die Deletionskonstrukte D404, D305, D214, D197 und D104 erstellt. (C) Mutation des Wildtyp (WT) Nonamers durch den Einbau von zwei Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI. NOSpro = Nopalinsynthese-Promotor, NPTII = Neomycin-Phosphotransferase II, NOSter = Nopalinsynthese-Terminator, AtRKD2pro = *AtRKD2*-Promotor, GFP = *green fluorescent protein*, GUS = β-Glucuronidase, 35Ster = CaMV35S-Terminator.

Pro Konstrukt wurden 25 transgene Pflanzen analysiert. Dazu wurden von jeder Pflanze mindestens drei Stempel (Pistille) aus geschlossenen Blüten freigelegt. Zwei Tage nach dieser Emaskulation wurden die Pistille geerntet und analysiert. Alle Pflanzen wurden auf eine spezifische GUS-Aktivität im Embryosack überprüft. Zusätzlich wurden pro Konstrukt mindestens 4 Pflanzen auf die Aktivität des GFP-Proteins getestet.

Eizell-spezifische GUS- und GFP-Signale wurden nur bei einer Promotorlänge von mindestens 305 bp nachgewiesen (Abb. 3-3 B-E). In den Deletionsreihen D214, D197 und D104 wurde keine Promotoraktivität beobachtet (Abb. 3-3 F-H). Die Eizell-spezifische Expression des chimären Reportergens blieb in den Mutationsreihen BamHI und EcoRI erhalten (Abb. 3-3 I-L), woraus sich schließen lässt, dass die Änderung der Nonamer-Sequenz keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat.

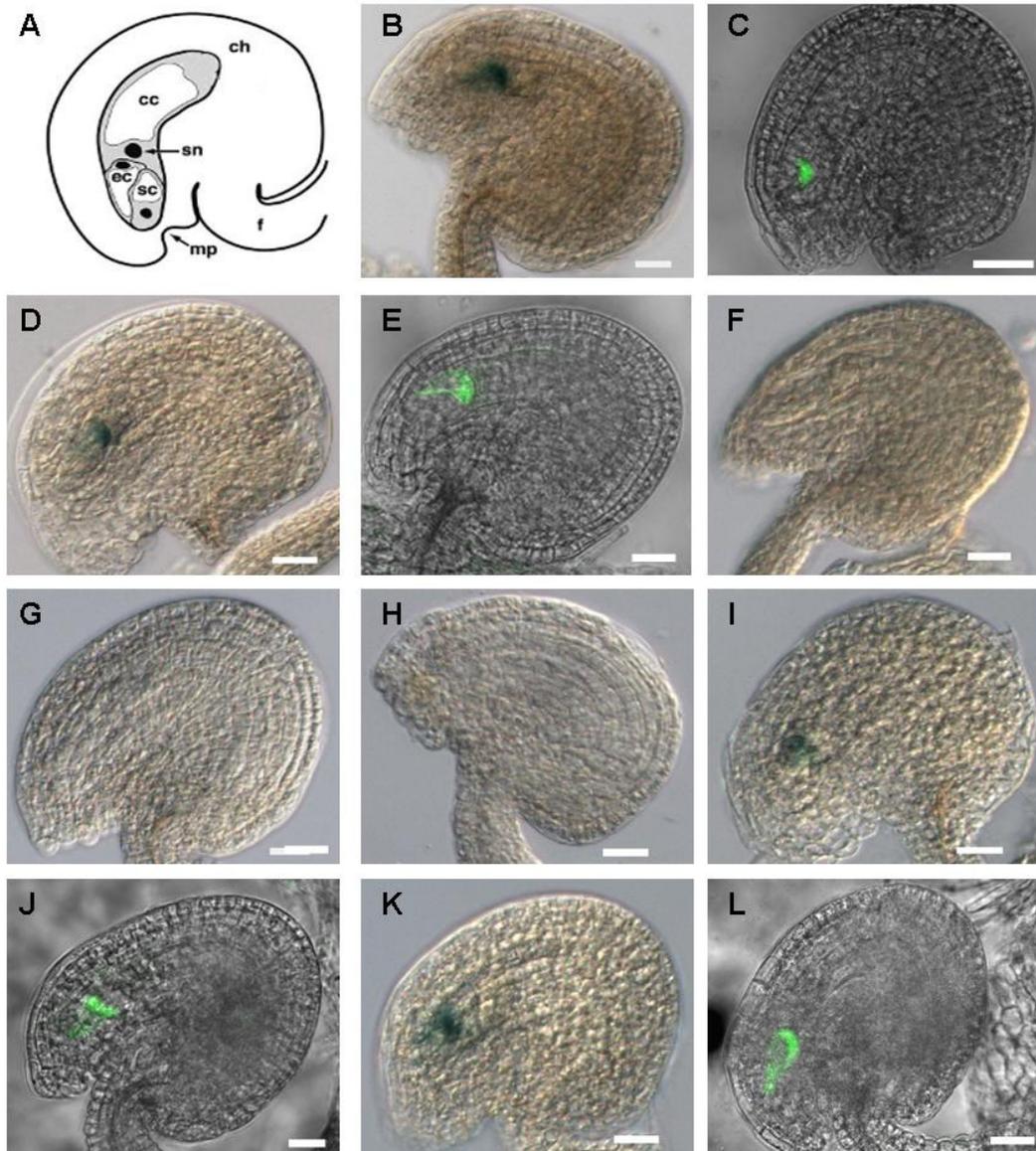


Abb. 3-3: Aktivität der *AtRKD2*-Promotorkonstrukte in den Ovula transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

(A) Schematische Darstellung der Samenanlage: Der Embryosack bestehend aus der Eizelle (EC), den Synergiden (SC), der Zentralzelle (CC) mit sekundärem Nukleus (SN), umgeben von Chalaza (CH) und Mikropyle (MP). Eizell-spezifische GUS- und GFP-Signale sind vorhanden in den Deletionsreihen D404 (B, C), D305 (D, E) und in den Mutationsreihen BamHI (I, J) sowie EcoRI (K, L). (F-H) In den Deletionsreihen D214 (F), D197 (G) und D104 (H) ist keine Promotoraktivität nachweisbar. Die Balkenlänge entspricht 20 μm .

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass mögliche *cis*-regulierende Elemente zwischen den Positionen -305 und -214 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons zu suchen sind. Diese 91 bp lange Region wurde mit der Datenbank PLACE (Higo et al., 1999; Lescot et al., 2002) auf bekannte *cis*-Motive abgeglichen. Es wurden 11 putative Bindungsstellen ermittelt, die an der Regulation von unterschiedlichsten Genen beteiligt sind (Abb. 3-4). Statistisch gesehen können die kurzen 4 bp bis 6 bp umfassenden DNA-Sequenzen alle 256 bp bzw. 4096 bp im

Arabidopsis-Genom auftreten. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine Funktion über einen Basenvergleich in der *AtRKD2*-Promotorregion ermittelt werden kann. Da aber nicht mit Sicherheit auszuschließen war, dass eines dieser putativen *cis*-Elemente in der Regulation des *AtRKD2*-Promotors von Bedeutung sein könnte, wurden die Positionen der Motive bei der Erstellung neuer Deletionskonstrukte berücksichtigt.

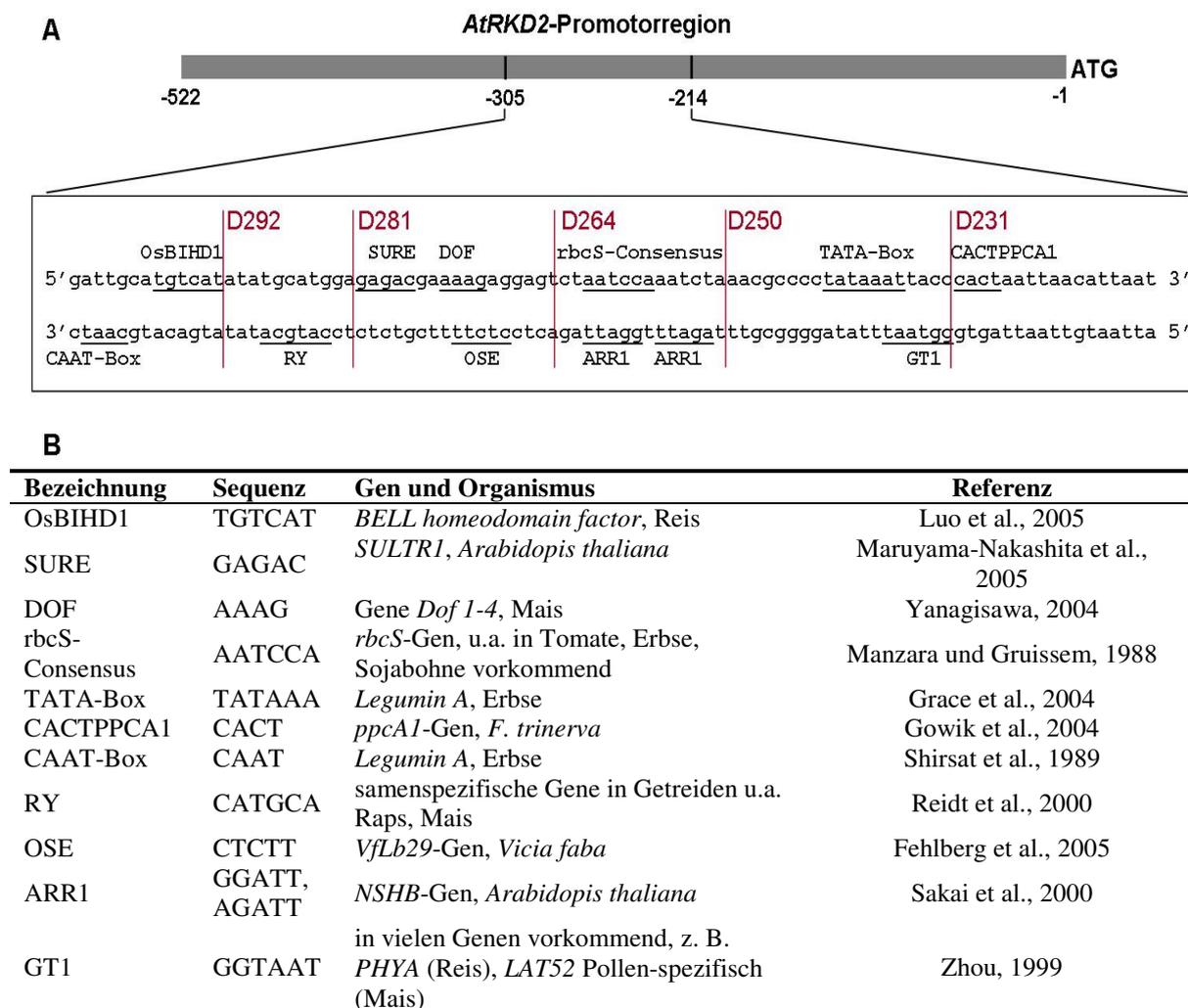


Abb. 3-4: In silico Analyse der 91 bp langen Region 214 bp oberhalb des *AtRKD2*-Gens

Für die Identifizierung von bekannten putativen *cis*-Motiven wurde die Datenbank PLACE verwendet. (A) Ausschnitt aus der *AtRKD2*-Promotorsequenz zwischen den Positionen -305 und -214. Putative *cis*-Motive sind schwarz unterstrichen. Querbalken zeigen Deletionskonstrukte (rote Schrift) auf Basis der Motiv-Informationen. (B) Bezeichnung der gefundenen *cis*-Elemente, Auftreten in den jeweiligen Genpromotoren und Angabe der entsprechenden Referenz.

Bei der Herstellung der in der Abbildung 3-4 auszugsweise dargestellten Deletionskonstrukte wurde die 91 bp lange Region zwischen den Positionen -305 bis -214 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons in Abständen von 11 bp bis 19 bp unter Berücksichtigung der Bindungsstellen

verkürzt. Die Konstrukte wurden in den Vektor pKGWFS7,0 kloniert, stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert und das resultierende transgene Saatgut auf Kanamycin-haltigem Selektionsmedium ausgelegt. Das chimäre Reporterergen wurde über PCR-Analysen nachgewiesen.

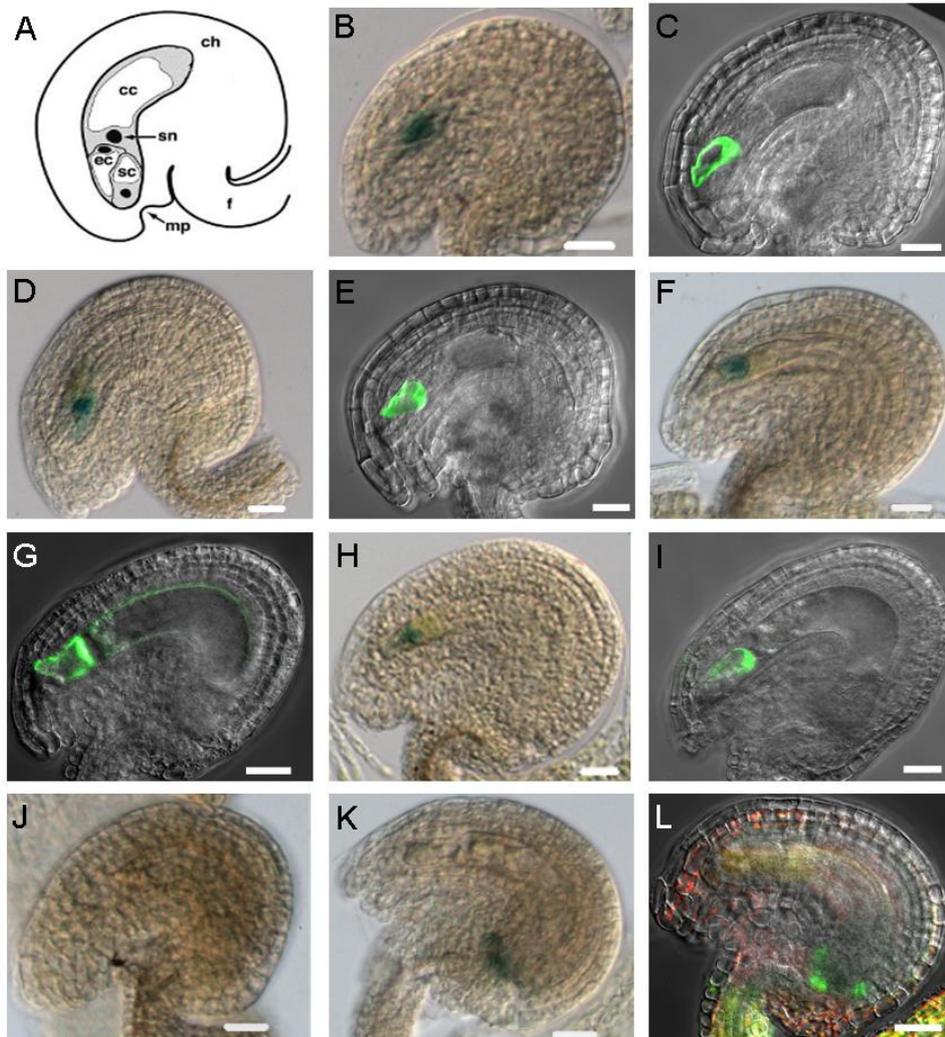


Abb. 3-5: Reporteraktivität in den Konstrukten D292, D281, D264, D250 und D231

(A) Schematische Darstellung der Samenanlage: Der Embryosack bestehend aus der Eizelle (EC), den Synergiden (SC), der Zentralzelle (CC) mit sekundärem Nukleus (SN), umgeben von Chalaza (CH) und Mikropyle (MP). (B)-(I) Eizellspezifische GUS- und GFP-Signale konnten nachgewiesen werden in den Deletionsreihen D292 (B, C), D281 (D, E), D264 (F, G) und D250 (H, I). Bei D231 wurde keine Reporterergenaktivität im Embryosack beobachtet. (J), jedoch wiesen 3 der 25 D231-Pflanzen eine Promotoraktivität im sporophytischen Gewebe (K, L) im Bereich der Chalaza auf. Rote Färbungen in (L) sind auf die Autofluoreszenz von Chlorophyll zurückzuführen. Die Balkenlänge entspricht 20 μm .

Pro Deletionskonstrukt wurden wiederum 25 transgene Pflanzen der T₀-Generation auf eine spezifische Promotoraktivität im Embryosack überprüft. In den Pflanzen der Deletionsreihen

D292, D281, D264 und D250 wurde eine spezifische Reporterogenaktivität von GUS und GFP im weiblichen Gametophyten beobachtet (Abb. 3-5 B-I). In der Deletionsreihe D231 wiesen 22 Pflanzen keine Reporterogenaktivität auf (Abb. 3-5 J). In den 3 übrigen Pflanzen wurde eine schwache GUS-Aktivität im Bereich der Chalaza unterhalb der Antipodenzellen beobachtet (Abb. 3-5 K). Diese spezifische Promotoraktivität im sporophytischen Gewebe wurde durch die Detektion schwacher GFP-Signale bestätigt (Abb. 3-5 L).

Zusammenfassend ergaben die Analysen des *AtRKD2*-Promotors folgende Erkenntnisse: (I) In den meisten Konstrukten wiesen mindestens die Hälfte der 25 untersuchten Pflanzen eine Reporteraktivität in den Samenanlagen auf (Abb. 3-6). Erst in der Deletionsreihe D250, in der nur 6 von 25 Pflanzen positiv getestet wurden, gab es eine deutliche Abnahme der spezifischen Reporteraktivität. Trotzdem ist die *AtRKD2*-Promotorregion auch bei einer Länge von 250 bp noch spezifisch aktiv. (II) Die Verkürzung der Promotorregion auf 231 bp führte zu dem totalen Verlust der spezifischen Eizell-Aktivität des chimären Reportergens, d.h. es wurden keine spezifischen GUS- sowie GFP-Signale in der Eizelle detektiert. (III) Diese Ergebnisse grenzen eine putative *cis*-regulatorische Region auf 19 bp zwischen den Positionen -250 und -231 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons ein.

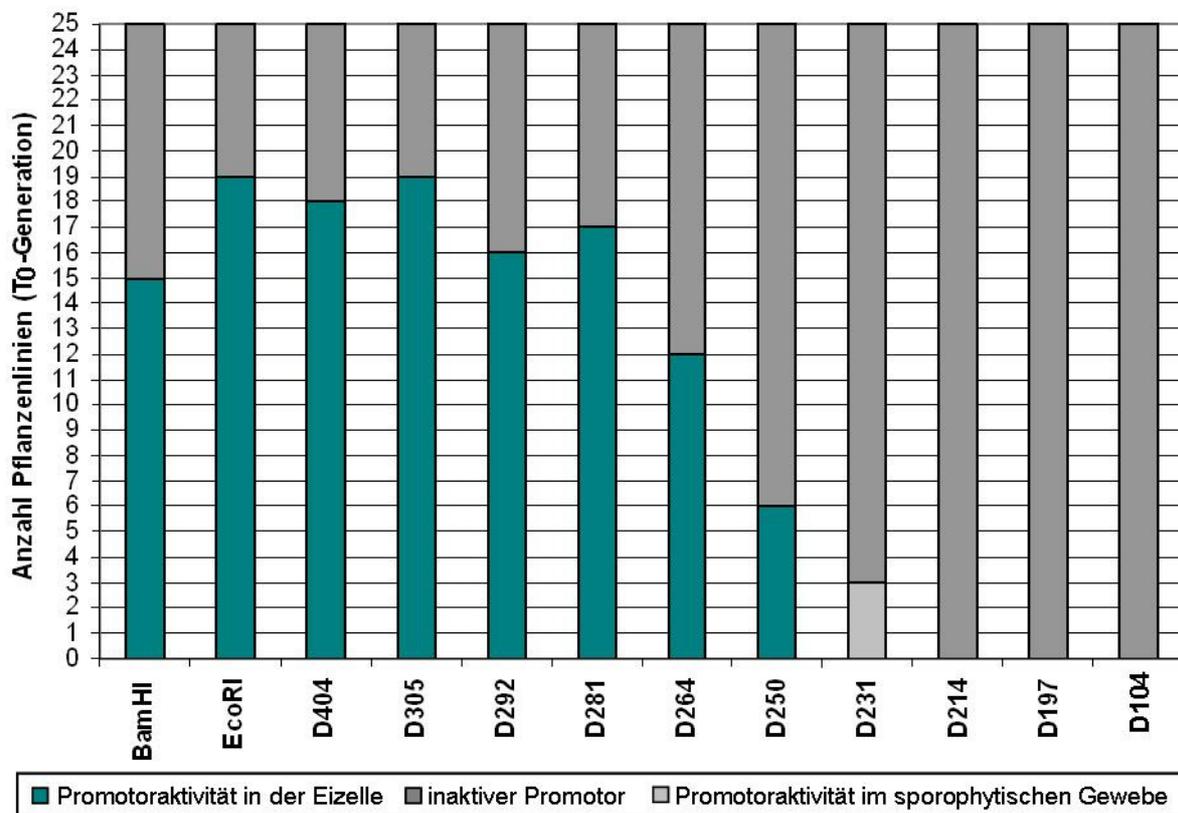


Abb. 3-6: Spezifische Promotoraktivität in Abhängigkeit des *AtRKD2*-Promotorkonstrukts

In weiteren Experimenten wurde die 19 bp lange Region zwischen den Positionen -250 und -231 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons näher analysiert. Auffällig sind die hintereinander liegenden GC-reichen und AT-reichen Basenabfolgen (Abb. 3-7 A). Um die Bedeutung dieser DNA-Sequenzen innerhalb der 19 bp langen Region zu untersuchen, wurden die Basenabfolgen CCCC (Positionen -246 bis -243) und AAA (Positionen -239 bis -237) mutiert und zugleich die Promotorregion vom 5'-Ende auf 250 bp verkürzt (Abb. 3-7 A, $\Delta 250_MutCCCC$ und $\Delta 250_MutAAA$).

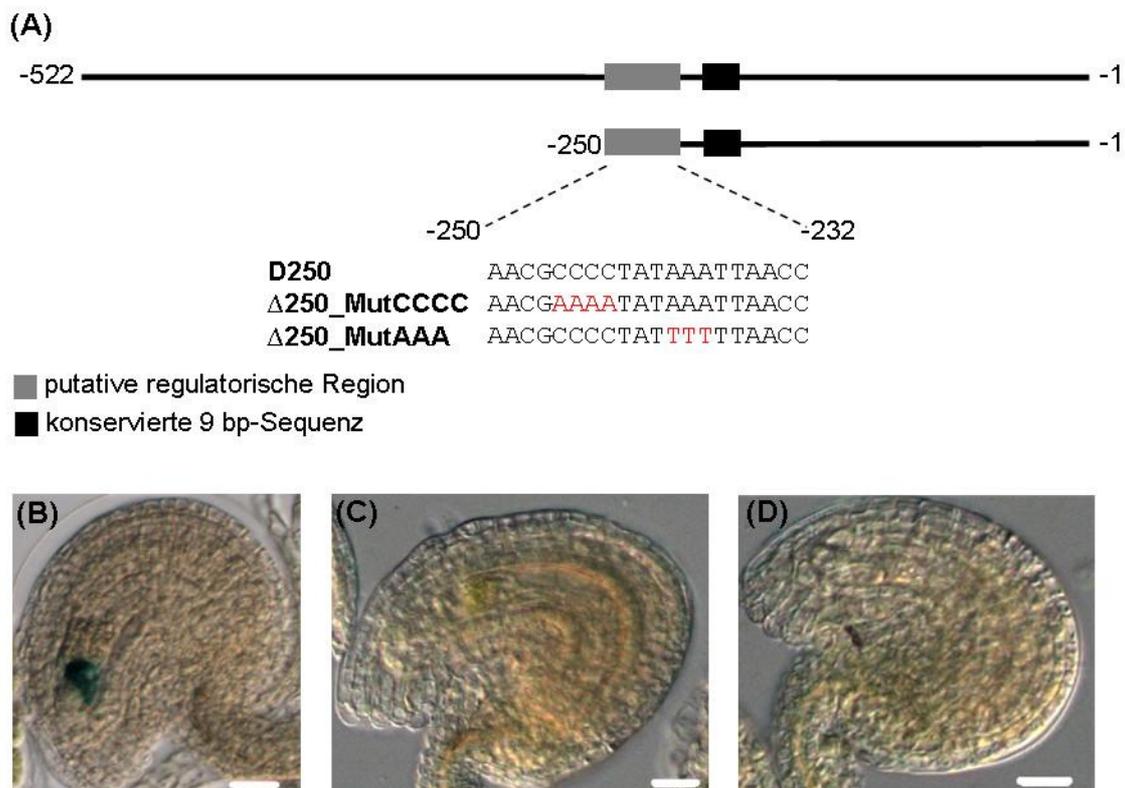


Abb. 3-7: Analyse der 250 bp langen Promotorregion oberhalb des *AtRKD2*-Gens

(A) Ursprüngliche intergenische Region (522 bp) und Mutationskonstrukte oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons. In der auf 250 bp verkürzten Promotorregion wurden mehrere Nukleotide mutiert ($\Delta 250_MutCCCC$, $\Delta 250_MutAAA$). (B-D) Histologische Analysen der Samenanlagen von Pflanzen mit den Konstrukten $\Delta 250_MutCCCC$ (C) und $\Delta 250_MutAAA$ (D) zeigen, dass im Gegensatz zu der Deletionsreihe D250 (B) der Promotor nicht aktiv ist. Die Balkenlänge entspricht 20 μm .

Die Konstrukte $\Delta 250_MutCCCC$ sowie $\Delta 250_MutAAA$ wurden in den Vektor pKGWFS7,0 kloniert und stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Die Selektion transgener T_0 -Pflanzen erfolgte, wie in den vorhergehenden Mutationsanalysen beschrieben, über ein Selektionsmedium und durch PCR-Analysen.

Bei allen 25 untersuchten transgenen Pflanzen der Mutationsreihen $\Delta 250_MutCCCC$ und $\Delta 250_MutAAA$ konnten weder eine GUS- noch eine GFP-Aktivität im Embryosack

nachgewiesen werden (Abb. 3-7 C, D). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Mutationen in der 19 bp langen Region zwischen den Positionen -250 und -231 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons eine Inaktivität des chimären Reportergens im Embryosack bewirken.

3.1.3 Bestimmung des *AtRKD2*-Transkriptionsstartpunkts

Die Transkription eines Gens wird an dem Transkriptionsstartpunkt initiiert. Zur Identifizierung des Transkriptionsstartpunkts in der *AtRKD2*-Promotorregion wurde eine 5'-RACE-PCR mit aus *Arabidopsis*-Blüten isolierter mRNA durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.3). Mit dieser Methode wurden nur mRNA-Sequenzen detektiert, die eine 5'-CAP-Struktur aufweisen und damit vollständig sind. Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente führte zu der Identifizierung einer 35 bp umfassenden 5'-untranslatierten Region des *AtRKD2*-Gens.

```

-522 TACTTCATTAATAACTTATGATTAATTATGAGAAATGGAAATTAAGATA
-472 TATGGCCATGATCTACAATAATGTTTTAACCATAACGTTTCATTTTCTTAT
-422 CTTAATCATTTCAGTTACTGCTTATTTAAACAATACATAATCATGATCATTG
-372 TCATGTCTATGTATGCCGTATATATAAGAACATGTACATTGAGTACTACTA
-322 CACTATTTACTCGAAATGATTGCATGTCATATATGCATGGAGAGACGAAA
-272 AGAGGAGTCTAATCCAATCTA AACGCCCTATAAATTACC CACTAATTA
-222 ACATTAATCATATCTTCTCGTAACTCCAATTTAACACGACAATCAATTA
-172 GCCGTCAATACTCAATACCCCACTTCTCCTAATAGATTCATCATCACTTC
-122 CATTCTTTATTCTCTCTCCATATCTTACTACCACTAGTCTCTTCTCTGAA
-72 TGTAGTATATAAATCTTTTCTCGCATCATCGAGTTTCAC AACACAACCTTC
-22 TATCTCTCTCACTTTCTTTACAATG

```

Abb. 3-8: Promotorregion des *AtRKD2*-Gens

Durchgestrichene DNA-Sequenzen stellen den Teil der intergenischen Region dar, der nicht bestimmend für die *AtRKD2*-Promotoraktivität ist. Rot hervorgehoben ist die 19 bp große, vermutlich *cis*-regulatorische Region. Gelb unterlegt ist die 5'-untranslatierte Region. Die putative TATA-Box (schwarz unterstrichen) ist in der basalen Promotorregion lokalisiert.

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse und der 5'-RACE-PCR sind in der Abbildung 3-8 dargestellt. Das kleinste aktive Promotorfragment umfasst ausgehend vom Startkodon 250 bp (-250 bis -1). Zwischen den Positionen -250 und -231 führten Nukleotid-Mutationen zu einer Inaktivität des Eizell-spezifischen Promotors. Der Startpunkt der Transkription befindet sich an der Position -35. Ausgehend von dem Transkriptionsstart ist 24 bp entfernt eine putative TATA-Box lokalisiert.

3.1.4 Sequenzvergleich der *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region

Um zu untersuchen, ob die Genpromotoren innerhalb der *AtRKD*-Familie ähnliche oder sogar identische Basenabfolgen zu der 19 bp langen *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region aufweisen,

wurden die 5'-intergenischen Regionen von *AtRKD1* (1422 bp), *AtRKD3* (1313 bp) und *AtRKD4* (645 bp) mit der von *AtRKD2* (522 bp) verglichen. In der Abbildung 3-9 ist die Basenabfolge der 19 bp langen Region im Vergleich zu den DNA-Sequenzen der anderen Genpromotoren dargestellt. Auffällig ist, dass nur die *AtRKD1*-Genpromotorregion eine Sequenzähnlichkeit zu der *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region aufweist.

<i>AtRKD2</i> -Promotor	AACGCCCTATAAATTACC
<i>AtRKD1</i> -Promotor	AACGTCCCTCTTA-TTAGC
<i>AtRKD3</i> -Promotor	ATCAACACTAATCATTAAT
<i>AtRKD4</i> -Promotor	GTGAATTTTAGCAATATG
Consensus	ATCGACCCTATTCATTA C

Abb. 3-9: Vergleich der *AtRKD*-Genpromotoren mit der 19 bp *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region

Positionen mit durchgängig identischen Nukleotiden sind rot markiert und Positionen, in denen die Mehrheit der Nukleotide identisch ist, sind grün markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm AlignX (Invitrogen, CA, USA) durchgeführt.

Ferner wurde auf der Basis veröffentlichter Expressionsdaten von Eizell-aktiven Genen in *Arabidopsis thaliana* (Wuest et. al., 2010) eine statistische Analyse zur Signifikanz der 19 bp *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region durchgeführt. Insgesamt wurden 186 verschiedene K-Mere (mit $3 < K < 16$) aus der 19 bp langen DNA-Sequenz extrahiert und berechnet, in wievielen Eizell-aktiven bzw. Genom-weiten Promotoren jedes K-Mer vorkommt (Tab. 3-1). Unter der Berücksichtigung von 1 bzw. 2 möglichen Basensubstitutionen wurden statistisch signifikant angereichert auftretende Basenabfolgen identifiziert, die den GC-reichen Teil der *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region umfassen.

Tab. 3-1: Identifizierung von signifikant angereichert auftretenden Basenabfolgen in der *cis*-regulatorischen *AtRKD2*-Region

Mit der Schwelle „egg mean signal > 2000“ wurden die Gene auf 365 Eizell-aktive Gene (FG) und 32897 Gene des *Arabidopsis*-Genoms (BG, background) unterteilt. Basierend auf dieser Unterteilung wurden die entsprechenden Promotoren entsprechend der TAIR8 Annotation (Garcia-Hernandez et al., 2002) mit einer festgelegten Größe von 500 bp [-500, -1] auf beiden Strängen nach K-meren mit maximal 2 Substitutionen durchsucht. Zur Ermittlung der Signifikanz des Auftretens dieser K-mere wurden mit dem Fisher's exact Test p-Werte berechnet. Das Signifikanzniveau (0,05) wurde durch die Bonferroni-Korrektur auf den Wert 2,7E-04 reduziert.

DNA-Sequenz	Anzahl FG (gesamt)	Anzahl BG (gesamt)	% FG	% BG	Anreicherung	p-Wert
AACGCC (1 Substitution)	187 (365)	11127 (32897)	0,51	0,34	1,51	4,63E-06
ACGCCCTAT (2 Substitutionen)	69 (365)	3602 (32897)	0,19	0,11	1,73	6,46E-05

3.2 Rekombinante Proteinexpression

3.2.1. Proteinexpression in *E. coli*

Für Nachweisverfahren von Protein-Protein-Interaktionen und Protein-DNA-Wechselwirkungen werden ausreichende Mengen an aktivem Protein benötigt. Größere Proteinmengen werden meist mit Hilfe von heterologen Expressionssystemen in Bakterien, Hefen sowie Pflanzen produziert.

Für die Herstellung der rekombinanten Proteine AtRKD1 und AtRKD2 wurde ein Expressionssystem in *E. coli* getestet. Die kodierenden Regionen von *AtRKD1* und *AtRKD2* wurden in den pQE30-Vektor (Invitrogen, USA) ligiert und in den *E. coli* Stamm M15 transferiert. In dem pQE30-Vektor befindet sich die kodierende Sequenz für den Poly-HIS-tag an dem N-terminalen Ende der eingefügten Sequenz. Die heterologe Genexpression wird durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert (Abb. 3-10).

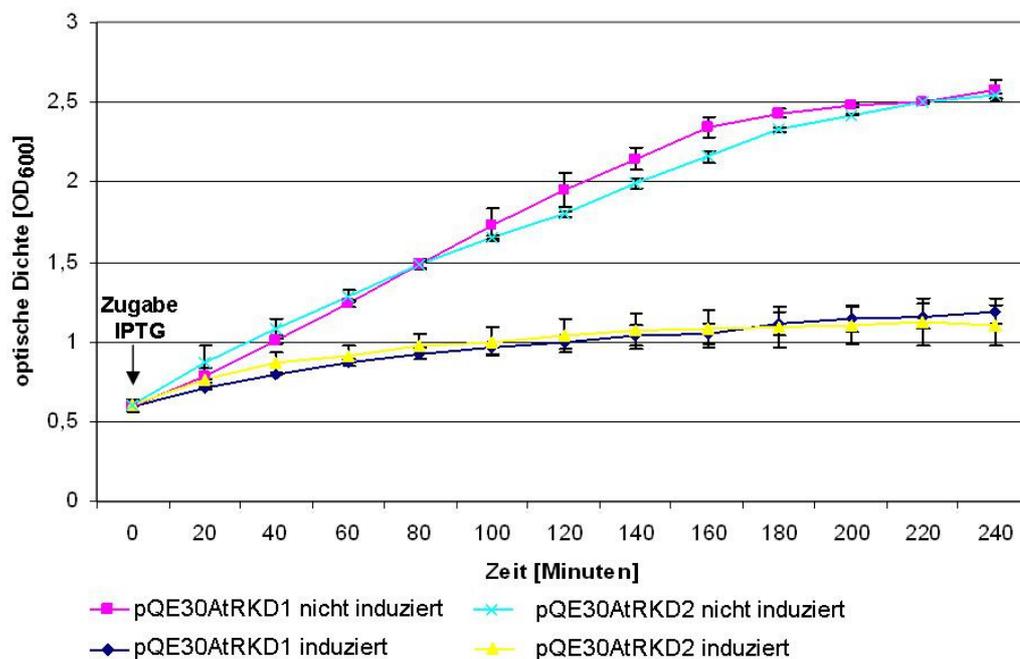


Abb. 3-10: Produktion rekombinanter Proteine AtRKD1 und AtRKD2 in *E. coli* Flüssigkulturen
 Bakterienkulturen wurden unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Die Synthese der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nicht-induzierte Kontrollkulturen wuchsen in dem gleichen Zeitraum etwa dreimal so schnell.

Die rekombinante Proteinproduktion führt zu geringeren, aber stabilen Wachstumsraten der Bakterienkulturen. Toxische Effekte auf die Wirtszellen wurden nicht beobachtet.

Die Aufarbeitung der Bakterienkulturen zeigte, dass die synthetisierten Proteine AtRKD1 und AtRKD2 sowohl im löslichen Überstand als auch in der unlöslichen Fraktion zu finden sind. Eine hohe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* kann zur Bildung von

unlöslichen Aggregaten (Einschlusskörpern) führen (Thomas und Baneyx, 1996; Sachdev und Chirgwin, 1998). In manchen Fällen ist es vorteilhaft, die Temperatur während der Proteinsynthese zu senken (Schein, 1989). Im Fall der rekombinanten RKD-Proteinsynthese führte die Senkung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 28°C aber nicht zu einer verminderten Produktion von Einschlusskörpern in dem *E. coli* Stamm M15.

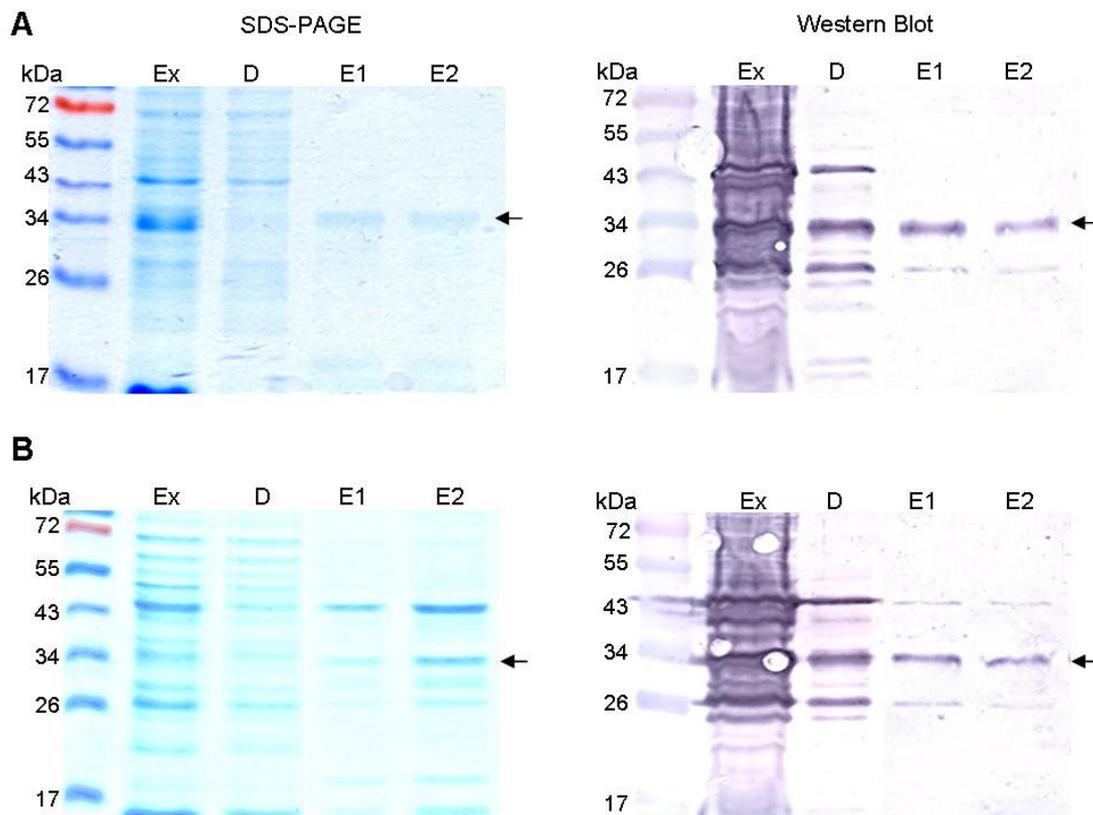


Abb. 3-11: Proteinaufreinigung von AtRKD1 und AtRKD2 unter denaturierenden Bedingungen
 SDS-PAGE-Bilder zeigen die denaturierende Aufreinigung (Zugabe von 8 M Harnstoff) der Proteinrohextrakte in Ni-NTA-Säulen. In Western-Blot-Analysen erfolgte der Proteinnachweis mit dem spezifischen Anti-HIS Antikörper. (A) Aufreinigung von AtRKD1, (B) Aufreinigung von AtRKD2; Ex = Proteinrohextrakt; D = Durchfluss; E1 und E2 = Elutionsschritte.

Mit der Fraktion der löslichen Proteine wurden weitere Aufarbeitungsschritte durchgeführt. Die Reinigung der Proteinrohextrakte nach dem Zellaufschluss erfolgte durch Affinitätschromatographie über Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) -Säulen. Unter nativen Bedingungen war es nicht möglich, die rekombinanten Proteine AtRKD1 und AtRKD2 über HIS-tag in den NI-NTA-Säulen zu binden. Möglicherweise verhindert die Faltung der Proteine eine Bindung des HIS-Epitops an die Ni²⁺-Ionen der Ni-NTA-Agarose (Debeljak et al., 2006). Erst wenn die rekombinanten Proteine AtRKD1 und AtRKD2 mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (GuHCl) denaturiert wurden, war eine Bindung an die NI-NTA-Säule

möglich (Abb. 3-11). Die Bindung und damit Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen lässt sich wahrscheinlich auf die Entfaltung der rekombinanten Proteine zurückführen, aufgrund dessen die Histidinreste an Nickelionen gebunden werden. Die Größen der durch Western-Blot-Analysen detektierten Proteinbanden stimmen gut mit den theoretischen Vorhersagen (AtRKD1 31 kDa, AtRKD2 33 kDa) aus den DNA-Sequenzen der klonierten Gene überein.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die Proteinbanden mit der MALDI-TOF-Technik (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation mit einer gepulsten Ionenerzeugung *time of flight*) analysiert. Nach dem Ausschneiden der Proteinbanden aus dem Acrylamidgel und dem anschließenden tryptischen Verdau wurden die entstandenen Peptidfragmente nach dem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Gefundene Massen wurden mit den in der Datenbank (Expasy, www.expasy.org) vorhandenen Massen abgeglichen und die entsprechenden Aminosäuresequenzen zugeordnet.

AtRKD1					
1	MKSFCK LEYD	QVFG KENNSF	SFLNHSSLYS	HQSELANPFF	ELEDEMLPSA
51	TSSNCF TSAS	SFLALPDLEP	ISIVSHEADI	LSVYGSASWT	AEETMFVSDP
101	AKKSETTTTK	KRRCREECFS	SCSVSKTLSK	ETI SLYFYMP	ITQAARELNI
151	GLTLLK KRCR	<u>ELGIKR</u> WPHR	<u>KLMSLQ</u> KLIS	NVKELEK MEG	EENEDKLRNA
201	LEKLEK EKKT	IEKL PD LKFE	DKTKRLRQAC	FKANHKRKR	SGMSTPITSS
251	SSSASASSS	YSSVSG FER			
AtRKD2					
1	MADHTTKEQK	SFSFLAHSPS	FDHSSLSYPL	FDWEEDLLAL	QENSGSQAFP
51	FTTSLPLPD	LEPLSE DVLN	SYSSASWNET	EQNRGDGASS	EKK RENGTVK
101	ETTKRKINE	RHREHSVRII	SDITTYTTSS	AP TTL SK ETV	SRFYMPITQ
151	AAIALNVGLT	LLKRRCRELG	IRR WPHR KLM	SLNTLIS NVK	ELQKMEGEE
201	AEK LQDALEM	LEK EKRT I ED	LPDLEF KDKT	KRLRQACFKA	NHKRKKRSL
251	KSDQSQVPSC	SSSGSVPSDE	SVDEAGMESD	EEMKYLLCGE	SSEFTSGL

Abb. 3-12: Aminosäuresequenzen von AtRKD1 und AtRKD2

Rot markiert sind die identifizierten Peptidfragmente aus der MALDI-TOF-Analyse. Massen von sechs Peptidfragmenten (AtRKD1) und sieben Peptidfragmenten (AtRKD2) stimmen zu 100 % mit den korrespondierenden Aminosäuresequenzen überein. Die RWP-RK-Domäne der RKD-Proteine ist unterstrichen.

Die identifizierten Peptidfragmente stimmten zu 100 % mit den korrespondierenden Aminosäuresequenzen von AtRKD1 und AtRKD2 überein (Abb. 3-12). Der prozentuale Anteil der identifizierten Peptide an den gesamten Aminosäuresequenzen liegt bei 30 % (AtRKD1) bzw. 19 % (AtRKD2).

Die denaturierenden Bedingungen führen höchstwahrscheinlich zur fehlenden bzw. nicht korrekten Faltung der rekombinanten Proteine und damit zur Aufreinigung biologisch

inaktiver Proteine. Obwohl es in einigen Fällen möglich ist, Proteine zu renaturieren, ist die Ausbeute meist gering und der Rückfaltungsprozess sehr zeitaufwendig (Schmidt und Hoffman, 2002). Daher wurden verschiedene Optimierungsversuche mit dem Ziel durchgeführt, native Proteine zu produzieren.

In einem ersten Versuch wurden sogenannte „Hybrid“-Bedingungen getestet. Die Zelllyse und Bindung der rekombinanten Proteine an die Ni-NTA-Säule erfolgten unter denaturierenden Bedingungen (6 M GuHCl). Wasch- und Elutionsschritte wurden unter nativen Bedingungen (steigende Konzentrationen an Imidazol) durchgeführt. Le (2011) hat gezeigt, dass es möglich ist, mit dieser Methode biologisch aktive Proteine aufzureinigen. Allerdings führte die Anwendung der Hybridbedingungen nicht zur Reinigung der rekombinanten Proteine AtRKD1 und AtRKD2 aus dem Proteinextrakt. Es ließ sich zwar eine Bindung an die Säule nachweisen, aber eine Elution unter nativen Bedingungen war nicht möglich (Abb. B1, Anhang B).

Da für Antikörperproduktionen nicht das gesamte Protein erforderlich ist, sondern durchaus Proteinfragmente verwendet werden können, wurde in dem nachfolgenden Versuch die kodierende Sequenz von *AtRKD1* (803 bp) vom 3' Ende deletiert, um zwei DNA-Sequenzen mit 600 bp Länge (*AtRKD1_600*) und 300 bp Länge (*AtRKD1_300*) zu isolieren. Für die heterologe Genexpression wurde das pQE30-Überexpressionssystem verwendet. Die Deletionen am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz von *AtRKD1* führten allerdings nicht zu einer größeren Ausbeute an löslichem Protein (Abb. B-2, Anhang B). Auch die Senkung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 28°C hatte keinen Effekt auf die Expressionsbedingungen. Die rekombinanten Peptide *AtRKD1_600* und *AtRKD1_300* können nur unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden.

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Position des *tags* C-terminal bzw. N-terminal des rekombinanten Proteins die Löslichkeit in *E. coli* bestimmen kann (Sachdev und Chirgwin, 1998). Deshalb wurde der Vektor pQE60 eingesetzt, in dem die kodierende Sequenz für den Poly-HIS-*tag* C-terminal der eingefügten DNA-Sequenz vorgeschaltet ist. In dem *E. coli* Stamm M15 konnten weder *AtRKD1* noch *AtRKD2* synthetisiert werden. Weder unter nativen noch unter denaturierenden Bedingungen wurden spezifische Proteinbanden detektiert (nicht gezeigt).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit dem bakteriellen pQE30-Expressionssystem in *E. coli* die rekombinanten Proteine *AtRKD1* und *AtRKD2* synthetisiert und mittels der MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden. Trotz verschiedener Optimierungsversuche ließen sich die Proteine nur unter denaturierenden Bedingungen nachweisen.

3.2.2. Rekombinante Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana*

Die Verwendung eines pflanzlichen Expressionssystems bietet die Möglichkeit, rekombinante Proteine mit allen post- und cotranslationalen Modifikationen zu erhalten. In dieser Arbeit wurden die viralen MagnICON- Vektoren (Icon Genetics, Deutschland) für eine transiente Proteinexpression in Tabak verwendet (vgl. Kap. 2.2.12.2). Für einen ersten Test wurde die kodierende Sequenz von *AtRKD2* in den Vektor pICHM-10990 (modifiziert von Zimmermann et al., 2009) ligiert. Das Konstrukt enthält N-terminal der eingefügten Sequenz *AtRKD2cds* eine DNA-Sequenz, die für den Poly-HIS-tag kodiert. Für eine rekombinante Proteinexpression wurden zusätzlich die Vektoren pICH10570 und pICH14011 benötigt (vgl. Kap. 2.1.5.1). Die drei Vektoren wurden in den Agrobakterienstamm GV3101 transferiert und die resultierenden rekombinanten Agrobakterien in das Blattmaterial infiltriert. Blattproben konnten nur in einem Zeitraum von vier bis sieben Tage nach der Injektion entnommen werden, da innerhalb der sieben Tage zunehmend nekrotische Erscheinungen an den infiltrierten Blattstellen auftraten. Es wurde eine Proteinbande bei 34 kDa detektiert, deren Größe dem *AtRKD2*-Protein zugeordnet werden kann (Abb. 3-13). Die stärkste Proteinexpression wurden am Tag 5 nach der Injektion beobachtet.

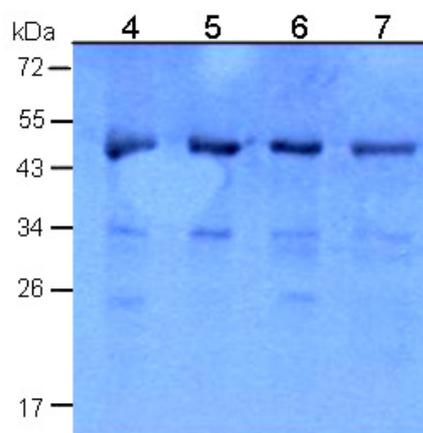


Abb. 3-13: Rekombinante Proteinexpression von *AtRKD2* in *Nicotiana benthamiana*

Für Western-Blot-Analysen wurden je 20 µg Rohproteinextrakt isoliert aus den Blattproben der Tage 4 bis 7 aufgetragen. Die Detektion spezifischer Proteinbanden erfolgte mit einem Anti-HIS-Antikörper.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der rekombinanten Proteinexpression eine gute Grundlage für die Isolierung von *AtRKD*-Proteinen aus *Nicotiana benthamiana* bieten.

3.3 Protein-Protein-Interaktionen

Die tatsächlichen Funktionen der AtRKD-Proteine in der Zelle sind bislang nicht eindeutig aufgeklärt. Der Nachweis der Kernlokalisierung (Koszegi, 2008) und die strukturelle Ähnlichkeit zu den AtbZIP- Transkriptionsfaktoren sind Grundlage für die Hypothese, dass es sich bei den AtRKD-Proteinen um Faktoren handelt, die in den Zellkern transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktoren wirken.

3.3.1 Untersuchungen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Ziel des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist es, Interaktionspartner von Proteinen an ihrem Wirkungsort zu finden und zu analysieren. Das System basiert auf der *in vivo* Analyse von Fusionsproteinen in Hefe. Dabei können cDNA-Banken nach unbekanntem Interaktionspartnern durchsucht werden.

Von den Mitgliedern der *AtRKD*-Genfamilie sind *AtRKD1*, 2 und 4 Embryosack-spezifisch aktiv (Koszegi, 2008). Hieraus erfolgte die Annahme, dass Protein-Protein-Interaktionen im Embryosack stattfinden und mögliche unbekannte Proteininteraktionspartner im weiblichen Gametophyten exprimiert werden. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurden unbefruchtete Stempel (Pistille) verwendet.

3.3.1.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus *Arabidopsis*-Pistillen

Aus ca. 900 geschlossenen Blüten von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia-0) wurden Pistille freigelegt. Um eine synchrone Entwicklung der Samenanlagen zu gewährleisten, erfolgte eine Inkubation der präparierten Pflanzen für zwei Tage im Lichtraum. Aus den isolierten Pistillen wurden 1,7 µg mRNA gewonnen und anschließend eine cDNA-Synthese auf Grundlage des Stratagene-Protokolls durchgeführt (vergleiche Kap. 2.2.15.1).

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurden radioaktiv markierte Proben nach der Erst- und Zweitstrangsynthese entnommen (Abb. 3-14 A). Der Nachweis der Kontrollprobe (Bande um 1,8 kb) zeigt, dass die cDNA-Synthese erfolgreich durchgeführt wurde. Die Fragmente der Pistill-cDNA aus der Erststrangsynthese wiesen eine breite Verteilung der Fragmentgrößen bei einem Maximum um 1 kb auf. Nach der Zweitstrangsynthese sind die Fragmente nur noch sehr schwach zu erkennen. Dies ist laut dem Hersteller (Stratagene, Kanada) auf die relative Menge von [α^{32} -P] und NTP in der Erst- bzw. Zweitstrangsynthese zurückzuführen.

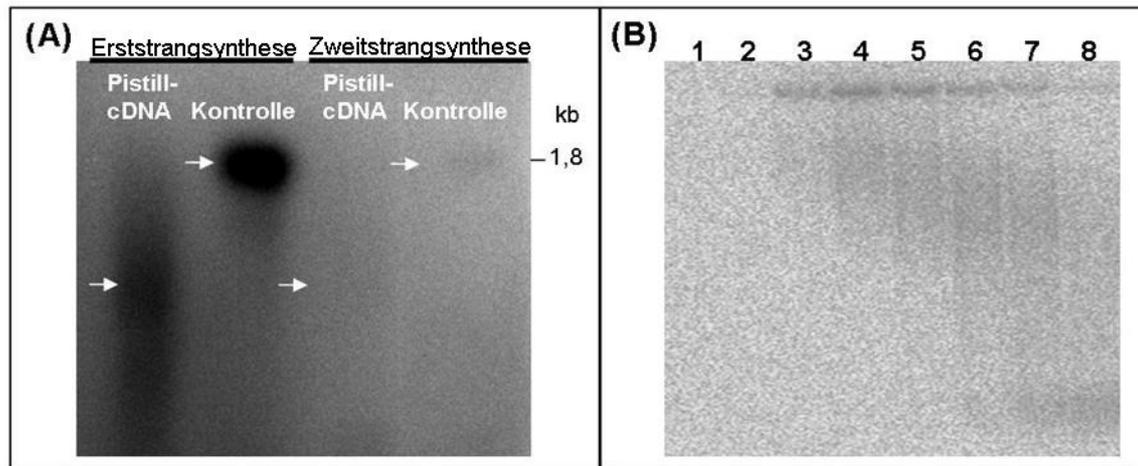


Abb. 3-14: Überprüfung der Pistill-cDNA-Synthese und der cDNA-Fractionen

(A) Die radioaktiv markierten Proben wurden auf 1 % alkalischen Agarosegel aufgetragen und nach der Gelelektrophorese über Nacht exponiert. Die Kontrolle war Test-RNA aus dem Stratagene-Kit. (B) Pistill-cDNA wurde über eine mit Sepharosegel CL-2B gefüllte Säule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 5 % nativem Acrylamidgel überprüft. Die Exposition erfolgte über Nacht.

Die aus Pistill-mRNA generierte doppelsträngige cDNA wurde durch Größenfraktionierung aufgetrennt (Abb. 3-14 B). Die größten auf dem Acrylamidgel nachweisbaren cDNA-Fragmente traten in den Fraktionen 3 bis 5 auf, während in den weiteren Fraktionen kleinere cDNA-Fragmente und zunehmend nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu erkennen sind. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, wurden aus den Fraktionen 2 bis 5 insgesamt 150 ng Pistill-cDNA aufgereinigt.

Von der aufgereinigten Pistill-cDNA wurden 45 ng cDNA mit 500 ng HybriZAP-2.1 Vektor-DNA ligiert. Die primäre HybriZAP-2.1-Bibliothek wies ca. 3×10^5 Klone auf. Die Amplifizierung der Klone erfolgte in dem Bakterienstamm XL0LR (siehe Kap. 2.1.4.1).

Zur Überprüfung der Fragmentgrößen inserierter Pistill-cDNA wurden Plasmide aus 30 zufällig gewählten Kolonien isoliert. Die Plasmide wurden mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. In der Abbildung 3-15 ist das Ergebnis der Plasmidpräparation von 18 Klonen dargestellt. Die einheitlich auftretende Bande bei 7,7 kb entspricht dem linearisierten Vektor pAD-GAL2.1. Die Fragmente von 28 zufällig gewählten Klonen ergeben eine durchschnittliche cDNA-Länge von 1,3 kb. Zwei der Klone zeigten eine einzige Bande, die dem leeren Vektor entspricht (vgl. Klon 6 in Abb. 3-15).

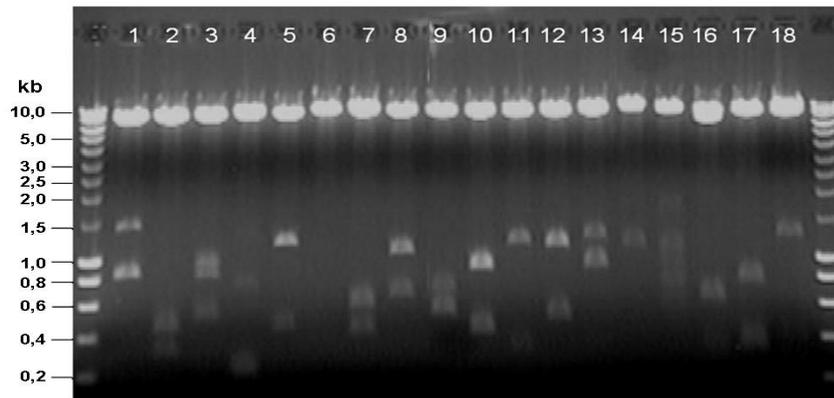


Abb. 3-15: Testverdau von 18 zufällig ausgewählten Klonen der Pistill-cDNA-Bank

Bakterienkolonien wurden über Nacht bei 37°C vermehrt. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA und Doppelverdau mit *EcoRI* und *BamHI* wurden die Proben in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Zur Identifizierung von cDNA-Fragmenten der Pistill-Bibliothek wurden 18 der 30 zufällig ausgewählten Klone sequenziert. Die Sequenzhomologiesuche (BLASTsearch, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) ergab, dass jede Insertion einer bestimmten Gensequenz entspricht (Tab. 3-2). Von der Genannotation lassen sich allerdings keine Rückschlüsse auf eine spezifische Genaktivität in den Samenanlagen ziehen. Erst die Veröffentlichung Genomweiter Expressionsdaten von Genen, die im Eiapparat und der Zentralzelle des reifen *Arabidopsis*-Embryosacks transkriptionell aktiv sind (Wuest et al., 2010), ermöglichte es, die 18 Gene auf eine spezifische Aktivität in dem weiblichen Gametophyten zu überprüfen. Laut der Analyse weisen zehn der Gene erhöhte Transkriptlevel im Embryosack auf (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Genannotation der 18 sequenzierten Gene aus der Pistill-cDNA-Bank

Der Vergleich mit Daten aus einer Mikroarray-Analyse (Wuest et al., 2010) zeigt, dass zehn der identifizierten Gene ein erhöhtes Transkriptlevel im Embryosack aufweisen.

Gennummer	Funktion	Nachweis von Transkripten im Embryosack
AT1G07840	Leucizipper factor-related	x
AT1G12580	PEPKR1	
AT2G21660	AtGRP7	x
AT2G24270	Aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	
AT2G46560	WD-40 Transducinfamilie	x
AT2G47060	putative Serin-/ Threoninkinase	x
AT3G10550	Phosphatase	
AT3G21865	PEX22, Proteinbindung	x
AT3G41768	18SrRNA	
AT3G56910	PSRP5	x
AT4G00830	RNA-Erkennungsmotiv (RRM) enthaltendes Protein	x
AT4G26590	AtOPT5	x
AT5G02840	Transkriptionsfaktor LCL1 (Myb-Familie)	
AT5G09600	Succinatdehydrogenase	
AT5G16200	50S ribosomales Protein	
AT5G20920	EMB1401	x
AT5G25520	Elongationsfaktor	x
AT5G62350	Invertase	

Während genomische DNA generell kodierende und nichtkodierende Regionen umfasst, enthält eine cDNA-Bank in der Regel nur transkribierte DNA-Fragmente. Die Pistill-cDNA-Bank wurde auf *AtRKD1*- und *AtRKD2*-Transkripte überprüft. Zur Kontrolle wurden die Gene *AtRKD1* und *AtRKD2* aus genomischer DNA amplifiziert (Abb. 3-16).

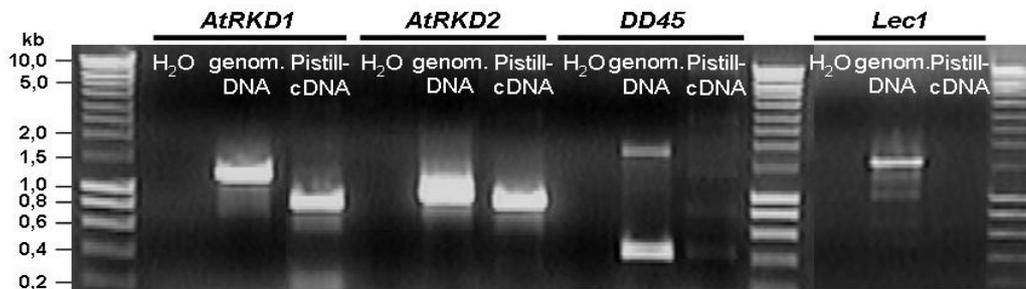


Abb. 3-16: Nachweis von *AtRKD1*- und *AtRKD2*- Transkripten in der Pistill-cDNA-Bank

Für die PCR-Analyse wurden als Kontrollen Wasser und genomische DNA (aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* isoliert) verwendet. Eingesetzte Primer sind *AtRKD1oStartNcoIfor* und *AtRKD1oStopSalIrev*, *AtRKD2oStartNcoIfor* und *AtRKD2oStopSalIrev*, *DD45for* und *DD45rev*, *Lec1for* und *Lec1rev* (Anhang A). Die genomische Sequenz von *LEC1* umfasst 1,8 kb. Amplifizierte DNA wurde in 1 % Agarose-Gel aufgetrennt.

Die genomischen Amplifikationsprodukte von *AtRKD1* (1,3 kb) und *AtRKD2* (1,1 kb) zeigen deutliche Größenunterschiede zu den amplifizierten Transkripten aus der Pistillbibliothek (*AtRKD1* mit 0,8 kb und *AtRKD2* mit 0,9 kb). Die Bandengrößen stimmen mit den theoretisch ermittelten Werten überein. Zusätzlich wurde die Pistill-cDNA-Bank auf das Vorhandensein der Transkripte von *DD45*, welches in der Eizelle des reifen Embryosacks aktiv ist (Steffen et al., 2007), und von *LEC1*, das für einen in der Embryoentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktor kodiert (Lotan et al., 1998), untersucht. Dabei wurde nur eine sehr schwache Bande von dem Intron-losen *DD45* (ca. 0,4 kb) nachgewiesen. Da die stichprobenartige Überprüfung der Pistill-cDNA-Bank auch darauf hinwies, dass die Pistill-cDNA nicht durch genomische Fragmente verunreinigt ist, wurde die Pistill-cDNA-Bank für weiterführende Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen eingesetzt.

3.3.1.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit der Pistill-cDNA-Bank aus *Arabidopsis thaliana*

In dem Hefe-Zwei-Hybrid-System werden die Eigenschaften des GAL4-Proteins als Transkriptionsfaktor genutzt, um in Hefe Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Die DNA-bindende (BD) und Transkriptions-aktivierende Domäne (AD) von GAL4 sind jeweils unabhängig voneinander fähig, ihre Funktion zu erfüllen (Keegan et al., 1986). Diese Eigenschaft wird innerhalb des Zwei-Hybrid-Systems genutzt, indem zu untersuchende Proteine in der Hefe als Fusionsproteine exprimiert werden. Hierbei werden ein Partner (*Bait*)

an die DNA-bindende Domäne und der andere Partner (*Prey*) an die Transkriptionsaktivierende Domäne fusioniert. Die GAL4-Domänen können nur ihre Funktion erfüllen, wenn *Bait*- und *Prey*-Protein miteinander interagieren. So wird die aktivierende Domäne in die Nähe des Transkriptionsstartpunkts eines Reportergens gebracht, das in der Promotorregion Bindestellen für die DNA-bindende Domäne besitzt (Abb. 3-17). Als Reporter dienen hier Prototrophie vermittelnde Faktoren (z.B. HIS3) und die β -Galactosidase. Auf Minimalmedium ohne die entsprechenden Aminosäuren wachsen dann Hefen, die miteinander interagierende *Bait*- und *Prey*-Proteine exprimieren. Das Wachstum und die entsprechende Blaufärbung der Hefekolonien dienen hier als Nachweis einer Interaktion.

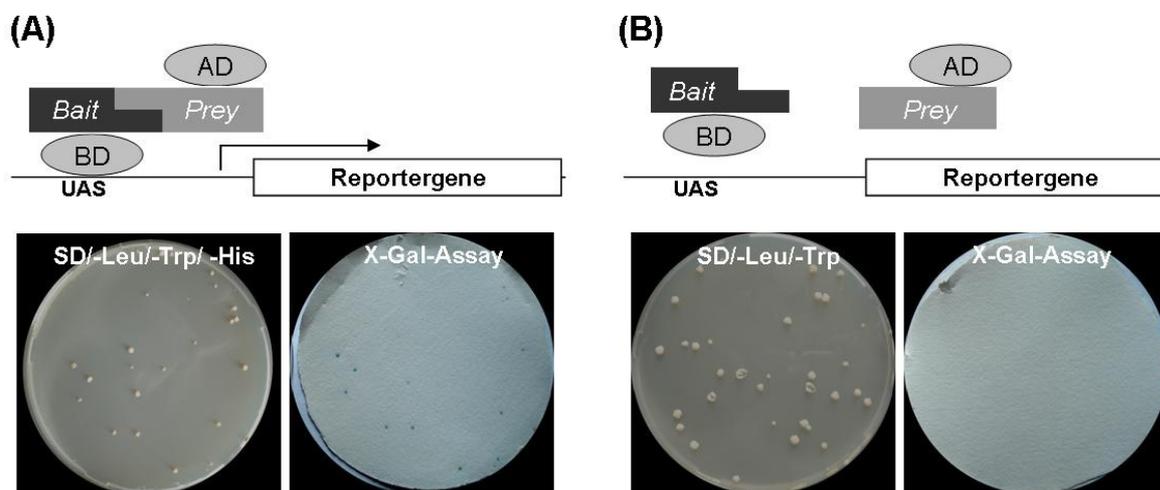


Abb. 3-17: Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

(A) Die Expression der Kontrollvektoren BD-WT und AD-WT (positive Interaktionskontrolle) in dem Hefestamm YRG-2 (Stratagene, Kanada) führt zur Interaktion der Fusionsproteine. Dabei aktiviert die aktivierende Domäne die Transkription der Reportergene. Die Hefen wachsen auf Minimalmedium ohne die Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Histidin. Im X-Gal-Assay wird die Aktivität des exprimierten Enzyms β -Galactosidase in Form einer Blaufärbung der Hefekolonien nachgewiesen. (B) Fehlende Interaktionen zwischen den Fusionsproteinen AD-WT und pLaminC in Hefestamm YRG-2 (negative Interaktionskontrolle) bedeuten keine Aktivierung der Transkription der Reportergene. Hefeklonen können ohne Leucin und Tryptophan wachsen, brauchen aber Histidin (nicht gezeigt) und die Kolonien weisen keine Blaufärbung im X-Gal-Assay auf.

Die aus Pistill-mRNA hergestellte cDNA-Bank sollte als Vorlage für die Detektion unbekannter *Prey*-Proteine dienen. Ziel war es, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System mögliche Proteininteraktionspartner von AtRKD1 zu identifizieren.

Zur Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* und Hefe wurde die transkribierte Sequenz von *AtRKD1* aus *Arabidopsis*-Blüten-cDNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in die entsprechende Schnittstelle des Vektors pBD-GAL4 Cam (BD) kloniert (Kap. 2.2.15.2). Zur Kontrolle wurde das inserierte Fragment sequenziert.

Für die Etablierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde die Selbstaktivierung des AtRKD1-Proteins untersucht. Das Konstrukt und die Kontrollvektoren pBD-WT sowie pGAL4 (siehe Kap. 2.1.5.2) wurde in den Hefestamm YRG-2 transferiert. Die resultierenden Stämme wurden auf SD/-Trp (Minimalmedium ohne Tryptophan) und SD/-Leu (Minimalmedium ohne Leucin) ausgestrichen. Der Hefestamm, in dem *AtRKD1cds* fusioniert an die Bindedomäne exprimiert wird, zeigte ein Wachstum auf Medium ohne Tryptophan, aber keine Expression des Reportergens *lacZ* (Abb. 3-18).

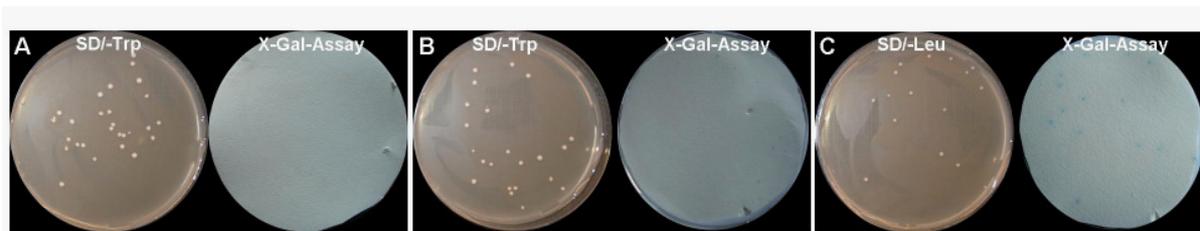


Abb. 3-18: Fehlende Selbstaktivierung von AtRKD1

Hefezellen transformiert mit (A) pLaminC, (B) BD-RKD1 und (C) pGAL4 wurden auf SD/-Trp bzw. SD/-Leu ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Im X-Gal-Assay (Kap. 2.2.15.2) wurden Filterabdrücke der Hefekolonien genommen und in X-Gal-Lösung bei 30°C inkubiert. Die Negativkontrolle Vektor BD-Lam kodiert für *LaminC* fusioniert an die Bindedomäne, die Positivkontrolle Vektor pGAL4 enthält eine kodierende Region für das Gen GAL4.

Zur Isolierung von möglichen AtRKD1-Interaktionspartnern wurde der Stamm YRG-2 mit der Pistill-cDNA und dem Vektor BD-RKD1 kotransformiert. Die Transformationseffizienz betrug $7,8 \times 10^5$ Transformanten für 40 µg eingesetzte Pistill-cDNA. 206 Klone wurden selektiert, die auf Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (SD/-Leu/-Trp/-His, 3xDO) wuchsen und bei denen eine enzymatische Aktivität der β -Galactosidase nachgewiesen werden konnte. Die Klone wurden auf 3xDO wiederholt ausgestrichen, nach drei Tagen Inkubation isoliert und die cDNA amplifiziert sowie die Kandidaten sequenziert.

Unter den 156 erhaltenen Kandidaten befanden sich 142 Proteine mit verschiedenen Funktionen. Zehn davon besaßen eine Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren und von drei weiteren Faktoren ist bekannt, dass sie im weiblichen Gametophyten spezifisch aktiv sind. (Tab. C1, Anhang C).

Diese 13 Faktoren wurden auf eine spezifische Protein-bindende Aktivität überprüft. Dazu wurde der Stamm YRG-2 mit den aus der Pistill-cDNA-Bank isolierten Plasmiden (AD-cDNA) sowie dem Vektor pLaminC kotransformiert. Die resultierenden Stämme wurden auf 3xDO ausgestrichen. Das Wachstum von Hefekolonien auf 3xDO sowie der Nachweis sich blaufärbender Kolonien sind eindeutige Indikatoren für eine Expression der Reportergene

(Abb. 3-19). Somit muss geschlussfolgert werden, dass die in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse 13 identifizierten Faktoren unabhängig von AtRKD1 in der Lage sind, die Reporter gene zu aktivieren.

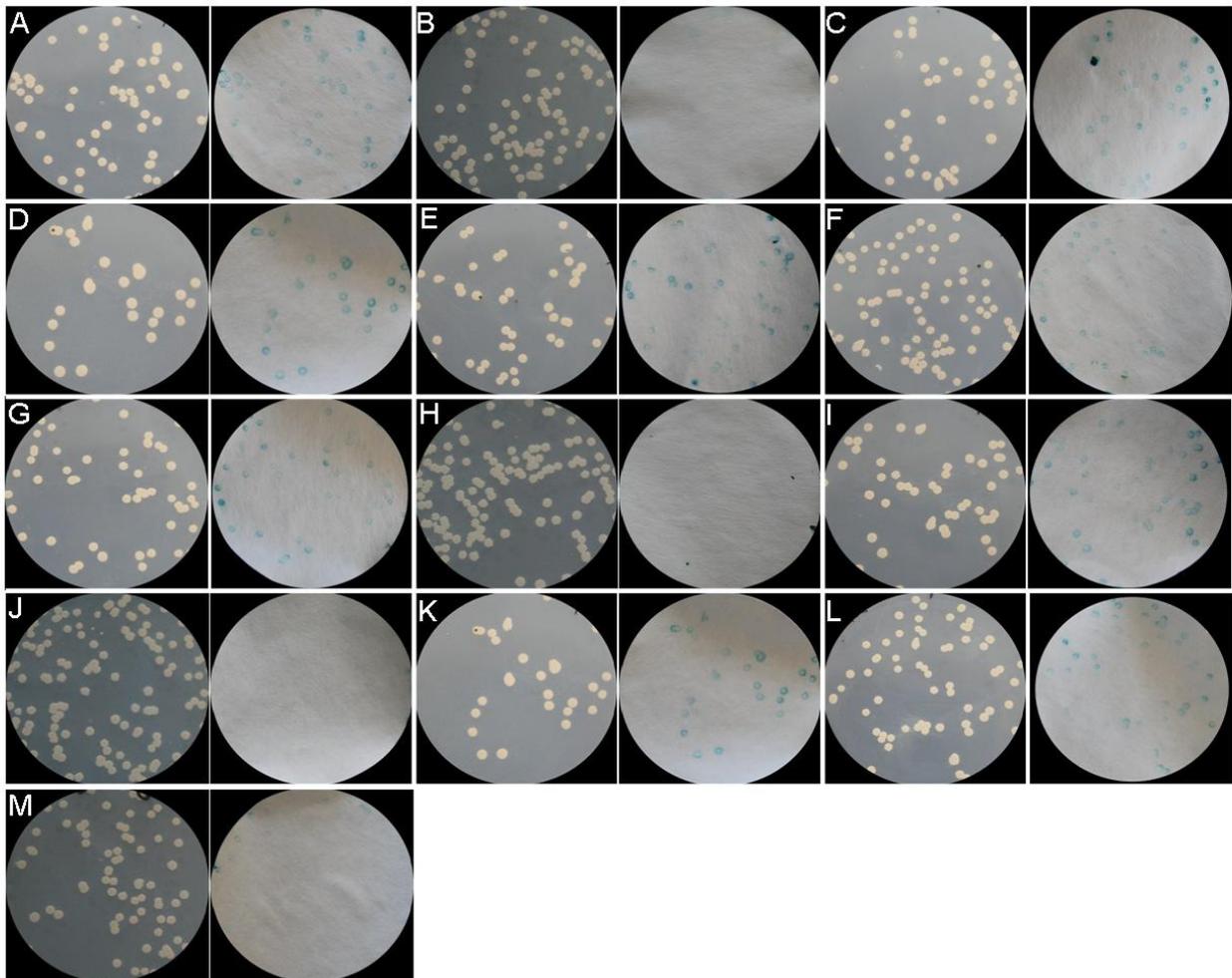


Abb. 3-19: Überprüfung Proteinwechselwirkungen putativer AtRKD1-Kandidaten mit LaminC
 Transformierte Hefekulturen, die jeweils die AtRKD1-Kandidatengene, fusioniert an eine Aktivierungsdomäne, und LaminC, fusioniert an die DNA-bindende Domäne, exprimieren, wurden auf SD-His/-Leu/-Trp (links) ausgestrichen und anschließend mit dem X-Gal-Assay (rechts) getestet. Das Kolonienwachstum aller 13 transformierten Hefekulturen und die Blaufärbung der Kolonien zeigen eine Aktivierung der Reporter gene an. (A) At1g16520, (B) At1g17880, (C) At1g29220, (D) At1g32870, (E) At1g63650, (F) At1g72260, (G) At2g21655, (H) At2g22670, (I) At2g36320, (J) At2g36740, (K) At3g03340, (L) At3g57920, (M) At4g31550

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die aus der Pistill-cDNA-Bank detektierten Kandidaten keine nachweisbaren Protein-Interaktionen mit AtRKD1 ausführen.

3.3.1.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer Eizell-cDNA-Bank

Die Pistill-cDNA-Bank besteht aus transkribierten Sequenzen sowohl von gametophytisch als auch von sporophytisch aktiven Genen. Transkripte von *AtRKD1* und *AtRKD2* ließen sich aber nur im Embryosack nachweisen (Koszegi, 2008). Die Verwendung einer Eizell-cDNA-Bank (Kooperation mit Prof. T. Dresselhaus und Dr. S. Sprunck, Universität Regensburg) bot die Möglichkeit, *Prey*-Proteine im gleichen Gewebe der vermutlich Eizell-spezifisch exprimierten Gene *AtRKD1* und *AtRKD2* zu detektieren. In diesem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Clontech, USA) basiert der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen auf die Expression der Reportergenene *HIS3* und *ADE2* sowie des für die β -Galactosidase kodierende Gen *lacZ*.

Voraussetzung für die Durchführung der Zwei-Hybrid-Analyse war die Herstellung von zwei Konstrukten. Die kodierenden Regionen von *AtRKD1* und *AtRKD2* wurden in die internen Schnittstellen *EcoRI*/*SalI* des Vektors pGBKT7 kloniert, der eine kodierende Sequenz für den Myc-tag zwischen Bindedomäne (BD) und multipler Klonierungsstelle (MCS) enthält. Zur Kontrolle erfolgte die Sequenzierung der inserierten DNA-Sequenzen. Der Hefestamm Y187 wurde jeweils mit den zwei Konstrukten transformiert.

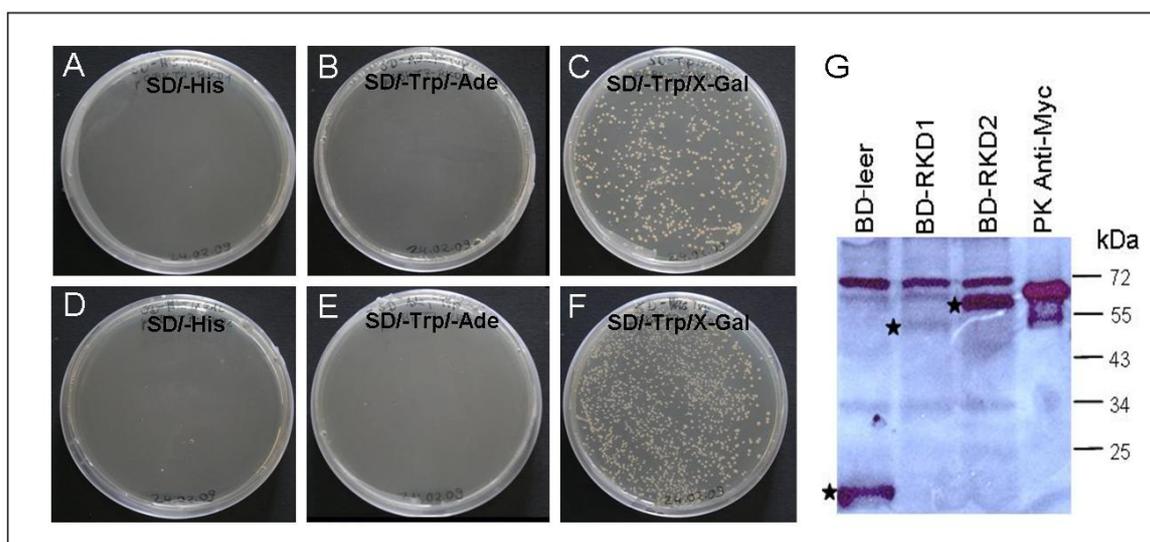


Abb. 3-20: Überprüfung der Synthese und Selbstaktivierung von *AtRKD1* und *AtRKD2* im Hefestamm Y187

Hefezellen transformiert mit *BD-RKD1* (A-C) bzw. *BD-RKD2* (D-F) zeigen kein Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin (A, D) sowie Selektionsmedium ohne Tryptophan und Adenin (B, E). Ein Hefekolonienwachstum wurde auf Medium ohne Tryptophan (C, F) beobachtet. Die Expression von Fusionsproteinen wurde durch eine Western-Blot-Analyse mit Anti-Myc Antikörper nachgewiesen (G): BD-leer = pGBKT7; BDRKD1 = pGBKT7*AtRKD1*cds; BD-RKD2 = pGBKT7*AtRKD2*cds; PK Anti-Myc = Positivkontrolle TNF α -ELP (U. Conrad, IPK). Spezifische Proteinbanden sind markiert mit „*“.

In dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde die Selbstaktivierung der Proteine AtRKD1 und AtRKD2 überprüft. Dazu wurden die transformierten Hefestämme auf Minimalmedium ohne Histidin (SD/-His), ohne Tryptophan (SD/-Trp) sowie Minimalmedium ohne Tryptophan und Adenin (SD/-Trp/-Ade) ausgestrichen (Abb. 3-20 A-F). Beide Hefestämme wuchsen nicht auf SD/-His und SD/-Trp/-Ade. Hefekolonien, die *AtRKD1* bzw. *AtRKD2* fusioniert an die DNA-bindende Domäne exprimierten (BD-RKD1 und BD-RKD2), wuchsen nur auf SD/-Trp. Eine β -Galactosidase-Aktivität war nicht nachweisbar.

Weiterhin wurde die Synthese der Fusionsproteine in dem Hefestamm Y187 überprüft. Der Nachweis wurde mit einem Anti-Myc Antikörper durchgeführt (Abb. 3-20 G). Als Kontrolle wurde der leere Vektor pGBKT7 (BD-leer) verwendet, dessen Bindedomäne ein Molekulargewicht von 16,8 kDa hat. Zusätzlich wurde TNF α -ELP (U. Conrad, IPK) zur Detektion des Anti-Myc Antikörpers eingesetzt. Es konnten eine schwache Bande von BD-RKD1 um die 50 kDa (theoretisch 47,3 kDa) und eine starke Bande von BD-RKD2 um die 57 kDa (theoretisch 52,3 kDa) nachgewiesen werden. Der Nachweis der fehlenden Selbstaktivierung und der Nachweis der AtRKD-Proteine im Hefe-System waren Voraussetzung dafür, um mit der Durchsichtung der Eizell-cDNA-Bank nach Interaktionspartnern zu beginnen.

Zur Detektion von Interaktionspartnern wurden Hefepaarungen mit den haploiden Zellen des Hefestammes A109 (Typ α mit Eizell-cDNA) und den haploiden Zellen des Hefestammes Y187 (Typ α mit BD-RKD1, BD-RKD2) durchgeführt. Die Hefepaarungen führten zu der Ausbildung diploider Zellen. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die größten Hefekolonien der beiden Ansätze auf 3xDO und parallel dazu auf 4xDO (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) gestrichen. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung der *lacZ*-Reportergenaktivität (Kap. 2.2.15.3). Aus den wiederholt ausgestrichenen und selektierten Hefekolonien wurde cDNA isoliert, die Fragmente mit einer Größe von mindestens 200 bp sequenziert und eine Sequenzhomologiesuche (BLASTsearch, NCBI) durchgeführt (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Selektion putativer Interaktionspartner von AtRKD1 und AtRKD2

Hefepaarung mit	Selektion der Klone		Sequenzhomologiesuche (NCBI, nBLAST)		
	3xDO	X-Gal-Assay	sequenzierte Klone	mehrfach identifizierte Klone	einzeln identifizierte Gene
AtRKD1	288	26	26	5	12
AtRKD2	470	262	131	11	55

Unter den 26 (AtRKD1) bzw. 131 (AtRKD2) erhaltenen Kandidaten befanden sich 17 Gene bzw. 66 Gene (Tab. C2 und C3, Anhang C). Davon befanden sich 3 Gene (At1g07750, At1g76750, At1g31450) sowohl unter den AtRKD1- als auch unter den AtRKD2-Kandidaten. Zur Verifizierung der Protein-Protein-Interaktionen in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden alle 17 AtRKD1-Kandidaten (AD1-cDNA) und 11 AtRKD2-Kandidaten (mehrfach identifizierte Klone, AD2-cDNA) ausgewählt. Dazu wurden Hefepaarungen der Stämme Y187 (Synthese von BD-RKD1, BD-RKD2, BD-leer) mit den Stämmen A109, die jeweils die ausgewählten Kandidaten fusioniert an die aktivierende Domäne exprimieren, durchgeführt. Die Selektion der diploiden Hefeklone erfolgte auf 2xDO (SD/-Trp/-Leu) und 4xDO.

Alle Hefestämme zeigten ein Wachstum auf 2xDO, was sowohl auf eine Expression der Kandidaten mit aktivierender Domäne (Prototrophiemarker *Leu*) als auch auf eine Expression der Faktoren mit Bindedomäne (Prototrophiemarker *Trp*) zurückzuführen ist (Abb. 3-21).

Die Hefestämme, die BD-RKD1 und den jeweiligen AD1-cDNA-Kandidaten gemeinsam exprimieren, wuchsen auch auf 4xDO. Das war nicht der Fall, wenn die AD1-cDNA-Kandidaten gemeinsam mit BD-leer exprimiert wurden. Das gleiche Resultat wurde bei den Stämmen, die AD2-cDNA-Kandidaten und BD-RKD2 bzw. BD-leer gemeinsam exprimierten, beobachtet. Allerdings war es nicht möglich, bei diploiden Klonen der Hefepaarung AD1-cDNA mit BD-RKD1 eine Expression des Reportergens *lacZ* nachzuweisen. Nur eine Kolonie der Hefepaarung BD-RKD1xAD1-8 wies eine Blaufärbung vermutlich aufgrund einer Kontamination auf. Hingegen wurde in den Hefestämmen, die AD2-cDNA-Kandidaten und BD-RKD2 gemeinsam exprimieren, eine *lacZ*-Reportergenaktivität beobachtet.

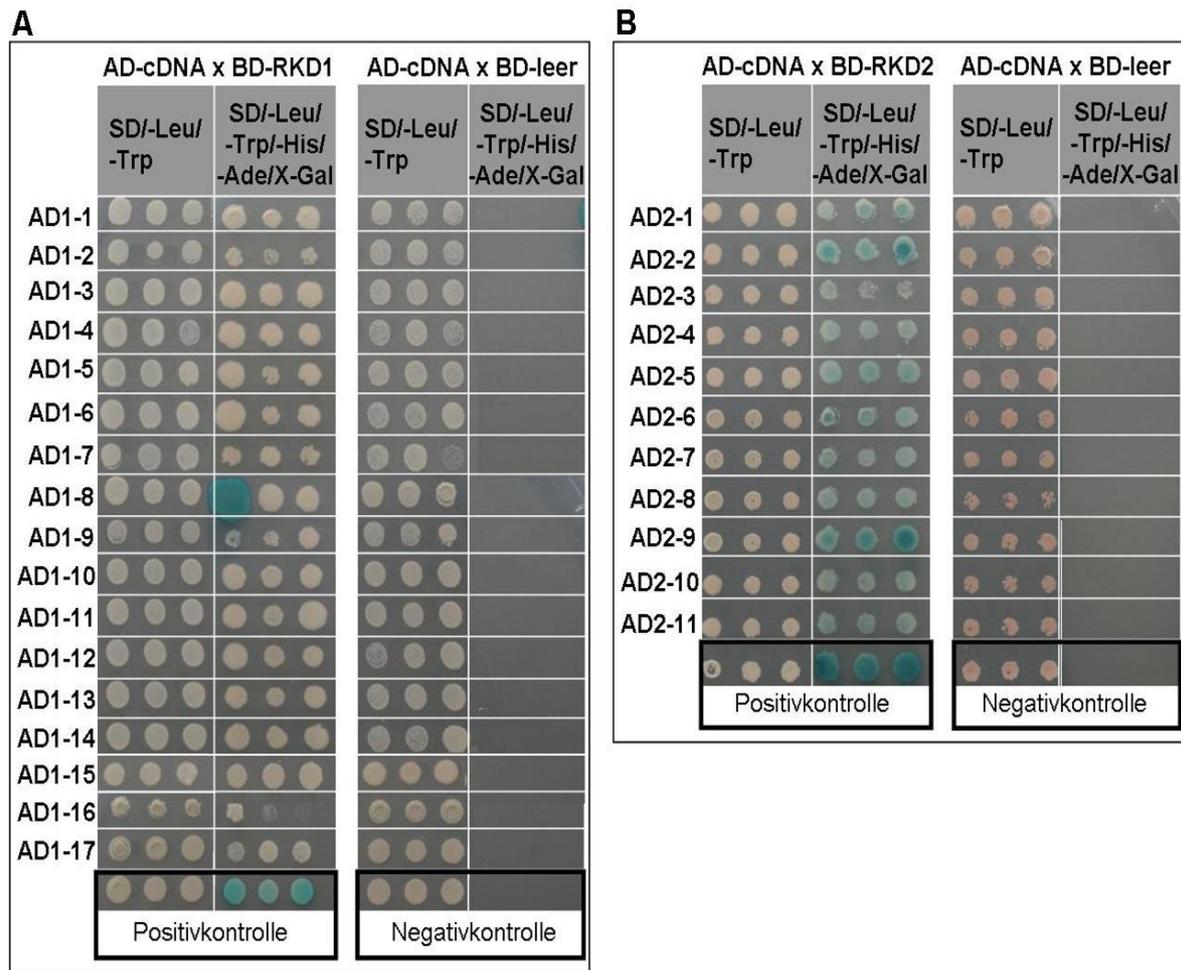


Abb. 3-21: Überprüfung der Protein-Protein-Interaktionen von ausgewählten AtRKD1- sowie AtRKD2-Kandidaten im Hefe-Zwei-Hybrid-System

(A) Testergebnisse von allen 17 identifizierten AtRKD1-Kandidaten: AD1-1 At1g31450, AD1-2 At1g07750, AD1-3 At1g71810, AD1-4 At5g42080, AD1-5 At4g03200, AD1-6 At5g11110, AD1-7 At5g65260, AD1-8 At5g55740, AD1-9 At3g24340, AD1-10 At5g13150, AD1-11 At1g11680, AD1-12 At5g14050, AD1-13 At3g02360, AD1-14 At1g76750, AD1-15 At4g24130, AD1-16 At2g02090 und AD1-17 At3g47370. (B) Testergebnisse von 11 mehrfach identifizierten AtRKD2-Kandidaten: AD2-1 At2g28680, AD2-2 At1g07750, AD2-3 At1g31450, AD 2-4 At2g35620, AD 2-5 At1g76750, AD2-6 At2g02770, AD2-7 At1g50400, AD2-8 At5g040660, AD2-9 At2g21740, AD2-10 At4g31980 und AD2-11 At2g07675. Selektionsmedien: 2xDO (SD/-Leu/-Trp) und 4xDO (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade), überschichtet mit X-Gal-Lösung und Bactoagar. Negative Interaktionskontrolle: pGBKT7-Lam x pGADT7-T; positive Interaktionskontrolle: pGBKT7-53 x pGADT7-T.

3.3.2 Versuch zur Bestätigung von gefundenen Protein-Protein-Interaktionen

In dem folgenden Teil wurde versucht, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Ergebnisse in einem ersten unabhängigen Experiment zu überprüfen. Es wurden die 3 Kandidaten ausgewählt, die in beiden Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen auftraten (Tab. 3-4). Unter den 63 identifizierten AtRKD2-Kandidaten befanden sich zwei Faktoren, die ebenfalls wie zwei der ausgewählten Kandidaten Mitglieder der Cupinfamilie sind bzw. eine gleiche

Domänenstruktur DUF 1278 (*domain of unknown function* 1278) aufweisen. Aufgrund dessen wurden auch diese Kandidaten für ein weiteres Experiment ausgewählt.

Tab. 3-4: AtRKD1- und AtRKD2-Kandidaten für die Protoplasten-Zwei-Hybrid-Analyse

Nr	Kandidat von	Gennummer	Annotation	Transkription in der Eizelle*
1	RKD1, RKD2	AT1G07750	Cupinfamilie	x
2	RKD2	AT2G28680	Cupinfamilie	x
3	RKD1, RKD2	AT1G31450	Aspartylprotease	x
4	RKD1, RKD2	AT1G76750	hypothetisch, ECA1-ähnlich (DUF 1278)	keine Daten
5	RKD2	AT2G21740	DD45 (DUF 1278)	x
6	RKD1	AT2G02090	CHR19 (chromatin remodeling 19)	x
7	RKD1	AT5G42080	ADL1 (<i>Arabidopsis</i> dynamin-like protein)	

* Wuest et al. (2010)

Die Auswahl von zwei AtRKD1-Kandidaten diente zur stichprobenartigen Überprüfung beobachteten Proteininteraktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, bei denen aber keine Aktivierung des Reportergens *lacZ* nachgewiesen werden konnte. Daten von Wuest et al. (2010) deuten darauf hin, dass fünf der Gene in der Eizelle aktiv sind. Hingegen sind bisher keine Expressionsdaten zu At1g76750 sowie kein Nachweis zu einer Embryosack-spezifischen Aktivität von At5g42080 bekannt.

Für einen unabhängigen Test von möglichen Protein-Protein-Interaktionen wurde eine transiente Zwei-Hybrid-Analyse in *Arabidopsis*-Protoplasten (Suspensionskultur C24) durchgeführt (Kap. 2.2.6). Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen der sieben Kandidaten aus Blüten-cDNA von *Arabidopsis thaliana* isoliert.

Die DNA-Fragmente wurden in den Vektor p35S-GAD-GW kloniert, der eine DNA-Sequenz enthält, die für die Transkriptions-aktivierende GAL4-Domäne (AD) kodiert. Die DNA-Sequenzen *AtRKD1cds* und *AtRKD2cds* wurden in den Vektor p35S-GBD-GW (BD) mit der kodierenden Region für eine Bindedomäne kloniert. Für den Nachweis von Proteininteraktionen wird ein weiterer Vektor GAL-UAS₄::GUS benötigt, der Bindestellen für die GAL4-Bindedomäne sowie das Reportergen *uidA* (*GUS*) enthält. Bei einer Interaktion von exprimierten Fusionsproteinen führt die Bindung in der Promotorregion von *uidA* zur Transkription des Reportergens.

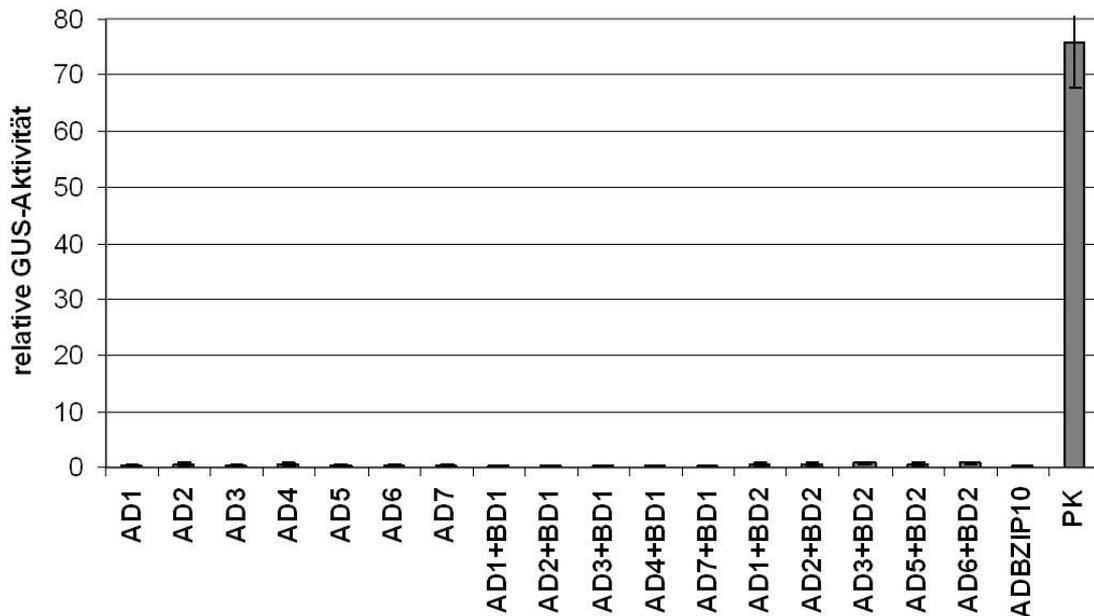


Abb. 3-22: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in *Arabidopsis*-Protoplasten

Fusionsproteine mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) bzw. einer DNA-bindenden Domäne (BD) wurden in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert. Als Positivkontrolle dienten zwei Fusionsproteine AD-bZIP10 und BD-bZIP53, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung eingehen und so eine Aktivierung des Reportergens *GUS* bewirken. Für die Bestimmung der relativen GUS-Aktivität siehe Kapitel 2.2.6. AD1 = At1g07750, AD2 = At1g31450, AD3 = At1g76750, AD4 = At2g02090, AD5 = At5g42080, AD6 = At2g21740, AD7 = At2g28680, BD1 = BD-RKD1, BD2 = BDRKD2, PK= AD-bZIP10 mit BD-bZIP53.

Die Protoplasten wurden mit den hergestellten Konstrukten sowie dem Vektor GAL-UAS₄:GUS transformiert. Als positive Interaktionskontrolle wurden Konstrukte (AD-bZIP10, BD-bZIP53) verwendet, in denen Gene für die Transkriptionsfaktoren AtbZIP10 und AtbZIP53 kodieren, welche nachgewiesenermaßen als Heterodimer interagieren (Ehlert et al., 2006). Protoplasten, in denen die Kandidaten allein exprimiert wurden, wiesen eine sehr niedrige Reporteraktivität auf (Abb. 3-22). Ebenso wurde nur eine ähnlich niedrige Reporteraktivität in Protoplasten gemessen, in denen die BD-Konstrukte gemeinsam mit den AD-Konstrukten exprimiert wurden.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Ergebnisse im Hefe-Zwei-Hybrid-System zwar auf mögliche AtRKD2-Protein-Interaktionen hinweisen, aber ein erster unabhängiger Nachweis außerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nicht erbracht werden konnte.

3.3.3 Untersuchungen zu möglichen Proteininteraktionen innerhalb der AtRKD-Familie

Um mögliche Interaktionen innerhalb der AtRKD-Familie zu untersuchen, wurde nach Walter et al. (2004) ein transienter BiFC-Assay (*bimolecular fluorescence complementation*)

durchgeführt. In dem BiFC-Assay wurden mit potentiellen Interaktionspartnern fusionierte Fragmente des autofluoreszierenden Reportermoleküls YFP (*yellow fluorescent protein*, YFP^N 155 aa und YFP^C 83 aa) verwendet, um Interaktionen *in planta* nachzuweisen.

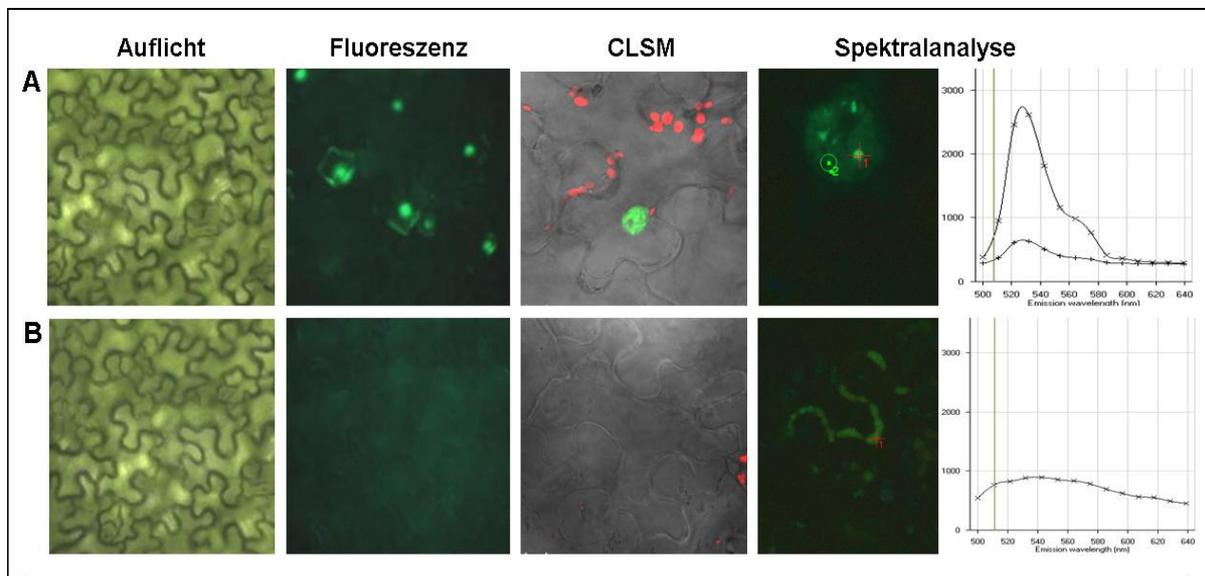


Abb. 3-23: Untersuchung von AtRKD1-AtRKD2-Interaktionen in *Nicotiana benthamiana*

(A) Fluoreszenzkomplementation der Positivkontrolle AtbZIP63-YFP^N/ AtbZIP63-YFP^C im Zellkern. (B) Keine Interaktionen bei der Kombination AtRKD1-YFP^C und AtRKD2-YFP^N. Das Auflichtbild zeigt die infiltrierten Blattunterseiten des Tabaks, welche zuerst mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie, später mit CLSM (*confocal laser scanning microscopy*) untersucht wurde. Durch Messung des Emissionsspektrums konnte die Identität des YFP-Proteins bestätigt werden. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten ist rot dargestellt.

Dazu wurden in *Nicotiana benthamiana* verschiedene Kombinationen der AtRKD1-YFP^C-, AtRKD1-YFP^N-, AtRKD2-YFP^C- und AtRKD2-YFP^N- Konstrukte koinfiltriert. Als Positivkontrolle wurde AtbZIP63-Konstrukte (AtbZIP63-YFP^N/ AtbZIP63-YFP^C) eingesetzt, die exprimiert als Homodimere interagieren. Die Fluoreszenzkomplementation von AtbZIP63-YFP^N mit AtbZIP63-YFP^C in den epidermalen Blattzellen resultierte in Zellkernspezifische YFP-Signale (Abb. 3-23 A). Hingegen wurden keine YFP-Signale nach der Koinfiltration von AtRKD1-YFP^C mit AtRKD1-YFP^N und AtRKD2-YFP^C mit AtRKD2-YFP^N detektiert. Auch traten bei der Kombination von AtRKD1-YFP^C mit AtRKD2-YFP^N keine Fluoreszenz-Signale auf (Abb. 3-23 B).

Zusätzlich wurde eine Zwei-Hybrid-Analyse in *Arabidopsis*-Protoplasten (Suspensionskultur C24) durchgeführt (Kap. 2.2.6). Die DNA-Sequenzen AtRKD1 und AtRKD2 wurden sowohl in den Vektor p35S-GBD-GW (BD) als auch in den Vektor p35S-GAD-GW (AD) kloniert. Protoplasten, die verschiedene Konstrukte gemeinsam mit dem Vektor GAL-UAS₄::GUS

exprimierten, wiesen keine erhöhte Reporterogenaktivität im Vergleich zu Protoplasten, die die Fusionsproteine einzeln exprimierten, auf (Abb. 3-24). Hingegen ließ sich in transformierten Protoplasten mit AD-bZIP10 und AD-bZIP53 eine hohe GUS-Aktivität nachweisen.

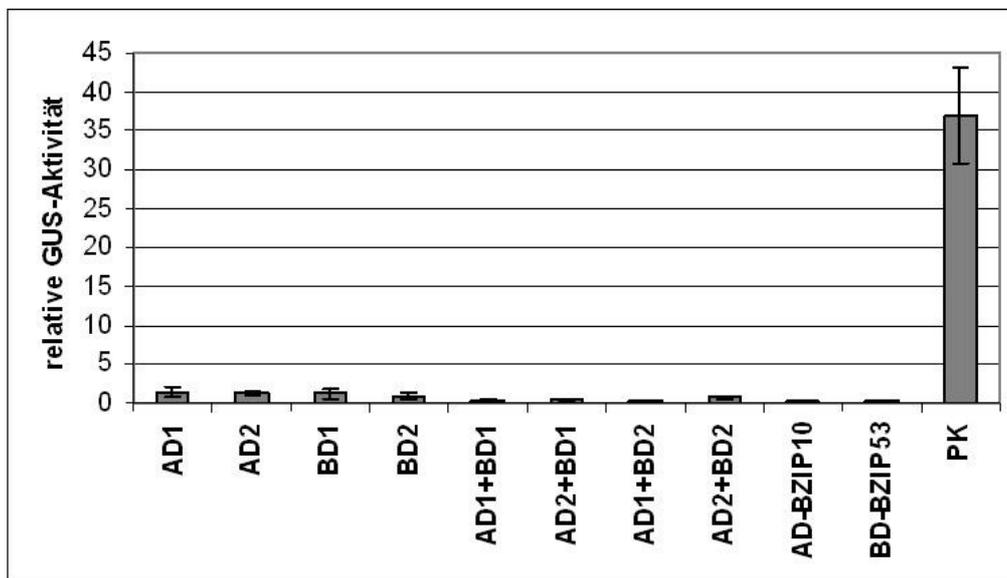


Abb. 3-24: Protoplasten-Zwei-Hybrid-Analyse zur Überprüfung von AtRKD-Interaktionen

Fusionsproteine mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) bzw. einer DNA-bindenden Domäne (BD) wurden in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert. Als Positivkontrolle dienten zwei Fusionsproteine AD-bZIP10 und BD-bZIP53, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung eingehen und so eine Aktivierung des Reportergens *GUS* bewirken. Zur Bestimmung der relativen GUS-Aktivität siehe Kapitel 2.2.6. AD1 = ADRKD1, AD = AD-RKD2, BD1 = BD-RKD1, BD2 = BD-RKD2, PK = AD-bZIP10 mit BD-bZIP53.

Aus den Untersuchungen zu AtRKD-Protein-Interaktionen lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (I) Bislang konnte kein unabhängiger Nachweis außerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems erbracht werden, dass die Proteine AtRKD1 und AtRKD2 mit anderen Proteinen interagieren, um an DNA binden zu können. (II) Außerdem deuten Ergebnisse aus dem BiFC-Assay und der Zwei-Hybrid-Analyse in *Arabidopsis*-Protoplasten darauf hin, dass die Proteine AtRKD1 und AtRKD2 weder als Homodimere noch untereinander als Heterodimere aktiv sind.

3.4 Anwendung des Glucocorticoid-induzierbaren System auf *AtRKD*

Induzierbare Systeme bieten die Möglichkeit, die Translokation der Faktoren in den Zellkern bzw. die Genexpression von Kandidatengenomen zeitlich zu regulieren und somit

präzise funktionelle Analysen von Transkriptionsfaktoren unter anderem zur Identifizierung von Zielgenen durchführen zu können.

Für die regulierte Aktivierung von *AtRKD1* und *AtRKD2* wurden unter Verwendung des Glucocorticoid-induzierbaren System (GR-System) transgene *Arabidopsis*-Linien nach Baudry et al. (2004) generiert (Abb. 3-25).

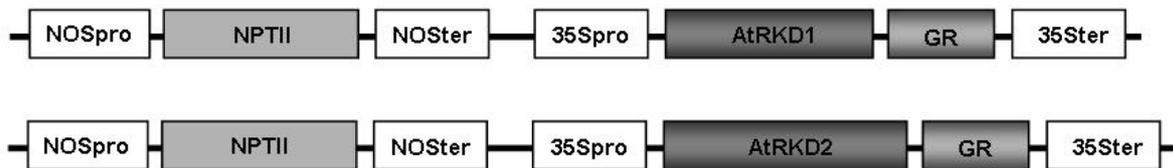


Abb. 3-25: Schematische Darstellung der Konstrukte für das GR-System

Die kodierenden Regionen der Gene *AtRKD1* und *AtRKD2* wurde in den Vektor p35SR₁R₂ΔGR ligiert (Baudry et al., 2004). Die Expression von *AtRKD::GR* wird durch den Promotor *CaMV35S* (35Spro) kontrolliert. NOSpro = Nopalinsynthese-Promotor, NPTII = Neomycin-Phosphotransferase II, NOSter = Nopalinsynthese-Terminator, GR = Glucocorticoidrezeptor, 35Ster = CaMV35S-Terminator.

Das GR-System basiert auf der translationalen Fusion der Kandidatengene mit der aus Ratten isolierten Glucocorticoid-Rezeptordomäne. Unter der Kontrolle eines *CaMV35S*-Promotors (*Cauliflower Mosaic Virus*) wird das Fusionsprotein konstitutiv im Zytosol exprimiert und durch Hitzeschockproteine, die als Chaperone wirken, stabilisiert. Nach der Induktion mit dem synthetischen Glucocorticoid-Analogon Dexamethason (DEX) führen Veränderungen in der Konformation der Proteine zum Ablösen der Chaperone und zur anschließenden Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern.

Die kodierenden Regionen von *AtRKD1* (807 bp) und *AtRKD2* (897 bp) wurden in den Vektor p35SR₁R₂ΔGR kloniert und anschließend in *Arabidopsis thaliana* (Col0) transformiert. Nach der Selektion mit den entsprechenden Antibiotika wurden die primären Transformanten (T₀-Generation) durch PCR-Analysen auf eine genomische Integration der T-DNA analysiert. Mit der T₁-Generation wurden Segregationsanalysen durchgeführt, um homozygote Linien in der nachfolgenden Generation zu erhalten.

Transgene Linien der T₂-Generation mit den induzierbaren Konstrukten *AtRKD1::GR* und *AtRKD2::GR* wurden auf eine Expression der Transgene durch quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) unter der Verwendung *AtRKD*-spezifischer Primer überprüft.

Die Induktion mit DEX bewirkt nur eine Translokation der Fusionsproteine *AtRKD::GR* vom Zytosol in den Zellkern bewirkt. Deshalb konnten für die Messungen 14 Tage alte, auf MS-Medium ohne DEX angezogene transgene Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen (Col0) verwendet

werden. Aus den Pflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert und diese anschließend in cDNA umgeschrieben.

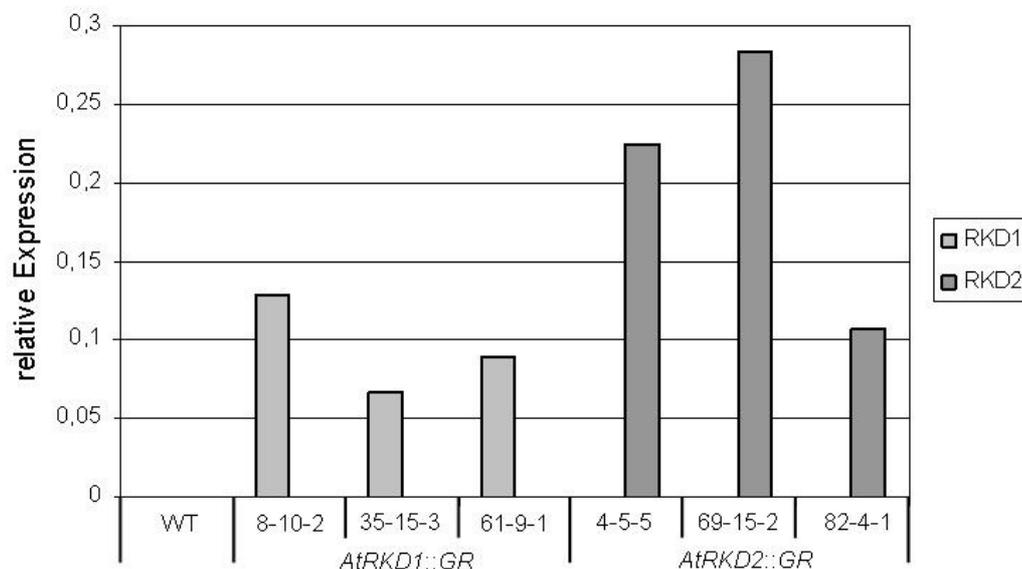


Abb. 3-26: Relative Expression in Dexamethason-induzierbaren Überexpressionslinien

Expressionslevel von *AtRKD1* und *AtRKD2* wurde mittels qRT-PCR in 14 Tagen alten *AtRKD::GR*-Linien gemessen und mit gleich alten Wildtyp-Pflanzen (WT) verglichen. Jede Probe entspricht dem Durchschnittswert von drei technischen Replikaten.

Als interne Kontrolle für die qRT-PCR-Reaktionen wurde die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *UBQ10* (At4g05320) gemessen und zur Normalisierung der Daten verwendet. Die relativen Expressionswerte wurden mit der ΔC_T -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Alle transgenen Linien zeigen erhöhte Transkriptionslevel von *AtRKD1* und *AtRKD2* auf (Abb. 3-26). In den 14 Tage alten Wildtyppflanzen sind beide *AtRKD*-Gene nicht transkribiert. Auch wurde keine Expression von *AtRKD1* in *AtRKD2::GR*-Linien und umgekehrt (*AtRKD2* in *AtRKD1::GR*-Linien) detektiert.

3.4.1 Phänotypen der *AtRKD*-exprimierenden Pflanzen

Zur Analyse der Phänotypen transgener *AtRKD::GR*-Pflanzen wurde das Saatgut homozygoter Linien auf MS-Medium ergänzt mit DEX (Induktionsmedium) ausgelegt. Zur Kontrolle wurde transgenes Saatgut auf MS-Medium mit der äquivalenten Menge an Ethanol (Kontrollmedium) ausgelegt. Die morphologische Gestalt der transgenen Pflanzen wurde mit der des Wildtyps Col0 in den verschiedenen Entwicklungsstadien verglichen. Unter DEX-induzierten Bedingungen zeigten die transgenen Pflanzen eine verlangsamte Entwicklung im Vergleich zu den auf Kontrollmedium wachsenden Pflanzen und dem Wildtyp Col0 auf (Abb. 3-27).

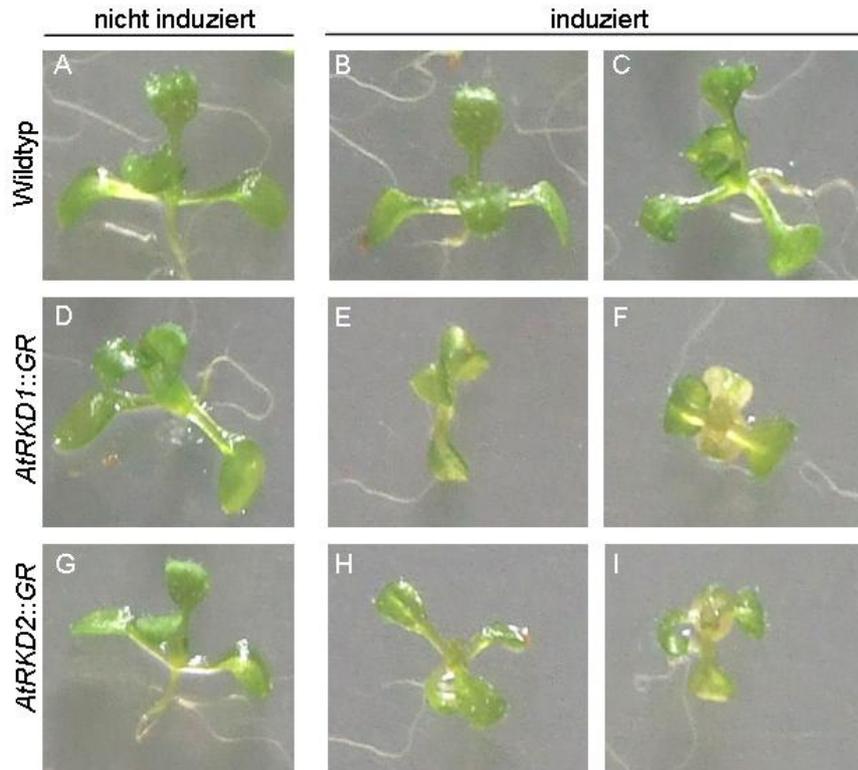


Abb. 3-27: Entwicklung der induzierten *AtRKD::GR*-Keimlinge

Saatgut vom Wildtyp Col0 und den Linien *AtRKD1::GR* 8-10-2, *AtRKD2::GR* 4-5-5 wurden auf MS-Medium mit 0,1 % Ethanol sowie auf MS-Medium mit 10 μ M DEX ausgelegt. Wildtyp-Pflanzen zeigen unter beiden Bedingungen den gleichen Phänotyp (A, B, C). Die unter nicht-induzierten Bedingungen herangezogenen transgene Pflanzen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die Wildtyp-Pflanzen (D, G). Die kontinuierliche Induktion mit DEX führt zu einem veränderten Wachstum der transgenen Pflanzen (E, F, H, I).

Die Blätter haben die Tendenz, sich nach außen zu wölben und nach innen zu rollen. Zudem bleiben die Pflanzen kleinwüchsig (Abb. 3-28 A, E). Nach 10-11 Wochen kontinuierlicher Induktion sterben die Pflanzen, ohne einen Blütenstand ausgebildet zu haben (Abb. 3-28 D). Eine sehr kleine Zahl der Pflanzen (< 1 %) bildete grünes Kallus-ähnliches Gewebe (Abb. 3-28 B, C, F). Bei *AtRKD2::GR*-Pflanzen wurde die Entstehung weißer und grüner Strukturen beobachtet (Abb. 3-28 G). Die Strukturen der kontinuierlich induzierten *AtRKD::GR*-Linien sind vergleichbar mit den Kallus-ähnlichen Gebilden, welche sich aus den Samen der Überexpressionslinien (Konstrukt *d35SP::AtRKD::GFP*) von *AtRKD1* und *AtRKD2* entwickeln können (Abb. 3-28 H, Bild D. Koszegi). Es muss aber betont werden, dass die Entstehung der proliferierenden Gewebe bei den *AtRKD::GR*-Pflanzen erst nach 11 Wochen unter kontinuierlichen Induktionsbedingungen beobachtet wurde.

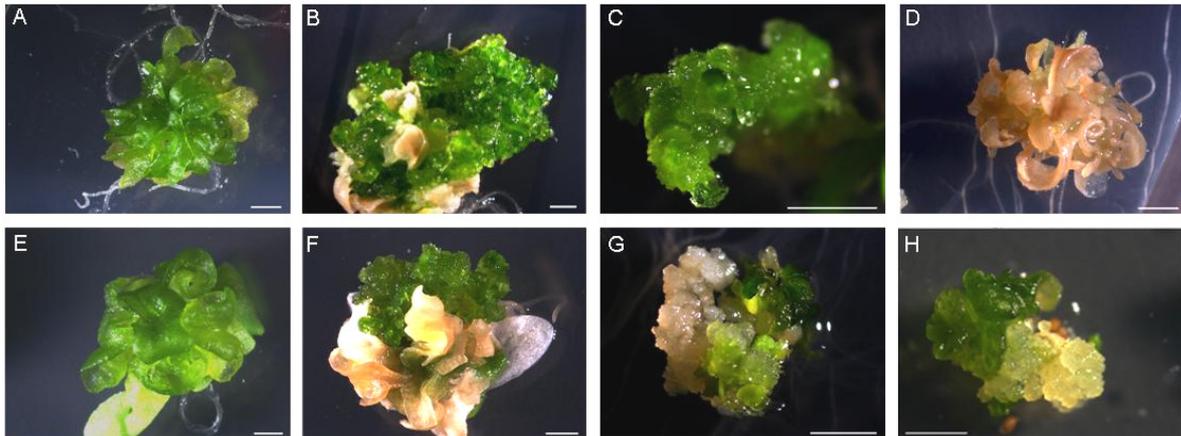


Abb. 3-28: Weiterentwicklung induzierter *AtRKD::GR*-Pflanzen

(A-D) *AtRKD1::GR*-Pflanzen nach 5 Wochen (A) und nach 11 Wochen (B, C, D) auf Induktionsmedium. (E-G) *AtRKD2::GR*-Pflanzen nach 5 Wochen (E) und nach 11 Wochen (F, G) auf Induktionsmedium. (H) Überexpressionslinie *d35SP::RKD2::GFP*. *AtRKD1::GR*- und *AtRKD2::GR*-Pflanzen weisen ähnliche phänotypische Veränderungen während der permanenten Induktion auf. Bei *AtRKD2::GR*-Pflanzen ist die Entwicklung zu Kallus-ähnlichem Gewebe stärker ausgeprägt, wobei der Phänotyp den Strukturen von den Überexpressionslinien *d35SP::RKD2::GFP* gleicht (vergleiche G-H). Die Balkenlänge entspricht 2mm.

Um den Einfluss der induzierten Aktivität von *AtRKD::GR* auf das Sprosswachstum der Pflanzen zu untersuchen, wurden Makroarray-Experimente zur Detektion von *AtRKD*-Zielgenen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, durchgeführt.

Die Induktion mit DEX bewirkt eine Translokalisierung von *AtRKD::GR* in den Zellkern und zunächst eine Aktivierung von primären Zielgenen. Das Zeitfenster für die Detektion primärer Zielgene ist bislang nicht klar definiert, manchmal können sie sogar innerhalb von 4 Stunden nach der Induktion detektiert werden (Braybrook et al., 2006). Aufgrund dessen wurden 14 Tage alte *AtRKD::GR*-Pflanzen (*AtRKD1::GR* 8-10-2, *AtRKD2::GR* 4-5-5) sowie Wildtyp-Pflanzen für 4, 8 und 24 Stunden in Flüssigmedium mit 10 μ M DEX bzw. 0,1 % Ethanol (Endkonzentration) inkubiert. Aus dem Probenmaterial wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Hybridisierung wurden REGIA-Filter verwendet, die über 1200 *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktoren repräsentieren (Paz-Ares et al., 2002). Transkriptionsfaktoren, die bei den Makroarray-Experimenten identifiziert wurden, sind nach TAIR annotiert (Garcia-Hernandez et al., 2002).

Nach 4 Stunden und 8 Stunden Induktion wurden ausschließlich Kandidaten detektiert, die unter Ethanol- und DEX-Bedingungen auch im Wildtyp auftraten. Nach 24 Stunden Induktion wurden putative *AtRKD*-Zielgene identifiziert. Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen zweimal wiederholt. Allerdings wurden unterschiedliche Kandidaten in allen

drei Experimenten identifiziert (Tab. D-1, Anhang D). Da mit den Makroarray-Experimenten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzeugt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die REGIA-Filter keine geeignete Wahl für die Identifizierung von primären AtRKD-Zielgenen darstellen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen treffen: In den generierten *AtRKD::GR*-Linien waren die Transkripte von *AtRKD1* bzw. *AtRKD2* nachweisbar. Die kontinuierliche Induktion mit dem Hormon DEX führte von Veränderungen des Sprosswachstums transgener *AtRKD::GR*-Pflanzen bis hin zur Entstehung proliferierender Gewebe in *Arabidopsis thaliana*. Makroarray-Analysen mit REGIA-Filtern, auf denen 1200 Transkriptionsfaktoren repräsentiert sind, führten nicht zur Identifizierung von primären AtRKD-Zielgenen.

In weiteren Experimenten sollte nun genauer untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen die induzierte Aktivität von *AtRKD::GR* bei der Entwicklung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen bewirkt.

3.4.2 Histologische Analyse der induzierten *AtRKD::GR*-Pflanzen

Phänotypische Beobachtungen hatten ergeben, dass spätestens nach 14 Tagen kontinuierlicher Induktion mit DEX die *AtRKD::GR*-Pflanzen ein verändertes Sprosswachstum aufweisen. Eine detaillierte Untersuchung erfolgte mit rasterelektronenmikroskopischen Analysen. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Linien *AtRKD1::GR* 8-10-2 und *AtRKD2::GR* 4-5-5 verwendet.

Beobachtungen an drei Wochen alte Pflanzen mit deutlichem Phänotyp zeigten zwischen den schon existierenden Blättern viele neue Zentren der Blattentwicklung in den Blattachseln (Abb. 3-29 G-I).

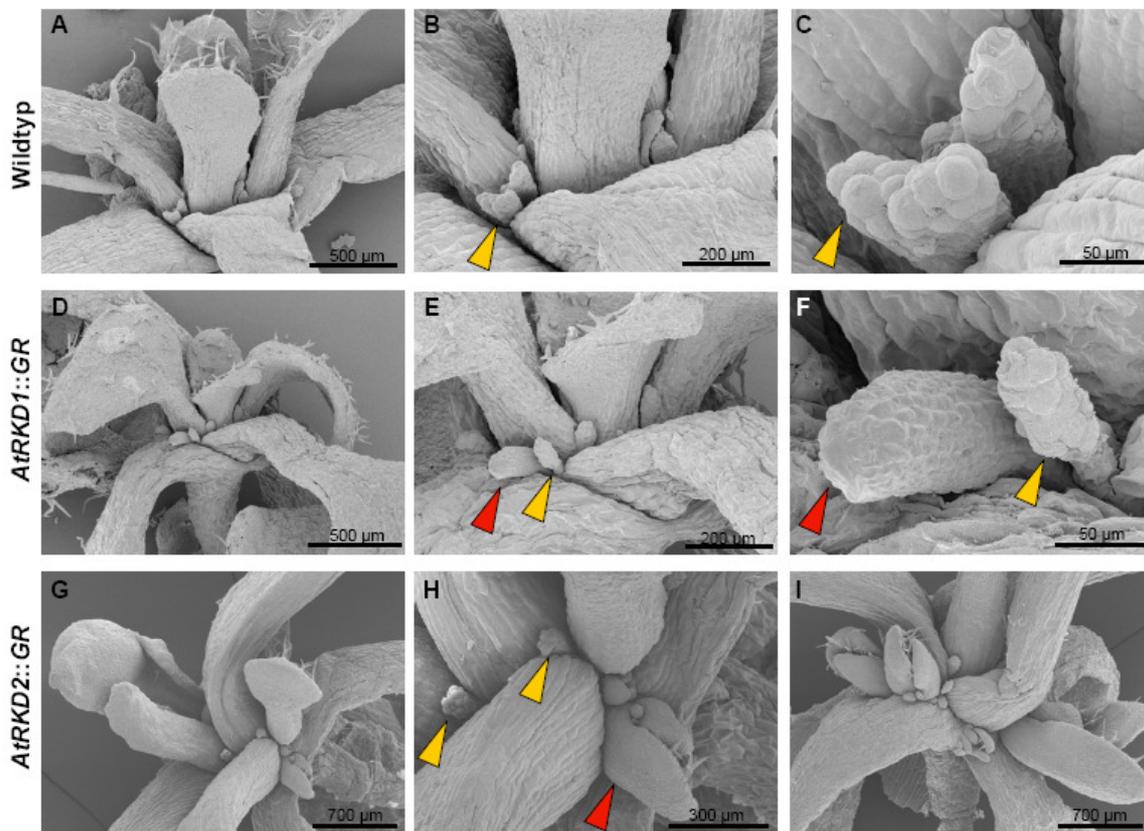


Abb. 3-29: Neubildung von Seitenblättern permanent induzierter *AtRKD::GR*-Pflanzen

Die 14 Tage alten, auf MS-Medium mit DEX angezogenen *AtRKD::GR*-Pflanzen entwickeln erste Seitenblätter unterhalb der älteren Blätter (Vergrößerung der Aufnahme von D-F). In diesem Stadium sind beim Wildtyp Col0 nur die Stipeln erkennbar (Vergrößerung der Aufnahme von A-C). 3 Wochen alte *AtRKD::GR*-Pflanzen, gewachsen auf Induktionsmedium, weisen mehrere zur gleichen Zeit entstandene Blattanlagen auf (G-I). Der gelbe Pfeil weist auf Stipeln hin, der rote Pfeil markiert die neu gebildeten Seitentriebe der *AtRKD::GR*-Pflanzen.

Außerdem befanden sich von den neuen Blattanlagen immer mehrere im ungefähr gleichen Entwicklungsstadium (Abb. 3-29 I). Daraus kann geschlossen werden, dass diese

Entwicklung an mehreren Stellen fast zeitgleich angefangen haben muss. Offensichtlich haben die neuen Blattansätze ihren Ursprung an der Basis von älteren Blättern.

In 14 Tage alten Keimlingen konnten zwischen den Blättern Neubildungen entdeckt werden, die sich eindeutig von den Stipeln unterschieden (Abb. 3-29 E, F). Die keulenförmig strukturierten Stipeln sind links und rechts der Blattbasis angeordnet, und bestehen aus großen runden Zellen, die eine stark gewölbte Oberfläche haben. Hingegen sind die Neubildungen aus vielen gleichmäßig angeordneten Zellen aufgebaut, welche die Oberfläche glatter erscheinen lassen und weiterhin fehlt die Keulenform (Abb. 3-29 F). Für eine Bestimmung der allerersten Ansätze dieser neuen Blattenstehung erwies sich das Rasterelektronenmikroskop jedoch als ungeeignet, weil es ab dem 12. Tag durch die Anordnung der Blätter unmöglich war, die Blattbasis und das Hauptsprossmeristem (*shoot apical meristem*, SAM) zu studieren.

Um die Veränderungen in der Pflanzenentwicklung unter induzierten Bedingungen genauer zu analysieren, wurden 12, 14 und 17 Tage alte Pflanzen eingebettet und Längsschnitte durch das Hauptsprossmeristem angefertigt. Eindeutig ist in der Abbildung 3-30 zu erkennen, dass unter nicht-induzierten Bedingungen die transgenen Pflanzen eine vergleichbare Entwicklung wie die Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Ab dem 14. Tag ist eine beginnende Weiterentwicklung des vegetativen SAM zum Infloreszenzmeristem zu erkennen. Hingegen entwickeln sich unter dem Einfluss von AtRKD1 und AtRKD2 neben dem Hauptsprossmeristem frühzeitig laterale Sprossmeristeme. Erste Hinweise zu dieser Entwicklung sind schon am Tag 12 erkennbar. Diese neuen Meristeme sind ab dem Tag 14 deutlich sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt erscheinen die Hauptsprossmeristeme der auf Induktionsmedium wachsenden *AtRKD1::GR*- und *AtRKD2::GR* -Pflanzen deutlich kleiner als die der Kontrollpflanzen. Letztendlich bilden diese Hauptsprossmeristeme kein Blütenmeristem und auch keine neue Blätter aus.

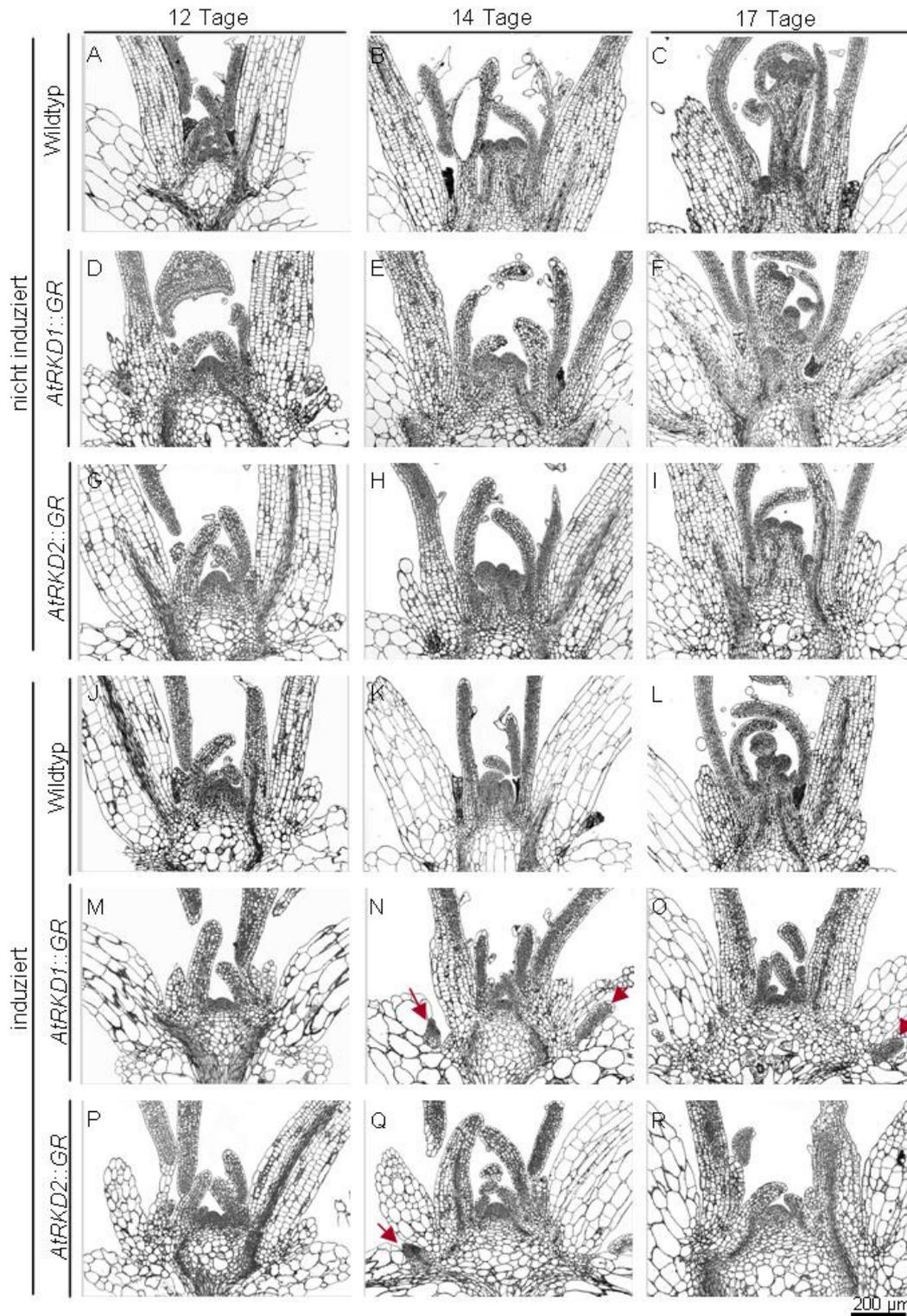


Abb. 3-30: Morphologische Analyse der *AtRKD::GR*-Pflanzen

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Längsschnitten durch das Hauptsprossmeristem von 12, 14 und 17 Tage alten Pflanzen. (A)-(I) Das Wachstum auf MS-Medium mit Ethanol zeigt, dass Pflanzen der Wildtypkontrolle (A-C), *AtRKD1::GR*-Pflanzen (D-F) und *AtRKD2::GR*-Pflanzen (G-I) morphologisch identisch sind. (J)-(R) Das Wachstum auf MS-Medium mit DEX (Induktionsmedium) hat keinen Einfluss auf die Morphologie des Wildtyps (J-L). Im Falle von *AtRKD1::GR* (M-O) und *AtRKD2::GR* (P-R) zeigt sich aber spätestens ab dem 14. Tag ein Entwicklungsstillstand des Hauptsprossmeristems und die Ausbildung von lateralen Meristemen (Pfeile in N, O, Q). Die Balkenlänge entspricht 200 µm.

Um mehr Einsicht in die zellularen Prozesse der lateralen Meristementwicklung permanent induzierter Pflanzen zu gewinnen, wurden verschiedene Markerlinien mit der Linie *AtRKD2::GR* 4-5-5 gekreuzt. Die Markerlinien exprimieren Promotor-Reportergen-Konstrukte, welche für die Visualisierung der Promotoraktivität eingesetzt werden (GFP *green fluorescent protein*, GUS β -Glucuronidase). Für eine vergleichende Analyse der RKD-induzierten lateralen Meristementwicklung wurden Markerlinien ausgewählt, deren Promotoren eine Aktivität im vegetativen SAM und Infloreszenzmeristem aufweisen (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Mit *AtRKD2::GR*-Linien gekreuzte Markerlinien

Markerlinie	ATG-Nummer und Expression im Wildtyp	Referenzen
<i>DR5::GFP</i>	synthetischer Promotor, zeigt Auxinmaxima an, im Sprossmeristem aktiv	Ulmasov et al., 1997
<i>ATML1::NLS::GFP</i>	At4g21750 MERISTEM LAYER1, lokalisiert in der L1-Schicht des Meristems	Lu et al., 1996
<i>WUS::GUS</i>	At2g17950 WUSCHEL, aktiv im OZ (Organisationszentrum) des Sprossmeristems	Laux et al., 1996
<i>CLV3::GUS</i>	At2g27250 CLAVATA3, aktiv in der ZZ (zentralen Zone) des Sprossmeristems	Fletcher et al., 1999

Die Funktion des SAM und die Entwicklung von floralen Organen wird durch die räumliche und zeitliche Verteilung des Hormons Auxin beeinflusst (Shani et al., 2006). Mit dem synthetischen Auxin-induzierbaren Promotor *DR5* können lokale Auxinakkumulationen visualisiert werden (Ulmasov et al., 1997; Sabatini et al., 1999).

Das Homeobox-Protein *ATML1* ist in der L1-Schicht (Epidermis) des SAM, Infloreszenzmeristems, Blütenmeristems und jungen Blütenprimordia aktiv (Lu et al., 1996). Dabei beschränkt sich die Aktivität auf undifferenzierte protodermale Zellen. Es wird vermutet, dass *ATML1* an der Erhaltung der Epidermis-Spezifität beteiligt ist und Epidermis-spezifische Zielgene reguliert (Abe et al., 2003).

WUSCHEL (*WUS*) ist einer der Faktoren, welcher die Stammzellenidentität im Sprossmeristem von Pflanzen reguliert (Laux et al., 1996; Ikeda et al., 2009). Im vegetativen und infloreszenten Sprossmeristem wird *WUS* unterhalb der L1-, L2- und L3-Schichten (Tunika und Corpus) in dem Organisationszentrum (OZ), das aus 4-6 Zellen besteht, exprimiert (Mayer et al., 1998). In Blütenprimordien akkumuliert *WUS* in wenigen Zellen, die auch die L3-Schicht umfassen.

In den Stammzellen des SAM wird das Signalpeptid CLAVATA3 (CLV3) synthetisiert (Fletcher et al., 1999). CLV3 reguliert durch die Restriktion der WUS-Aktivität die Anzahl der Stammzellen und fördert die Zelldifferenzierung (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). CLV3 wird in der zentralen Zone des SAM und Infloreszenzmeristems exprimiert (Brand et al., 2002).

Saatgut aus den Kreuzungen der T₁-Generation wurde auf MS-Medium mit 10 µM DEX sowie mit 0,1 % Ethanol (Endkonzentration) ausgelegt. Die Pflanzen wurden in dem Abschnitt 12 bis 17 Tage nach der Keimung analysiert. In dieser Zeitspanne werden morphologische Veränderungen im Vergleich der auf Induktionsmedium und Kontrollmedium gewachsenen transgenen Pflanzen deutlich erkennbar.

3.4.2.1 Kontinuierliche DEX-Induktion führt zur Repression meristemaler

Auxinmaxima

Nach 14 und 16 Tagen DEX-Induktion wurden die Nachkommen aus der Kreuzung *DR5::GFP* x *AtRKD2::GR* an dem CLSM analysiert, um die GFP-Aktivität zu überprüfen. Die auf MS-Medium mit 0,1 % Ethanol (Endkonzentration) gewachsenen *AtRKD2::GR*-Pflanzen und *DR5::GFP*-Pflanzen weisen lokale Auxinakkumulationen auf. Eindeutig sind Auxinmaxima in den Spitzen der jungen Blätter, in den Stipeln und infloreszenten Meristemen erkennbar (Abb. 3-31 A-B, D-E, G-H, J-K). Dagegen ist keine GFP-Fluoreszenz in dem SAM der auf Induktionsmedium gewachsenen *AtRKD2::GR*-Pflanzen nachweisbar (Abb. 3-31 C, F, I, L). Am 14. Tag ist das beginnende Wachstum lateraler Blattanlagen in den Blattachseln zu beobachten (Abb. 3-31 C, F). Deutlich sind die transgenen Pflanzen an dem Hauptsprossmeristem zu erkennen, das keine Weiterentwicklung zum Blütenmeristem aufweist (Abb. 3-31 I, L). Unter Induktionsbedingungen ist ein Einfluss von *AtRKD2::GR* auf die Bildung lokaler Auxinmaxima im SAM der sich entwickelnden Pflanzen gegeben.

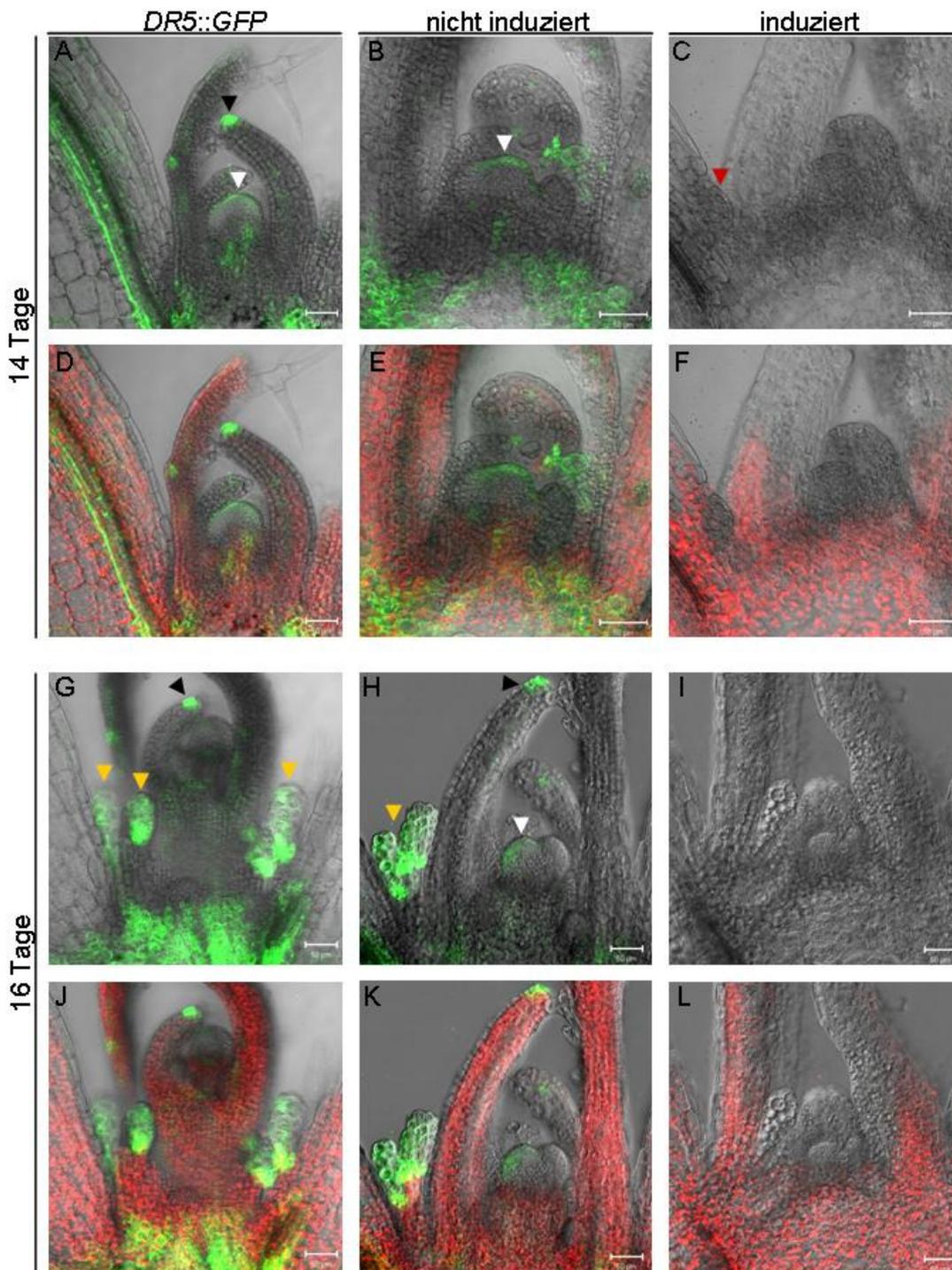


Abb. 3-31: Nachweis lokaler Auxinmaxima im SAM von *AtRKD2::GR*- Pflanzen

(A-F) 14 Tage nach der Keimung: Pflanzen der Markerlinie *DR5::GFP* (A, D), und der T₁-Generation aus der Kreuzung *DR5::GFP* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 ohne Induktion (B, E) zeigen deutliche Auxinmaxima im Sprossmeristem. Unter Induktionsbedingungen sind keine Auxinmaxima, aber laterale Blattansätze (roter Pfeil) in dem SAM der transgenen Pflanzen nachweisbar (C, F). (G-L) 16 Tage nach der Keimung: Pflanzen der Markerlinie *DR5::GFP* (G, J) und der Kreuzung *DR5::GFP* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 ohne Induktion (H, K) zeigen deutlich erkennbare Infloreszenzmeristeme. Im apikalen Bereich gibt es klare Auxinmaxima in den Stipeln (gelber Pfeil), den Apices von jungen Blättern (schwarzer Pfeil) und dem Infloreszenzmeristem (weißer Pfeil). Unter Induktionsbedingungen (I, L) hat das SAM sich nicht weiterentwickelt und es fehlen weiterhin Auxinmaxima. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz im SAM (A-C, G-H) ist in den Bildern (D-F) und (J-L) rot dargestellt. Die Balkenlänge entspricht 50 μm.

3.4.2.2 Kontinuierliche DEX-Induktion beeinträchtigt nicht die Promotoraktivität von *ATML1*

Saatgut der Kreuzung *ATML1::NLS::GFP* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 und der Markerlinie *ATML1::NLS::GFP* wurden auf Induktionsmedium sowie auf Kontrollmedium ausgelegt. Der Vergleich der 14 und 16 Tage alten transgenen Pflanzen zeigt, dass der *ATML1*-Promotor sowohl unter nicht-induzierten als auch unter induzierten Bedingungen ähnlich aktiv ist. Deutlich ist eine spezifische GFP-Fluoreszenz in der Epidermis (L1-Schicht) des Sprossmeristems, des Floreszenzmeristems und den jüngsten Blättern zu erkennen (Abb. 3-32 B-D, F-H). Unter Induktionsbedingungen ist im Spross transgener Pflanzen wieder kein Wechsel von der vegetativen Phase zur generativen Phase zu beobachten. Die 14 und 16 Tage alten Pflanzen weisen ähnlich große Haupt sprossmeristeme auf, in denen der *ATML1*-Promotor in der Epidermis aktiv ist.

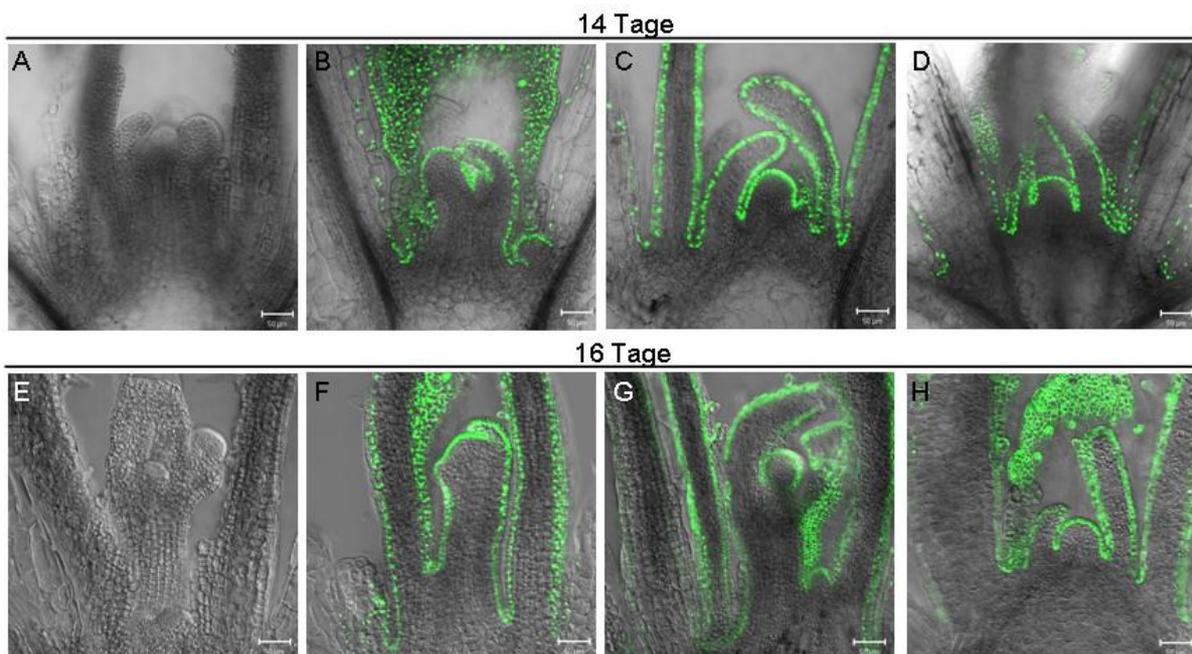


Abb. 3-32: *ATML1*-Promotoraktivität im SAM von *AtRKD2::GR*-Pflanzen

14 und 16 Tage alte Pflanzen der Wildtyps (A, E), der Markerlinie *ATML1::NLS::GFP* (B, F) und der T₁-Generation aus der Kreuzung *ATML1::NLS::GFP* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 (C, D, G, H). Das Saatgut wurde auf Medium mit 0,1 % Ethanol (C, D) und Medium mit 10 μM DEX (D, H) ausgelegt. Die Balkenlänge entspricht 50 μm.

3.4.2.3 *CLV3* und *WUS* sind in den lateralen Sprossmeristemen vom *AtRKD2::GR*-Pflanzen aktiv

Die 12, 14 und 17 Tage alten Pflanzen aus der Kreuzung *CLV3::GUS* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 wurden mittels GUS-Färbung auf eine spezifische Promotoraktivität im Sprossmeristem analysiert. Die GUS-Färbung ist nicht auf die zentrale Zone im Meristem beschränkt, sondern im ganzen apikalen Sprossmeristem sichtbar (Abb. 3-33). Die unspezifische Färbung in den angrenzenden Zellen könnte auf die Dauer der Inkubationszeit zurückzuführen sein. Versuche, die Inkubationszeit von 6 Stunden zu verringern, führten aber nicht zur Restriktion der GUS-Färbung. Entweder es wurden starke GUS-Signale detektiert oder es war keine Färbung erkennbar. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass GUS-Proteine stark in angrenzende Zellen diffundieren.

Unter nicht-induzierten Bedingungen weisen die transgenen Pflanzen eine GUS-Färbung in den Stammzellen des Infloreszenzmeristems und sich entwickelnden Blütenprimordien auf (Abb. 3-33 G-I). Unter induzierten Bedingungen ist anfangs nur eine Aktivität des *CLV3*-Promotors in dem SAM der transgenen Pflanzen zu beobachten (Abb. 3-33 J). Ab dem 14. Tag aber sind zunehmend GUS-Färbungen in den Blattachsen zu beobachten, welche auf die Aktivierung von lateralen Meristemen hinweisen. In dem Spross 17 Tage alter Pflanzen zeigt die *CLV3*-Promotor-Aktivität die zeitgleiche Entwicklung von mehreren lateralen Achselmeristemen auf (Abb. 3-33 L).

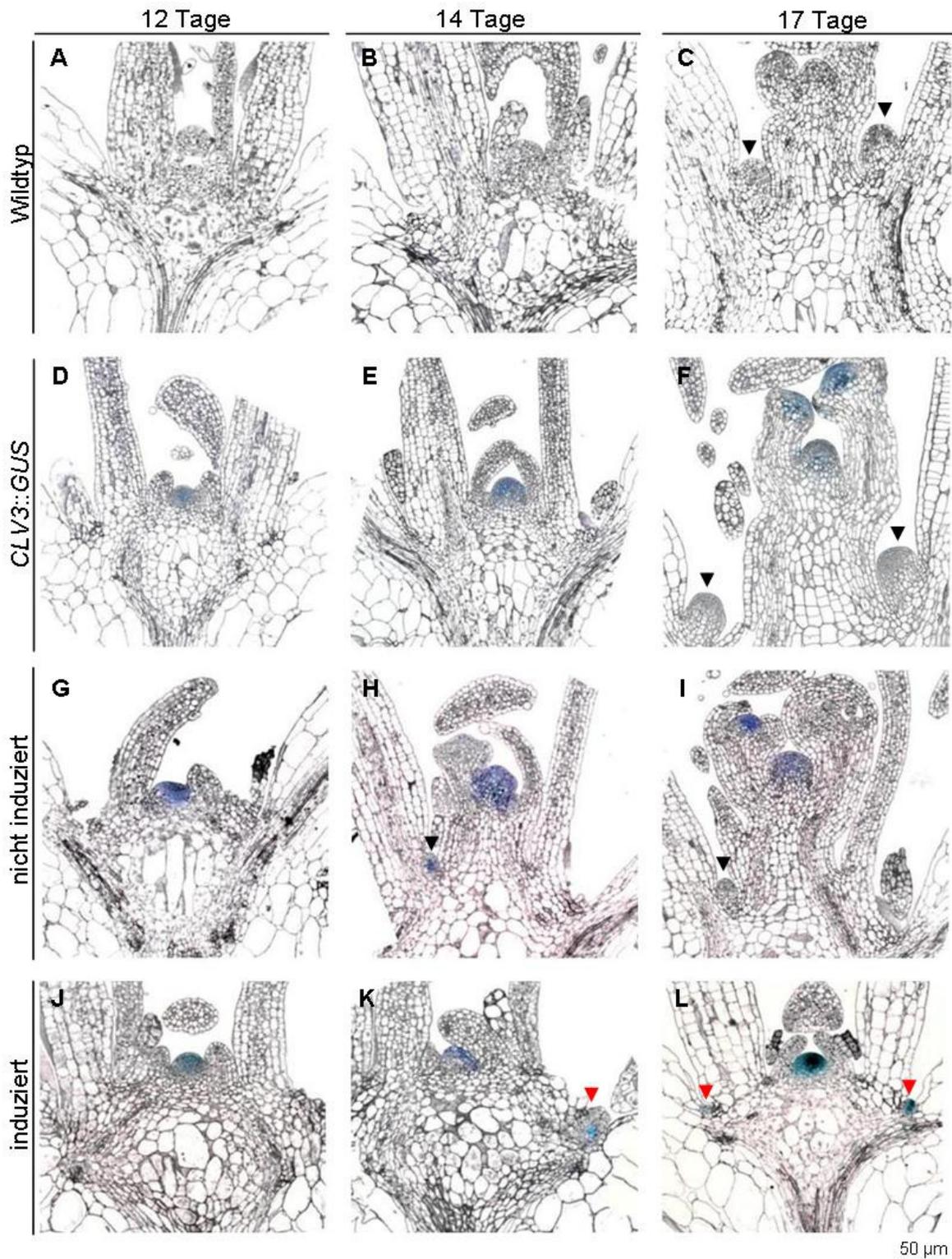


Abb. 3-33: Nachweis der *CLV3*-Promotoraktivität im SAM von *AtRKD2::GR* Pflanzen

Detektion der spezifischen GUS-Färbung in 12, 14 und 17 Tage alten Pflanzen der T₁-Generation aus der Kreuzung *CLV3::GUS* x *AtRKD2::GR* 4-5-5. Während der Entwicklung des Blütenmeristems in nicht induzierten Pflanzen werden an der Basis des apikalen Meristems laterale Meristeme aktiviert (schwarze Pfeilspitzen in C, F, H, I). Transgene Pflanzen unter Induktionsbedingungen bilden keine Floreszenzmeristeme (J-L). Laterale Sprossmeristeme entstehen in der Achselhöhle von älteren Blättern (rote Pfeilspitze in K, L). Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

Auch die Promotoraktivität von *WUS::GUS* wurde im Sprossmeristem von 12, 14 und 17 Tage alten Pflanzen aus der Kreuzung *WUS::GUS* x *AtRKD2::GR* 4-5-5 nachgewiesen. In 12 Tage alten Pflanzen war nur das Organisationszentrum des Hauptsprossmeristems GUS-markiert (Abb. 3-34 D). In der weiteren Entwicklung unter nicht-induzierten Bedingungen verzeichneten die Pflanzen spezifische GUS-Färbungen in Floreszenz- und Blütenmeristemen (Abb. 3-34 E, F). Unter induzierten Bedingungen ist im gleichen Zeitraum keine Weiterentwicklung des vegetativen Sprossmeristems zum Infloreszenzmeristem zu beobachten. Trotzdem finden sich auch hier spezifische GUS-Färbungen im SAM und in den sich ausbildenden lateralen Meristemen (Abb. 3-34 G-J).

Durch die Einkreuzung von verschiedenen Markerlinien in die *AtRKD2::GR*-Pflanzen konnte festgestellt werden, dass unter induzierten Bedingungen, obwohl die Weiterentwicklung des apikalen Sprossmeristems ab den 12. Tag gehemmt ist, die Funktionalität des Meristems nicht beeinträchtigt wird. Auch die lateralen Sprossmeristeme weisen eine beginnende Funktionalität auf. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass keine lokalen Auxinakkumulationen im Sprossmeristem nachgewiesen werden konnten.

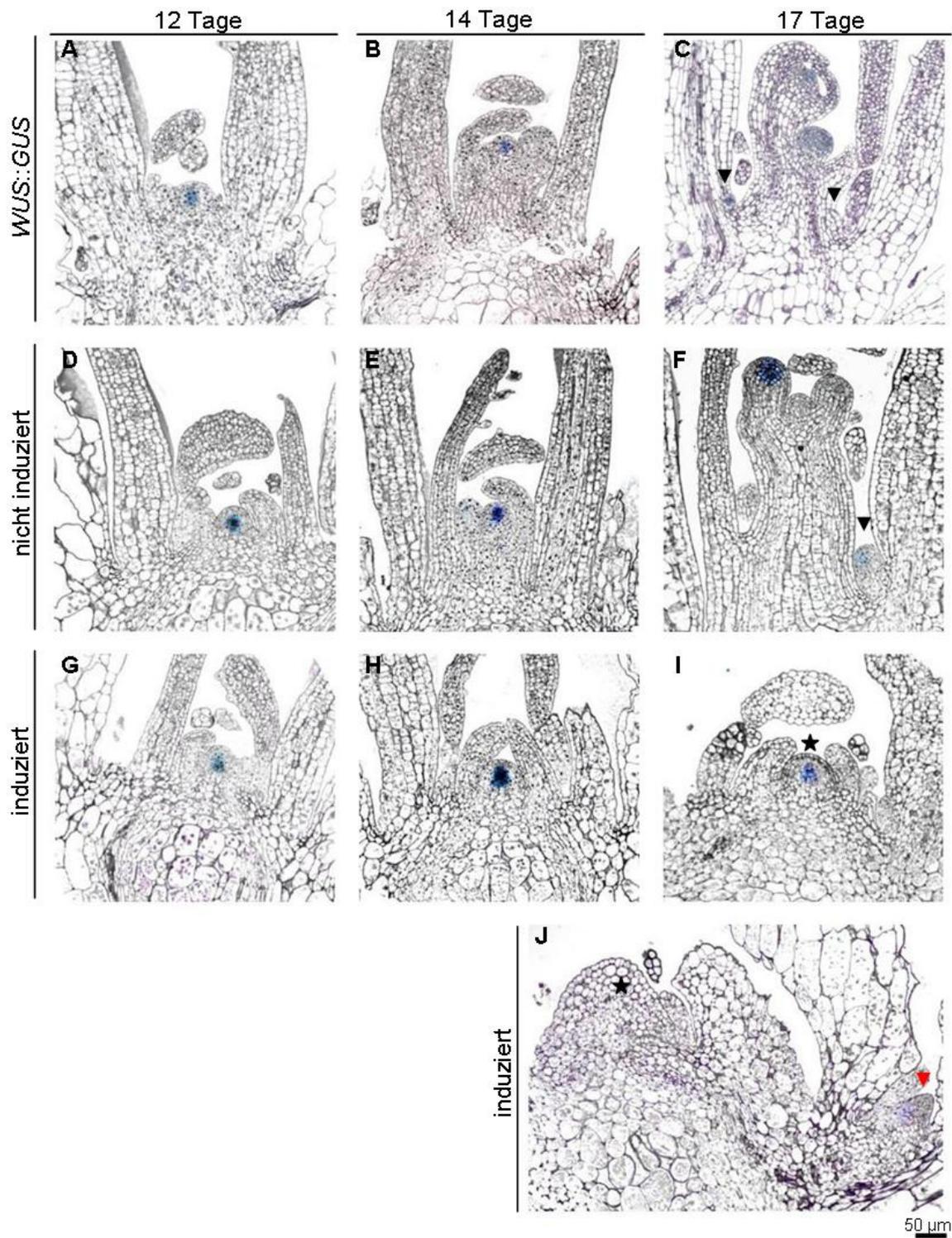


Abb. 3-34: Nachweis der *WUS*-Promotoraktivität im SAM von *AtRKD2::GR*-Pflanzen

Untersuchung von spezifischen GUS-Färbungen in den Sprossmeristemen 12, 14 und 17 Tage alter Pflanzen (T_1 -Generation) aus der Kreuzung *WUS::GUS* x *AtRKD2::GR* 4-5-5. Laterale Meristeme entwickeln sich an der Basis des Meristems unter nicht-induzierten Bedingungen (schwarze Pfeilspitzen in C, F). Unter induzierten Bedingungen bilden die Pflanzen keine Blütenansätze aus (G-J) und laterale Meristeme entstehen in den Achseln von älteren Blättern (rote Pfeilspitze in J). Die Bilder I und J zeigen verschiedene Schnitte einer Pflanze. Der Stern kennzeichnet das Hauptsprossmeristem, das in (J) durch Blätter verdeckt wird. Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

3.5 ChIP-chip-Analyse des AtRKD2-Proteins

Mit ChIP-chip-Experimenten können die Bindungsstellen von DNA-bindenden Proteinen identifiziert werden. Durch die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) werden die DNA-Protein-Bindungen fixiert und die DNA-Fragmente präzipitiert. Angereicherte DNA-Fragmente werden auf Mikroarray-Filter hybridisiert (chip). Die Kombination beider Methoden erlaubt eine Genom-weite Analyse von *in vivo* Interaktionen zwischen DNA-bindenden Proteinen und der DNA.

Für die Identifizierung möglicher DNA-Bindungsstellen des AtRKD2-Proteins wurden *AtRKD2*-Überexpressionslinien in *Arabidopsis thaliana* verwendet. Die ektopische Expression von *AtRKD2* führt zur Entwicklung von proliferierendem Gewebe direkt aus dem Samen (Konstrukt *d35SP::AtRKD2::GFP*, Abb. 3-35 A). Untersuchungen von Koszegi (2007) zeigen, dass nur in dem chlorophyllfreiem Teil das Fusionsprotein AtRKD2::GFP synthetisiert wird. Dieser Bereich ist leicht von den chlorophyllhaltigen Zellen zu isolieren. Durch Fluoreszenzmessung ist die Aktivität des GFP-Proteins eindeutig in den chlorophyllfreien proliferierenden Zellen nachweisbar (Abb. 3-35 B-D).

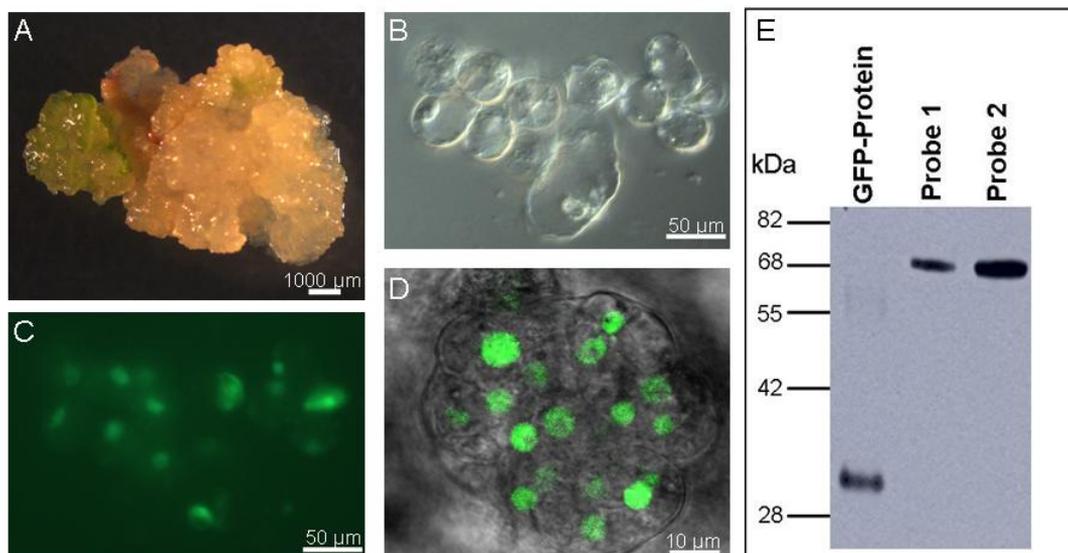


Abb. 3-35: Nachweis von AtRKD2::GFP in dem *AtRKD2*-überexprimierendem Gewebe

(A) Das Auflichtbild zeigt proliferierendes Gewebe bestehend aus grünen chlorophyllhaltigen und weißen chlorophyllfreien Zellen, in denen *AtRKD2::GFP* exprimiert wird. Die chlorophyllfreien Zellen (B) wurden zuerst mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie unter (C) und später mit CLSM (D) untersucht. (E) Detektion des Fusionsproteins AtRKD2::GFP unter Verwendung eines Anti-GFP Antikörpers. Für den Western Blot wurden 5ng GFP-Standard und je 30 µg Rohproteinextrakt eingesetzt. Proben wurden von 6 Monate (Probe 1) bzw. 2 Monate (Probe 2) altem Gewebe entnommen.

In der Western-Blot-Analyse wurde eine Proteinbande detektiert, deren Größe dem Fusionsprotein AtRKD2::GFP zugeordnet werden kann, da der theoretisch ermittelte Wert bei ca. 63 kDa liegt (Abb. 3-35 E). Als Positivkontrolle wurde das GFP-Protein verwendet, das ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa hat. Bei längerem Wachstum der Gewebekulturen waren geringere Mengen an Fusionsprotein detektierbar (Vergleich Probe 1 und 2, Abb. 3-35 E).

Die ChIP-chip-Experimente wurden mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Dazu wurde aus je 1g Pflanzenmaterial Chromatin isoliert (Abb. 3-36). Die AtRKD2-gebundenen DNA-Fragmente wurden unter Verwendung eines Anti-GFP Antikörpers angereichert und präzipitiert (IP-Probe). Antikörper-unbehandelte Chromatinproben wurden als Kontrollfraktion verwendet (Input-Probe). Nach der linearen Amplifikation der DNA und Fluoreszenzmarkierung wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurden 244K-Filter (Agilent Technologies, USA) verwendet, auf denen das ganze *Arabidopsis*-Genom repräsentiert ist.

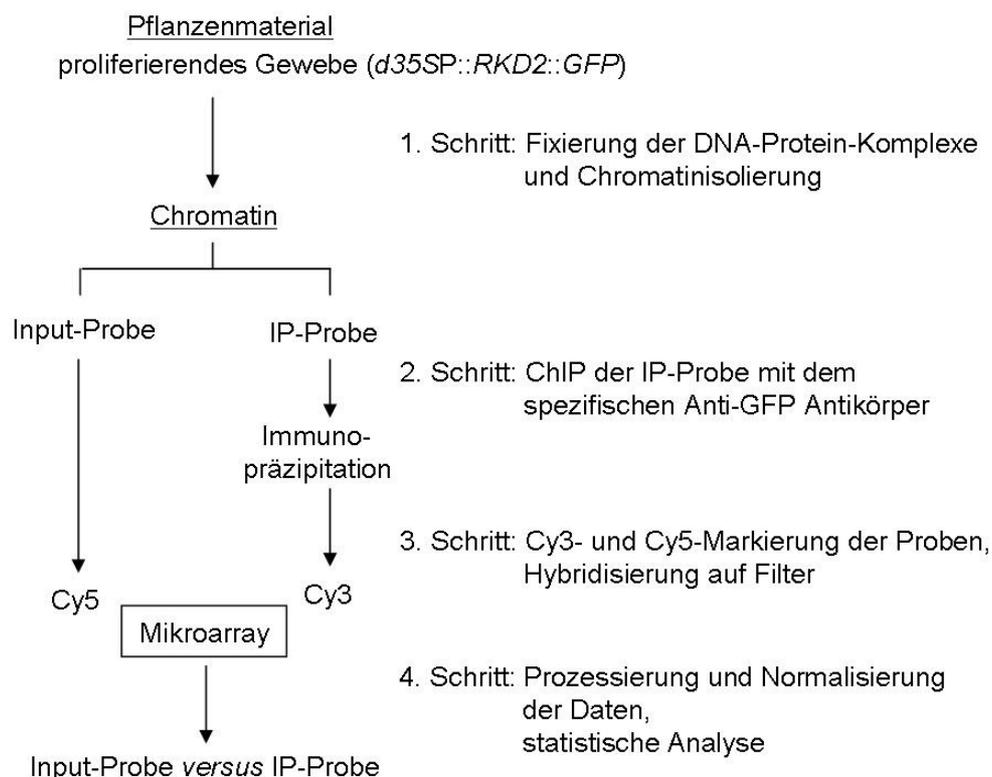


Abb.3-36: Schematische Übersicht über die Durchführung der ChIP-chip-Experimente

Die Normalisierung der Daten und statistische Analyse führten zu der Identifizierung von insgesamt 50 angereicherten Promotorregionen der IP-Proben im Vergleich zu den Input-

Proben (Abb. 3-37). Die in den Experiment 2 und 3 gefundenen Promotorregionen weisen eine hohe Übereinstimmung auf (159 Promotoren von 191 Promotoren bzw. von 565 Promotoren). Dagegen gibt es nur eine geringe Übereinstimmung zum Experiment 1.

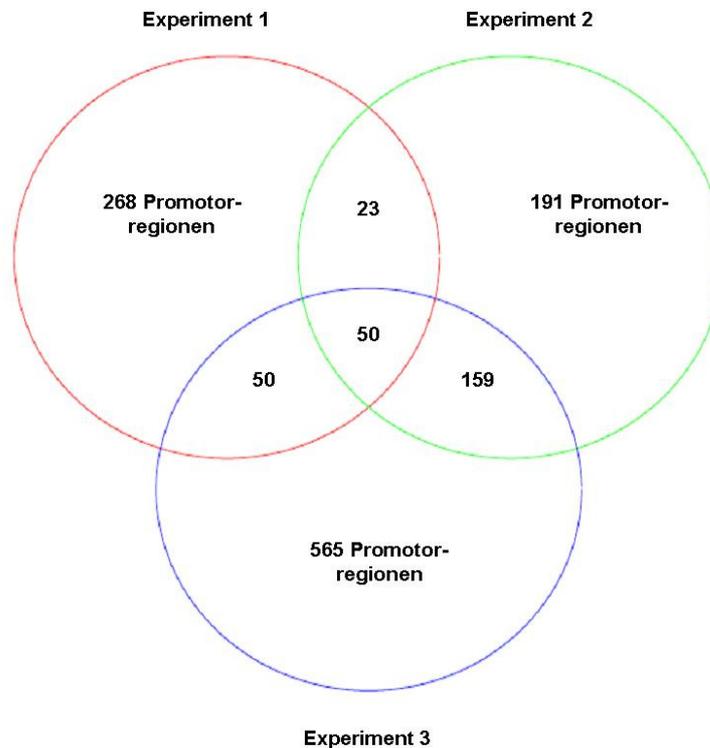


Abb. 3-37: Anzahl der angereicherten DNA-Fragmente in Promotorregionen aus 3 biologischen ChIP-chip- Experimenten mit dem AtRKD2-Protein

Von den 50 Promotorregionen wiesen 30 DNA-Fragmente eine Anreicherung um mindestens 1,9 und 20 weitere einen Anreicherungs Wert über 1,5 auf (Mittelwert von drei Experimenten mit Standardabweichung gemäß Tab. 3-6). Nur wenige der Kandidaten sind funktionell charakterisiert. 29 Gene kodieren für hypothetische Proteine oder Proteine mit unbekannter Funktion (Tab.3-6).

In einem weiteren Experiment wurde die Aktivierung der Zielgene in *AtRKD2*-Überexpressionslinien untersucht. Mit qRT-PCR wurde zunächst die Expression von 32 Genen in dem *AtRKD2*-exprimierenden Gewebe überprüft. Daten von Koszegi (D. Koszegi, unveröffentlichte Daten) deuten darauf hin, dass das Transkriptom des *AtRKD2*-exprimierenden Gewebes sowohl für den Kallus als auch für die Eizelle charakteristisch ist. Infolgedessen wurde Auxin-induziertes Kallusgewebe von *Arabidopsis thaliana* (Typ C24) als Kontrolle für die *AtRKD2*-Überexpressionslinien verwendet. Das konstitutiv exprimierte Gen *EF1 α* wurde als Referenz verwendet und die relativen Expressionswerte nach der ΔC_T -

Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). In zwei biologisch unabhängigen Experimenten wurden qRT-PCR-Reaktionen unter Verwendung von jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt, so dass für jede Reaktion sechs Datenpunkte gemessen wurden.

Tab. 3-6: Anreicherung der Promotor-DNA-Fragmente in ChIP-chip-Experimenten und qRT-PCR von 32 identifizierten Zielgenen

Alle 50 Gene sind mit Gennummer, Name und Funktion aufgelistet. Aus den Daten der 3 ChIP-chip-Experimente wurden die durchschnittlichen Anreicherungswerte (*fold change*) mit Standardabweichung berechnet. Die qRT-PCR wurde zunächst mit 32 Zielgenen in zwei biologisch unabhängigen Experimenten unter Verwendung von je drei technischen Replikaten durchgeführt. Dabei zeigten 8 Kandidaten erhöhte Transkriptlevel im AtRKD2-proliferierenden Gewebe (RKD2) im Vergleich zum Auxin-induzierten Kallusgewebe C24 (Aux) und 5 Kandidaten erhöhte Transkriptlevel im Vergleich Auxin-Kallus *versus* RKD2-Kallus (*fold change*): „-,“, = keine abweichenden Werte, n. d. = nicht durchgeführt.

Name	ChIP-chip	qRT-PCR	
		RKD2 / Aux	Aux / RKD2
AT1G74480 AtRKD2	-	2449,25 ± 54	0,00
Transkriptionsfaktoren			
AT2G07760 <i>zinc knuckle</i> (CCHC-type) family	1,90 ± 0,17	-	-
AT2G13350 C2-Domänenprotein	1,96 ± 0,11	-	-
AT4G04450 AtWRKY42	2,01 ± 0,22	-	-
AT5G23110 C3HC4-Typ RING finger	1,95 ± 0,25	1,89 ± 0,01	0,53 ± 0,00
AT5G37020 ARF8 (<i>Auxin response factor 8</i>)	1,98 ± 0,17	1,53 ± 0,01	0,65 ± 0,00
Metabolismus und Enzyme			
AT1G28010 PGP14 (P-Glycoprotein 14)	2,05 ± 0,30	-	-
AT2G07240 Cysteinpeptidase	1,90 ± 0,08	-	-
AT2G13680 CALS5 (Callosesynthase 5)	1,91 ± 0,11	-	-
AT3G42640 putative ATPase	1,85 ± 0,11	n. d.	n. d.
AT3G42850 putative Arabinosekinase	1,96 ± 0,26	n. d.	n. d.
AT3G43860 Glycosylhydrolase	1,88 ± 0,18	n. d.	n. d.
AT3G44830 Acyltransferase	1,89 ± 0,02	n. d.	n. d.
AT4G39110 Proteinkinase	1,94 ± 0,09	5,85 ± 1,55	0,18 ± 0,05
AT5G33340 CDR1	2,09 ± 0,07	-	-
Zellwand und Transport			
AT1G21230 WAK5 (<i>wall associated kinase 5</i>)	1,93 ± 0,06	-	-
AT1G35860 TOC75-I	1,77 ± 0,17	-	-
AT2G13620 CHX15	1,76 ± 0,12	-	-
AT3G02260 BIG, Auxin-Transport	1,84 ± 0,30	2,85 ± 1,27	0,39 ± 0,17
AT3G30842 putativer ABC-Transporter	1,90 ± 0,19	n. d.	n. d.
AT3G42880 Transmembran-Protein	2,06 ± 0,20	n. d.	n. d.
AT4G03830 <i>myosin heavy chain-related</i>	2,17 ± 0,42	-	-
unbekannte Funktion			
AT1G37113 unbekannt	1,72 ± 0,21	-	-
AT2G06562 unbekannt	1,73 ± 0,13	-	-
AT2G07213 unbekannt	2,21 ± 0,32	0,00	2067,10 ± 869,77
AT2G07215 unbekannt	2,21 ± 0,35	0,00	794,21 ± 267,30
AT2G07280 unbekannt	1,64 ± 0,12	0,01 ± 0,01	113,49 ± 88,13
AT2G10550 unbekannt	1,51 ± 0,18	11,53 ± 5,54	0,09 ± 0,04
AT2G10965 unbekannt	2,02 ± 0,11	-	-
AT2G11010 unbekannt	1,96 ± 0,06	-	-

AT2G20960	pEARLI4	1,99 ± 0,20	0,37 ± 0,00	2,71 ± 0,00
AT3G30220	unbekannt	1,68 ± 0,51	n. d.	n. d.
AT3G30222	unbekannt	1,78 ± 0,20	n. d.	n. d.
AT3G30230	unbekannt	1,90 ± 0,26	n. d.	n. d.
AT3G30769	unbekannt	2,12 ± 0,19	n. d.	n. d.
AT3G30770	unbekannt	1,72 ± 0,14	n. d.	n. d.
AT3G30820	unbekannt	1,91 ± 0,17	n. d.	n. d.
AT3G31910	unbekannt	2,12 ± 0,30	n. d.	n. d.
AT3G32150	unbekannt	1,89 ± 0,34	n. d.	n. d.
AT3G32896	unbekannt	2,00 ± 0,13	n. d.	n. d.
AT3G32904	unbekannt	1,80 ± 0,09	n. d.	n. d.
AT3G42060	unbekannt	2,01 ± 0,17	n. d.	n. d.
AT3G50370	unbekannt	2,41 ± 0,57	n. d.	n. d.
AT4G00060	MEE44	1,86 ± 0,11	14,72 ± 2,62	0,07 ± 0,01
AT4G06526	unbekannt	2,16 ± 0,29	3,28 ± 0,42	0,31 ± 0,04
AT4G07932	unbekannt	2,21 ± 0,27	-	-
AT5G05680	<i>nuclear pore complex protein</i>	1,98 ± 0,11	2,33 ± 0,07	0,43 ± 0,01
AT5G28550	unbekannt	2,14 ± 0,50	-	-
AT5G29050	unbekannt	2,40 ± 0,57	-	-
AT5G29070	unbekannt	2,12 ± 0,51	-	-
AT5G39770	unbekannt	1,88 ± 0,24	0,04 ± 0,04	45,70 ± 41,08

Von den 32 untersuchten Genen wiesen acht Gene erhöhte Transkriptlevel im *AtRKD2*-exprimierenden Gewebe auf, während fünf weitere Gene erhöhte Transkriptlevel im Auxin-Kallus zeigten, was auf eine mögliche Repression im *AtRKD2*-exprimierenden Gewebe hinweisen könnte (Tab. 3-6). Alle anderen Kandidaten wiesen ähnliche Transkriptlevel sowohl im Auxinkallus als auch im *AtRKD2*-proliferierenden Gewebe auf.

Es ist nicht auszuschließen, dass erhöhte Transkriptlevel aufgrund zellspezifischer Aktivitäten gemessen wurden. Um eine Aktivierung der Promotoraktivität durch *AtRKD2* zu messen, wurde zusätzlich ein transienter Assay in Protoplasten geplant.

4 Diskussion

Die RWP-RK DOMAIN Faktoren (RKD) stellen eine evolutionär konservierte Subfamilie der RWP-RK-Familie dar. RKD-Proteine haben eine konservierte RWP-RK-Domäne gemeinsam. Mitglieder der RKD-Familie wurden unter anderem in *Chlamydomonas reinhardtii* und Weizen identifiziert. Für eine detaillierte funktionelle Analyse wurde die entsprechende Genfamilie in der Modellpflanze *Arabidopsis* untersucht. Die *AtRKD*-Familie besteht aus bisher 5 identifizierten Mitgliedern (*AtRKD1*, 2, 3, 4 und 5). Daten von Koszegi (2007) weisen auf eine wichtige Funktion der *AtRKD*-Faktoren in der Gametogenese des weiblichen Gametophyten hin.

In der vorliegenden Arbeit werden Experimente beschrieben, deren Ergebnisse eine wichtige Voraussetzung für weitere funktionelle Analysen der *AtRKD*-Familie bilden. Diese beinhalten (I) die Identifizierung einer *cis*-regulatorischen Region des im weiblichen Gametophyten aktiven *AtRKD2*-Gens, (II) die Untersuchung von putativen *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen und (III) die Identifizierung von mindestens 8 putativen *AtRKD2*-Zielgenen.

4.1 Eine *cis*-regulatorische Region ist bestimmend für die Eizell-Aktivität von *AtRKD2*

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war die Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente in der *AtRKD2*-Promotorregion, welche die Eizell-spezifische Transkription des Gens im weiblichen Gametophyten steuern.

Informationen zu funktionalen *cis*-Elementen sind in vielen Datenbanken wie PLACE (Higo et al., 1999) oder AGRIS (Davuluri et al., 2003) zusammengefasst. Grundlage dieser Datenbanken sind überwiegend Veröffentlichungen, in denen Experimente zur spezifischen Promotoraktivität von Kandidatengenomen bzw. die Bindung von regulatorischen Faktoren in spezifische DNA-Regionen beschrieben werden. Die Schwierigkeit in der Anwendung dieser Datenbanken für die *AtRKD*-Promotoren liegt darin, dass bisher nur zwei Publikationen zu Embryosack-regulatorischen *cis*-Elementen vorliegen (Kap. 1.3). In der einen Publikation werden *cis*-Elemente beschrieben, die eine regulatorische Funktion für die Synergid-spezifische Gentranskription aufweisen (Punwani et al., 2008). In der zweiten Publikation identifizierte Yang et al. (2005) eine 77 bp *Enhancer*-Region, welche eine spezifische Reporterexpression in der Eizelle bewirkt. Allerdings blieb unklar, welche

Genpromotorregion durch das *Enhancer*-Element reguliert wird, da die zu dem *Enhancer*-Element benachbarten Gene keine Eizell-spezifische Aktivität aufweisen.

Ein Hinweis auf ein putatives Motiv war durch den Sequenzvergleich der *AtRKD*-Genpromotoren mit weiteren zu diesem Zeitpunkt bekannten weiblichen Gametophyt-spezifischen Genpromotoren gegeben (Koszegi, 2008). Aufgrund der Information über die 9 bp lange Sequenz, die sowohl in *AtRKD*-Genen als auch im Eizell-spezifisch aktiven Gen *DD45* (Steffen et al., 2007) lokalisiert ist, wurde eine gezielte Mutationsanalyse der 522 bp langen *AtRKD2*-Promotorregion durchgeführt (Kap. 3.1.2).

Deletionsanalysen der 5'-Promotorregion und Mutationen in der DNA-Sequenz des putativen Motivs zeigten, dass das Nonamer in dem *AtRKD2*-Promotor keinen Einfluss auf die Eizell-spezifische Gentranskription hat. Die *cis*-Motiv-Vorhersage auf Grundlage des Programms CoMo-Finder stimmt nicht mit den Resultaten der Mutationsanalyse des *AtRKD2*-Promotors überein. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass das Motiv auf der Basis nur weniger Promotoren vorhergesagt wurde. Je weniger Daten zur Verfügung stehen, umso schwieriger können statistisch relevante Aussagen getroffen werden.

In den Deletionsanalysen der 5'-Promotorregion des *AtRKD2*-Gens konnte gezeigt werden, dass das kleinste Eizell-aktive Promotorfragment, ausgehend vom ATG-Startkodon, 250 bp umfasst. Bei einer minimalen Länge von 231 bp wurde keine Promotoraktivität mehr in der Eizelle beobachtet. Interessanterweise wurden in 3 von 25 untersuchten T₀-Linien schwache Reporter-genaktivitäten in der Funiculus-Region, dem sporophytischen Gewebe von Ovula, detektiert. Diese Beobachtungen führten zunächst zu der Vermutung, dass durch die Deletion möglicherweise die Promotorspezifität, nicht aber die Promotoraktivität zerstört wurde. Im Widerspruch zu dieser Vermutung stehen die erzielten Ergebnisse durch Mutationen der Basenabfolgen CCCC (Position -243) bzw. AAA (Position -237). Die resultierende Inaktivität des chimären Reportergens sowohl in sporophytischen als auch in gametophytischen Zellen der Samenanlagen weist auf eine Zerstörung der *AtRKD2*-Promotorfunktion hin. Es bleibt zu klären, ob die Beobachtungen der sporophytischen Promotoraktivität in den Ovula von einigen wenigen Pflanzen der D231-Reihe relevant bei weiterführenden Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *AtRKD2*-Gens sein werden.

Die Ergebnisse der Mutationen der Basenabfolgen CCCC (Position -243) bzw. AAA (Position -237) bei einer Promotorfragmentgröße von 250 bp entsprechen der Vermutung, dass ein *cis*-regulatorisches Element zwischen den Positionen -250 und -231 oberhalb des *AtRKD2*-Startkodons lokalisiert ist. Die statistisch signifikante Anreicherung von Basenabfolgen aus der 19 bp langen Sequenz in Eizell-exprimierten Genen aus *Arabidopsis*

thaliana unterstützt diese Hypothese (Kap. 3.1.3). Interessanterweise wurden keine identischen Basenabfolgen der *cis*-regulatorischen Region innerhalb der *AtRKD*-Genfamilie detektiert. Das deutet darauf hin, dass die *AtRKD*-Gene unterschiedlich transkriptionell reguliert werden. Beispielsweise ist *AtRKD1*, das die höchste Sequenzähnlichkeit in seiner Promotorregion zu dem *AtRKD2*-Genpromotor aufweist, nachgewiesenermaßen sowohl in der Eizelle als auch in den Synergiden aktiv.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wichtige *cis*-Elemente für die Regulation der *AtRKD2*-Gentranskription identifiziert wurden. Der Startpunkt der Transkription ist an der Position -35 oberhalb des Startkodons lokalisiert. Im *Arabidopsis*-Genom sind TATA-Boxen, wenn in den Genpromotoren vorhanden, in der Regel zwischen 18 bis 45 bp entfernt vom Transkriptionsstartpunkt (TSS) zu finden (Yamamoto et al., 2009). In dieser Hinsicht ist davon auszugehen, dass die putative TATA-Box, die 30 bp vom TSS entfernt ist, eine wichtige Rolle für die Bindung des Transkriptionsinitiationskomplexes spielt. Ausgehend von den Resultaten ist folgendes Modell der transkriptionellen Regulation des *AtRKD2*-Gens denkbar: TSS und TATA-Box sind für die Initiation der Transkription bestimmend, wohingegen ein *cis*-regulatorisches Element in distaler Position für die spezifische Transkription von *AtRKD2* im reifen Embryosack entscheidend ist (Abb. 4-1). Die Frage nach möglichen *trans*-regulatorischen Faktoren, die spezifisch an das *cis*-regulatorische Element im *AtRKD2*-Promotor binden, bleibt zu klären.

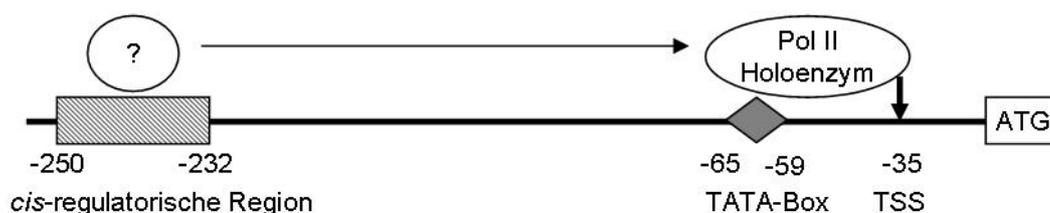


Abb. 4-1: Vereinfachtes Modell der Regulierung Eizell-spezifischer Transkription des *AtRKD2*-Gens im weiblichen Gametophyten

Die Eizell-spezifische Transkription des *AtRKD2*-Gens wird wahrscheinlich über die Bindung von *trans*-Faktoren an das neu identifizierte *cis*-Element und an die TATA-Box reguliert, wobei an der Position -35 der Transkriptionsstartpunkt (TSS) lokalisiert ist.

Bislang wurden auch andere Genpromotoren wie die der Gene *DD45*, *ABA INSENSITIVE 4* (*ABI4*) und *WUS homeobox-containing 8* (*WOX8*) aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert, die im reifen Embryosack wie *AtRKD2* ausschließlich eine transkriptionelle Aktivität in der Eizelle aufweisen (Steffen et al., 2007; Wang et al., 2010). Allerdings wurden die Promotoren dieser Gene bislang nicht auf spezifische *cis*-Elemente analysiert. Interessanterweise sind

ABI4 und WOX8 bislang als wichtige Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Embryogenese bekannt (Bossi et al., 2009; Finkelstein et al., 1998; Haecker et al., 2004; Wu et al., 2007). Darüber hinaus zeigt *DD45*, das eine Sequenzähnlichkeit zu Eizell-spezifischen Mitgliedern der *ECA1*-Familie in Weizen aufweist (Sprunck et al., 2005), im Embryo eine spezifische Promotoraktivität 2 Tage nach der Befruchtung (Steffen et al., 2007). Eine *AtRKD2*-Promotoraktivität ließ sich auch 2 Tage nach der Befruchtung im Embryo nachweisen (Koszegi, 2008), aber in der weiteren embryonalen Entwicklung wurden keine Promotorgenaktivitäten detektiert. Aus den Publikationen ist bekannt, dass die meisten Genpromotoren, die eine transkriptionelle Aktivität im reifen Embryosack aufweisen, auch während der Embryoentwicklung aktiv sind (Steffen et al., 2007; Wang et al., 2010). Allerdings kann nach der Befruchtung mit den Promotor-Reporter-Konstrukten nicht zwischen maternaler Genaktivität und *de novo* Expression unterschieden werden. Beispielsweise gehen Steffen et al. (2007) davon aus, dass bei dem Nachweis von Transkripten in *Arabidopsis*-Schoten eine *de novo* Expression der entsprechenden Gene nach der Befruchtung stattfindet. Hingegen wurde keine *AtRKD2*-Genexpression in den Schoten detektiert (Koszegi, 2008). Es bleibt zu bestimmen, inwieweit *AtRKD2* eine Rolle während der Befruchtung und frühen embryonalen Entwicklung spielen könnte.

Durch die Identifizierung der *cis*-regulatorischen und der 5'-untranslatierten Region im *AtRKD2*-Promotor bietet sich die Möglichkeit, eine minimale Promotorsequenz für weitere Experimente zu nutzen. Die Eizell-spezifische Aktivität des minimalen *AtRKD2*-Genpromotors könnte für die Missexpression von Kandidatengen verwendet werden, um eine befruchtungsunabhängige, parthenogenetische Aktivierung der Eizelle zu erreichen. Kandidatengene könnten isolierte Gene wie unter anderem *BABYBOOM* (Boutilier et al., 2002), *LEAFY COTYLEDON 1* (Lotan et al., 1998) und *WUSCHEL* (Zuo et al., 2002) sein, die überexprimiert eine Embryonenentwicklung aus somatischen Zellen bewirken.

Alternativ können die Promotor-Reporter-Linien als Eizell-Marker bei der Analyse von gametophytischen Mutanten eingesetzt werden (u. a. Gross-Hardt et al., 2007; Huck et al., 2003; Moll et al., 2008; Portereiko et al., 2006).

4.2 AtRKD-Faktoren und ihre mögliche Funktionen als Protein-Interaktionspartner

Transkriptionsfaktoren der bZIP-Klasse haben in der Regel eine sogenannte Leucin-Zipper-Domäne sowie C-terminal eine darauf folgende, vorwiegend aus basischen Aminosäuren bestehende, basische Domäne gemeinsam (Jakoby et al., 2002). Die heptamere Leucin-Zipper-Domäne besteht aus einer Folge hydrophober Aminosäuren, wie z. B. Leucin, Isoleucin oder Valin, die jeweils sieben Aminosäure-Positionen voneinander getrennt vorliegen. Diese Domäne ist generell für die Homo- bzw. Heterodimerisierung zweier bZIP-Proteine verantwortlich, während die basischen Domänen an die Bindung spezifischer DNA-Sequenzmotive beteiligt sind.

RKD-Faktoren weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit bZIP-Transkriptionsfaktoren auf. An eine kurze, teilweise untypisch ausgeprägte Zipper-ähnliche Domäne schließt C-terminal das hochkonservierte, ebenfalls basische RWP-RK-Motiv an. Diese strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen den Faktoren der bZIP- und RKD-Klasse führten zu der Hypothese, dass auch RKD-Faktoren als Dimere interagieren, um dann über das RWP-RK-Motiv an DNA zu binden. Um dieser Hypothese experimentell nachzugehen, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System angewandt, mit dem unbekannte Proteininteraktionspartner identifiziert werden können.

Für die Ermittlung von unbekanntem Interaktionspartnern ist es entscheidend, eine cDNA-Bank aus dem Gewebe zu generieren, in dem die Proteine biologisch aktiv sind (van Criekinge und Beyaert, 1999). Da *AtRKD1* und *AtRKD2* nachgewiesenermaßen in dem reifen Embryosack aktiv sind, wurden *Arabidopsis*-Pistillen zu dem Zeitpunkt als bestmögliches Ausgangsmaterial für die Herstellung einer cDNA-Bank angesehen. Es muss betont werden, dass eine Emaskulation geschlossener Blüten und anschließend eine zweitägige Inkubation der freigelegten Pistille erfolgte, um einerseits eine weibliche Gametophytenentwicklung zum reifen Embryosack zu ermöglichen und andererseits eine Befruchtung der Samenanlagen zu vermeiden. Die Qualität der generierten Pistill-cDNA-Bank wurde in mehreren Tests analysiert und aufgrund der erzielten Resultate wurde die Pistill-cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet (Kap. 3.3.1.1). Beispielsweise wiesen 28 von 30 amplifizierten Klonen cDNA-Insertionen mit einer durchschnittlichen Größe von 1,3 kb auf. Die Sequenzierung von 18 cDNA-Klonen und der Vergleich mit veröffentlichten Expressionsdaten zeigte außerdem, dass 10 von 18 zufällig isolierten Klonen der Pistill-cDNA-Bank im Embryosack aktiv sind. Zudem wurden Transkripte von *AtRKD1* und

AtRKD2 in der Pistill-cDNA-Bank nachgewiesen, so dass eine Interaktion der RKD-Proteine technisch möglich wäre.

In einer ersten Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde die Pistill-cDNA-Bank auf mögliche Interaktionspartner von *AtRKD1* durchsucht und 13 potentielle Kandidaten detektiert, die eine Ähnlichkeit zu regulatorischen Faktoren bzw. eine nachgewiesene Aktivität im Embryosack aufweisen (Kap. 3.3.1.2). Darunter waren aber keine Mitglieder der *AtRKD*-Familie. Die Überprüfung der Spezifität von den detektierten Protein-Wechselwirkungen ergab allerdings, dass alle detektierten Klone falsch-positiv sind. Eine mögliche Erklärung ist, dass die synthetisierten Fusionsproteine direkt an die GAL4-Domäne binden und so transkriptionell aktivierend wirken (Bartel et al., 1993a, 1993b). Es ist auch denkbar, dass die exprimierten Gene in unterschiedlichen Geweben der Pistille entwicklungsabhängig aktiv sind und *in vivo* keine Proteininteraktionen zu erwarten wären. Basierend auf den Untersuchungen ist daher zu vermuten, dass die Pistill-cDNA-Bank, trotz der im Embryosack nachgewiesenen aktiven Gene, nicht die geeignete Wahl zur Detektion von *AtRKD*-Protein-Interaktionen darstellt.

Da sowohl *AtRKD1* als auch *AtRKD2* als Transkripte in der Eizelle nachweisbar sind (Koszegi, 2008), stellte die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse einer Eizell-cDNA-Bank eine sensitivere Methode dar, um unbekannte *AtRKD*-Interaktionspartner zu detektieren. Die Durchsuchung der aus *Arabidopsis*-Eizellen hergestellten cDNA-Bank (L. Soljic und S. Rademacher) führte zu der Detektion von 17 (*AtRKD1*) bzw. 66 Faktoren (*AtRKD2*, Kap. 3.3.1.3). Untersuchungen zur Spezifität detektierter *AtRKD1*-Protein-Wechselwirkungen zeigten, dass alle auftretenden *AtRKD1*-Kandidaten falsch-positive Klone sind, weil in dem X-Gal-Assay keine *lacZ*-Reportergenaktivität nachgewiesen werden konnte. Nur bei der Aktivierung aller Reportergene wird im Hefe-Zwei-Hybrid-System von einer nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktion ausgegangen (Durfee et al., 1993). Hingegen führte die Überprüfung der Interaktionen von *AtRKD2* mit 11 ausgewählten Kandidaten zur Bestätigung der aus der Durchsuchung der Eizell-cDNA-Bank erhaltenen Ergebnisse.

Interessanterweise befinden sich unter den potentiellen Kandidaten drei Faktoren (*At1g07750*, *At1g76750*, *At1g31450*), die sowohl bei der Durchsuchung der Eizell-cDNA-Bank mit *AtRKD1* als auch mit *AtRKD2* detektiert wurden. Dem stehen die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen gegenüber, die zeigen, dass die drei Faktoren nur putative *AtRKD2*-Interaktionspartner darstellen. Verschiedene Expressionsanalysen zeigten zwar, dass diese drei Gene im weiblichen Gametophyten aktiv sind (Hennig et al., 2004; Jones-Rhoades et al., 2007; Johnston et al., 2007; Yu et al., 2005), aber keines wurde bislang funktionell

charakterisiert. Aufgrund ihrer konservierten Domänen wurden 2 Faktoren der Cupinfamilie (At1g07750) und der Familie der Aspartylproteasen (At1g31450) zugeordnet. Während Cupine vor allem als Speicherproteine während der pflanzlichen Embryoentwicklung bekannt sind (Dunwell et al., 2000), sind Aspartylproteasen mit ihrer proteolytische Funktion unter anderem an der Prozessierung von Speicherproteinen und an der Pathogenantwort beteiligt (Schaller, 2004). Der dritte Faktor stellt ein hypothetisches Protein (At1g76750) dar, das Sequenzähnlichkeiten zur ECA1-Familie aufweist (Vrinten et al., 1999). Mitglieder der ECA1-Familie in *Triticum aestivum* wurden als Eizell-aktive Gene identifiziert (Kumlehn et al., 2001; Sprunck et al., 2005).

Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen zwischen AtRKD2 und den drei Kandidaten in einem unabhängigen Experiment erbrachten keinen Nachweis. Die mit dem Protoplasten-Zwei-Hybrid-System getesteten Faktoren wiesen keine Interaktion mit AtRKD2 auf. Aufgrund fehlender Informationen zur Funktion im Embryosack kann nicht geschlussfolgert werden, inwieweit die drei Faktoren einen molekularen Zusammenhang zu AtRKD2 aufweisen, außer dass sie in der Eizelle exprimiert werden. In dem Zusammenhang ist auch zu betonen, dass Mitglieder der ECA1-Familie in cDNA-Banken aus isolierten Weizen-Eizellen abundant auftraten (Kumlehn et al., 2001; Sprunck et al., 2005). So ist zu vermuten, dass das ECA1-ähnliche Protein nur aufgrund seiner Abundanz als möglicher RKD-Interaktionspartner detektiert wurde. Diese Möglichkeit ist auch für die anderen zwei Kandidaten nicht auszuschließen.

Die mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System ermittelten Hinweise zu Protein-Protein-Interaktionen ließen sich bisher nicht bestätigen. Inwieweit andere AtRKD2-Kandidaten als potentielle Interaktionspartner in Frage kommen, muss in weiteren Experimenten wie die *verse vica* Klonierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System und in *pull down* Assays geklärt werden. Die isolierten Eizell-spezifischen Faktoren bieten allerdings die Möglichkeit, ihre Rolle in der Embryosackentwicklung durch reverse Genetik zu analysieren.

Keiner der in den Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen isolierten Kandidaten war ein Mitglied der RKD-Familie in *Arabidopsis thaliana*, woraus sich aber keine Rückschlüsse auf fehlende Interaktionen innerhalb der AtRKD-Familie ziehen lassen können. Denn beispielsweise wurden in unabhängigen Untersuchungen Protein-Wechselwirkungen zwischen einzelnen bZIP-Proteinen nachgewiesen, die in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen nicht detektiert werden konnten (Ehlert et al., 2006).

Die Ergebnisse des BiFC-Assays und der Protoplasten-Zwei-Hybrid-Analyse machen allerdings wahrscheinlich, dass es keine spezifischen Interaktionen zwischen AtRKD1-AtRKD1, AtRKD1-AtRKD2 und AtRKD2-AtRKD2 gibt (Kap. 3.3.2). Weiterführende Arbeiten, die im Ergebnisteil nicht mehr dargestellt werden konnten, weisen auch auf fehlende Wechselwirkungen von AtRKD1 bzw. AtRKD2 zu AtRKD3 sowie zu AtRKD4 hin. Das spricht eher dafür, dass keine Homo- und Heterodimerisierungen zwischen Mitgliedern der AtRKD-Familie stattfinden. In diesem Zusammenhang muss aber die Rolle von AtRKD5 als putativer Interaktionspartner noch geklärt werden.

Denkbar ist auch, dass die RKD-Faktoren keine Protein-Interaktionen eingehen. Dieser Gedanke findet seine Begründung in der Tatsache, dass beispielweise nicht alle bZIP-Proteine Protein-Interaktionen eingehen. So wurde mit *in vitro* Experimenten nachgewiesen, dass bZIP-Proteine auch ohne vorherige Dimerisierung an DNA binden können (Cranz et al., 2004; Weltmeier et al., 2006).

Die umfangreichen Arbeiten auf der Basis der selbst generierten Pistill-cDNA-Bank, der Eizell-cDNA-Bank und des Protoplast-Zwei-Hybrid-Systems zur Detektion unbekannter AtRKD-Interaktionspartner einschließlich der direkten Testung von AtRKD-Proteinen zur Hetero- und Homodimerisierung erbrachten keinen Nachweis zu spezifischen Protein-Wechselwirkungen. Die Hypothese, dass RKD-Faktoren aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den bZIP-Proteinen als Dimere interagieren, wird durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht unterstützt.

4.3 AtRKD beeinflusst das apikale Sprosswachstum

Eine regulierte Aktivierung der AtRKD-Faktoren wurde durch die Anwendung des Glucocorticoid-induzierbaren Systems (GR-System) in *Arabidopsis thaliana* ermöglicht. Das GR-System ist nur für Faktoren geeignet, die im Zellkern lokalisiert sind. Die an eine GR-Domäne fusionierten Faktoren liegen in der Regel als inaktiver Proteinkomplex im Zytosol vor. Erst die Induktion mit dem Hormon Dexamethason (DEX) führt zu einer Translokation der Fusionsproteine in den Zellkern, wo die Faktoren aktiv werden (Baudry et al., 2004; Lloyd et al., 1994).

Unter DEX-induzierten Bedingungen wurde in den *AtRKD1::GR*-Linien und *AtRKD2::GR*-Linien vergleichbare morphologische Veränderungen beobachtet. Darüber hinaus führte die kontinuierliche Induktion mit DEX zu der Ausbildung Kallus-artiger Strukturen, die dem Phänotyp konstitutiv überexprimierender *AtRKD1*- sowie *AtRKD2*-Linien entsprechen (Abb. 3-28). Das zeigt, dass das GR-System prinzipiell für die Expression von *AtRKD* geeignet ist.

Zudem können durch Anwendung des induzierbaren Systems mögliche entwicklungsabhängige oder metabolische Anpassungseffekte umgangen werden, die gegebenenfalls in konstitutiven Überexpressionslinien stattfinden (Zuo und Chua, 2000).

Die kontinuierliche DEX-Induktion führte zur Hemmung der Blütenentwicklung in den transgenen *AtRKD1::GR*- und *AtRKD2::GR*-Pflanzen. Zugleich wiesen die *AtRKD::GR*-Pflanzen eine verstärkte Entwicklung neuer Blatttriebe auf. Diese neuen Blattanlagen entstanden in den Blattachsen älterer Blätter (Abb. 3-29). Diese Beobachtung steht im Kontrast zu der Entwicklung transgener *AtRKD::GR*-Pflanzen unter nicht-induzierten Bedingungen, die wie die Wildtyppflanzen kein verstärktes Seitentriebwachstum aufweisen. Die Analyse der Pflanzen in einem Zeitraum von 12 bis 17 Tagen nach der Keimung offenbart deutliche Unterschiede in der Entwicklung des Hauptsprossmeristems (*shoot apical meristem*, SAM). Das SAM ist für das Wachstum des oberirdischen Teils der Pflanze verantwortlich. Meist folgt nach einer vegetativen Phase der Wechsel zur generativen Phase, in der das SAM anstelle vegetativer Seitenorgane reproduktive Organe (Blüten) anlegt (Hempel und Feldman, 1994). Unter nicht-induzierten Bedingungen entwickelten *AtRKD::GR*-Pflanzen ähnlich wie die Wildtyp-Pflanzen ein Infloreszenzmeristem. Hingegen führte die kontinuierliche Induktion mit DEX zu einer Stagnation der SAM-Entwicklung und zu der Aktivierung erster lateraler Meristeme in den Achseln von Blättern in der Nähe des SAM (Abb. 3-30). Gewöhnlich werden während der vegetativen Wachstumsphase von *Arabidopsis thaliana* laterale Meristeme erst in einigem Abstand zum SAM in den Achseln älterer Blätter gebildet, bevor sie an jüngeren Blättern entstehen (Hempel und Feldman, 1994). Nach dem Übergang zur generativen Phase beginnen sich die lateralen Meristeme in den Achseln der jüngsten Blätter schneller zu entwickeln als in den älteren Blattachsen (Long und Barton, 2000).

Davon ausgehend, dass *AtRKD1* und *AtRKD2* in ähnlicher Weise die SAM-Entwicklung beeinflussen, wurden detaillierte histologische Analysen mit transgenen *AtRKD2::GR*-Pflanzen durchgeführt. Promotor-Reporter-Linien für *WUS*, *CLV3*, *ATML1* und *DR5* wurden mit *AtRKD2::GR*-Linien gekreuzt, um ihre Expression nach der Induktion mit DEX zu analysieren (Tab. 3-5).

Die Gene *WUS* und *CLV3* sind bekanntermaßen im SAM aktiv. So wird *WUS* unterhalb der zentralen Zone des Hauptsprossmeristems (Organisationszentrum) synthetisiert, um die Identität der Stammzellen in der zentralen Zone aufrecht zu erhalten (Laux et al., 1996; Ikeda

et al., 2009). Die Stammzellen wiederum produzieren CLAVATA-3-Peptide (CLV3, Fletcher et al., 1999), die über eine Signalkaskade die Expression des *WUS*-Gens reprimieren (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000).

Histologische Analysen der SAM-Region in den *AtRKD2::GR*-Pflanzen deuten auf eine Erhaltung der Meristemidentität hin. Dies wird durch die Promotoraktivität der Stammzell-spezifischen Marker *CLV3* und *WUS* in 12 bis 17 Tage alten Pflanzen belegt (Abb. 3-33 und 3-34). Auch ließen sich keine Unterschiede in der Promotoraktivität des Epidermis-spezifischen Markers *ATML1* (Lu et al., 1996) im vegetativen SAM der transgenen Pflanzen unter induzierten und nicht-induzierten Bedingungen feststellen (Abb. 3-32). Mit dem Wechsel der vegetativen zur generativen Phase war auch eine Meristementwicklung in den Achseln jüngster Blätter an der Basis des Infloreszenzmeristems der Kontrollpflanzen zu beobachten, die durch eine Aktivität von *CLV3* und *WUS* gekennzeichnet ist, während unter induzierten Bedingungen die *AtRKD2::GR*-Pflanzen *CLV3*- und *WUS*-spezifische Aktivitäten in den sich entwickelnden Achselmeristemen unterhalb des SAM aufzeigten. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass *AtRKD2::GR* keinen Einfluss auf die Aktivität von *ATML1*, *WUS* und *CLV3* hat.

Eine interessante Beobachtung ist, dass bei einer kontinuierlichen DEX-Induktion in dem Sprossmeristem der transgenen *AtRKD2::GR*-Pflanzen keine *DR5*-Reporter-genaktivität nachgewiesen werden konnte. In den Kontrollpflanzen waren hingegen GFP-Signale im SAM, in den Apices junger Blätter und den Stipeln erkennbar (Abb. 3-31). *DR5* ist ein synthetisch hergestellter Promotor, der aus verschiedenen *Auxin response* Elementen (AuxRE) besteht (Ulmasov et al., 1997; Sabatini et al., 1999). AuxRE entsprechen Promotorelementen spezifischer Gene, an die AUXIN RESPONSE Faktoren (ARF) binden und so eine Regulation der Transkription bewirken. Die Aktivität von *DR5* ist somit ein indirekter Nachweis der Auxin-induzierten Signalkaskade. Demzufolge deuten die Stagnation in der Entwicklung des SAM und die paarweise Entstehung von Blättern auf eine Störung von Auxin-gekoppelten Mechanismen hin.

Die unter kontinuierlich induzierten Bedingungen gewachsenen *AtRKD2::GR*-Pflanzen weisen einen vergleichbaren Phänotyp zu jungen *Arabidopsis*-Pflanzen mit Mutationen der Gene *AS1* und *AS2* (ASYMMETRIC LEAVES) auf (Li et al., 2005; Ueno et al., 2007; Zgurski et al., 2005). Charakteristisch für *as*-Mutanten sind beispielsweise die Ausbildung von kleinen asymmetrischen, nach unten rollenden Blättern und der buschige Phänotyp (Qi et al., 2004; Ikezaki et al., 2010). Allerdings ist zu betonen, dass im Gegensatz zu den *AtRKD2::GR*-

Pflanzen die Mutanten *as1* und *as2* Blütenstände ausbilden. Die Proteine AS1 und AS2 sind für die Repression der Aktivität von KNOX-Genen (Klasse-1 KNOTTED-like HOMEODOMAIN) in den Blattprimordien und jungen Blättern verantwortlich (Guo et al., 2008; Iwakawa et al., 2007). KNOX-Faktoren regulieren hingegen Meristem-spezifische Faktoren im SAM (Byrne et al., 2000). Die Störung der Kontrollmechanismen, die eine Repression der KNOX-Expression bewirken, ist mit einer Störung der Auxin-Homöostase und abnormalen Blattentwicklung verbunden (Scanlon et al., 2002; Zgurski et al., 2005). Daten von Hay et al. (2006) deuten auf einen Zusammenhang zwischen Auxintransport und der Funktionalität von AS1 hin. Die Faktoren AS1 und PIN1, letzterer ein Mitglied der PIN-FORMED (PIN)-Familie der Auxintransporter (Petrasek und Friml, 2009), werden vermutlich gemeinsam benötigt, um die Aktivität von *BP/KNOX1* zu unterbinden.

Im Hauptsprossmeristem ist PIN1 für den Auxin-Transport in Richtung junger Primordien zur Erzeugung lokaler Auxinmaxima erforderlich und spielt damit eine entscheidende Rolle in der lateralen Organpositionierung und -entwicklung (Benkova et al., 2003; Reinhardt et al., 2003). Allerdings lässt sich mit einer gestörten Funktionalität des Auxin-Transporters PIN1 nicht die Komplexität der phänotypischen Veränderungen bei dem Wachstum von *AtRKD::GR*-Pflanzen auf Induktionsmedium erklären. Die *pin1*-Mutante ist durch eine reduzierte Anzahl an Blättern und Nadel-ähnlichen Stängeln ohne Blütenstand charakterisiert (Okada et al., 1991). Es ist nicht auszuschließen, dass eine fehlende *DR5*-Reportergenaktivität auch auf Störungen in der Auxinbiosynthese oder auf eine fehlende Aktivität von ARF-Faktoren zurückzuführen sein kann.

Grundsätzlich weisen die Ergebnisse der histologischen Analyse auf einen Zusammenhang zwischen *AtRKD*-Faktoren und Auxin-gekoppelten Mechanismen hin.

4.4 Identifizierung putativer *AtRKD2*-Zielgene durch ChIP-chip-Analysen

Wie und ob *AtRKD*-Faktoren verschiedene Ziel-DNA-Sequenzen in den Pflanzenzellen erkennen und spezifisch binden können, ist bislang unklar. Daher ist es von hohem Interesse, Zielgene zu identifizieren, die von *RKD*-Faktoren reguliert werden.

Mit der Anwendung des GR-induzierbaren Systems wurde versucht, Zielgene von *AtRKD*-Faktoren zu identifizieren. Die Makroarray-Analysen unter Verwendung von REGIA-Filtern führten zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen (Kap. 3.4.1). Allerdings sind auf den REGIA-Filtern nur 1200 bekannte Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* repräsentiert. Die Tatsache, dass bislang sehr wenig über aktive Gene im weiblichen Gametophyten bekannt ist,

lässt vermuten, dass Genom-weite Mikroarray-Analysen eine bessere Grundlage zur Identifizierung von RKD-Zielgenen bieten.

Mit der ChIP-chip-Methode werden ausgehend vom regulatorischen Faktor Protein-DNA-Wechselwirkungen in der lebenden Zelle untersucht. Idealerweise wird die ChIP-chip-Methode auf native endogene Transkriptionsfaktoren in Wildtyppflanzen (natürliches System) angewendet. Allerdings werden Gene, die für Transkriptionsfaktoren in Pflanzen kodieren, in der Regel in geringen Mengen Gewebe-spezifisch und oft transient während der Entwicklung exprimiert (Czechowski et al., 2004). Zusätzlich kommt erschwerend dazu, dass generell eine große Menge an homogenem Pflanzenmaterial (1-3 g) für die ChIP-chip-Experimente benötigt wird. In vielen Studien werden deshalb transgene Pflanzen als Ausgangsmaterial verwendet, in denen entweder das Gen, das für den Transkriptionsfaktor kodiert, überexprimiert wird (Chua et al., 2005; Dong und Liu, 2010) oder durch Insertion von T-DNA zerstört ist (Dohmann et al., 2008; Kaufmann et al., 2009; Zheng et al., 2009).

Homozygote Einzelmutanten von *AtRKD2* wurden zwar erzeugt, zeigten aber keinen offensichtlichen Phänotyp, was vermutlich auf eine funktionelle Redundanz der Gene zurückzuführen ist (Koszegi, 2008). Alternativ wurden deshalb für die ChIP-chip-Experimente ektopisch überexprimierende *AtRKD2::GFP*-Linien unter Kontrolle des doppelten Promotors *CaMV35S* als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Überexpression von *AtRKD2* führt zu der Entstehung Kallus-artiger Gewebe direkt aus dem keimenden Samen. Vergleichende Experimente haben gezeigt, dass die Fusion des GFP-Proteins an *AtRKD2* keinen Einfluss auf die phänotypische Entwicklung der transgenen Linien hat (Koszegi, 2008). Das Fusionsprotein *AtRKD2::GFP* wurde nur in dem farblosen, nicht differenzierten Teil des Gewebes nachgewiesen und fehlt vollständig in dem grünen differenzierten Gewebe (Kap. 3-5).

Ein anderer wichtiger Aspekt für die ChIP-chip-Analyse ist die Verfügbarkeit eines hochspezifischen Antikörpers für den gegebenen Transkriptionsfaktor. Mit dem heterologen Expressionssystem in *E. coli* wurden unter denaturierenden Bedingungen erfolgreich rekombinante *AtRKD1*- und *AtRKD2*-Proteine produziert (Kap. 3.2.1). Trotz verschiedener Optimierungsversuche gelang es nicht, nativ aufgereinigte Proteine aus *E. coli* zu isolieren, so dass in weiteren Experimenten das pflanzliche Expressionssystem als Basis für die Produktion rekombinanter Proteine dienen soll (Kap. 3.2.2.). Da GFP keinen erkennbaren Einfluss auf die Entwicklung ektopisch exprimierender *AtRKD2*-Linien hat, wurde für die Detektion von *AtRKD2::GFP* ein spezifischer Anti-GFP Antikörper verwendet. Die Methode,

ChIP-chip-Analysen mit GFP-spezifischen Antikörpern zur Anreicherung von an GFP fusionierten Zielproteinen durchzuführen, wurde bereits mehrfach erfolgreich angewendet (u. a. Chua et al., 2005; Long et al., 2010; Mathieu et al., 2009).

Drei biologisch unabhängige ChIP-chip-Experimente wurden unter Verwendung der überexprimierenden *AtRKD2::GFP*-Linien durchgeführt. Insgesamt wurden 50 Promotorregionen von Genen identifiziert, welche als potentielle Zielgene von *AtRKD2* angesehen werden können (Abb. 3-37). Von in qRT-PCR-Analysen 32 getesteten Genen wiesen 8 Gene eine erhöhte Expression im proliferierenden *AtRKD2*-Gewebe auf. Die Tatsache, dass bislang nur 2 der 8 Gene funktionell charakterisiert sind (*At3g02260* und *At5g37020*), weist wieder darauf hin, wie wenig über mögliche regulatorisch gesteuerte Gene im weiblichen Gametophyten bekannt ist.

Interessanterweise sind die zwei funktionell charakterisierten Gene *ARF8* (*At5g37020*) und *BIG* (*At3g02260*) an der Auxin-induzierten Entwicklung floraler Organe beteiligt, was möglicherweise einen Zusammenhang zu Auxin-gekoppelten phänotypischen Veränderungen bei der Induktion der *AtRKD::GR*-Pflanzen (Kap. 4.3) herstellt.

Doppelmutanten der paralogen Gene *ARF6* und *ARF8* weisen nach der Blühinduktion eine Stagnation in der Entwicklung von reproduktiven Organen auf, was auf eine Funktion in der Reifung von Pistillen und Antheren schließen lässt (Nagpal et al., 2005). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ARF-Faktoren eine wichtige Funktion während der Entwicklung des weiblichen Gametophyten haben (Pagnussat et al., 2009). Die Verwendung einer künstlich hergestellten *microRNA*-Sequenz für *ARF1-8* und *ARF19* führte zu der Entwicklung defekter Embryosäcke. Allerdings muss betont werden, dass die Rolle von *ARF8* während der Embryosackentwicklung bislang nicht eindeutig geklärt ist. *ARF8* wird als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der sich möglicherweise autoregulatorisch aktiviert und dessen Transkriptlevel von *microRNA 167* reguliert wird (Goetz et al., 2006; Wu et al., 2006). Inwieweit *AtRKD2* tatsächlich in dem *ARF8*-Genpromotor binden und transkriptionell aktivierend wirken kann, muss in weiteren Analysen geklärt werden. Interessant ist auch, dass *ARF6* und *ARF8* parallel zu *AS1* und *AS2* die Aktivität der *Klasse 1 KNOX*-Gene in floralen Organen reprimieren (Tabata et al., 2010). Es wird spekuliert, dass *ARF6* und *ARF8* durch Kontrolle der Genexpression von *Klasse 1 KNOX*-Genen einen Einfluss auf die *PIN1*-Expression haben. Daraus könnte sich ein Zusammenhang zu dem Phänotyp der induzierten *AtRKD::GR*-Pflanzen ergeben, in denen eine Repression der lokalen Auxinmaxima beobachtet wurde.

Das vermutlich 566 kDa schwere *Arabidopsis*-Protein BIG weist Ähnlichkeiten zu dem Protein Calossin/ Pushover in *Drosophila melanogaster* auf (Xu et al., 1998). Mutationen im Locus *Pushover* verursachten unter anderem männliche Sterilität und eine mangelhafte achiasmatische Trennung der Chromosomen während der Oogenese (Sekelski et al., 1999). In *Arabidopsis thaliana* wurden in unabhängigen genetischen Analysen allelische Mutanten des *BIG*-Gens untersucht und gezeigt, dass BIG verschiedene Funktionen in Hormon- und Lichtsignal-Signalwegen hat (Li et al., 1994; Gil et al., 2001; Kanyuka et al., 2003). Beispielsweise wiesen die *BIG*-Mutanten *tir3-1*, *asal* und *umb1* Beeinträchtigungen in Gibberellin-, Cytokinin- und Ethylen-vermittelten Signalwegen auf. Zudem führten Mutationen in den *BIG*-Allelen *TIR3-1* und *DOC1* zur veränderten Expression von Licht-regulierten Genen. Auch wird vermutet, dass BIG an der Regulation des Auxintransports im sporophytischen Gewebe beteiligt ist, da es einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von PIN1-Proteinen hat (Gil et al., 2001; Yamaguchi et al., 2007). Aus der Tatsache, dass *BIG* als putatives Zielgen von AtRKD2 identifiziert wurde, ergibt sich wiederum ein möglicher Zusammenhang zwischen AtRKD2 und Auxin-vermittelten Signalwegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich unter den potentiellen Zielgenen von AtRKD2 zwei bereits charakterisierte Gene befinden, die nachweislich einen Einfluss auf die Auxin-induzierte Entwicklung von floralen Organen haben. Damit ist ein möglicher Zusammenhang zu der phänotypischen Entwicklung von *AtRKD2::GR*-induzierten Pflanzen gegeben, in denen allerdings keine lokalen Auxinakkumulationen zu beobachten waren.

Die asymmetrische Verteilung von Auxin bewirkt wiederum eine Spezifität der gametophytischen Zellen im sich entwickelnden Embryosack (Pagnussat et al., 2009). Der Aspekt, in wie weit die unterschiedlichen Auxinkonzentrationen Signalkaskaden in den gametophytischen Zellen bewirken, ist bislang nicht geklärt. In dieser Hinsicht könnte es möglich sein, dass der DNA-bindende Faktor AtRKD2, der vermutlich eine Rolle in der Eizelldifferenzierung spielt, als regulatorischer Faktor den Auxin-Signalweg im weiblichen Gametophyten beeinflusst. Es lässt sich auch spekulieren, dass AtRKD2 eine transkriptionelle Aktivierung von Genen bewirkt, die für Faktoren kodieren, welche in der frühen Embryogenese an Auxin-abhängigen Prozessen beteiligt sind.

4.5 Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen zu der molekularen Funktion von RKD in *Arabidopsis thaliana* unterstützen die Annahme, dass RKD-Proteine als regulatorische Faktoren aktiv sind. Auch wurden neue Erkenntnisse zur möglichen Beteiligung von AtRKD2 an Auxin-regulierten Prozessen gewonnen. Allerdings bleiben viele Fragen zu der Funktion von AtRKD-Faktoren bestehen, welche in weiteren Experimenten geklärt werden sollen.

Um die 19 bp *cis*-regulatorische AtRKD2-Region näher zu untersuchen, wurden weitere Mutationskonstrukte zur stabilen Transformation in *Arabidopsis thaliana* hergestellt. Ferner ist es geplant, mit Hefe-Ein-Hybrid-Analysen putative *trans*-Faktoren zu identifizieren.

Außerdem wird das pflanzliche Expressionssystem in *Nicotiana benthamiana* für die rekombinante Proteinexpression der *AtRKD*-Gene angewandt. Sollte die Aufreinigung nativer Proteine erfolgreich sein, könnten *Gel shift assays* für die Untersuchungen von Protein-DNA-Bindungen durchgeführt werden.

Für die Identifizierung von AtRKD-Zielgenen im GR-System sind Genom-weite Mikroarray-Analysen erforderlich. Zudem soll der Zusammenhang zwischen AtRKD und Auxin-vermittelten Signalwegen durch weitere Analysen wie beispielsweise Einkreuzungen von *YUCCA*- bzw. *PIN1*-Markerlinien in die *AtRKD::GR*-Linien geklärt werden.

Die identifizierten AtRKD2-Zielgene aus der ChIP-chip-Analyse sollen in unabhängigen Experimenten zur Aktivierung durch AtRKD2 und Expression im Embryosack untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der Lebenszyklus einer höheren Pflanze umfasst den abwechselnden Übergang zwischen der Gameten-produzierenden gametophytischen und der Sporen-produzierenden sporophytischen Generation. Die weibliche Gametophytenentwicklung beginnt mit der Keimung der meiotisch reduzierten funktionellen Megaspore und der reife Gametophyt der Angiospermen (Embryosack) besteht in der Regel aus Eizelle, zwei Synergiden, Zentralzelle und Antipoden. Nach der doppelten Befruchtung von Eizelle und Zentralzelle entwickeln sich daraus der Embryo sowie das triploide Endosperm des Samens, die sporophytische Generation.

Apomixis ist eine bei einigen Pflanzenarten auftretende asexuelle Alternative zur sexuellen Reproduktion. Apomiktische Pflanzen können sowohl Meiose als auch die Befruchtung umgehen; die nicht reduzierte Eizelle entwickelt sich parthenogenetisch. Diese „Klonierung durch Samen“ ermöglicht die Fixierung von Hybrideffekten, ein seit langem verfolgtes Ziel der Pflanzenzüchtung. Die molekularbiologischen Grundlagen der sexuellen bzw. parthenogenetischen Induktion der Eizelle und der Initiation der Embryogenese sind weitgehend unbekannt.

Durch experimentelle und virtuelle Subtraktionsverfahren war eine Familie von Transkriptionsfaktor-Genen identifiziert worden, deren Mitglieder bevorzugt in der Weizen-Eizelle exprimiert werden. Diese Transkriptionsfaktoren sind durch die hochkonservierte RWP-RK-Domäne charakterisiert. Aufgrund von Größe und Sequenz werden zwei Subfamilien, die NIN-like Proteine (NLP) und die RWP-RK DOMAIN-Proteine (RKD) unterschieden. Der RKD-ähnliche Faktor MINUS DOMINANCE (MID) der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist an der Kontrolle der Gametendifferenzierung beteiligt. Weiterführende Arbeiten an Weizen und *Arabidopsis* ließen vermuten, dass RKD-Faktoren auch bei der Gametenentwicklung höherer Pflanzen eine Rolle spielen, was für die phylogenetische Konserviertheit dieser Gene spricht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die weitere funktionelle Charakterisierung der RKD-Gene von *Arabidopsis thaliana*, insbesondere die Lokalisierung regulatorischer Promotorelemente, die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen sowie die Identifizierung putativer Zielgene.

AtRKD-Gene werden bevorzugt in der Eizelle exprimiert. Unter der Annahme, dass es sich dabei um eine transkriptionelle Regulation handelt, wurden Promotor-Reporter-Genkonstrukte in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht. Ein 522 bp langes *AtRKD2*-Promotorfragment beschränkt die Expression eines chimären Reportergens (β -Glucuronidase, GUS und *green fluorescent protein*, GFP) auf die Eizelle des reifen Embryosacks. Eine Deletionsanalyse zeigt, dass ein auf das ATG-Startkodon bezogen 250 bp langes Promotorfragment noch in der Eizelle aktiv wird. Weitere Mutationen grenzen regulatorisch essentielle *cis*-Elemente auf 19 bp ein. Die Genom-weite statistische Analyse der 19 bp langen *cis*-regulatorischen Region zeigt, dass Basenabfolgen statistisch signifikant in anderen Eizell-aktiven Genpromotoren angereichert sind.

Für DNA-Bindungsstudien sowie die Erzeugung spezifischer Antikörper wurde versucht, vollständige RKD-Proteine (*AtRKD1* 31 kDa, *AtRKD2* 33 kDa) als rekombinante Proteine in *E. coli* zu synthetisieren. Trotz umfangreicher Bemühungen ist es mit diesem Verfahren bisher nicht gelungen, native RKD-Proteine in ausreichender Menge zu isolieren. Die Schwierigkeiten bei der Aufreinigung nativer Proteine wird auf ihre komplexe Faltung zurückgeführt, die wahrscheinlich eine Bindung des His-tags an die Aufreinigungssäule verhindert. Mit der Etablierung eines pflanzlichen Expressionssystems in *Nicotiana benthamiana* wurde eine neue Option für die Aufreinigung nativer *AtRKD*-Proteinen gefunden.

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Dimeren bildenden bZIP-Transkriptionsfaktoren und den RKD-Faktoren führte zu der Suche nach möglichen RKD-Protein-Interaktionspartnern mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Technik. Dazu wurden zunächst eine Pistill-cDNA-Bank und anschließend eine Eizell-cDNA-Bank eingesetzt. Trotz umfangreicher Versuche wurden keine Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen. Auf der Basis dieser Versuche wird zunächst geschlossen, dass *AtRKD*-Faktoren keine Homo- bzw. Heterodimere bilden können. Für eine endgültige Abklärung sind weitere Versuche mit alternativen Techniken erforderlich.

Für die kontrollierte ektopische Expression wurden die Gene *AtRKD1* und *AtRKD2* mit der für einen Glucocorticoid-Rezeptor kodierenden Sequenz fusioniert und in *Arabidopsis thaliana* transferiert. Der Transport in den Kern und damit Aktivität der Fusionsproteine werden durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason kontrollierbar. Die regulierte

Aktivierung dieser Gene führte in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zu kallusartiger Proliferation und Wachstumsstörungen. Fehlende Blühinduktion, die verstärkte Entwicklung lateraler Meristeme und die asymmetrische Ausrichtung der Blätter werden als Störung des Auxintransports interpretiert.

Für die Identifizierung putativer Zielgene von AtRKD-Faktoren wurde die Chromatin-Immunoprecipitation in Verbindung mit einer *array*-Hybridisierung (*ChIP-on-chip*) angewandt. Durch quantitative RT-PCR konnten acht putative AtRKD2-Zielgene identifiziert werden. Für zwei der Kandidaten-Gene war eine Rolle beim Auxintransport beschrieben worden. Experimente zur Transaktivierung der Kandidaten-Gene durch AtRKD2 werden gegenwärtig noch durchgeführt.

Die beschriebenen Ergebnisse unterstützen die These, dass RKD-Faktoren als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression in der pflanzlichen Eizelle wirken, wobei wahrscheinlich Auxin-vermittelten Prozessen eine wichtige Rolle zukommt.

6 Summary

The life cycle of higher plants alternates between a haploid gamete-producing gametophytic and a spore-producing sporophytic generation. The female gametophyte development starts with the germination of the meiotically reduced functional megaspore. The mature gametophyte of angiosperms (embryo sac) usually consists of the egg cell, two synergids, the central cell and antipodes. Double fertilization, where egg and central cell fuse with one sperm each to form the homodiploid embryo and the triploid endosperm, respectively, initiates seed development- the new sporophytic generation.

Apomixis is an asexual alternative pathway of sexual reproduction. Apomictic plants can avoid meiosis and fertilization; then the non reduced egg cell develops parthenogenetically. This “cloning *via* seeds” allows the fixation of hybrid effects, a high priority aim of plant breeding. The molecular processes leading to egg cell differentiation as well as sexual or parthenogenetic induction of the egg cell and the initiation of embryogenesis are only poorly understood.

Using experimental and virtual subtraction approaches, a family of transcription factor genes had been identified in wheat. Member of this gene family are preferentially expressed in the egg cell. The transcription factors share the highly conserved RWP-RK domain. Based on size and sequence they are divided into two subfamilies, the NIN-like proteins (NLP) and the RWP-RK domain proteins (RKD). The factor MINUS DOMINANCE (MID) of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* is required for gamete differentiation and shares similarity to the RKD proteins. Further work on wheat and *Arabidopsis* suggested that RKD factors are involved in gamete differentiation of higher plants, indicating the phylogenetic conservation of the gene function.

Therefore, the current thesis aims to enhance the functional characterization of RKD genes in *Arabidopsis thaliana*, focusing on the analysis and localization of regulatory promoter elements, protein-protein interaction and the identification of putative target genes.

AtRKD genes are preferentially expressed in the egg cell. Assuming that this is based on transcriptional regulation, promoter-reporter gene constructs have been analyzed in transgenic

Arabidopsis plants. A 522 bp *AtRKD2* promoter fragment drives the expression of a chimeric reporter gene (β -glucuronidase, GUS and green fluorescent protein, GFP) in the egg cell of the mature embryo sac. A deletion series shows that a minimal 250 bp promoter fragment (relative to the start codon) is still active in the egg cell. Additional mutations further delimit the *cis*-regulatory elements to a 19 bp sequence region. A genome wide statistic analysis of this 19 bp *AtRKD2*-region revealed significant enrichments in *Arabidopsis* gene promoters which become active in egg cells.

For DNA binding studies and the generation of specific antibodies it was tried to synthesize full length AtRKD-proteins (AtRKD1 31 kD, AtRKD2 33 kD) as recombinant proteins in *E. coli*. Despite extensive efforts it was not possible to isolate sufficient amounts of native AtRKD-proteins. The difficulties encountered are most likely due to complex protein folding, possibly preventing the efficient interaction of the His-tag to the binding column. The establishment of an expression system in cells of *Nicotiana benthamiana* provides an applicable approach to synthesize and isolate native AtRKD proteins.

The structural similarity between protein dimer forming bZIP transcription factors and AtRKD-factors triggered a search for putative RKD interaction partners using the yeast two-hybrid technique. Both pistil cDNA library and subsequently egg cell-specific cDNA library have been applied. Despite extensive efforts no protein-protein interactions could be detected. Based on the current experiments it was suggest that *AtRKD*-factors do neither form homo- nor heterodimers. Additional experiments are required for further conclusions.

For the controlled ectopic expression of *AtRKD1* and *AtRKD2* genes the coding regions of these genes were fused to the coding region of the glucocorticoid receptor domain. After transformation of *Arabidopsis*, nuclear transport and subsequent activity of the fusion protein can be controlled by the synthetic glucocorticoid dexamethasone. The permanent DEX-induction led to callus-like proliferation and growth distortions of transgenic *Arabidopsis AtRKD::GR* plants. Lacking flower induction, the extensive development of lateral meristems and the asymmetric orientation of leaves are interpreted as a failure of auxin transport.

For the identification of putative target genes of AtRKD-factors chromatin immunoprecipitation combined with array hybridization (ChIP on chip) has been applied. Eight putative target genes could be identified using quantitative RT-PCR. For two of these

candidate genes a role in auxin transport had been described previously. Ongoing experiments aim to confirm the transactivation of these candidate genes by AtRKD2.

The results described support the thesis that RKD factors act as transcription factors regulating gene expression in the plant egg cell as well as the involvement of auxin-mediated processes.

7 Literaturverzeichnis

- Abe M., Katsumata H., Komeda Y. und Takahashi T. (2003).** Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* 130, 635-643.
- Acosta-Garcia G. und Vielle-Calzada J.P. (2004).** A classical ARABINOGALACTAN protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2614-2628.
- Albertini E., Marconi G., Barcaccia G., Raggi L. und Falcinelli M. (2004).** Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol.* 56, 879-894.
- Albertini E., Marconi G., Reale L., Barcaccia G., Porceddu A., Ferranti F. und Falcini M. (2005).** *SERK* and *APOSTART*: candidate genes for Apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Physiol.* 138; 2185-2199.
- Albertini E., Barcaccia G., Mazzucato A., Sharbel T.F. und Falcinelli M. (2010).** Apomixis in the era of biotechnology. In *Biotechnical perspectives: Volume 1*. Pua E.C., Davey M.R. (eds) *Plant Dev Biol.*, pp. 405-434.
- Bartel P.L., Chien C.T., Sternglanz R. und Fields S. (1993a):** Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*. (eds) Hartley D.A. Oxford University Press, Oxford, 153-179.
- Bartel P.L., Chien C.T., Sternglanz R. und Fields S. (1993b):** Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B. und Lepiniec L. (2004).** TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 39, 366-380.
- Bemer M., Wolters-Arts M., Grossniklaus U. und Angenent G. C. (2008).** The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *Plant Cell* 20, 2088-2101.
- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jürgens G. und Friml J. (2003):** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Bicknell R.A. und Koltunow A.M. (2004).** Understanding Apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell*, 16, S228-S245.
- Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M. und Speed T.P. (2003).** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19 (2), 185-193.

- Borisov A.Y., Madsen L.H., Tsyganov V.E., Umehara Y., Voroshilova V.A., Batagov A.O., Sandal N., Mortensen A., Schauser L., Ellis N., Tikhonovich I.A. und Stougaard J. (2003).** The Sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of Nin from *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131, 1009-1017.
- Bossi F., Cordoba E., Dupre P., Mendoza M.S., Roman C.S., Leon P. (2009).** The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *Plant J.* 59(3), 359-374.
- Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M. und Campagne M.M.L. (2002).** Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14, 1737–1749.
- Brand U., Fletcher J.C., Hobe M., Meyerowitz E.M. und Simon, R. (2000).** Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289, 617–619.
- Brand U., Grünewald M., Hobe M. und Simon R. (2002).** Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 565–575.
- Braybrook S.A., Stone S.L., Park S., Bui A.Q., Le B.H., Fischer R.L., Goldberg R.B. und Harada J.J. (2006).** Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103, 3468-3473.
- Byrne M.E., Barley R., Curtis M., Arroyo J.M., Dunham M., Hudson A. und Martienssen R.A. (2000).** Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408, 967–971.
- Callahan, M., Jerpseth, B., Mullinax, R. L. and Greener, A. (1995).** High-efficiency YRG-2 yeast competent cells ideal for screening two-hybrid libraries. *Strategies* 8 (2), 45–46.
- Capron A., Serralbo O., Fülöp K., Frugier F., Parmentier Y., Dong A., Lecureuil A., Guerche P., Kondorosi E., Scheres B. und Genschik P. (2003).** The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* 15, 2370-2382.
- Carman J.G. (1997).** Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* 61, 51–94.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. und Prasher D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chaudhury A.M., Craig S., Dennis E.S. und Peacock W.J. (1998).** Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 26–31.

- Chen L., Guan L., Seo M., Hoffmann F. und Adachi T. (2005).** Developmental expression of ASG-1 during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *J. Plant Physiol.* 162, 1141-1148.
- Choi Y., Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J.J., Goldberg R.B., Jacobsen S.E. und Fischer R.L. (2002).** DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110, 33–42.
- Christensen C.A., King E.J., Jordan J.R. und Drews G.N. (1997).** Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant. *Sex. Plant Reprod.* 10, 49–64.
- Christensen C.A., Gorsich S.W., Brown R.H., Jones L.G., Brown J., Shaw J.M. und Drews G.N. (2002).** Mitochondrial *GFA2* is required for synergic cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2215–2232.
- Chua Y.L., Channeliere S., Mott E. und Gray J.C. (2005).** The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in *Arabidopsis* by histone acetylation at ASYMMETRIC LEAVES1. *Genes Development* 19, 2245–2254.
- Clough S.J. and Bent, A.F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y. und Hsu L. (1972).** Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria – Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2110-&.
- Colombo M., Masiero S., Vanzulli S., Lardelli P., Kater M. M. und Colombo L. (2008).** AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 54, 1037-1048.
- Coury D. A., Zhang C., Ko A., Skaggs M. I., Christensen C. A., Drews G. N., Feldmann K. A. und Yadegari R. (2007).** Segregation distortion in *Arabidopsis* gametophytic factor1 (*gfa1*) mutants is caused by a deficiency of an essential splicing factor. *Sex. Plant Reprod.* 20, 87-97.
- Crane C.F. (2001).** Classification of apomictic mechanisms. In the flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 24–34.
- Cranz S., Berger C., Baici A., Jelesarov I., Bosshard H.R. (2004).** Monomeric and dimeric bZIP transcription factor GCN4 bind at the same rate to their target DNA site. *Biochemistry* 43, 718–727.
- Czechowski T., Bari R.P., Stitt M., Scheible W.R. und Udvardi M.K. (2004).** Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* 38, 366-379.

- Davuluri R.V., Sun H., Palaniswamy S.K., Matthews N., Molina C., Kurtz M. und Grotewold E. (2003).** AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of *Arabidopsis* cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics*, 4:25.
- Debeljak N., Feldman L., Davis K.L., Komel R. und Sytkowski A. J. (2006).** Variability in the immunodetection of HIS-tagged recombinant proteins. *Anal Biochem.* 359(2), 216-223.
- Deblaere R., Bytebier B., Degreve H., Deboeck F., Schell J., Vanmontagu M. und Leemans J. (1985).** Efficient Octopine Ti Plasmid-Derived Vectors for Agrobacterium-Mediated Gene-Transfer to Plants. *Nucleic Acids Research* 13, 4777-4788.
- Dohmann E.M.N., Levesque M.P., Isono E., Schmid M. und Schwechheimer C. (2008).** Auxin responses in mutants of the *Arabidopsis* CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 Signalosome. *Plant Physiol.* 147, 1369-1379.
- Dong C.J. und Liu J.Y. (2010).** The *Arabidopsis* EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC Plant Biology*, (10) 47.
- Drews G.N., Lee D. und Christensen G.A. (1998).** Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* 10, 5–17.
- Dunwell J.M., KHURI S. und Gane P.J. (2000).** Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1), 153–179.
- Durfee T., Becherer K., Chen P.L., Yeh S.H., Yang Y., Kilburn A.E., Lee W.H. und Elledge S.J. (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 1993 7, 555-569.
- Ebel C., Mariconti L. und Gruissem W. (2004).** Plant *RETINOBLASTOMA* homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 429, 776-780.
- Ehlert A., Weltmeier F., Wang X., Mayer C.S., Smeekens S., Vicente-Carbajosa J. und Dröge-Laser W. (2006).** Two-hybrid protein–protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.* 46, 890–900.
- Escobar-Restrepo J.M., Huck N., Kessler S., Gagliardini V., Gheyselinck V., Yang W.C. und Grossniklaus U. (2007).** The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* 317, 656–660.
- Evans M.M. (2007).** The *indeterminate gametophyte 1* gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. *Plant Cell* 19, 46-62.
- Faure J.E., Rotman N., Fortune P. und Dumas C. (2002).** Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *Plant J.* 30, 481–488.

- Fehlberg V., Vieweg M.F., Dohmann E.M., Hohnjec N., Puhler A., Perlick A.M. und Kuster H. (2005).** The promoter of the leghaemoglobin gene *VfLb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot.* 56, 799-806.
- Ferris P.J. und Goodenough U.W. (1997).** Mating type in *Chlamydomonas* is specified by mid, the *minus-dominance* gene. *Genetics* 146, 859-869.
- Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. und Goodman H.M. (1998).** The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10, 1043-1054.
- Fletcher J.C., Brand U., Running M.P., Simon R., Meyerowitz E.M. (1999).** Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.
- Garcia-Hernandez M., Berardini T., Chen G., Crist D., Doyle A., Huala E., Knee E., Lambrecht M., Miller N., Müller L.A., Mundodi S., Reiser L., Rhee S., Scholl R., Tacklind J., Weems D.C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J. und Zhang P. (2002).** TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct. Integrat. Genom.* (2) 6, 239-253.
- Gasser C.S., Broadhvest J. und Hauser B.A. (1998).** Genetic analysis of ovule development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 1–24.
- Gehring M., Huh J.H., Hsieh T.F., Penterman J., Choi Y., Harada J.J., Goldberg R.B. und Fischer, R.L. (2006).** DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124, 495–506.
- Gietz R.D. und R.A. Woods (2002).** Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol. Biol.* 185, 471-486.
- Gil P., Dewey E., Friml J., Zhao Y., Snowden K.C., Putterill J., Palme K., Estelle M. und Chory J. (2001).** BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15, 1985–1997.
- Goetz M., Vivian-Smith A., Johnson S.D. und Koltunow A.M. (2006).** AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1873–1886.
- Goodenough U., Lin H. und Lee J. H. (2007).** Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 350-362.
- Gowik U., Burscheidt J., Akyildiz M., Schlue U., Koczor M., Streubel M. und Westhoff P. (2004).** *Cis*-regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell* 16, 1077-1090.
- Grace M.L., Chandrasekharan M.B., Hall T.C. und Crowe A.J. (2004).** Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the beta-phaseolin promoter. *J. Biol. Chem.* 279, 8102-8110.

- Gross-Hardt R., Kägi C., Baumann N., Moore J. M., Baskar R., Gagliano W. B., Jürgens G. und Grossniklaus U. (2007).** LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5, 494-500.
- Grossniklaus U., Moore J.M., Brukhin V., Gheyselinck J., Baskar R., Vielle-Calzada J.P., Baroux C., Page D.R. und Spillane C. (2003).** Engineering of apomixis in crop plants: what can we learn from sexual model systems. In I Vasil, ed, *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 309–314.
- Grossniklaus U. and Schneitz K. (1998).** The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 227–238.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J.P., Hoepfner M.A. and Gagliano W.B. (1998).** Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280, 446-450
- Guo M., Thomas J., Collins G. und Timmermans M.C. (2008).** Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 48–58.
- Guittou A.E. und Berger F. (2005).** Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 15, 750-754.
- Gutierrez-Marcos J.F., Costa L.M. und Evans M.M.S. (2006).** Maternal gametophytic baseless1 is required for development of the central cell and early endosperm patterning in maize (*Zea mays*). *Genetics* 174, 317 - 329.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M. und Laux T. (2004).** Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 657-668.
- Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4), 557-580.
- Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J. (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4), 805-816.
- Hay A., Barkoulas M. und Tsiantis M. (2006).** ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development*, 133, 3955–3961.
- Hempel F.D. und Feldman L.J. (1994).** Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* 192, 276-286.
- Hennig L., Gruißem W., Grossniklaus U. und Köhler C. (2004).** Transcriptional Programs of Early Reproductive Stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 1765–1775.

- Higashiyama T., Kuroiwa H. und Kuroiwa T. (2003).** Pollen-tube guidance: Beacons from the female gametophyte. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 36-41.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. und Korenaga T. (1999).** Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nuc. Acids Res.* (27) 1, 297-300.
- Höfgen R. und Willmitzer L. (1988).** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* 16, 9877.
- Hofmeister W. (1851).** Vergleichende Untersuchungen der Keimung. Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen (Moose, Farn, Equisetaceen, Rhizocarpeen und Lycopodiaceen) und die Samenbildung der Coniferen. Leipzig, Deutschland.
- Huanca-Mamani W., Garcia-Aguilar M., Leon-Martinez G., Grossniklaus U. und Vielle-Calzada J.P. (2005).** CHR11, a chromatin-remodeling factor essential for nuclear proliferation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17231–17236.
- Huang B.-Q. und Russell S.D. (1992).** Female germ unit: Organization, isolation, and function. *Int. Rev. Cytol.* 140, 233–292.
- Huck N., Moore J.M., Federer M. und Grossniklaus U. (2003).** The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development* 130, 2149–2159.
- Ikeda M., Mitsuda N. und Ohme-Takagi M. (2009).** *Arabidopsis* WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. *Plant Cell* 21, 3409-3505.
- Ikezaki M., Kojima M., Sakakibara H., Kojima S., Ueno Y., Machida C. und Machida Y. (2010).** Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *Plant J.* 61, 70–82.
- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., Semiarti, E., Machida, Y. und Machida, C. (2007).** Expression of the ASYMMETRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J.* 51, 173–184.
- Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T. und Parcy F. (2002).** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7, 106–111.
- James P., Halladay J. und Craig E.A. (1996).** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-1436.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. und Bevan M.W. (1987).** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* (6) 13, 3901-3907.

- Jones-Rhoades M.W., Borevitz J.O. und Preuss D. (2007).** Genome-wide expression profiling of the *Arabidopsis* female gametophyte identifies families of small secreted proteins. *PLoS Genet.* 3, 1848-1861.
- Johnson M.A. und Preuss D. (2002).** Plotting a course: Multiple signals guide pollen tubes to their targets. *Dev. Cell* 2, 273-281.
- Johnston A.J., Meier P., Gheyselinck J., Wuest S.E., Federer M., Schlagenhauf E., Becker J.D. und Grossniklaus U. (2007).** Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte. *Genome Biol.* 8 (10), R204.
- Kanyuka K., Praekelt U., Franklin K.A., Billingham O.E., Hooley R., Whitelam G.C. und Halliday K.J. (2003).** Mutations in the huge *Arabidopsis* gene BIG affect a range of hormone and light responses. *Plant J.* 35, 57–70.
- Karimi M., Inze D. und Depicker A. (2002).** Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7 (5), 193-195.
- Kasahara R.D., Portereiko M.F., Sandaklie-Nikolova L., Rabiger D.S. und Drews G.N. (2005).** MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2981-2992.
- Kaufmann K., Muino J.M., Jauregui R., Airoidi C.A., Smaczniak C., Krajewski P. und Angenent G.C. (2009).** Target Genes of the MADS Transcription Factor SEPALLATA3: Integration of Developmental and Hormonal Pathways in the *Arabidopsis* Flower. *PLoS Biology* (7) 4.
- Keegan L., Gill G. and Ptashne. M. (1986).** Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-703.
- Kinoshita T., Miura A., Choi Y., Kinoshita Y., Cao X., Jacobsen S.E., Fischer R.L., und Kakutani T. (2004).** One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* 303, 521-523.
- Koltunow A.M. (1993).** Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5, 1425–1437.
- Koltunow A.M. und Grossniklaus U. (2003).** Apomixis: A developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 547–574.
- Koncz C. und Schell J. (1986).** The promoter of gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-96.
- Koszegi D. (2008).** RKD genes: a novel transcription factor family involved in the female gametophyte development of *Arabidopsis* and wheat. Dissertation, Universität Halle / Saale.

- Kumlehn J., Kirik V., Czihal A., Altschmied L., Matzk F., Lörz H. und Bäumlein H. (2001).** Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. *Sex. PlantReprod.* 14, 239–243.
- Kwee H.S. und Sundaresan V. (2003).** The *NOMEGA* gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in Arabidopsis. *Plant J.* 36, 853–866.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J. und Jürgens G. (1996).** The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* 122, 87–96.
- Le H.D. (2011).** Functional characterization of EFFECTOR OF TRANSCRIPTION (ET) in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Halle / Saale.
- Lescot M., Déhais P., Moreau Y., De Moor B., Rouzé P. und Rombauts S. (2002).** PlantCARE: a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30, 325–327.
- Li, H., Xu, L., Wang, H., Yuan, Z., Cao, X., Yang, Z., Zhang, D., Xu, Y. und Huang, H. (2005).** The putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165/166 in Arabidopsis leaf development. *Plant Cell*, 17, 2157–2171.
- Li H.M., Altschmied L. und Chory J. (1994).** *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes Dev.* 8, 339–349.
- Livak K.J. und Schmittgen T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V. und Davis, R.W. (1994).** Epidermal cell fate determination in Arabidopsis –Patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* 266, 436–439.
- Long J. und Barton M.K. (2000).** Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 218, 341–353.
- Long T.A., Tsukagoshi H., Busch W., Lahner B., Salt D.E. und Benfeya P.N. (2010).** The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell*, 22, 2219–2236.
- Lord E.M. und Russell S.D. (2002).** The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 81–105.
- Lotan T., Ohto M., Yee K.M., West M.A.L., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B. und 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. und O’Neil 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.

- Luo H., Song F., Goodman R.M. und Zheng Z. (2005).** Up-regulation of *OsBIHD1*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biol.* 7, 459-468.
- Luo M., Bilodeau P., Dennis E.S., Peacock W.J. und Chaudhury A. (2000).** Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA* and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10637–10642.
- Manzara T. und Gruissem W. (1988).** Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynth. Res.* 16, 117-139.
- Marsh J.F., Rakocevic A., Mitra R.M., Brocard L., Sun J., Eschstruth A., Long S.R., Schultze M., Ratet P. und Oldroyd G.E. (2007).** *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144, 324-335.
- Maruyama-Nakashita A., Nakamura Y., Watanabe-Takahashi A., Inoue E., Yamaya T. und Takahashi H. (2005).** Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulphur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 42, 305-314.
- Mathieu J., Yant L.Y., Mürdter F., Küttner F. und Schmid M. (2009).** Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. *PLoS Biology* (7) 7: e1000184.
- Matias-Hernandez L., Battaglia R., Galbiati F., Rubes M., Eichenberger C., Grossniklaus U., Kater M.M. und Colombo L. (2010).** VERDANDI is a Direct Target of the MADS Domain Ovule Identity Complex and Affects Embryo Sac Differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1702–1715.
- Mayer K.F.X., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jürgens G. und Laux T. (1998).** Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95, 805–815.
- Mercier R., Armstrong S.J., Horlow C., Jackson N.P., Makaroff C.A., Vezon D., Pelletier G., Jones G.H. und Franklin F.C. (2003).** The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 130, 3309-3318.
- Moll C., von Lyncker L., Zimmermann S., Kagi C., Baumann N., Twell D., Grossniklaus U. und Gross-Hardt R. (2008).** CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant J.* 56, 913-921.
- Moore J.M., Calzada J.P., Gagliano W. und Grossniklaus U. (1997).** Genetic characterization of hadad, a mutant disrupting female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 35-47.
- Murashige T. und Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta.* 15, 473-497.
- Ning J., Peng X.B., Qu L.H., Xin H.P., Yan T.T. und Sun M. (2006).** Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructured before the first zygotic division in tobacco. *FEBS Lett.* 580, 1747-1752.

- Nagpal P., Ellis C.M., Weber H., Ploense S.E., Barkawi L.S. und Guilfoyle T.J. (2005).** Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132, 4107–4118.
- Nagy J.I. und Maliga P. (1976).** Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 453–455.
- Nonomura K., Miyoshi K., Eiguchi M., Suzuki T. und Miyao A. (2003).** The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell* 15, 1728–39
- Nozaki H., Mori T., Misumi O., Matsunaga S. und Kuroiwa T. (2006).** Males evolved from the dominant isogametic mating type. *Curr. Biol.* 16, R1018-1020.
- Ohad N., Yadegari R., Margossian L., Hannon M., Michaeli D., Harada J.J., Goldberg R.B. und Fischer R.L. (1999).** Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell* 11, 407–415.
- Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J. und Shimura Y. (1991).** Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677–684.
- Pagnussat G.C., Alandete-Saez M., Bowman J.L. und Sundaresan V. (2009).** Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*. 324, 1684-1689.
- Pagnussat G.C., Yu H.J., Ngo Q.A., Rajani S., Mayalagu S., Johnson C.S., Capron A., Xie L.F., Ye D. und Sundaresan V. (2005).** Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132, 603-614.
- Pagnussat G.C., Yu H.J. und Sundaresan V. (2007).** Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis* eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-Like homeodomain gene BLH1. *Plant Cell* 19, 3578-3592.
- Pawlowska P.W., Wang C.J.R., Golubovskaya I.N., Szymaniaka J.M. und Shi L. (2009).** Maize AME10TIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3603–8.
- Paz-Ares J. und TR-Konsortium (2002).** REGIA, an EU project on functional genomics of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. *Comp. Funct. Genom* 3, 102–108.
- Pessino S.C., Espinoza F., Martinez E.J., Ortiz J.P.A., Valle E.M. und Quarin C.L. (2001).** Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134, 35–42.
- Petrasek J. und Friml J. (2009).** Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–2688.
- Ponting C.P., Ito T., Moscat J., Diaz-Meco M.T., Inagaki F. und Sumimoto H. (2002).** OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem. Sci.* 27:10.

- Portereiko M.F., Lloyd A., Steffen J.G., Punwani J.A., Otsuga D. und Drews G.N. (2006).** AGL80 is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1862–1872.
- Punwani J.A., Rabiger D.S. und Drews G.N. (2007).** MYB98 positively regulates a battery of synergid-expressed genes encoding filiform apparatus localized proteins. *Plant Cell* 19, 2557-2568.
- Punwani J. A., Rabiger D. S., Lloyd A. und Drews G. N. (2008).** The MYB98 subcircuit of the synergid gene regulatory network includes genes directly and indirectly regulated by MYB98. *Plant J.* 55, 406-414.
- Qi Y., Sun Y., Xu Y. und Huang H. (2004).** ERECTA is required for protection against heat-stress in the AS11 AS2 pathway to regulate adaxial-abaxial leaf polarity in *Arabidopsis*. *Planta* 219, 270–276.
- Reidt W., Wohlfarth T., Ellerström M., Czihal A., Tewes A., Ezcurra I., Rask L. und Bäumlein H. (2000).** Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *Plant J.* 21, 401–408.
- Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J. und Kuhlemeier C. (2003).** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426, 255–260.
- Riechmann J.L. (2002).** Transcriptional regulation: A genomic overview. *The Arabidopsis book*. Somerville C.R. and Meyerowitz E.M. (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 1-46.
- Rodrigues J.C.M., Cabral G.B., Dusi D.M.A., de Mello L.V., Rigden D.J. und Carneiro V.T.C. (2003).** Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol. Biol.* 53, 745-757.
- Rotman N., Rozier F., Boavida L., Dumas C., Berger F. und Faure J.E. (2003).** Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 13, 432–436.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N. und Weisbeek P. (1999).** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463–472.
- Sachdev D. und Chirgwin J.M. (1998).** Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 244, 933-937.
- Sakai H., Aoyama T. und Oka A. (2000).** *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* 24, 703-711.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (2001).** Molecular Cloning: A laboratory manual. 2 edn. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

- Scanlon M.J., Henderson D.C. und Bernstein B. (2002).** SEMAPHORE1 functions during the regulation of ancestrally duplicated knox genes and polar auxin transport in maize. *Development* 129, 2663-2673.
- Schaller A. (2004).** A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183–197.
- Schauser L., Roussis A., Stiller J. und Stougaard J. (1999).** A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191-195.
- Schauser L., Wieloch W. und Stougaard J. (2005).** Evolution of NIN-like proteins in *Arabidopsis*, rice, and *Lotus japonicus*. *J. Mol. Evol.* 60, 229-237.
- Schein C.H. (1989).** Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTechnology*, 7, 1141-1148.
- Schiefthaler U., Balasubramanian S., Sieber P., Chevalier D., Wisman E. und Schneitz K. (1999).** Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11664–11669.
- Schmidt M. und Hoffman D.R. (2002).** Expression systems for production of recombinant allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 264-270.
- Schneitz K. (1999).** The molecular and genetic control of ovule development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 13–17.
- Schneitz K., Balasubramanian S. und Schiefthaler U. (1998).** Organogenesis in plants: The molecular and genetic control of ovule development. *Trends Plant Sci.* 3, 468–472.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F., Jürgens G. und Laux T. (2000).** The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100, 635–644.
- Schroeter E.H., Kisslinger J.A. und Kopan R. (1998).** Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schütze K., Harter K. und Chaban C. (2009).** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to study protein-protein interactions in living plant cells. *Methods Mol. Biol.* 479, chapter 12.
- Seifert M., Keilwagen J., Strickert M. und Grosse I. (2009).** Utilizing gene pair orientations for HMM-based analysis of promoter array CHIP-chip data. *Bioinformatics* (25) 16, 2118–2125.
- Sekelsky J.J., McKim K.S., Messina L., French R.L., Hurley W.D., Arbel T., Chin G.M., Deneen B., Force S.J. und Hari K.L. (1999).** Identification of novel *Drosophila* meiotic genes recovered in a P- element screen. *Genetics* 152, 529–542.

- Shani E., Yanai O. und Ori N. (2006).** The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 484–489.
- Sharbel T.F., Voigt M.-L., Corral J.A., Thiel T., Varshney A., Kumlehn J., Vogel H. and Rotter B. (2009).** Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J.* 58, 870-882.
- Shirsat A., Wilford N., Croy R. und Boulter D. (1989).** Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 215, 326-331.
- Siddiqi I., Ganesh G., Grossniklaus U. und Subbiah V. (2000).** The *DYAD* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 127,197-207.
- Sheridan W.F., Avalkina N.A., Shamrov I.I., Batygina T.B. und Golubovskaya I.N. (1996).** The *mac1* gene: controlling the commitment to the meiotic pathway in maize. *Genetics* 142, 1009–20.
- Shi D.Q., Liu J., Xiang Y.H., Ye D., Sundaesan V. und Yang W.C. (2005).** *SLOW WALKER 1*, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. *Plant Cell* 17, 2340-2354.
- Smale S.T. (2001).** Core promoters: active contributors to combinatorial generegulation. *Genes Dev.* 15, 2503–2508.
- Smyth D.R., Bowman J.L. und Meyerowitz E.M. (1990).** Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767
- Springer P.S., McCombie W.R., Sundaesan V. und Martiensson R.A. (1995).** Gene trap tagging of *PROLIFERA*, an essential MCM2-3-5 like gene in *Arabidopsis*. *Science* 268, 877-880.
- Sprunck S., Baumann U., Edwards K., Langridge P. und Dresselhaus T. (2005).** The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J.* 41, 660-672.
- Srilunchang K.O., Krohn N.G. und Dresselhaus T. (2010).** DiSUMO-like DSUL is required for nuclei positioning, cell specification and viability during female gametophyte maturation in maize. *Development* 137, 333-345.
- Steffen J.G., Kang I.H., Macfarlane J. und Drews G.N. (2007).** Identification of genes expressed in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Plant J.* 51, 281-292.
- Steffen J.G., Kang I.H., Portereiko M.F., Lloyd A., Drews G.N. (2008).** AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148:259–68.
- Tabata R., Ikezaki M., Fujibe T., Aida M., Tian C., Ueno Y., Yamamoto K.T., Machida Y., Nakamura K. und Ishiguro S. (2010).** *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR 6 and 8 Regulate Jasmonic Acid Biosynthesis and Floral Organ Development via Repression of Class 1 *KNOX* Genes. *Plant Cell Physiol.* 51, 164–175.

- Thomas J.G. und Baneyx F. (1996).** Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 11141–11147.
- Tucker M.R., Araujo A.-C.G., Paech N.A., Hecht V., Schmidt E.D.L., Rossell J.-B., de Vries S.C., und Koltunow A.M.G. (2003).** Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *Plant Cell* 15, 1524–1537.
- Ueno Y., Ishikawa T., Watanabe K., Terakura S., Iwakawa H., Okada K., Machida C. und Machida Y. (2007).** Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 445–457.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. und Guilfoyle T.J. (1997).** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic Auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971.
- Van Criekinge W. und Beyaert. R. (1999).** Yeast two-hybrid: state of the art. *Biol. Proced. Online* 2, 1–38.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. und Baulcombe D. (2003).** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–956.
- Vrinten P.L., Nakamura T. und Kasha K.J. (1999).** Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. *Plant Molecular Biol.* 41, 455–463.
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., Näke C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K. und Kudla J. (2004).** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40, 428–438.
- Wang D., Zhang C., Hearn D.J., Kang I.H., Punwani J.A., Skaggs M.I., Drews G.N., Schumaker K.S. und Yadegari K. (2010).** Identification of transcription-factor genes expressed in the *Arabidopsis* female gametophyte. *BMC Plant Biol.* 10.
- Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., Dietrich K., Wang X., Schütze K., Alonso R., Harter K., Vicente-Carbajosa J. und Dröge-Laser W. (2006).** Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO Journal* (25) 13, 3133–3143.
- Wu M.F., Tian Q. und Reed J.W. (2006).** *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 139, 4211–4218.
- Wu X., Chory J. und Weigel D. (2007).** Combinations of WOX activities regulate tissue proliferation during *Arabidopsis* embryonic development. *Dev. Biol.* 309 (2), 306–316.

- Wuest S.E., Vijverberg K., Schmidt A., Weiss M., Gheyselinck J., Lohr M., Wellmer F., Rahnenführer J., van Mehring C. und Grossniklaus U. (2010).** Arabidopsis female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes. *Curr. Biol.* 20, 1-7.
- Xu X.Z., Wes P.D., Chen H., Li H.S., Yu M., Morgan S., Liu Y. und Montell C. (1998).** Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J. Biol. Chem.* 273, 31297–31307.
- Yadegari R. und Drews G.N. (2004).** Functional analysis of the female gametophyte. *Plant Cell* 16 Suppl, 133-141.
- Yamaguchi N., Suzuki M., Fukaki H., Morita-Terao M., Tasaka M. und Komeda Y. (2007).** CRM1/BIG-mediated Auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiol.* 48 (9), 1275–1290.
- Yamamoto Y.Y., Yoshitsugu T., Sakurai T., Seki M., Shinozaki K. und Obokata J. (2009).** Heterogeneity of *Arabidopsis* core promoters revealed by high-density TSS analysis. *Plant J.* 60, 350-362.
- Yanagisawa S. (2004).** Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 386-391
- Yang H., Kaur N., Kiriakopolos S. und McCormick S. (2006).** EST generation and analyses towards identifying female gametophyte-specific genes in *Zea mays* L. *Planta* 224, 1004-1014.
- Yang W., Jefferson R.A, Huttner E., Moore J.M., Gagliano W.B. und Grossniklaus U. (2005).** An egg apparatus-specific enhancer of *Arabidopsis*, identified by enhancer detection. *Plant Physiol.* 139, 1421–1432.
- Yang, W.C. und Sundaresan, V. (2000).** Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 53-57.
- Yang W.C., Ye D., Xu J. und Sundaresan V. (1999).** The *SPOROCTELESS* gene from *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev.* 13, 2108–2117.
- Yu H.J., Hogan P. und Sundaresan V. (2005).** Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression profiling. *Plant Phys.* 139, 1853-1869.
- Zgurski J. M., Sharma R., Bolokoski D. A. und Schultz E. A. (2005).** Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 17, 77-91.
- Zheng Y., Ren N., Wang H., Stromberg A.J. und Perry S.E. (2009).** Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-like 15. *Plant Cell* 21, 2563-2577.

Zimmermann J., Saalbach I., Jahn D., Giersberg M., Hähnel S., Wedel J., Macek J., Zoufal K., Glünder G., Falkenburg D. und Kipriyanov S.M. (2009). Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. *BMC Biotechnology* (9) 79.

Zhou D.X. (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci.* 4, 210-214.

Zuo J.R. und Chua N.H. (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr. Opin. Biotech.* 11, 146-151.

Zuo J., Niu Q.W., Frugis G. und Chau N.H. (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30, 349–359.

AtRKD1FEcoRI	GGAATTCATGAAATCGTTTTGCAAGTTGGAGTA
AtRKD1RSalI	ACGCGTCGACTTATCTCTCAAACCCGAAACAG
AtRKD2FEcoRI	GGAATTCCATGGCTGATCACACAACCAAAGAACA
AtRKD2RSalI	ACGCGTCGACTCACAAACCACTAGTAAATTCAC
pGADT7for	CTATTTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACCC
pGADT7rev	AGATGGTGCACGATGCACAG
pGBKT7rev	TTTTCGTTTTTAAACCTAAGAGTC
GAD-F	CGTATAACGCGTTTTGGAATCACTAC
GAD-R	AACAGAAATTATATGATAATCATCG
GBD-F	TGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCC
GBD-R	ATGATAATCATCGCAAGACCCGGCAA
At1g07750cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGAGTTGGATCTTACACCT
At1g07750cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtGTTGGAAGGAGGGAAGAAAAAT
At1g31450cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGCAACCAAAACTTTTTCTC
At1g31450cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtTAAGTCCCGGAGCAATCCAT
At1g76750cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGCTTCAAATCTAGTTTC
At1g76750cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtAGGGTTAGAAGGAGAAGCAGA
At2g02090cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGAAACCGGATTTTCGACGAA
At2g02090cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtTCCCATGAGAAGAGAAGCAAG
At2g21740cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGCTTCTAACACAAGTTTC
At2g21740cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtAAGTTTCACAGAGGAAGCGC
At2g28680cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGAATTGGATCTATCACCA
At2g28680cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtGTTGGAAGGAGAGAAGAAAAAT
At5g42080cdsF	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATGGAAAATCTGATCTCTCTG
At5g42080cdsR	ggggaccacttttgtacaagaaagctgggtCTTGACCAAGCAACAGCATC

3.4 Regulierte Proteinexpression

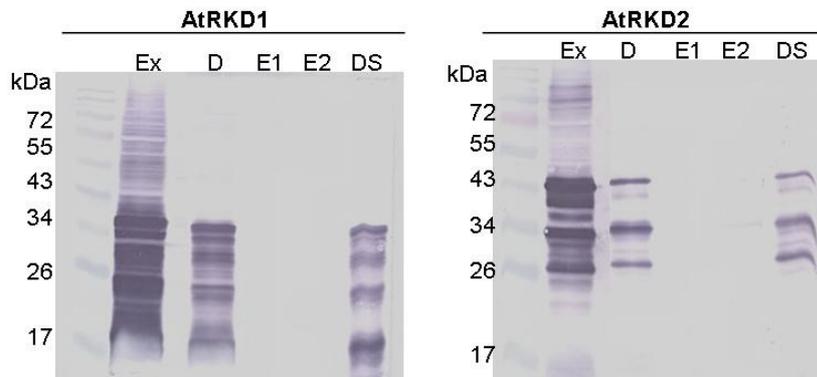
AtRKD1Sonde_100bpF	GAGTTAGCAAATCCTTTCTT
AtRKD2Sonde_120bpF	CAAGAAAACCTCTGGCTCTCA
GRSonde_120bpR	AGCAGTGACACCAAGGTAGG
qUB10F	CACACTCCACTTGGTCTTGCG
qUB10R	TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA
qRKD1F	GCCTACAAAACCTCATCAGCAA
qRKD1R	TCCTTCTCGAGCTTTTCAA
qRKD2F	TCCATCCTTTGATCACAGCTC
qRKD2R	TTCAGACAAGGGTTCAAGATCA

3.5 ChIP-on-chip (qRT-Primer)

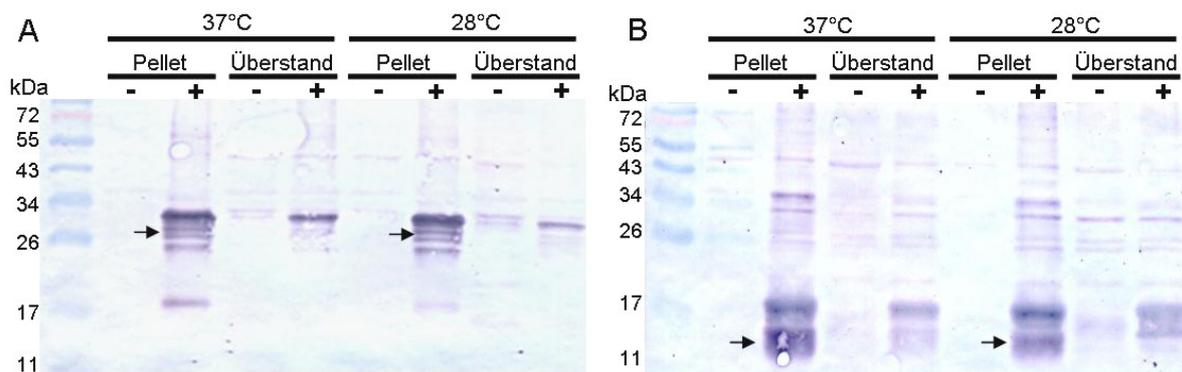
oJW102	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATT
oJW103	GAATTCAGATC
EF1afor	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
EF1arev	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
At1g21230for	GCTCGACTTGGAGACCGTAG
At1g21230rev	CCCAAGAGTTTGACCACGTT
At1g28010for	TTCTCGCGTTTCACAGAATG
At1g28010rev	TTTGTCTTTCCCTGTTTGC
At1g35860for	TCGAGCTAAAGGTTGGTGCT
At1g35860rev	TGAGCTTCCCAAATCGTTTC
At1g37113for	TCCAGAGTCATGGGTGACAA
At1g37113rev	CAATTTCCATCGCTCCATCT
At2g06562for	GCCATTACGGTTTTCTTTGC
At2g06562rev	AAGGAGATTTCGCCATCATCA
At2g07213for	CCATATTTTGCACCCAAGT

At2g07213rev	ACGCCTACATTGGGACAGAC
At2g07215for	AGAAACGACGCCTACATTGG
At2g07215rev	TTGCGACCCAAGTCCTTTAC
At2g07240for	CTTCCATCTTTCCAGGGTGA
At2g07240rev	GACGGATCAGTCGGAACATT
At2g07280for	GTTCCGCTTCAAGAAACTCG
At2g07280rev	TCGAAGAAAGGTGGGTTTTG
At2g07760for	GCCGCAGTTGATAAGAAAGG
At2g07760rev	ACTGCCACATTTTCCACAT
At2g10550for	GGCGAGTTTGCTACAGAACC
At2g10550rev	CCAAACGTCTCAAAGCTTCC
At2g10965for	CAAAAGAACGTCCGAGAAGC
At2g10965rev	TCATAGGCGACCAATCCTTC
At2g11010for	CGAGTGGAGAGGAAGGTGAG
At2g11010rev	CGGAGGTACATCCAAAGCAT
At2g13350for	GTGACACAATCCCGTGTGAG
At2g13350rev	CCTCATTGTATTCCGGCTTT
At2g13260for	TGAGTGTCTTGAGCTTGGTG
At2g13260rev	ATCTTCTTGTGCCCATGACC
At2g13680for	TTGTGGTGAAGCACGAGAAG
At2g13680rev	TGCTGCTTTCCATAAAATCC
At2g20960for	GCAAGCACAGACGACGATAA
At2g20960rev	GTTTCGCTGCTTCCAGATTTC
At3g02260for	CAGCGATGGAAGCACTCATA
At3g02260rev	TCCTCATGACGTTGCTGAAG
At4g00060for	TAAAAGCCCAAACGTTCCAC
At4g00060rev	TGCTCACAGGAGAAGGAGGT
At4g03830for	CTCGAAGCGATATGGGGATA
At4g03830rev	GGCTAGCATCCCTCTCTCT
At4g04450for	GCACCATTCCCAACCATTAC
At4g04450rev	GAATTGCATCAGCGGGTTAT
At4g06526for	GCGGAAGAAAACGAGAGATG
At4g06526rev	CCCATATCCATCCCAAGTG
At4g07932for	GTCGAGGAGGTCTGTCTGA
At4g07932rev	TTTCTTCGGGCTCATTCTTG
At4g39110for	CTCATTGGCTGGAACGATT
At4g39110rev	TCTCCATTGTTGGCCTATC
At5g05680for	GAAGCTCTCAAACGCCATC
At5g05680rev	AGGCACAAAACCCAACAAG
At5g23110for	TTTTGCCATTGCAGAGTCAC
At5g23110rev	TGCCAGGAAATCTTGCTTCT
At5g28550for	AATTGGCCTGAAGCTGAAGA
At5g28550rev	TTGTGCACATCCCAAGAAAA
At5g29050for	GGATTGGATCGAACTTGGAA
At5g29050rev	CTCCTTGGCCAGCAAGATAG
At5g29070for	CACGGGCAAAGTCATACTCA
At5g29070rev	TCACTCGGTTTCATTCCCTTT
At5g33340for	ATCAACTCGGAACCAATGC
At5g33340rev	GGTCTCTTGAGACGCCTTGT
At5g37020for	ATCTCCCGATTGAGCAGCTA
At5g37020rev	AAGCTGCCAGCCTGATCTAA
At5g39770for	ACAAACGGACTGGGTGAGAC
At5g39770rev	GAGTCCGCAACTTTCCTCTG

Anhang B

**Abb. B-1: Aufreinigung der rekombinanten Proteine unter Hybrid-Bedingungen**

Zelllyse und Bindung an die Ni-NTA-Säule mit 6 M GuHCl. Waschschritte (20 mM, 40 mM Imidazol) und Elution (250 mM Imidazol) erfolgten unter nativen Bedingungen. Nach der Elution wurde die Säule mit denaturierenden Puffer durchgespült. Ex = Proteinextrakt, D = Durchfluss, E1, E2 = Elution, DS = Durchfluss Säule.

**Abb. B-2: Western-Blot-Analyse der rekombinanten Proteinexpression von AtRKD1_600 und AtRKD2_300**

Von den induzierten (Zugabe von IPTG) und nicht-induzierten Bakterienkulturen wurden Fraktionen des löslichen Überstands und Fraktionen des unlöslichen Pellets für die Western-Blot-Analyse verwendet. Die rekombinanten Proteine (A) AtRKD2_600 und (B) AtRKD2_300 wurden bei 37°C und 28°C im *E. coli* Stamm M15 synthetisiert. – nicht induziert, + induziert

Anhang C

Tab. C-1: Identifizierte AtRKD1-Kandidaten aus dem *Screen* der Pistill-cDNA-Bank

Anzahl Klone	Gennummer	Name und Funktion	Lokalisierung
1	AT1G16520	unbekannt, Transkriptionsfaktor BTF3b-ähnlicher Transkriptionsfaktor (enthält NAC-Domäne)	Zellkern
1	AT1G17880	transkriptionelles Regulatorprotein	unbekannt
1	AT1G29220	ANAC013, Transkriptionsfaktor	unbekannt
1	AT1G63650	EGL3, Transkriptionsfaktor	Zellkern
4	AT1G72260	Thionin 2.1, Toxinrezeptor	Endomembran
1	AT2G21655	DD12, enthält DUF784	unbekannt
1	AT2G22670	IAA8, Transkriptionsfaktor	Zellkern
1	AT2G36320	Zinkfingerprotein	unbekannt
1	AT2G36740	unbekannt, DNA-Bindung	Zellkern
1	AT3G03340	UNE6 (unfertilized embryo sac 6)	unbekannt
1	AT3G57920	Squamosa-Promotor bindendes Protein	Zellkern
1	AT4G31550	AtWRKY11, Transkriptionsfaktor	Zellkern

Tab. C-2: Identifizierte Klone aus dem *Screen* der Eizell-cDNA-Bank mit AtRKD1

Anzahl Klone	ATG-Nummer	Genbeschreibung
transkriptionelle Regulation		
1	AT2G02090	CHR19 (chromatin remodeling 19)
1	AT3G24340	chromatin remodeling 40
1	AT4G24130	unknown
RNA-Synthese und Modifikationen		
2	AT3G47370	40S ribosomal protein S20-1
1	AT5G14050	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog
1	AT5G55740	chloro respiratory reduction 21
2	AT5G65260	PABP family (polyadenylate-binding protein)
Proteinsynthese und Modifikationen		
1	AT5G13150	Proteinbindung
Enzyme und Metabolismus		
1	AT1G07750	cupin family
1	AT1G11680	oxygen binding
2	AT1G31450	aspartyl protease
3	AT1G71810	ABC1 family
3	AT3G02360	6-phosphogluconate dehydrogenase-like
1	AT4G03200	unknown
1	AT5G11110	AtSPS2F (sucrosephosphate synthase)
1	AT5G42080	ADL1 (Arabidopsis dynamin-like protein)
nicht kategorisiert		
1	AT1G76750	ECA1-like protein

Tab. C-3: Identifizierte Klone aus dem Screen der Eizell-cDNA-Bank mit AtRKD2

Klone	ATG- Nummer	Genbeschreibung
transkriptionelle Regulation		
1	AT1G11510	DNA-binding storekeeper protein-related
1	AT4G24570	DIC2 (mitochondrial substrate carrier family protein)
1	AT4G28450	nucleotide binding / protein binding
1	AT5G03740	HD2C (histone deacetylase 2C)
1	AT5G21150	PAZ domain-containing protein
RNA-Synthese und Modifikationen		
3	AT2G07675	ribosomal protein S12
1	AT2G27710	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)
1	AT2G40360	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
1	AT3G25520	ATL5, 5S rRNA binding / structural constituent of ribosome
1	AT3G53870	40S ribosomal protein S3 (RPS3B)
1	AT4G27090	60S ribosomal protein L14 (RPL14B)
1	AT5G02960	40S ribosomal protein S23 (RPS23B)
1	AT2G27710	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)
Proteinsynthese und Modifikationen		
1	AT1G24510	T-complex protein 1 epsilon subunit, putative
1	AT1G76140	serine-type endopeptidase
1	AT2G28000	CPN60A, (CHAPERONIN-60ALPHA)
1	AT2G30910	ARPC1A (ACTIN-RELATED PROTEIN C1A)
1	AT4G26840	SUM1, (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER 1)
1	AT4G27960	UBC9 (Ubiquitin conjugating protein 9); ubiquitin-protein ligase
1	AT5G40260	nodulin MtN3 family protein
1	AT5G57870	eukaryotic translation initiation factor 4F
Enzyme und Metabolismus		
1	AT1G04010	phosphatidate-sterol O-acyltransferase
1	AT1G07670	ATECA4 (calcium-transporting ATPase)
17	AT1G31450	aspartyl protease
1	AT1G28320	DEG15 endopeptidase
1	AT2G24200	cytosol aminopeptidase
10	AT2G35615	aspartyl protease family
1	AT3G46340	leucine-rich repeat protein kinase, putative
1	AT3G58100	PDCB5 (Plasmodesmata callose-binding protein 5)
1	AT3G59480	pfkB-type carbohydrate kinase family protein
1	AT4G16155	dihydrolipoyl dehydrogenase
1	AT4G22720	glycoprotease M22 family protein
1	AT4G36360	BGAL3 (beta-galactosidase 3)
1	AT5G06460	ATUBA2; ubiquitin activating enzyme
1	AT5G12860	DiT1 (dicarboxylate transporter 1)
1	AT5G21326	protein kinase family protein / NAF domain-containing protein
1	AT5G43940	HOT5 (S-nitrosoglutathione reductase)
1	AT5G59120	ATSBT4.13 (<i>Arabidopsis thaliana</i> Subtilase)
1	AT5G60640	ATPDIL1-4 (rotein disulfide isomerise)
1	AT5G65620	peptidase M3 family protein
1	AT5G66530	aldose 1-epimerase family protein
1	AT5G67220	nitrogen regulation family protein

Zellstruktur und Transport

2	AT1G50400	porin family
6	AT2G02770	COP1-interacting protein-related nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein
1	AT3G07250	motif (RRM)-containing protein
1	AT5G48650	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein

Stress

1	AT1G60490	ATVPS34; 1-phosphatidylinositol-3-kinase
1	AT1G75040	PR5 (pathogenesis-related gene 5)
1	AT2G03800	GEK1 (D-aminoacyl-tRNA deacylase)
1	AT2G47730	ATGSTF8 (Glutathione transferase PHI 8)
1	AT5G09590	MTHSC70-2 (mitochondrial hsp)

nicht kategorisiert

7	AT1G07750	cupin family
12	AT1G76750	ECA1-like protein
1	AT1G80890	unknown protein
1	AT2G03350	unknown protein
3	AT2G21740	unknown protein
9	At2g28680	cupin family
1	AT2G36695	unknown protein
1	AT3G19080	SWIB complex BAF60b domain-containing protein
1	AT3G48860	unknown protein I
1	AT3G59630	diphthamide synthesis DPH2 family protein
2	AT4G31980	unknown protein
1	AT5G23040	CDF1 (cell growth defect factor)
2	AT5G40660	unknown protein
1	AT5G63350	unknown protein
1	AT5G64720	unknown protein
1	AT5G66290	unknown protein

Anhang D

Tab. D-1: Ergebnisse der 3 Makroarray-Experimente

24 Stunden DEX-Induktion mit 14 Tage alten AtRKD::GR-Pflanzen, die Kontrollpflanzen wurden mit Ethanol (EtOH) behandelt. Die Hybridisierung erfolgte mit REGIA-Filtern.

Experiment 1					
Nummer	Gennummer	RKD1-Signal EtOH	RKD1-Signal DEX	n-fache Anreicherung	Regulation
F - 04 : 08 (a)	At1g18330	0,72	2,22	3,09	hochreguliert
A - 01 : 06 (a)	At4g37260	50,38	157,30	3,12	hochreguliert
D - 03 : 03 (a)	At3g54220	1,01	3,24	3,21	hochreguliert
C - 12 : 02 (a)	At1g56650	0,47	1,54	3,30	hochreguliert
C - 02 : 13 (a)	At5g01380	1,31	4,90	3,73	hochreguliert
F - 06 : 06 (a)	At1g19850	0,22	1,02	4,72	hochreguliert
E - 01 : 16 (a)	At4g00050	0,12	0,75	6,29	hochreguliert
C - 08 : 15 (a)	At2g18120	0,12	0,77	6,60	hochreguliert
E - 06 : 10 (a)	At4g36870	0,17	1,16	6,78	hochreguliert
E - 10 : 16 (a)	At4g35280	0,35	2,44	7,05	hochreguliert
C - 08 : 02 (a)	At4g38140	0,12	0,87	7,42	hochreguliert
E - 01 : 01 (a)	At2g37590	0,12	1,05	8,88	hochreguliert
D - 09 : 15 (a)	At3g60080	1,65	0,51	3,22	runterreguliert
D - 02 : 14 (a)	At1g79880	1,08	0,33	3,27	runterreguliert
B - 10 : 16 (a)	At3g47600	1,27	0,37	3,46	runterreguliert
F - 12 : 13 (a)	At4g09460	6,19	1,64	3,79	runterreguliert
E - 09 : 12 (a)	At2g14210	0,76	0,20	3,86	runterreguliert
F - 04 : 11 (a)	At1g59810	0,79	0,18	4,42	runterreguliert
A - 07 : 11 (a)	At3g04070	3,61	0,74	4,85	runterreguliert
F - 09 : 04 (a)	At4g35900	0,61	0,12	5,27	runterreguliert
A - 11 : 17 (a)	RD17	1,40	0,23	6,12	runterreguliert
B - 07 : 10 (a)	At4g18460	1,84	0,29	6,40	runterreguliert
A - 08 : 01 (a)	At1g54140	1,34	0,21	6,43	runterreguliert
E - 02 : 15 (a)	At3g56980	0,76	0,10	7,81	runterreguliert
F - 01 : 11 (a)	At1g74650	1,38	0,18	7,89	runterreguliert
B - 11 : 01 (a)	At3g24800	1,55	0,14	11,21	runterreguliert
E - 02 : 08 (a)	At3g02380	1,89	0,11	17,04	runterreguliert
Nummer	Gennummer	RKD2-Signal EtOH	RKD2-Signal DEX	n-fache Anreicherung	Regulation
D - 08 : 09 (a)	At4g04890	0,19	2,61	13,85	hochreguliert
F - 11 : 01 (a)	At2g37740	0,23	1,52	6,56	hochreguliert
F - 11 : 09 (a)	At4g17880	0,23	1,07	4,63	hochreguliert
C - 01 : 11 (a)	At5g45050	0,20	0,92	4,54	hochreguliert
C - 08 : 15 (a)	At2g18120	0,23	1,01	4,42	hochreguliert
F - 05 : 16 (a)	At4g01540	1,01	3,25	3,21	hochreguliert
C - 10 : 09 (a)	At4g03090	1,52	0,50	3,06	runterreguliert
A - 03 : 14 (a)	At1g21960	0,84	0,22	3,76	runterreguliert
B - 12 : 10 (a)	At3g16280	1,24	0,28	4,42	runterreguliert
F - 08 : 03 (a)	At5g07690	2,36	0,34	6,94	runterreguliert

D - 04 : 03 (a)	At1g29160	0,84	0,12	7,03	runterreguliert
F - 09 : 12 (a)	At3g54340	1,06	0,14	7,71	runterreguliert
E - 06 : 04 (a)	At2g46990	0,79	0,10	7,90	runterreguliert
D - 05 : 16 (a)	At1g32510	0,95	0,11	8,99	runterreguliert
B - 05 : 16 (a)	At4g01550	1,35	0,15	9,25	runterreguliert
D - 02 : 15 (a)	At3g50410	1,97	0,09	22,78	runterreguliert

Experiment 2

Nummer	Gennummer	RKD1-Signal EtOH	RKD1-Signal DEX	n-fache Anreicherung	Regulation
E - 01 : 08 (a)	At1g06180	2,69	0,85	3,16	runterreguliert

Nummer	Gennummer	RKD2-Signal EtOH	RKD2-Signal DEX	n-fache Anreicherung	Regulation
D - 11 : 14 (a)	At3g46620	2,11	10,91	5,17	hochreguliert

Experiment 3

Nummer	Gennummer	RKD1-Signal EtOH	RKD1-Signal DEX	n-fache Anreicherung	Regulation
F - 09 : 02 (a)	At5g65330	0,22	0,76	3,45	hochreguliert
D - 08 : 12 (a)	At5g61380	0,59	2,12	3,59	hochreguliert
D - 03 : 07 (a)	At3g49760-	0,14	0,68	4,90	hochreguliert
B - 10 : 11 (a)	At1g33760	0,24	1,18	4,91	hochreguliert
A - 11 : 03 (a)	At3g18650	0,77	3,86	5,00	hochreguliert
D - 03 : 16 (a)	At3g61630	0,14	0,72	5,18	hochreguliert
D - 12 : 01 (a)	At1g47760	0,14	0,76	5,54	hochreguliert
F - 05 : 12 (a)	At5g61590	0,13	0,80	6,25	hochreguliert
C - 02 : 08 (a)	At5g15840	0,19	1,25	6,54	hochreguliert
C - 07 : 03 (a)	At4g22950	0,25	1,87	7,37	hochreguliert
D - 03 : 10 (a)	At3g54430	0,14	1,35	9,79	hochreguliert
F - 07 : 06 (a)	At4g00150	0,07	1,22	16,95	hochreguliert
B - 06 : 03 (a)	At2g37580	1,35	4,30	0,31	runterreguliert
E - 02 : 07 (a)	At1g75540	0,59	1,80	0,33	runterreguliert
A - 07 : 08 (a)	At2g22740	0,67	2,03	0,33	runterreguliert
B - 02 : 06 (a)	At1g80390	1,76	0,54	3,29	runterreguliert
B - 03 : 12 (a)	At5g23000	1,53	0,43	3,53	runterreguliert
B - 10 : 05 (a)	At2g47520	1,34	0,33	4,06	runterreguliert
D - 01 : 01 (a)	At3g45610	2,03	0,37	5,47	runterreguliert
F - 05 : 03 (a)	At5g63470	1,67	0,30	5,52	runterreguliert
C - 11 : 15 (a)	At2g41710	2,59	0,46	5,59	runterreguliert
B - 04 : 14 (a)	At4g18880	0,97	0,13	7,77	runterreguliert
F - 06 : 14 (a)	At5g65070	0,74	0,09	8,48	runterreguliert
C - 10 : 02 (a)	At2g47190	1,98	0,20	10,01	runterreguliert
D - 05 : 16 (a)	At1g32510	0,94	0,08	11,08	runterreguliert
F - 04 : 14 (a)	At1g35560	1,10	0,09	11,57	runterreguliert
D - 05 : 14 (a)	At2g17900	1,52	0,08	17,99	runterreguliert

Nummer	Gennummer	RKD2-Signal	RKD2-Signal	n-fache	Regulation
		EtOH	DEX	Anreicherung	
D - 03 : 13 (a)	At4g18110	1,25	3,76	3,02	hochreguliert
D - 01 : 07 (a)	At5g06950	0,23	0,79	3,38	hochreguliert
C - 03 : 06 (a)	At1g22070	1,04	3,53	3,41	hochreguliert
E - 01 : 09 (a)	At1g30650	0,21	0,74	3,53	hochreguliert
D - 12 : 06 (a)	At5g56780	0,67	2,70	4,05	hochreguliert
A - 05 : 04 (a)	At5g50490	0,18	0,77	4,30	hochreguliert
D - 03 : 08 (a)	At5g13330	0,53	2,39	4,52	hochreguliert
D - 01 : 16 (a)	At1g68810	0,26	1,41	5,43	hochreguliert
D - 12 : 10 (a)	At1g79180	0,28	1,56	5,65	hochreguliert
D - 12 : 14 (a)	At2g45120	0,33	2,02	6,11	hochreguliert
B - 09 : 16 (a)	At5g02810	0,22	1,53	6,95	hochreguliert
D - 06 : 05 (a)	At3g11580	0,35	2,55	7,36	hochreguliert
D - 01 : 11 (a)	At3g51060	0,14	1,07	7,47	hochreguliert
C - 01 : 16 (a)	At2g43010	0,37	2,84	7,64	hochreguliert
B - 03 : 05 (a)	At2g02825	0,16	1,55	9,48	hochreguliert
F - 01 : 13 (a)	At2g46160	0,14	1,47	10,79	hochreguliert
B - 02 : 05 (a)	At5g62010	6,31	1,87	3,38	runterreguliert
F - 12 : 01 (a)	At2g03710	4,55	0,83	5,51	runterreguliert
A - 08 : 13 (a)	At3g03660	1,21	0,22	5,60	runterreguliert
D - 04 : 05 (a)	At3g05480	0,87	0,15	5,78	runterreguliert
D - 05 : 04 (a)	At5g27910	1,45	0,20	7,36	runterreguliert
D - 04 : 02 (a)	At1g07640	2,15	0,15	14,30	runterreguliert
A - 06 : 16 (a)	At2g40200	2,11	0,13	16,35	runterreguliert

Tab. D-2 Einbettungsprotokolle für histologische Analysen

Einbettungsprotokoll Spurr - Standard

Fixierung:	4,0 % FA + 1,0 % GA in PBS Puffer 20mM pH 7,0	8°C	3h
Waschen:	2x Puffer	RT	15'
	1x A.D.	RT	15'
Entwässerung:	30 % Ethanol	RT	15'
	50 % Ethanol	RT	15'
	70 % Ethanol	RT	15'
	90 % Ethanol	RT	20'
	100 % Ethanol	RT	30'
	100 % Ethanol	RT	30'
	100 % Propylenoxid	RT	30'
	100 % Propylenoxid	RT	30'
Harzstufen:	25 % SPURR	RT	16h
	50 % SPURR	RT	4h
	75 % SPURR	RT	4h
	100 % SPURR	RT	16h
Polymerisation:	Wärmeschrank	70°C	24 h

Einbettungsprotokoll Spurr - Mikrowelle

Entwässerung:	90 % Ethanol	RT	20'
	100 % Ethanol	RT	30'
	100 % Ethanol	RT	30'
Harzstufen:	25 % Spurr	Shuttler	30'
	Mikrowelle	350W, 5mm Hg	3'
	50 % Spurr	Shuttler	30'
	Mikrowelle	350W, 5mm Hg	3'
	75 % Spurr	Shuttler	30'
	Mikrowelle	250W, 5mm Hg	3'
	100 % Spurr	Shuttler	30'
	Mikrowelle	250W, 5mm Hg	3'
Polymerisation:	Wärmeschrank 70°C		24 h

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die an dem Zustandekommen meiner Doktorarbeit maßgeblich beteiligt waren.

Besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter und Betreuer Dr. Helmut Bäumlein, der mir die Bearbeitung meines Themas in der Arbeitsgruppe Genregulation ermöglichte. Innerhalb der Arbeitsgruppe habe ich sehr viel Unterstützung von den technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern bekommen. Andreas Czihal führte die Makroarray-Experimente durch und war immer da, wenn es um allgemeine Laborfragen sowie Klonierungsexperimente ging. Elke Liemann war für die *Arabidopsis*-Transformationen verantwortlich und kümmerte sich liebevoll um die Pflanzenlinien in „ihrem“ Lichtraum. Sabine Skiebe führte mit mir zusammen *Arabidopsis*-Protoplastentransformationen durch und wir hatten viele anregende Diskussionen in unserem Laboralltag. Ich danke außerdem Annett Busching und Monika Gottowik dafür, dass sie mir am Anfang meiner Doktorarbeit kleine Tricks und Kniffe für experimentelle Arbeiten beigebracht haben. Ein herzlicher Dank gilt David Koszegi, mit dem ich viele interessante Diskussionen zu der Thematik RKD hatte und einige weiterführende Schritte besprach. Ich bedanke mich außerdem bei Corina Gryczka, Diep Le Hong und Anna Schallau für die sehr gute Zusammenarbeit in der AG Genregulation. Außerhalb der Arbeitsgruppe bedanke ich mich bei Twan Rutten, der ein Großteil der histologischen Analysen durchgeführt hat und mir mit seinem Humor auch in schwierigen Situationen zur Seite stand. Gudrun Mönke spielte eine entscheidende Rolle für die Durchführung der ChIP-chip-Analysen. Sie half mir bei der Etablierung des ChIP-chip-Protokolls für das *AtRKD2*-Kallusgewebe und war maßgeblich an den anschließenden qRT-PCR-Analysen beteiligt. In diesem Zusammenhang danke ich Michael Seifert und Jens Keilwagen, dass sie die statistischen Analysen durchführten und mir komplizierte mathematische Zusammenhänge verständlich erklärten. Ich danke auch Andrea Matros für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen und Erik Boer für die Unterstützung bei Hefetransformationen.

Ich danke des weiteren den externen Kooperationspartnern. Andrea Ehlert (Universität Göttingen) führte mich in die Thematik Protoplasten-Zwei-Hybrid-Analyse ein. Prof. Thomas Dresselhaus (Universität Regensburg) ermöglichte es mir, in seiner Arbeitsgruppe Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit der zur Verfügung gestellten Eizell-cDNA-Bank durchzuführen.

Schließlich gilt mein größter Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir viel Rückhalt gegeben haben, und besonders meinem Mann Daniel.

Veröffentlichung der Ergebnisse

Tagungsbeiträge Poster

Mildner M., Koszegi D., Böer E., Johnston A.J., Czihal A., Hähnel U., Altschmied L., Kumlehn J., Grossniklaus U. and Bäumlein H.: Molecular characterisation of a gametophyte specific transcription factor family. XX International Congress of Genetics, Berlin / Germany, 12.-17.07.2008.

Mildner M., Koszegi D., Böer E., Johnston A.J., Czihal A., Hähnel U., Altschmied L., Kumlehn J., Grossniklaus U. and Bäumlein H.: Molecular characterisation of a gametophyte specific transcription factor family. 1st International Phd School Plant Development, Retzbach / Germany, 17.-19.09.2008.

Koszegi D., Johnston A.J., Mildner M., Wuest S.E., Rutten T., Kirioukhova O., Grossniklaus U. and Bäumlein H.: Plant RKD transcription factors reprogram sporophytic cells towards an egg cell fate. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction, Bristol / UK, 02.-06.08.2010.

Tagungsbeiträge Vorträge

Mildner M.: An egg-cell specific regulator in *A. thaliana*. 2st International Phd School Plant Development, Retzbach / Germany, 07.-09.10.2009.

Koszegi D., Saalbach I., Johnston A.J., Mildner M., Rutten T., Wuest S.E., Kumlehn J., Grossniklaus U. and Bäumlein H.: RKD defines the Egg cell identity in wheat and Arabidopsis. International Congress Molecular Aspects of Plant Development, Vienna / Austria, 23.-26.02.2010.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Maria Mildner geb. Michael
Geburtsdatum	19.08.1981
Geburtsort	Leipzig
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

1988-1992	Grundschule Leipzig
1992-1997	Gymnasium Leipzig
1997-2000	Gymnasium Pirna mit Abitur

Studium

2001-2004	Bakkalaureus-Studium Biotechnologie an der Hochschule Zittau/Görlitz Bakkalaureus-Arbeit am Julius-Kühn-Institut in Dresden-Pillnitz (AG Apfelzüchtung) mit dem Thema: „Genotypisierung phänotypisch auffallender Nachkommen innerhalb der gelenkten Kreuzung von <i>M. niedzwetzkyana</i> mit verschiedenen Kulturapfelsorten anhand von SSR-Markern.“ Abschluss: Bakkalaureus Scientiarum
2004-2007	Master-Studium Life Science an der Leibniz-Universität Hannover Master-Arbeit am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben mit dem Thema: „Untersuchungen zur Etablierung eines Selektionsmarker-Systems auf der Grundlage der Phosphomannose-Isomerase aus <i>E. coli</i> für die Transformation von Gerste.“ Abschluss: Master of Science

Berufstätigkeit

2000-2001	Freiwilliges Ökologisches Jahr in Mecklenburg-Vorpommern
2007-2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abteilung Molekulare Genetik, Arbeitsgruppe Genregulation Gatersleben

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Die angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich für die Anfertigung der Arbeit verwendet. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen dieser Werke sind als solche gekennzeichnet.

Gatersleben, 16. Dezember 2010

Maria Mildner