

Charakterisierung der BTB-MATH Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Henriette Weber
aus Berlin

September 2010

Freie Universität  Berlin

Diese Arbeit wurde von Mai 2006 bis September 2010 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hanjo Hellmann am Lehrstuhl für „Molekulare Entwicklungsphysiologie der Pflanzen“ des Instituts für Biologie/Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin bzw. an der „School of Biological Sciences“ der Washington State University (Pullman, USA) erstellt.

Gutachter 1: Prof. Dr. Hanjo Hellmann

Gutachter 2: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Letzte mündliche Prüfung am: 28.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die BTB-Domäne.....	1
1.2 Die BTB-Superfamilie.....	3
1.3 BTB Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.4 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg.....	10
1.5 Ubiquitinierung als regulatorisches Prinzip	13
1.5.1 Selektion der Substratproteine durch Pre-Modifikationen	14
1.5.2 Mono-, Multi- und Polyubiquitinierung	14
1.5.3 Modulation von Ubiquitinketten	15
1.6 Cullin Ubiquitin E3-Ligasen	16
1.6.1 Cullin1 - Der SCF Komplex	16
1.6.2 Cullin4 - DNA damage-binding Proteins (DDB)	17
1.6.3 Der Anaphase Promoting Complex (APC)	17
1.6.4 Cullin3 - BTB-Proteine	19
1.7 Die <i>Arabidopsis</i> BPM (BTB/POZ-MATH) Proteinfamilie.....	19
1.8 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Materialien.....	23
2.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide.....	23
2.1.2 Enzyme, Marker, Antikörper.....	23
2.1.3 Organismen und deren Anzucht	24
2.1.3.1 Bakterien Stämme.....	24
2.1.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm	24
2.1.3.3 Pflanzen	25
2.1.4 Nährmedien, Selektion, Plasmide.....	25
2.1.4.1 Nährmedien und Selektion - Bakterien	25
2.1.4.2 Nährmedien und Selektion - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.1.4.3 Nährmedien und Selektion - <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.1.4.4 Plasmide	28
2.2 Allgemeine Methoden	28
2.3 Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1 Herstellung und Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i>	28
2.3.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i>	29
2.3.3 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>A. tumefaciens</i>	29
2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	30
2.3.6 DNA-Aufreinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
2.3.7 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	31
2.3.8 RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial	32
2.3.9 Semiquantitative RT-PCR	32
2.3.10 Northern-Blot Analyse	33
2.3.10.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA und Northern-Blottin	33
2.3.10.2 Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Northern-Hybridisierung.....	33
2.3.11 Klassische Klonierung und Gateway™ Klonierungen.....	34
2.3.12 Proteininteraktionstest in <i>S. cerevisiae</i> mit dem Yeast Two-Hybrid-System ..	34
2.3.12.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i>	34
2.3.12.2 Y2H- screening einer cDNA-Expressionsbibliothek	35

2.3.12.3 Amplifizierung und Aufreinigung einer Expressionsbibliothek	36
2.3.12.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	37
2.3.12.5 Analyse der Plasmide aus dem Hefescreen	38
2.3.13 Zielgerichtete Plasmid-Mutagenese	38
2.4 Pflanzenanzucht und -transformation.....	38
2.4.1 Samensterilisation und Sterilkultur <i>A. thaliana</i>	38
2.4.2 Anzucht von <i>A. thaliana</i> Pflanzen in Erde	39
2.4.3 Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> durch Agrobakterien	39
2.4.4 Kreuzung von <i>A. thaliana</i> Pflanzen.....	39
2.4.5 Topfanzucht und Transformation von <i>N. benthamiana</i> Pflanzen.....	39
2.4.6 Qualitativer Nachweis der GUS-Aktivität durch histologische Färbung	40
2.4.7 Mikroskopie, DAPI-Färbung.....	41
2.5 Proteinbiochemische Methoden	41
2.5.1 Proteinextraktion aus Pflanzen	41
2.5.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	42
2.5.3 Proteinbestimmung und SDS-PAGE.....	42
2.5.4 Western-Blot Analyse.....	43
2.5.5 DNA-Protein Interaktionen	43
2.5.6 Protein-Protein Interaktionen	44
2.5.6.1 In vitro Transkription/Translation	44
2.5.6.2 in vitro - Interaktionstest	44
2.5.6.3 Interaktionstests in Pflanzenextrakt.....	45
3. ERGEBNISSE.....	47
3.1 Sequenzanalysen der BPM Familie.....	47
3.2 Interaktionsanalyse innerhalb der BPM Proteinfamilie und mit CUL3 Proteinen....	50
3.3. Suche nach BPM- Interaktoren mittels Y2H cDNA library screen.....	53
3.3.1 Auswahl und Erstellung der Y2H <i>bait</i> -Konstrukte	53
3.3.2 Vorversuche und Durchführung des Hefe- <i>screens</i>	54
3.4. BPM Proteine interagieren mit Proteinen der AP2/ERF Familie.....	59
3.4.1 RAP2.4 interagiert spezifisch mit den sechs BPM Proteinen	60
3.4.2 BPM Proteine binden spezifisch verschiedene AP2-Proteine.....	61
3.4.3 RAP2.4 bildet Homo- und Heterodimere	63
3.4.4 Die BPM/RAP2.4 Interaktion erfolgt zwischen der MATH-Domäne und einem N-terminalen Bereich von RAP2.4.....	64
3.5 Herstellung von Überexpressionspflanzen	67
3.5.1 Interaktionsstudien mit <i>in planta</i> exprimierten Hybridproteinen.....	70
3.5.1.1 Pulldown-Experimente mit 35S:GFP:BPM4 Pflanzenextrakt (<i>A. thaliana</i>)	70
3.5.1.2 Pulldown-Experimente mit PDX1.3:myc:CUL3A Pflanzenextrakt (<i>A. thaliana</i>).....	71
3.5.1.3 Pulldown-Experimente in 35S:RAP2.4:myc Pflanzenextrakt (<i>N. benthamiana</i>)	72
3.5.2 Untersuchungen zur Proteininstabilität von RAP2.4:myc und GFP:BPM4.....	73
3.6 Subzelluläre Lokalisation	77
3.6.1 Subzelluläre Lokalisation der BPM Proteine	77
3.6.2 Subzelluläre Lokalisation des BPM-Interaktors RAP2.4.....	82
3.6.3 Subzelluläre Lokalisation des BPM-Interaktors CUL3A.....	83
3.7 Expressionsanalysen.....	84
3.7.1 Analyse der <i>BPM</i> Expression anhand von Promotor:GUS Pflanzen	84
3.7.1.1 Expression BPM1	85
3.7.1.2 Expression BPM2	86

3.7.1.3 Expression BPM3	88
3.7.1.4 Expression BPM4	89
3.7.1.5 Expression BPM5	90
3.7.1.6 Expression BPM6	91
3.7.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Promotor:GUS Analysen der BPM Gene	93
3.7.1.8 Expression RAP2.4	94
3.7.2 RT-PCR Analyse	96
3.8 Untersuchungen von Insertionsmutanten für BPM2, BPM5, BPM6 und RAP2.4 ...	98
3.8.1 Identifizierung von <i>bpm</i> Mutanten	98
3.8.2 Ergänzender Versuchsansatz zum Ausschalten von <i>BPM1</i> und <i>BPM4</i> durch <i>antisense</i> Konstrukte	100
3.8.3 Identifizierung einer <i>rap2.4</i> Mutante	103
3.8.4 Vergleich von <i>asbpm4</i> , <i>bpm5-2</i> , <i>rap2.4-1</i> und Col0 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen	103
3.9 Induktionsanalysen durch RT-PCR	107
3.10 EMSA Analysen	110
3.10.1 GST:RAP2.4 bindet <i>in vitro</i> an ein Fragment des <i>rd29A</i> Promotors	110
3.10.2 Die Mutagenese der AP2-Domäne führt zum Verlust der DNA-Bindung	111
3.10.3 Die Interaktion BPM/RAP2.4 hat <i>in vitro</i> keinen Einfluß auf die DNA-Bindung durch RAP2.4	113
4. DISKUSSION	115
4.1 Die Interaktoren der BPM Proteine	116
4.2 Kartierung der BPM1/RAP2.4 Interaktion	121
4.3 Stabilitätsanalysen RAP2.4 und BPM4	122
4.4 Die subzelluläre Lokalisation	123
4.5 Die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression	124
4.6 Die Wirkung von ABA, ACC, NaCl, Sorbitol und Trockenstress	125
4.7 Eigenschaften der RAP2.4 DNA-Bindung	128
4.8 Schlußfolgerungen und Ausblick	129
5. ZUSAMMENFASSUNG	131
6. SUMMARY	133
7. LITERATURVERZEICHNIS	135
8. ERFOLGTE PUBLIKATIONEN	149
9. DANKSAGUNG	150
10. ANHANG	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kladogramm der gesamten <i>Arabidopsis</i> BTB-Superfamilie.....	7
Abbildung 2: Das Ubiquitin 26S-Proteasom-System.....	12
Abbildung 3: Modell der Cullin Ubiquitin E3-Ligasen in <i>Arabidopsis</i>	18
Abbildung 4: Alignment der Aminosäuresequenzen der sechs <i>Arabidopsis</i> BPM Proteine.	48
Abbildung 5: Phylogenetische Verhältnisse innerhalb der BPM Familie.....	50
Abbildung 6: Ergebnisse der Interaktionsstudien BPM/BPM und BPM/CUL3 in Hefe. ...	51
Abbildung 7: BPM Proteine können als GST-Fusionsproteine <i>in vitro</i> translatiertes CUL3A Protein copräzipitieren.....	52
Abbildung 8: Diagramm der im Hefe- <i>screen</i> verwendeten Konstrukte und Sequenzanalyse der MATH-Domäne der BPM Proteine.	54
Abbildung 9: Test PCR auf verschiedene cDNA-Banken und Restriktionsverdau der cDNA Fragmente aus dem Y2H- <i>screen</i>	55
Abbildung 10: Die partiellen Interaktoren präzipitieren als GST-Fusionsproteine das <i>in vitro</i> translatierte BPM1 ¹⁻¹⁸⁹ Protein.	58
Abbildung 11: Phylogenetische Gruppierung der <i>Arabidopsis</i> Proteine mit APETALA2- Domäne.....	60
Abbildung 12: RAP2.4 interagiert im <i>in vitro</i> Pulldown-Experiment mit allen BPM, aber nicht mit einem nah verwandten MATH-Protein.	61
Abbildung 13: BPM1 interagiert spezifisch mit mehreren Mitgliedern der Gruppe I der CBF/DREB Proteine.	62
Abbildung 14: RAP2.4 bildet Homodimere im Y2H- und <i>in vitro</i> Translationssystem.	63
Abbildung 15: Kartierung des Bindemotivs für die Interaktion BPM/RAP2.4 im BPM1 Protein.....	65
Abbildung 16: Kartierung des Bindemotivs für die Interaktion BPM/RAP2.4 im RAP2.4 Protein.....	67
Abbildung 17: Nachweis der Überexpression verschiedener Hybridproteine in <i>A. thaliana</i> auf Protein- und RNA-Ebene.	69
Abbildung 18: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen in transgenen <i>35S::GFP::BPM4 Arabidopsis</i> Pflanzen.	71
Abbildung 19: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen in transgenen <i>PDX1.3::4xmyc::CUL3A Arabidopsis</i> Pflanzen.....	72
Abbildung 20: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen mit transient exprimiertem RAP2.4:myc Protein.	73
Abbildung 21: Test der Proteinstabilität RAP2.4:myc und GFP:BPM4 in Abhängigkeit vom 26S Proteasom.	74
Abbildung 22: Generierung transgener Pflanzen <i>35S::HA::RAP2.4/cul3^{hyp}</i>	76
Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von GFP:BPM1 in Epidermiszellen von <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	78
Abbildung 24: Transiente Expression von GFP:BPM2 in Epidermiszellen von <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	79
Abbildung 25: Transiente Expression von BPM3, BPM5 und BPM6 als GFP- Fusionsproteine in Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i>	80
Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von GFP:BPM4.	81
Abbildung 27: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur transienten Expression von GFP:RAP2.4 in Epidermiszellen <i>N. benthamiana</i>	82
Abbildung 28: Transiente Expression von GFP:CUL3A in <i>N. benthamiana</i> Epidermiszellen.	83

Abbildung 29: Expressionsanalyse transgener <i>BPM1:GUS</i> Pflanzen.....	86
Abbildung 30: Expressionsanalyse <i>BPM2:GUS</i>	87
Abbildung 31: Expressionsanalyse <i>BPM3:GUS</i>	88
Abbildung 32: Expressionsanalyse <i>BPM4:GUS</i>	89
Abbildung 33: Expressionsanalyse <i>BPM5:GUS</i>	91
Abbildung 34: Expressionsanalyse <i>BPM6:GUS</i>	92
Abbildung 35: Expressionsanalyse <i>RAP2.4:GUS</i>	95
Abbildung 36: RT-PCR Analyse der Expression von <i>BPM</i> und <i>RAP2.4</i> im Wildtyp und in <i>cul3^{hyp}</i>	97
Abbildung 37: Genotypisierung und Expressionsanalyse von <i>BPM</i> -Insertionsmutanten...	99
Abbildung 38: Schema der <i>antisense</i> Konstrukte <i>asbpm1</i> und <i>asbpm4</i> und Identifizierung von <i>asbpm4</i> <i>knock out</i> Mutanten.	102
Abbildung 39: Genotypisierung und Expressionsanalyse <i>rap2.4-1</i>	103
Abbildung 40: Phänotyp der Linien <i>asbpm4</i> , <i>bpm5-2</i> und <i>rap2.4</i> im Vergleich mit Wildtyp Col0.	104
Abbildung 41: Quantitative Darstellung der Wirkung von ACC, ABA oder Salzstress auf die Mutanten <i>asbpm4</i> , <i>bpm5-2</i> und <i>rap2.4-1</i> im Vergleich zum Wildtyp Col-0.	106
Abbildung 42: Semiquantitative RT-PCR auf sieben Tage alte Keimlinge nach verschiedenen Stressbehandlungen.	109
Abbildung 43: GST:RAP2.4 bindet <i>in vitro</i> spezifisch an ein rd29A Promotorfragment, unbeeinflusst von BPM Proteinen.	112
Abbildung 44: Zweiteiliger Aufbau der APETAL2-DNA-Bindedomäne.	156
Abbildung 45: Mutagenese der BTB-Domäne des BPM1 Proteins.	156
Abbildung 46: Auszug der gewebespezifischen Expressionsanalyse der BPM Genfamilie durch Gingerich et al. (2005).....	157
Abbildung 47: RT-PCR Bestätigung der <i>asbpm4</i> Nullmutante.	157
Abbildung 48: MCS und ggf. T-DNA Bereiche verwendeter Plasmide.	158
Abbildung 49: Alignment der BTB-Domäne verschiedener BTB-Proteine.	159
Abbildung 50: Alignment der MATH-Domänen von BPM1, BPM3 und CeMEL-26.	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die BTB-Proteinfamilien in <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Marker, Antikörper.	23
Tabelle 3: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	24
Tabelle 4: Verwendeter <i>S. cerevisiae</i> Stamm.	25
Tabelle 5: Verwendete <i>A. thaliana</i> T-DNA Insertionslinien.....	25
Tabelle 6: Antibiotika-Stammlösungen.	26
Tabelle 7: Aminosäure-Stammlösungen für Hefemedien.	27
Tabelle 8: ATS Medium für <i>A. thaliana</i>	27
Tabelle 9: Selektionsmedien für <i>S. cerevisiae</i> (L40ccU3) im Y2H System.	35
Tabelle 10: Informationssammlung zu den sechs <i>Arabidopsis</i> BPM Proteinen und den kodierenden Genen	47
Tabelle 12: Verwendete Plasmide.	151
Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide.....	152
Tabelle 14: Generierte stabil transgene Pflanzen.	154
Tabelle 15: Expressionsbedingungen für GST-Fusionsproteine.....	155
Tabelle 16: Verwendete cDNA-Banken.....	155

Abkürzungen

ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BTB	Bric-a-Brac/Tramtrack/POX-virus and Zinc finger
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CUL	Cullin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat (Na-Salz)
GST	Glutathion-S-Transferase
MATH	Meprin and TRAF homology
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (20-25°C)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
tlw.	teilweise
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
Triton-X	Octylphenol-Polyethylen-glykolether
ÜN	über Nacht
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

1. EINLEITUNG

1.1 Die BTB-Domäne

Die BTB-Domäne ist ein Vermittler von Protein-Protein-Interaktionen, wobei vornehmlich homomere Dimerisierungen, in einigen Fällen auch heteromere Wechselwirkungen mit nah verwandten BTB-Proteinen beschrieben wurden, aber auch mit anderen Strukturen gezeigt wurden (Bardwell und Treisman, 1994; Chen et al., 1995; Dong et al., 1996; Dhordain et al., 1997; Hoatlin et al., 1999). Namensgebend war das gemeinsame Vorkommen bei den Transkriptionsregulatoren *Br-Core* des *Broad*-Komplexes, *tramtrack* und *bric a brac* in *Drosophila melanogaster*, wo sie zuerst beschrieben wurde (Zollman et al., 1994). Das Motiv wurde jedoch auch in Proteinen des Menschen und bei Poxviren gefunden, wobei man zunächst hauptsächlich Vertreter mit zusätzlichen Zinkfingerstrukturen identifizierte. Daher wird das Motiv in der Literatur stellenweise auch POZ-Domäne (*poxvirus and zinc finger*) genannt (Bardwell und Treisman, 1994).

Inzwischen weiß man, daß das BTB-Motiv in Eukaryoten weit verbreitet ist. Die Sequenzierung der Genome verschiedener Spezies eröffnete die Möglichkeit, nach vergleichbaren Strukturen und konservierten Sequenzen zu suchen, um einen Einblick in die Evolution der BTB-Domäne und ihre Funktion zu erhalten. Eine Übersicht über BTB Proteine in 17 sequenzierten eukaryotischen Genomen, einschließlich *Arabidopsis thaliana* als einzigem pflanzlichen Vertreter, bietet „The BTB domain database“ (<http://btb.uhnres.utoronto.ca>), die 2005 als Teil eines Graduiertenprogramms entwickelt wurde. Im gleichen Jahr zogen Stogios et al. (2005) diese Datenbank heran, um Divergenzen in den Aminosäuresequenzen von BTB-Proteinen verschiedener Arten zu untersuchen. Ein Ergebnis dieser Arbeit war eine Neudefinition der BTB-Domäne. Während im Allgemeinen das BTB-Motiv als eine Sequenz von knapp 120 Aminosäuren beschrieben wird, die sich in der Sekundärstruktur zu sechs α -Helices und drei β -Faltblättern formt (Ahmad et al., 1998), fanden Stogios et al. (2005) eine konservierte Basisstruktur, welche trotz Unterschieden in der Aminosäuresequenz der betrachteten BTB-Proteine als Faltungsstruktur in ihrem Kern konserviert ist. Diese sogenannte BTB-Faltung umfaßt nur etwa 95 Aminosäurereste und besteht aus fünf dicht gepackten, alternierenden α -Helices und drei kurzen β -Faltblättern. Basierend auf Kristallstrukturanalysen entdeckten sie diese BTB-Faltung auch bei anderen

Proteinfamilien, teilweise versehen mit Extensionen im N- oder C-terminalen Sequenzbereich der Proteine. Sie unterteilten die BTB-Proteine entsprechend des Typus ihres BTB-Motivs in vier Familien: Proteine der T1-Kv (*voltage-gated potassium channel T1*) Familie kodieren die beschriebene BTB-Faltung, den Elongin C Proteinen (*transcription elongation factor subunit C*) fehlt hingegen die letzte α -Helix. Die Skp1-Familie (*S-phase kinase-associated protein 1*) kodiert zwei zusätzliche α -Helices am C-Terminus der Domäne. Die vierte Familie weist eine konservierte N-terminale Verlängerung (ein β -Faltblatt und eine α -Helix) auf. In diese Gruppe fallen vor allem BTB-Proteine mit einem zweiten Strukturmotiv, wie z.B. die BTB-Zinkfinger, BTB-MATH und BTB-KELCH Proteine.

Die beschriebenen Strukturunterschiede scheinen die verschiedenen spezifischen Bindefähigkeiten der BTB-Faltung widerzuspiegeln. T1-Kv wurden als Tetramere gefunden, Elongin C und Skp1 Proteine sind Adapterproteine von Cullin1 bzw. Cullin2 Proteinen in E3 Ubiquitin Ligasekomplexen (Deshaies, 1999; Kile et al., 2002; Zheng et al., 2002). Der N-terminale Bereich der BTB-Domäne der vierten Familie dient unter anderem der Bildung von Homodimeren, was teilweise bedeutsam für die Funktion dieser Proteine scheint, diese verstärken oder modulieren kann. So konnte durch die Kristallstrukturanalysen der BTB-Domäne des menschlichen Zinkfinger Proteins PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) gezeigt werden, daß das Dimer der BTB-Domäne eine Tasche formt, deren Ladung essentiell für die Interaktion mit Komponenten des Histon-Actetylase Co-Repressor Komplexes (u.a. N-CoR und SMRT) und dementsprechend unerlässlich für die Funktion von PLZF als Transkriptionsrepressor ist (Dhordain et al., 1995; Dong et al., 1996). Im Gegensatz dazu liegt das *Arabidopsis* NPR1 (*Nonexpressor of PR genes1*), ein Protein mit BTB-Domäne und Ankyrin-repeats, in seiner inaktiven Form als Oligomer vor, und wird im Zuge der Pathogenantwort in eine aktive monomere Form gebracht (Mou et al., 2003; Boyle et al., 2009).

Die Einbindung der Elongin C und Skp1 Proteine in die BTB-Familie durch Stogios et al. (2005) wurde von Gingerich et al. (2005) und Dieterle et al. (2005), die ebenfalls eine Genom- und Aminosäuresequenzanalyse vornahmen, nicht übernommen. Beide Gruppen sehen in der BTB-Domäne ein degeneriertes Motiv, welches in seiner dreidimensionalen Struktur zwar den Cullin-Binderegionen der Skp1 und Elongin C Adapterproteine ähnelt, aber gleichzeitig eine eigene Familie definiert.

Die BTB-Faltung ist, zusammenfassend formuliert, ein in Eukaryoten hoch konserviertes Interaktionsmotiv, welches durch familienspezifische Extensionen oder Verkürzungen der

Domäne eine hohe Variabilität erhält, und somit ein breites Potential für diverse Protein-Proteinwechselwirkungen in sich birgt. In den letzten Jahren konnte durch Mutageneseansätze für verschiedene Proteine eine Reihe hoch konservierter, teilweise oberflächenexponierter Aminosäuren nachgewiesen werden, die essentiell für die verschiedenen durch die BTB-Domäne vermittelten Protein-Protein-Interaktionen und deren Spezifität sind (Schulman et al., 2000; Zheng et al., 2002; Xu et al., 2003; Weber et al., 2005). Einige dieser Aminosäuren sind teilweise auch in entsprechenden Proteinversionen in Hefe und Mensch konserviert. Dies spricht für konservierte Interaktionsmuster der BTB-Proteine und daraus folgend für die bedeutende Rolle der vermittelten Interaktionen. Andere Aminosäurepositionen variieren innerhalb der Familien und wirken wahrscheinlich selektiv hinsichtlich möglicher Interaktionspartner.

1.2 Die BTB-Superfamilie

Schließt man die von Stogios et al. (2005) einbezogenen Skp1 und Elongin C Proteine aus, so befindet sich die BTB-Domäne meist N-terminal als Einzelkopie in Proteinen, die noch ein oder zwei andere Motive enthalten. Es wurden bereits mehr als 20 verschiedene Domänen in BTB-Proteinen gefunden (Perrez-Torrado et al., 2006). Die häufigsten sind KELCH (nach *Drosophila* KELCH; Stogios und Privé, 2004), MATH (*Meprin and TRAF-C homology*; Uren und Vaux, 1996), NPH3 (*non-phototropic hypocotyl 3*; Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007), sowie Motivwiederholungen (*repeats*) von C₂H₂ Zinkfingerdomänen (Collins et al., 2001). Da die gefundenen Domänen z.B. als Proteinbindemotive beschrieben wurden, kann man davon ausgehen, daß die BTB-Domäne in der Regel nur einen funktionellen Teilbereich des jeweiligen Proteins bildet. Die Identität der verknüpften Domänen bietet neben der Art der BTB-Domäne eine weitere Möglichkeit, die BTB-Proteine zu klassifizieren. Auch lassen sich hieraus Schlüsse auf die evolutionäre Entwicklung der Domäne ziehen.

Die BTB-Domäne wurde in Pilzen, Pflanzen, Nematoden, Insekten und Vertebraten gefunden. Jedoch scheinen einige der mit ihr gekoppelten (klassendefinierenden) Motive, obwohl sie universell von Pflanzen und Vertebraten kodiert werden, in Verbindung mit der BTB-Domäne nur speziesspezifisch vorzukommen: z.B. findet man BTB-Ankyrin Proteine in Hefen und Pflanzen, sie scheinen jedoch in *Caenorhabditis elegans*, Maus und Mensch nicht vertreten zu sein. *Arabidopsis*, und wahrscheinlich Pflanzen im Allgemeinen, kodieren nicht

für die Actin-bindenden BTB-KELCH Proteine, die aber in Maus und Mensch in großer Zahl zu finden sind (Stogios et al., 2005). Das *Arabidopsis* Genom kodiert für 30 BTB-NPH3 Proteine (Gingerich et al., 2005), die wahrscheinlich alle bei der Blaulicht-Signalperzeption eine Rolle spielen und in Vertebraten fehlen. Während aber die NPH3-Domäne tatsächlich ein pflanzenspezifisches Motiv ist, sind z.B. Ankyrin-*repeats* sowohl in Pflanzen, als auch in Vertebraten und *C. elegans* weitverbreitet. KELCH-Proteine sind ebenfalls in Pflanzen präsent - allerdings nicht in Verbindung mit der BTB-Domäne. Daraus folgt, daß hier abstammungsspezifisch eine Kombination unabhängiger Proteine und ihrer Domänen zu neuen Proteinen mit neuen Funktionen stattgefunden hat.

Neben diesem *domain shuffling* gibt es auch einige art- und abstammungsspezifische Erweiterungen, sowohl in der Gesamtzahl der BTBs, als auch einzelne Klassen betreffend. Die Vertebraten kodieren mit jeweils über 150 BTB Proteinen deutlich mehr als z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (5), Dictyostellium (41) *Arabidopsis* (77) oder Drosophila (85). Überraschenderweise ergab eine iterative BLAST Suche mit verschiedenen BTB-Sequenzen aus Hefen, Pflanzen und Tieren für die monocotyledone Pflanze *Oryza sativa* 112 BTB Proteine (Gingerich et al., 2007). Hervorzuheben ist die Zunahme der BTB-BACK-KELCH Proteine und der BTB-Zinkfinger Proteine bei Tieren. Außerdem gibt es eine drastische Erhöhung der Zahl der BTB-MATH Proteine speziell bei *C. elegans*, wie auch eine zahlenmäßige die Vergrößerung der Skp1-Familie in *C. elegans* und *A. thaliana*. Wahrscheinlich zeugen diese Unterschiede von einer adaptiven Anpassung an neue Funktionen und (artspezifische) Bindungspartner.

Die Variabilität innerhalb der BTB-Proteinfamilie läßt eine hohe Bandbreite an möglichen biologischen Rollen erahnen. Es wurden BTB-Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen gefunden wie z.B. BTB-Zinkfinger, die als Transkriptionsregulatoren wirken (Dhordain et al., 1995; Dong et al., 1996) oder BTB-KELCH Proteine als Modifikatoren des Zytoskelettes (Deweindt et al., 1995; Huynh und Bardwell, 1998; Collins et al., 2001). Proteinen der Skp1 und Elongin C Familien, aber auch z.B. dem BTB-MATH Protein MEL-26 aus *C. elegans*, wurde eine Funktion als Substratadapter in verschiedenen Ubiquitin E3-Ligasekomplexen zugewiesen (Furukawa et al., 2003; Geyer et al., 2003; Pintard et al., 2003). Für den weitaus größeren Anteil der BTB-Proteine ist eine Funktion jedoch noch immer offen und, bedingt durch die Größe und Variabilität der BTB-Familie, nicht sicher vorhersagbar. Im Folgenden wird auf den aktuellen Wissensstand über Vorkommen und Funktionen der BTB-Proteine in *A. thaliana* eingegangen.

1.3 BTB Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Die verwandtschaftlichen Verhältnisse der rund 80 annotierten *Arabidopsis* BTB Proteine sind in Abbildung 1 in Form eines ungewurzelten Kladogramms dargestellt, welches auf Sequenzvergleichen des 120 Aminosäuren umfassenden BTB-Motivs beruht (Gingerich et al., 2005). Es ergeben sich 10 Untergruppen, von deren Mitgliedern bisher nur verhältnismäßig wenige charakterisiert wurden (Tabelle 1). Von den bereits länger in ihrer Funktion beschriebenen Vertretern seien hier einige aufgeführt: BOP1 (*Blade-on-petiole1*), ein BTB-Ankyrin Protein, spielt eine Rolle in der Blattmorphogenese und reprimiert *class 1 KNOX* Gene, die für die Aufrechterhaltung der Meristemidentität benötigt werden (Ha et al., 2004). NPR1 (*Nonexpressor of PR genes1*) war das erste beschriebene *Arabidopsis* BTB-Ankyrin Protein (Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997). Es reguliert die Genexpression im Rahmen der Pathogen-Antwort bei der durch Salicylsäure induzierten systemisch erworbenen Resistenz, wirkt aber auch regulierend bei der durch Jasmonsäure induzierten Abwehr von Pathogenen (Dong, 2004). Ein weiteres BTB-Armadillo Protein, ARIA (*Arm repeat protein interacting with ABF2*), ist ein positiver Regulator der Abscisinsäure-Antwort, wahrscheinlich durch seine direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor ABF2 (*ABA-responsive element-binding factor 2*; Kim et al., 2004). NPH3 (*Nonphototropic hypocotyl3*) und RTP2 (*Root phototropism2*) wurden als Akteure des Signalweges der phototropen Antwort auf Blaulicht entdeckt, wo sie mit den Photorezeptor-Kinasen PHOT1 und PHOT2 interagieren, und im weiteren Signaltransduktionsweg positiv auf die phototrope Reaktion der Pflanze wirken (Motchoulski und Liscum, 1999; Inada et al., 2004). Ebenfalls schon länger bekannt ist das einzige BTB-Protein mit C-terminalen Pentapeptid-repeats, FIP2 (Banno und Chua, 2000). Es wurde als Interaktor von AFH1 (*Arabidopsis Formin Homology-1*) gefunden, ein an Aktinmikrofilamente bindendes Protein, das eine Rolle bei der polaren Pollenschlauchverlängerung spielt (Cheung und Wu, 2004).

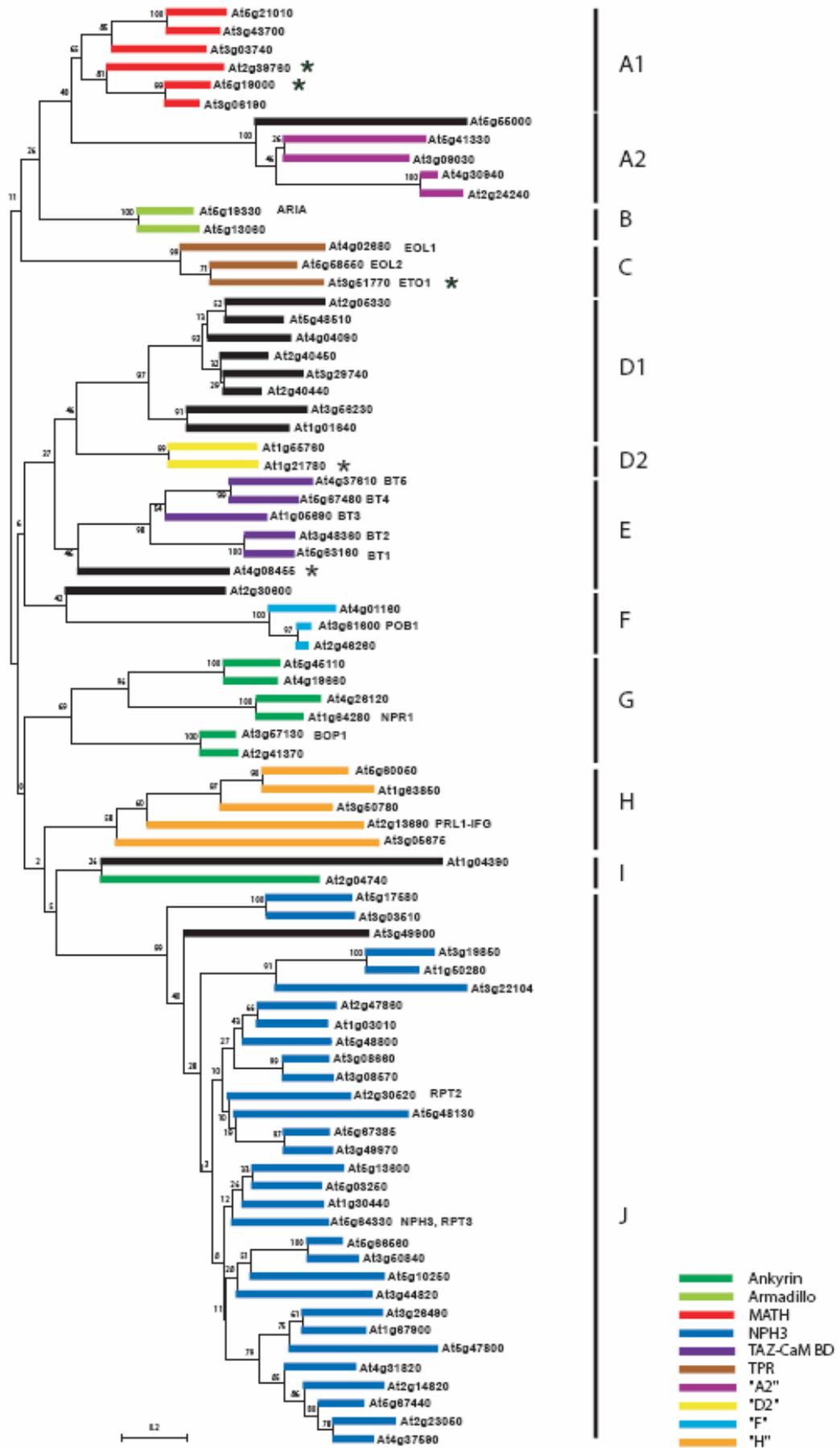


Abbildung 1: Kladogramm der gesamten *Arabidopsis* BTB-Superfamilie.

Der Stammbaum basiert auf einem Alignment des 120 Aminosäuren BTB-Motivs aller 80 möglichen BTB Proteine im CLUSTALX Programm. Das Alignment wurde zur Erstellung eines (ungewurzelten) Stammbaums mit der MEGA 2.1 Software verwendet (Poisson Methode, paarweises Löschen von *gaps*, Bootstrap-Wert 1000). Die sich aus der phylogenetischen Analyse ergebenden 10 Unterfamilien sind auf der rechten Seite gekennzeichnet. Die farbliche Gestaltung entspricht den Eigenschaften der Domänen N- oder C-terminal der BTB-Domäne und dementsprechend den BTB-Familien. Die einzelnen Proteine wurden mit ihrer annotierten AGI Nummer versehen. Sternchen markieren Proteine, deren Interaktion mit einem Cullin3 Protein im Yeast Two-Hybrid Ansatz bereits gezeigt wurden (modifiziert nach Gingerich et al., 2005).

Ein weiterer, bereits gut charakterisierter Vertreter ist ETO1 (*Ethylene Overproducer 1*; Wang et al., 2004). Das Protein weist neben der N-terminalen BTB-Domäne eine pflanzenspezifische TPR-Domäne auf (*Tetratrico Peptide Repeat*). Es ist ein potentieller Substratadapter einer Ubiquitin E3-Ligase mit dem Cullin CUL3 (*Cullin homolog-3*) als zentraler Untereinheit, und hat eine regulatorische Funktion in der Ethylenbiosynthese. Bisher wurde eine Interaktion mit CUL3 bzw. ACS5 (ACC-Synthase) gezeigt, sowie eine Stabilisierung des ACS5 Proteins in der *eto-1* Mutante, jedoch noch keine Komplexbildung einer CUL3-ETO1-ACS5 E3-Ligase (Thomann et al., 2009).

Von Masuda et al. (2008) wurde mit ABAP1 (*Armadillo BTB Arabidopsis protein 1*) ein weiteres BTB-Arm Protein in *Arabidopsis* charakterisiert. ABAP1 bildet mit dem Transkriptionsfaktor TCP24 einen Komplex und bindet in dieser Form mit reprimierender Wirkung an die Promotoren der Gene *CDT1* und *CDT2* (DNA-Replikationsfaktoren). ABAP1 ist somit nicht nur ein Transkriptionsregulator, sondern wirkt spezifisch auf die DNA-Replikation ein.

Weiterhin wurde vor kurzem eine Gruppe von fünf BTB-TAZ (*Transcriptional Adaptor Zinc Finger*) Proteinen beschrieben, die in der Gametophytenentwicklung eine Rolle spielen (Robert et al., 2009). Sie scheinen in ihrer Funktion im Wesentlichen redundant zu sein, da selbst Mehrfachmutanten keinen Phänotyp aufzeigten. Hintergrund ist eine reziproke Regulation der Transkription innerhalb dieser Gruppe. Im Falle des *knockouts* eines BT-Proteins werden die jeweils anderen BT-Proteine in ihrer Expression reguliert und können so den Ausfall kompensieren. Zuvor wurden Mitglieder der Gruppe als Interaktoren von Calmodulin und B3-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Du und Poovaiah, 2004). Die Kombination aus BTB und TAZ Domäne wurde exklusiv in Landpflanzen gefunden. Die TAZ Domäne wurde in Transkriptions-Coaktivatoren gefunden, die als Histon-Acetyltransferasen wirken, und mit ihrer TAZ Domäne Transkriptionsfaktoren binden können

(Ponting et al., 1996). Möglicherweise bekleiden die *Arabidopsis* BT-Proteine ähnliche Funktionen.

Das BTB-Protein AtPOB1 (POZ-BTB 1) war Thema einer kürzlich erschienenen Dissertation von J. Mesmar (2009). AtPOB1 ist Interaktor der E3-Ligase PUB17, einem Regulator des *Hypersensitive Response* (hypersensitiver Zelltod), und besitzt C-terminal der BTB-Domäne ein sogenanntes BACK Motiv (*BTB and C-terminal KELCH*). Solche Proteine werden auch als BBK (BTB-BACK-KELCH) bezeichnet, da sie normalerweise C-terminal weitere *KELCH-repeats* umfassen. AtPOB1 besitzt zwar kein einziges echtes KELCH-Motiv, es enthält jedoch mehrere für die BACK-Domäne charakteristische Aminosäurereste, die bereits von Stogios und Privé (2004) als Sequenzhomologien der BACK Domäne in *Arabidopsis* identifiziert wurden. AtPOB1 ist neben PLZF ein weiteres Beispiel für die Notwendigkeit eines intakten Dimers für die Funktionsfähigkeit eines BTB-Proteins.

Außer den bereits erwähnten konservierten Motiven finden sich in *Arabidopsis* drei Proteine mit *WD40-like repeats* in Verbindung mit der BTB-Domäne. Sie bilden zusammen mit dem BTB-TPR Protein FIP2 und einem weiteren BTB Protein ohne zusätzliche Domäne eine eigene Gruppe (Abbildung 1), da sie eine T1-Kv ähnliche BTB-Domäne aufweisen, die der von Stogios et al. (2005) beschriebenen BTB-Faltung entspricht.

Die bisherigen Charakterisierungen von Mitgliedern verschiedener BTB-Familien offenbarten deren Beteiligung an diversen pflanzenspezifischen Aufgaben. Faßt man die für verschiedene Eukaryoten gesammelten Daten zusammen, scheint die Interaktion mit Cullin Proteinen als Interaktionsmuster wiederkehrend aufzutreten, vor allem bei Berücksichtigung der Elongin C und Skp1 Proteine als Träger der BTB-Faltung (Stogios et al., 2005). Culline fungieren als sogenannte Gerüstproteine von multimeren Ubiquitin E3-Ligasen. Das Ubiquitin-Proteasom-System, die Funktionen der Modifizierung von Proteinen mit Ubiquitin und eine detaillierte Beschreibung der E3-Ligasen und ihrer Funktionen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Tabelle 1: Die BTB-Proteinfamilien in *Arabidopsis thaliana*.

Aufgelistet sind die von Gingerich et al. (2005) und Dieterle et al. (2005) definierten BTB Proteinfamilien, das sie kennzeichnende sekundäre Motiv, sowie die Anzahl der annotierten Mitglieder. Zusätzlich wurden in der Literatur beschriebene bzw. genannte Vertreter zusammengetragen und gegebenenfalls deren Funktion genannt. (¹ tetratricopeptide repeat, ² BTB and C-terminal Kelch, ³ potassium channel tetramerization domain -like BTB, ⁴ PINOID kinase)

Familie	sekundäres Motiv	Anzahl	Beispiele	Funktion / Interaktion von Mitgliedern
1/A1	MATH	6	BPM1-6 (Weber et al., 2005)	CUL3 Interaktion
2/A2	TAZ	5	BT1-5 (Du und Poovaiah, 2004; Figueroa et al., 2005; Robert et al., 2009)	PID ⁴ Interaktion (CUL3 Interaktion) Gametophytenentwicklung
3/J	NPH3	28	NPH3 (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007) RPT2 (Sakai et al., 2000) NPY1-5 (Cheng et al., 2007 und 2008)	CUL3 Interaktion Blaulichantwort Auxinantwort Organogenese
4/G	Ankyrin repeats	6	NPR1 (Cao et al., 1997) NPR4 (Liu et al., 2005) BOP1 (NPR5, Ha et al., 2004) BOP2 (NPR6, Hepworth et al., 2005; Norberg et al., 2005)	systemische Resistenz Morphogenese
5/B	Armadillo repeats	2	ARIA (Kim et al., 2004) ABAP1 (Masuda et al., 2008)	ABA- Signaltransduktion Transkription DNA Replikation
6	-- (< 300 aa)	8		
7	-- (N-terminale Erweiterung)	2	At1g21780 (Figueroa et al., 2005; Gingerich et al., 2005)	CUL3 Interaktion
8/C	TPR ¹	3	ETO1 (Wang et al., 2004) EOL1/EOL2 (Christians et al., 2009)	CUL3 Interaktion Ethylenbiosynthese
9/F	BACK ²	3	AtPOB1 (Thelander et al., 2002) (Dissertation J. Mesmar, 2009)	Pathogenabwehr GMPOZ Othologe
11	T1-like BTB ³	11	FIP2 (Pentapeptid-Domäne; Banno und Chua, 2000)	AFH1 Interaktion pollen tube extension

1.4 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg

Ubiquitin (Ub) ist ein hochgradig konserviertes Polypeptid von 76 Aminosäuren und in allen eukaryotischen Zellen, also ubiquitär, zu finden (Vierstra, 1996). Das Protein verändert durch reversible Bindung an andere Proteine deren Eigenschaften. Ursprünglich wurde die Funktion von Ubiquitin als Markierung von Proteinen für den Abbau durch das 26S Proteasom beschrieben. Obwohl inzwischen verschiedene zusätzliche ubiquitin-abhängige Funktionen offengelegt wurden, soll hier zunächst das Grundprinzip der selektiven Proteolyse beschrieben werden. Für die Aufdeckung der Grundlagen des durch Ubiquitin vermittelten Proteinabbaus (Ubiquitin-Proteasom-Weg) wurden Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.

Die Degradation eines intrazellulären Proteins durch das 26S Proteasom wird durch dessen kovalente Modifikation mit einer Kette aus Ubiquitin Molekülen eingeleitet. Diesen ATP-abhängigen Vorgang nennt man Ubiquitinierung, und er ist Voraussetzung für die Erkennung des Zielproteins durch das 26S Proteasom (Vierstra, 2009). Der Mechanismus der Ubiquitinierung benötigt eine Kaskade von 3 Enzymen, die nach ihrer Reaktionsfolge E1, E2 und E3 (auch E3-Ligase) genannt werden. Die Vorgänge der Ubiquitinierung und des Proteinabbaus erfolgen sowohl im Cytosol als auch im Zellkern (Vierstra, 1996).

Die Enzymkaskade beginnt mit der Aktivierung des Ubiquitin C-Terminus durch ein Ub-aktivierendes Enzym E1 (Abbildung 2). Diese Reaktion umfaßt die Bildung einer hochenergetischen Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen G76 des Ubiquitin und einem konservierten Cysteinrest im E1 Protein. Die nötige Energie für diese Reaktion wird durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Dieser erste Schritt besitzt keine regulatorische oder spezifizierende Funktion, daher kodieren eukaryotische Genome generell nur für wenige E1 (Pickart, 2001).

Der nächste Schritt beinhaltet den Transfer des Ub vom E1 an einen Cysteinrest im katalytischen Zentrum eines Ub-konjugierenden Enzym E2, wobei wiederum eine Thioesterbindung entsteht. Die E2 Proteine scheinen außerdem eine Rolle bei der „gerechten“ Verteilung des aktivierten Ubiquitin auf verschiedene E3 Ligasen zu spielen (Vierstra, 2003; Smalle und Vierstra, 2004). In *Arabidopsis* wurden bisher 37 sehr ähnliche E2 Isoformen identifiziert. Einige Familienmitglieder haben N- oder C-terminale Verlängerungen, die wahrscheinlich für die Spezifität der Interaktion mit E3 Ligasen eine Rolle spielen, und

möglicherweise auch die Substraterkennung und Lokalisation beeinflussen (Smalle und Vierstra, 2004). Die *Arabidopsis* E2 Familie kann in 12 Unterfamilien unterteilt werden, und nur für wenige Mitglieder konnte bisher eine direkte Aktivität bei der Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Vierstra, 1996).

Im letzten Schritt wird das Ubiquitin durch eine E3-Ligase auf das eigentliche Zielprotein übertragen. Als E3-Ligase werden allgemein Enzyme definiert, die ein Ubiquitin durch eine Isopeptidbindung kovalent an einen Lysinrest des Zielproteins anfügen. Um diese Aufgabe zu erfüllen, erhalten einige E3-Ligasen ein Ubiquitin von einem E2 Enzym und übertragen dieses auf ein Zielprotein. Andere E3-Ligasen binden sowohl ein spezifisches E2 Enzym mit einem aktivierten Ubiquitin, als auch das Zielprotein, und sorgen so für die Übertragung des Ubiquitin. Letzteres resultiert in der Bildung einer Isopeptidbindung zwischen dem carboxyterminalen G76 des Ubiquitins und gewöhnlich der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Zielproteins. Nach der Anbindung eines initialen Ub-Restes an ein Substrat, werden weitere Ub ligiert, indem die beschriebene Enzymkaskade mehrmals durchlaufen wird. Es entsteht ein Poly-Ubiquitin-Strang. Die Folgen dieser Modifikation für das Substratprotein hängen hierbei von der Position des für die Verknüpfung der Ub-Proteine genutzten Lysins ab (siehe 1.5.3). Ubiquitinketten, die z.B. über den Lysinrest 48 des Ubiquitins gebildet wurden, sind die am häufigsten in der Zelle vorkommenden, und markieren ein Protein für die Prozessierung durch das 26S Proteasom (Pickart und Fushman, 2004). Das Proteasom erkennt fast ausschließlich Substrate, deren Ubiquitinkette mindestens vier Ub enthält, die über Lysin 48 miteinander verknüpft sind.

Für Hefe, *C. elegans* und Mammalia wurden zusätzlich Proteine identifiziert, die in einigen speziellen Fällen für die Entstehung von Ub-Ketten aus mehr als drei Ub-Molekülen nötig sind. Solche „Elongationsfaktoren“ wurden E4 Enzyme genannt (Koegl et al., 1999; Hoppe, 2005).

Der eigentliche Ort der Degradation des markierten Zielproteins ist das 26S Proteasom, ein Proteinkomplex mit einer Masse von 1.7 MDa, der bei Eukaryoten im Zellkern und Cytoplasma zu finden ist. Es besteht aus dem proteolytischen 20S *core* Komplex und dem regulatorischen 19S Komplex.

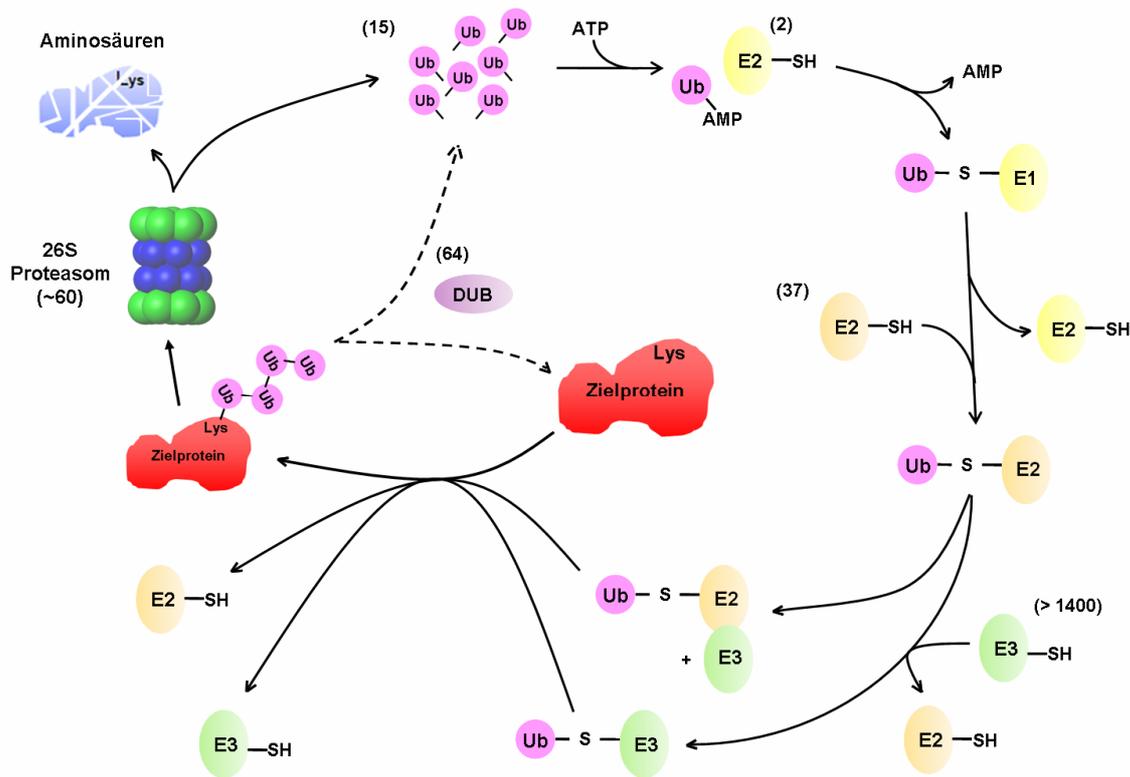


Abbildung 2: Das Ubiquitin-26S-Proteasom-System.

In der ersten ATP-verbrauchenden Reaktion aktiviert zunächst ein E1 (Ubiquitin aktivierendes) Enzym das Ubiquitin (Ub), indem es eine hochenergetische Thioesterbindung (SH) zwischen einem E1 Cysteinrest und dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins bildet. Dieses aktivierte Ubiquitin wird nun durch *trans*-Veresterung an einen Cysteinrest eines E2 (Ubiquitin konjugierendes) Enzyms übertragen. Nun interagiert das Ubiquitin-E2 Zwischenprodukt entweder mit einer (komplexen) E3-Ligase, um das Zielprotein zu identifizieren und den Ubiquitin-Transfer zu katalysieren. Oder das Ubiquitin wird auf eine E3-Ligase übertragen, die dann ihrerseits ein spezifisches Zielprotein mit dem Ubiquitin markiert. Das finale Produkt ist in beiden Fällen ein Ubiquitinkonjugat in dem die C-terminale Glycerin-Carboxylgruppe des Ubiquitins durch eine Isopeptidbindung mit einer zugänglichen Aminogruppe im Zielprotein verknüpft wird. Typischerweise ist dies eine Lysin ϵ -Aminogruppe. Durch sich mehrmals wiederholende Runden der Ubiquitinierung werden nun polymere Ubiquitinketten aufgebaut, wobei einer der sieben Ubiquitin-Lysinreste für die Verknüpfung verwendet wird. Nach der Kettenbildung kann das Ubiquitinkonjugat entweder durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) wieder demontiert werden, um das Zielprotein und die Ubiquitinmoleküle intakt zu entlassen, oder das Zielprotein wird durch das 26S Proteasom degradiert, wobei gleichzeitig das Ubiquitin von den DUBs zur Wiederverwendung freigegeben wird. Die Zahlen in Klammern geben die vorhergesagte Anzahl der Gene von *Arabidopsis thaliana* an, die für die jeweilige Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems kodieren. Die Polyubiquitylierung dient hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, als Substratmarkierung für den proteasomalen Abbau. Dagegen kann eine Monoubiquitylierung verschiedene Prozesse regulieren, wie z.B. die Endocytose, die DNA-Reparatur und die Transkription.

Die tonnenförmige 20S Untereinheit besitzt eine multikatalytische Proteaseaktivität und kann entfaltete Proteine prozessieren. Auf den beiden offenen Enden des 20S Komplexes sitzt je ein 19S Komplex aus Rpt und Rpn Proteinen, der das polyubiquitinierte Protein erkennt und entfaltet. Die Rpns (*regulatory particle non-ATPase*) der 19S Untereinheiten identifizieren abzubauen Proteine an der Markierung mit Ubiquitinmolekülen und binden diese. Die Rpt (*regulatory particle triple-A ATPase*) Proteine können ATP für die nötige Energie hydrolysieren. Um mit Ubiquitin markierte Proteine über das 26S Proteasom abzubauen, wenden eukaryotische Zellen etwa 20 % des verfügbaren ATPs auf. Die als Markierung dienende Ubiquitinkette wird im Zuge des Abbaus des Zielproteins wieder in einzelne Ubiquitine zerlegt, und kann so erneut in den Kreislauf des Ubiquitinsystems einfließen.

1.5 Ubiquitinierung als regulatorisches Prinzip

Obwohl die Zelle über mehrere Mechanismen verfügt, um unnötige, geschädigte oder gefährliche Proteine zu beseitigen, ist der Hauptweg für die Degradation von Proteinen - insbesondere der kurzlebigen - das Ubiquitin-Proteasom-System. Jüngste Ergebnisse deuten sogar auf Ubiquitinanalogue in Prokaryoten hin (Pearce et al., 2008). Die Regulierung der Proteinexpression und Aktivität wurde für lange Zeit nur im Hinblick auf Transkriptions- und Translationseffizienz betrachtet. In den letzten Jahren zeigte jedoch die Entdeckung von posttranskriptionalen und -translationalen Regulierungsmechanismen, daß der Schlüsselfaktor bei der Bestimmung des tatsächlichen Verhältnisses von Transkript zu Protein das Verhältnis zwischen Synthese und Abbau ist, regulierend ergänzt durch die posttranslationale Modifikation von Proteinen. Neuere Studien besagen, daß etwa 6% des *Arabidopsis* Genoms für Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems kodieren (Vierstra, 2009). Die meisten von ihnen (>1000 Gene) entsprechen E3 Ubiquitin Ligasen, die spezifisch Zielproteine erkennen und markieren. Sie sind an der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt, wie z.B. der hormonellen Kontrolle des vegetativen Wachstums und der pflanzlichen Reproduktion, der Lichtantwort, sowie der Vermittlung biotischer und abiotischer Stresstoleranzen und der DNA Reparatur. All dies deutet darauf hin, daß der selektive Proteinabbau eine Hauptrolle bei der Kontrolle des Pflanzenlebens spielt (Mazzucotelli et al., 2006).

1.5.1 Selektion der Substratproteine durch Pre-Modifikationen

Die spezifische Selektion der Substrate für das Ubiquitin-Proteasom-System unterliegt diversen regulatorischen Prozessen. Sie wird unter anderem durch verschiedene kovalente Modifikationen der Substratproteine gesteuert, wie z.B. deren Oxidation (Kazuhiro, 2003), Hydroxylierung (Masson et al., 2001), Phosphorylierung (Deshaies et al., 1999) oder Glycosylierung (Yoshida et al., 2002; Ciechanover, 1998). Für die menschlichen Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53 konnte beispielsweise gezeigt werden, daß eine CSN (*COP9 Signalosom*)-vermittelte Phosphorylierung die Stabilität der beiden Proteine beeinflusst (Bech-Otschir et al., 2001). So wird durch signalabhängigen Proteinabbau eine Feinregulation metabolischer Abläufe, spezifischer Substratmengen oder aber auch transkriptioneller Aktivität möglich, wodurch z.B. Signaltransduktion und Stressantworten reguliert werden können (Hershko und Ciechanover, 1998; Deshaies et al., 1999; Hellmann und Estelle, 2002; Smalle und Vierstra, 2004; Spoel et al., 2009).

1.5.2 Mono-, Multi- und Polyubiquitinierung

Ubiquitinierung ist nicht gleichbedeutend mit Abbau. Die Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin kann auf verschiedene Arten erfolgen. Zunächst kann ein Protein mit nur einem einzigen Ub-Polypeptid gekennzeichnet werden (Monoubiquitinierung). So können derartig markierte Transmembranproteine (z.B. Rezeptoren) von Membranen gelöst werden und in dieser Form Signalfunktionen in der Zelle übernehmen. Die Monoubiquitinierung von Plasmamembranproteinen bewirkt ihre Internalisierung und häufig ihren Abbau in den Lysosomen. Die Markierung von Histonen kann zu einer Änderung des Kondensationsgrades des Chromatins führen und dadurch zur Transkriptionsregulation beitragen (Sun und Allis, 2002). Eine weitere Variante ist die Multiubiquitinierung, die Modifizierung mehrerer Lysinreste des Zielproteins, was z.B. die Endocytose des Substratproteins einleiten kann (Dikic et al., 2003; Haglund et al., 2003; Mosesson et al., 2003).

1.5.3 Modulation von Ubiquitinketten

Ubiquitin ist eines der vielseitigsten Signale in der Zelle. Zunächst kann es Substratproteine sowohl in seiner monomeren Form modifizieren, als auch in fortschreitender Verknüpfung als Ubiquitinkette. Des Weiteren können alle möglichen Lysinreste des Ubiquitins in die Kettenverlängerung einbezogen werden (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63; Xu und Peng, 2008). Zusätzlich können Ubiquitin-ähnliche Proteine, wie z.B. SUMO (*Ub-like modifier*) in die Ketten integriert werden (heterologe Ketten; Ikeda und Dikic, 2008). Chau et al. (1989) beschrieben als erste Lys48-verknüpfte Ubiquitinketten, die - wie man heute weiß - in fast allen Fällen zum schnellen Abbau des markierten Proteins durch das 26S Proteasom führen. Über Lys63 verknüpfte Ketten konnten bisher nur in *in vitro* Experimenten den proteasomalen Abbau von Zielproteinen vermitteln (Kim et al., 2007). In anderen Experimenten wurde die Funktion der Lys63-Ketten in der Signaltransduktion und bei der DNA-Reparatur gezeigt (Hofmann und Pickart, 1999; Deng et al., 2000). Außerdem wurden lineare Ub-Ketten entdeckt, die wahrscheinlich ebenfalls zur Degradation des Zielproteins führen (Kirisako et al., 2006). Sie entstehen durch eine Verknüpfung der C- und N-Termini der Ubiquitine. Als letztes Beispiel seien die beim Menschen nachgewiesenen gegabelten Ubiquitinketten genannt (Kim et al., 2007). In diesem Fall werden verschiedene Bindungstypen aneinandergereiht, wodurch es vorkommen kann, daß ein Ubiquitin über zwei Lysinreste an andere Ubiquitinmonomere gebunden wird.

Die Entstehung solcher „atypischen“, nicht durch Lys48 verbundenen Ketten wird durch verschiedene Paarungen von E2 und E3 Enzymen ermöglicht (Kim et al., 2007). Es ist wahrscheinlich, daß zusätzliche Faktoren, wie die subzelluläre Lokalisation einzelner E2/E3 Kombinationen die Bildung der Kettentypen *in vivo* einschränken und die Spezifität der Signalleistung erhöhen. Zusätzlich führen die verschiedenen Verknüpfungsarten zu unterschiedlichen Konformationen der entstehenden Ketten, und daraus ergeben sich spezifische Interaktionsmotive für Proteine mit Ubiquitin-Bindungsdomäne (Übersichtsartikel Ikeda und Dikic, 2008). Ein zukünftiges Ziel wird es sein, die Erkennung dieser verschiedenen Markierungen durch andere Proteine und die daraus folgenden Signalfunktionen zu entschlüsseln.

Wie bereits zuvor beschrieben, kann die Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin in verschiedenen Formen erfolgen, die jeweils sehr unterschiedliche Effekte auf das markierte

Protein haben. Hinsichtlich des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus wird die hohe Spezifität durch sehr komplexe Mechanismen auf mehreren Ebenen erreicht. Zunächst greift die dem Ubiquitin-Proteasom-System eigene Hierarchie: Den ein bis drei unspezifisch wirkenden E1 Enzymen, sind etwa 30 homologe Proteine mit E2 Funktion nachgeschaltet, die teilweise unterschiedlich lokalisiert sind und mit verschiedenen E3-Ligasen interagieren können. Es folgt eine enorme Zahl von E3-Ligasen verschiedener Familien. Diese können in vielen Fällen selektiv einzelne Substrate markieren, indem sie hochmolekulare Komplexe mit verschiedensten Adapterproteinen zur spezifischen Substratbindung eingehen. Die Substraterkennung wiederum hängt zusätzlich oft von einer vorangegangenen Modifikation des Substrates, wie z.B. einer Phosphorylierung ab. Es sind immer die E3-Ligasen, die durch ihre diskreten Fähigkeiten zur Substraterkennung, teilweise unterstützt durch eine variable Zusammensetzung, die Substratspezifität bestimmen. Zusätzlich sind Beispiele für aktivitätsbestimmende Modifikationen einzelner Untereinheiten von E3-Ligasen bekannt (Übersichtsartikel Vierstra, 2009). Berücksichtigt man alle Enzyme, die strukturell zu den E3-Ligasen gehören, ist bei höheren Organismen von einer Zahl zwischen mehreren Hundert und bis zu über Tausend auszugehen. Im Folgenden Kapitel wird die Grundstruktur und Funktionsweise einer Gruppe von komplexen Ubiquitin E3-Ligasen erklärt, die ein Cullinprotein als zentrale Untereinheit besitzen.

1.6 Cullin Ubiquitin E3-Ligasen

E3-Ligasen liegen entweder als Monomere vor, oder sie sind als Proteinkomplex mit mehreren Untereinheiten aktiv. Zu letzteren gehören die Cullin Ubiquitin E3-Ligasen. Sie bilden Multiproteinkomplexe, die ein Cullin als zentrale Untereinheit aufweisen, an das spezielle Module zur Bindung von Substraten und ubiquitiniertem E2-Enzym anlagern. In Pflanzen unterscheidet man je nach Cullin-Homolog vier verschiedene Gruppen, deren Aufbau sich jedoch ähnelt (Abbildung 3).

1.6.1 Cullin1 - Der SCF Komplex

Die am besten charakterisierte Gruppe der Cullin E3-Ligasen sind die SCF-Komplexe (*SKP1-Cullin1-E-box Protein*; Abbildung 3A). An das Cullin1 (CUL1) bindet C-terminal ein RING (*Really Interesting New Gene*) Finger Protein RBX1 (RING-BOX1), welches das E2 Enzym rekrutiert. Auf der N-terminalen Seite assoziiert das Cullin mit SKP1 (*Saccharomyces*

cerevisiae Suppressor of kinetochor protein 1) als Bindungspartner für verschiedene Substratadaptoren. In *Arabidopsis* gibt es 21 SKP1 ähnliche Proteine, die als ASK (*Arabidopsis SKP1-like*) Proteine bekannt sind (Gagne et al., 2002). Als Substratadaptoren dienen hier F-box Proteine, welche mit 694 Mitgliedern die größte Proteinfamilie in *Arabidopsis* darstellen, und eine Vielzahl verschiedener SCF-Komplexe ermöglichen. Mehrere Beispiele von SCF Komplexen wurden bereits gut charakterisiert und ihre Rolle in der Phytohormon-Signaltransduktion beschrieben. Der SCF^{TIR1} Komplex, mit dem F-box Protein TIR1, spielt eine Rolle bei der Auxinsignaltransduktion (Dharmasiri et al., 2005). Die E3-Ligase SCF^{EBF1/EBF2} reguliert eine Ethylenantwort durch die Proteolyse des Transkriptionsfaktors EIN3 (*Ethylene Insensitive 3*; Guo und Ecker, 2003), während die Komplexe SCF^{COII} (Ren et al., 2005) und SCF^{SLY1/SNE} (Fu et al., 2004) an der Vermittlung der Jasmonsäure bzw. Gibberrelinsäure Signaltransduktion beteiligt sind.

1.6.2 Cullin4 - DNA damage-binding Proteins (DDB)

Cullin4 E3-Ligasen sind eine weitere große Gruppe der komplexen E3-Ligasen (Abbildung 3C). Sie bilden Komplexe aus drei Haupteinheiten: Cullin4 (CUL4), RBX1 zur Ubiquitin-E2 Rekrutierung, und DDB1 (*UV-damaged DNA binding protein 1*) als Brückenprotein für die Bindung von Substratrezeptoren, die hauptsächlich aus der Familie der WD40 Proteine stammen (Bernhardt et al., 2006; Chen et al., 2006; Lee und Zhou, 2007; Lee et al., 2008). In *Arabidopsis* wurden Funktionen von CUL4 E3-Ligasen bisher für die folgenden Bereiche beschrieben: die Photomorphogenese (Chen et al., 2006; Chen et al., 2010), die Signaltransduktion von Cytokinin, ABA und Zucker (Lee et al., 2008), die Nukleotidexzisionsreparatur (Molinier et al., 2008) und die Endoreplikation (Roodbarkelari et al., 2010).

1.6.3 Der Anaphase Promoting Complex (APC)

Eine weitere eigenständige Gruppe bildet der APC (*Anaphase-promoting complex*), mit elf oder mehr Untereinheiten (Abbildung 3D). Hierunter finden sich Verwandte der Culline (APC2) und RBX1 (APC11), zusammen mit verschiedenen auswechselbaren Modulen zur Substratbindung, wie z.B., CDC20 (*Cell Division Cycle protein 20*) oder APC10 (Capron et al., 2003). Der Komplex kontrolliert die Aktivität verschiedener Cyclin-abhängiger Proteinkinasen durch die Ubiquitinierung und daraus folgende Proteolysis der entsprechenden

Cycline. Hieraus ergibt sich eine übergeordnete Funktion des APC Komplexes im Pflanzenwachstum und der Biomasseproduktion (Rojas et al., 2009).

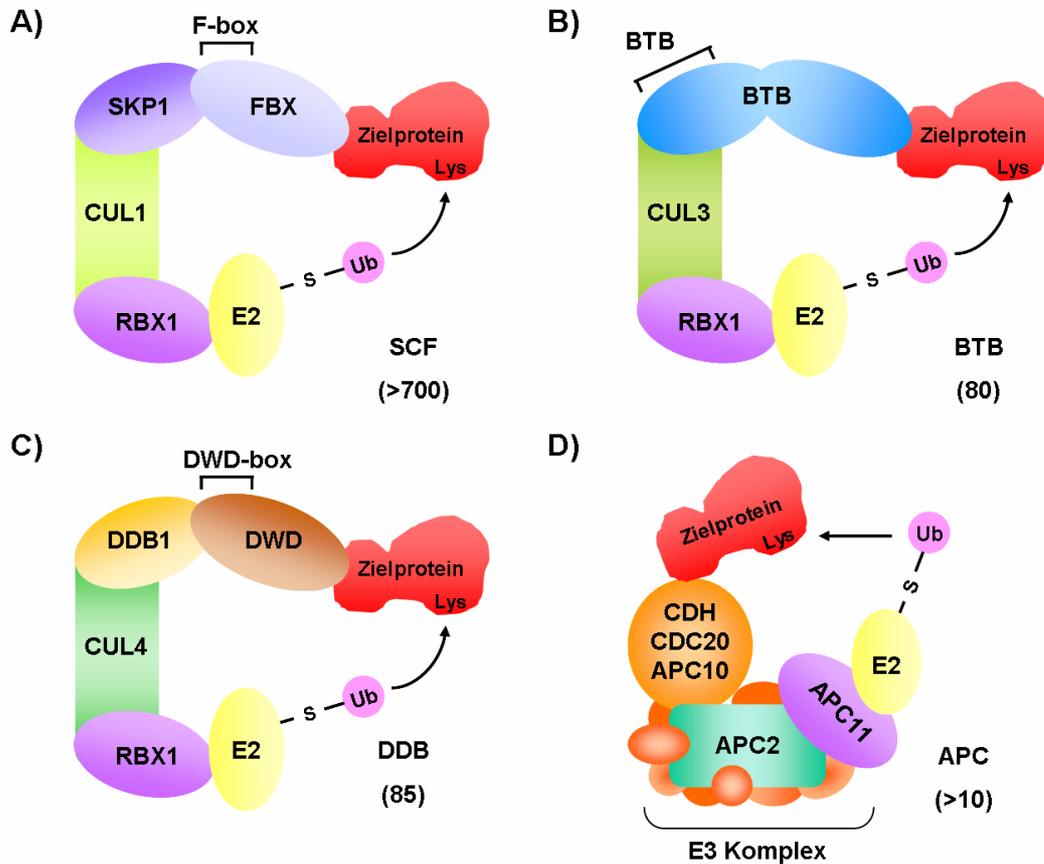


Abbildung 3: Modell der Cullin Ubiquitin E3-Ligasen in *Arabidopsis*.

Die multimeren Cullin E3-Ligasen besitzen ein Cullin Protein (CUL) als zentrale Untereinheit, ein RBX1 (*RING-box 1*) Protein zur E2-Ubiquitin-Bindung und variierende Module zur Substraterkennung und -bindung. A) Im SCF-(SKP1-CUL1-F-box) Komplex interagiert CUL1 mit SKP1 (*ASK* in *Arabidopsis*), welches wiederum F-box Proteine (FBX) als Substratadapter binden kann. B) In den CUL3 E3-Ligasen bindet das Cullin die BTB-Domäne eines BTB-Proteins, welches mit seinem sekundären Motiv Substratproteine rekrutieren kann. C) In CUL4-Komplexen fungiert ein DDB1 (*DNA-damage-binding 1*) Protein als Brücke zu einem Substratadapter der DWD-Proteinfamilie. D) Der APC (*Anaphase-promoting Complex*) umfaßt teilweise mehr als 11 Untereinheiten. Ein APC2 Cullin Protein bildet das Zentrum. Das mit RBX1 verwandte APC11 dient der Bindung eines mit Ubiquitin konjugierten E2-Enzyms. Die Substratspezifität können verschiedene Proteine vermitteln (z.B. CDH, CDC20, APC10). Die Kennzeichnung „Lys“ im Zielprotein kennzeichnet den zu ubiquitinierenden Aminosäurerest. Die Zahlen in Klammern geben die für *Arabidopsis* annotierten Gene für die jeweiligen Substratadapter an.

1.6.4 Cullin3 - BTB-Proteine

Die vierte beschriebene Gruppe unter den pflanzlichen komplexen E3-Ligasen bilden die CUL3 E3-Ligasen (Abbildung 3B). Auch hier assoziiert das Cullin C-terminal mit RBX1 und über dieses mit dem E2 Enzym. Im N-terminalen Bereich bindet das Cullin direkt den Substratadapter - ein BTB-Protein (Dieterle et al., 2005; Figueroa et al., 2005; Weber et al., 2005). Für Mammalia und *C. elegans* wurden bereits funktionale CUL3 E3-Ligasen beschrieben, in denen Mitglieder verschiedener BTB-Familien als Substratadaptoren dienen (Furukawa et al., 2003; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). Hervorzuheben ist hierbei, daß in allen bisher beschriebenen Fällen die Substratbindung über die zweite Domäne des jeweiligen BTB-Proteins erfolgt, die Funktionen des Brückenproteins und des Substratadapters somit in einem einzigen Protein vereint sind.

In *Yeast Two-Hybrid* Experimenten wurden für die *Arabidopsis* CUL3-Homologen CUL3A und CUL3B tatsächlich vornehmlich BTB Proteine als Interaktoren identifiziert. Diese wurden in Abbildung 1 mit einem Stern markiert. Hierzu gehören ETO1 (BTB-TPR), POB1 (BTB-BACK), ein unbeschriebenes BTB-ARM Protein (At5g13060), BPM1 und BPM3 (BTB-MATH), aber auch mehrere BTB-Proteine ohne zweite Domäne (z.B. At1g21780), (Dieterle et al., 2005; Figueroa et al., 2005; Gingerich et al., 2005; Weber et al., 2005). Aufgrund des hohen Konservierungsgrades sowohl der Cullin Proteine als auch der BTB-Domäne könnten alle Mitglieder der *Arabidopsis* BTB-Familie potentielle Substratadapter für CUL3 E3-Ligasen darstellen. Eine Funktion als Substratadapter konnte bisher aber nur für ETO1 gezeigt werden, mit dem Substrat ACS5 (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 5*; Wang et al., 2004, Thomann et al., 2009). Das BTB-Ankyrin Protein NPR1 hingegen ist selbst das Substrat einer CUL3 E3-Ligase (Spoel et al., 2009), deren Substratadapter noch nicht bekannt ist. Es wird jedoch vermutet, daß es sich um ein weiteres BTB-Protein handelt.

1.7 Die *Arabidopsis* BPM (BTB/POZ-MATH) Proteinfamilie

Das *Arabidopsis* Genom kodiert sechs potentielle BPM (BTB/POZ-MATH) Proteine. Im Gegensatz zu den meisten BTB Proteinen liegt bei diesen Proteinen die BTB Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins, durch eine kurze *linker*-Sequenz von der sogenannten MATH (*Meprin and TRAF-C homology*) Domäne am N-Terminus getrennt (Weber et al.,

2005). Das MATH Motiv ist definiert durch seine Homologie zwischen TRAF-C Domäne der intrazellulären TRAF (*Tumor necrosis factor (TNF) Receptor-Associated Factors*) Proteine und einer C-terminalen Region der extrazellulären Meprinproteine Meprin A und B (Uren und Vaux, 1996; Sunnerhagen et al., 2002). Letztere sind für Mammalia als gewebespezifische Metalloendopeptidasen der Astacin-Familie beschrieben worden. TRAF Proteine wurden isoliert aufgrund ihrer Fähigkeit mit membrangebundenen TNF Rezeptoren zu interagieren. Beide Familien spielen eine Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. Zellwachstums-Signaling und Apoptose (Baker und Reddy, 1996; Arch et al., 1998; Bauvois, 2001; Bertenshaw et al., 2001). Die MATH Domäne der TRAF Proteine ist für deren homomere Zusammenlagerung zu Trimeren und die Rezeptorbindung nötig, bei den Meprinen vermittelt sie die homomere Tetramerisierung (Baker und Reddy, 1996; Arch et al., 1998; Sunnerhagen et al., 2002). In Pflanzen wurden weder Meprine noch TRAF Proteine identifiziert (Zapata et al., 2007).

Der pflanzlichen MATH-Domäne konnte bisher keine spezifische Funktion zugeordnet werden. Dem Motiv fehlen zusätzliche Sequenzen, die in TRAFs und Meprinen bei den genannten Bindungen eine Rolle spielen (Marchand et al., 1996; Sunnerhagen et al., 2002). Interaktionsstudien mit *Arabidopsis* BPM Proteinen zeigten die Ausbildung sowohl von Homo-, als auch von Heterodimeren innerhalb der kleinen Proteinfamilie. Durch Deletions- und Mutageneseansätze konnte aber gezeigt werden, daß diese Interaktionen durch die BTB-Domäne vermittelt werden (Weber et al., 2005).

Ein schon länger charakterisiertes BTB-MATH Protein ist das SPOP (*Speckle-type POZ protein*) Protein der Säugetiere, welches als Substratadapter von CUL3 E3-Ligasen beschrieben wurde. Es interagiert durch seine BTB Domäne mit dem CUL3 Protein und rekrutiert über die MATH Domäne verschiedene Substrate. Eines der Substrate ist MacroH2A1.2, eine Variante des H2A Histons. Es wird durch Ubiquitinierung in seiner Anlagerung an das inaktivierte X-Chromosom reguliert (Hernández-Muñoz et al., 2005).

Eine weitere mögliche Funktion der MATH-Domäne wurde anhand des BTB-MATH Proteins MEL-26 (Maternal-Effect Lethal) aus *Ceanorhabditis elegans* beschrieben. Es wurde zunächst ebenfalls als Substratadapter einer CUL3 E3-Ligase beschrieben, die das Mikrotubuli-destabilisierende Protein MEI-1 seiner Degradation zuführt (Pintard et al., 2003). Außerdem konnte für MEL-26 eine CUL3-unabhängige Funktion nachgewiesen werden: Durch die Interaktion mit dem F-Aktin-bindenden Protein POD-1 wird die subzelluläre Lokalisation von MEL-26 an der Teilungsfurche gewährleistet. Das POD-1 Protein wird nicht

über eine CUL3 E3-Ligase für den proteasomalen Abbau markiert, und seine Lokalisation ist unabhängig von MEL-26 oder CeCUL3 (Luke-Glaser et al., 2005).

Die sechs *Arabidopsis* BPM Proteine zeigen eine sehr hohe Homologie zum menschlichen SPOP Protein (AAH03385; Weber et al., 2005). Zusätzlich wurde neben den Interaktionen der BPM Proteine untereinander auch eine Interaktion mit den *Arabidopsis* CUL3 Orthologen CUL3A und CUL3B in Yeast Two-hybrid und *in vitro* Pulldownexperimenten gezeigt (Weber et al., 2005). Daher läßt sich spekulieren, daß Mitglieder der *Arabidopsis* BPM-Familie ebenfalls eine Rolle als Substratadapter in E3-Ligasen spielen.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die BTB-Proteine verschiedener Spezies, von *D. melanogaster* über *C. elegans* bis hin zum Menschen, wurden mit diversen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht.

Für einige der 80 *Arabidopsis* BTB-Proteine konnten regulatorische Funktionen in teilweise pflanzenspezifischen Abläufen beschrieben werden. Die *Arabidopsis* BTB-MATH (BPM) Familie umfaßt sechs Mitglieder, mit unbekannter Funktion. Die zuvor gezeigte spezifische Interaktion einiger Vertreter mit *Arabidopsis* CUL3 Orthologen läßt eine Rolle der BPM Proteine als Substratadaptoren von CUL3-E3 Ligasen vermuten (Weber et al., 2005). Als Thema dieses Projektes wurde daher die Charakterisierung der BTB-MATH Familie gewählt. Zunächst sollten Ergebnisse von vorangegangenen Interaktionsstudien durch verschiedene Methoden (Y2H, *in vitro* / *in planta* Pulldown-Experimente) vervollständigt werden, um Interaktionen innerhalb der BPM Familie bzw. mit CUL3A und CUL3B aufzuzeigen. Weiterhin war die Untersuchung der Expressionslevel der sechs *BPM* Gene in verschiedenen Pflanzengeweben und -entwicklungsstadien mittels Promotor:GUS Fusionen und RT-PCR geplant, sowie die Lokalisierung der Proteine durch stabile Expression von GFP-Fusionsproteinen in *A. thaliana* und transiente Expression in Tabakblättern (*Nicotiana benthamiana*). Um Einblicke in die biologische Rolle der BPM Proteine zu erhalten, sollten Nullmutanten der einzelnen Gene identifiziert und analysiert, sowie Überexpressionspflanzen generiert und analysiert werden.

Um aktiv Interaktoren der BPM Proteine und gleichzeitig potentielle Substrate einer CUL3-BPM E3-Ligase zu identifizieren, war der Yeast Two-hybrid (Y2H) *-screen* einer cDNA-Bank mit der MATH-Domäne des BPM1 Proteins (At5g19000) geplant. Interaktionen sollten durch Copräzipitationsexperimente bestätigt werden, sowie die Art der Bindung durch die Kartierung der interagierenden Motive bestimmt werden. Des Weiteren sollte der

Hypothese der biologischen Funktion der BPM Proteine als Substratadapter von CUL3-E3 Ligasen durch Experimente zur Stabilität der potentiellen Substrate bzw. deren Abbau durch das 26S Proteasom nachgegangen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Oligonukleotide

Alle verwendeten Chemikalien und Zusätze für Nährmedien besaßen analytischen Reinheitsgrad. Im folgenden sind die wichtigsten Lieferanten aufgeführt: Applichem (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), DIFCO Laboratories (Augsburg), Duchefa (Niederlande), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim). Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) oder Eurogentec (Köln) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotiden sind im Anhang in Tabelle 13 aufgeführt. Sequenzierungen wurden von Dr. Meixner GmbH (Humboldt Universität Berlin) bzw. Eurogentec (Köln) durchgeführt.

2.1.2 Enzyme, Marker, Antikörper

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen MBI Fermentas (Sankt Leon-Rot) und New England Biolabs (Beverly, USA) bezogen. Weitere Enzyme, Größenstandards und Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Gegebenenfalls wurden die im jeweiligen Kit enthaltenen Enzyme verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Marker, Antikörper.

Name	Bezugsquelle
DNA-Größenmarker P405, P815, P805	MBBL, Bielefeld
Protein-Größenmarker PageRuler (prestained, unstained)	Fermentas, Sankt Leon-Rot
Pfu/Taq DNA Polymerase, rekombinant	AG Schuster, Berlin
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
CIAP Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway™ BP/LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Steinheim
Antikörper	
anti-myc (Anti-myc Tag, clone 4A6, 16-213)	Millipore, Schwalbach
anti-HA (mono HA.11 clone 16B12, MMS-101P)	Covance, München
anti-GFP (GFP (FL): sc-8334, rabbit)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Maus (goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Kaninchen (bovine anti-rabbit IgG-HRP, sc-2370)	Santa Cruz, Heidelberg

2.1.3 Organismen und deren Anzucht

2.1.3.1 Bakterien Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* sind in Tabelle 3 aufgeführt. Als *Agrobacterium tumefaciens* Stamm wurde GV3101 verwendet (pMP90RK, Gm^r, Km^r, Rif^r; Koncz und Schell 1986).

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
DB3.1	Hanahan, 1983; Bernard und Couturier, 1992	F- <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i>	Plasmidvermehrung Gateway- kompatibler Vektoren
DH5α	Hanahan, 1983; Raleigh et al., 1989	F- <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
DH10B	Calvin und Hanawalt, 1988; Raleigh et al., 1988	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG (Str^r)</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
XL1Blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
TOP10	Invitrogen	F, <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^r), endA1, nupG</i>	Amplifikation cDNA-Bank
Bl21 (DE) pLysS	Grunberg-Manago, 1999; Lopez et al., 1999	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam^r)</i>	Proteinexpression
Bl21 Star (DE3) pLysS	Kido et al., 1996 ; Lopez et al., 1999	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam^r)</i>	Proteinexpression
Rosetta2	Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1996	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm</i>	Proteinexpression

2.1.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stamm

Der in dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stamm und dessen Genotyp ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendeter *S. cerevisiae* Stamm.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
L40ccua	Goehler et al., 2004	MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ ADE2::(lexAop)8-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2	Yeast Two-Hybrid

2.1.3.3 Pflanzen

In dieser Arbeit wurden *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia) und *Nicotiana benthamiana* Pflanzen verwendet. *N. Benthamiana* diente der transienten Proteinexpression. Die in dieser Arbeit generierten transgenen *A. thaliana* Pflanzen sind als Tabelle 15 im Anhang aufgeführt, die untersuchten Insertionslinien sind in Tabelle 5 angegeben. Als Wildtyp-Kontrolle diente in allen Versuchen die Linie Col-0 (J. Dangl, University of North Carolina, USA).

Tabelle 5: Verwendete *A. thaliana* T-DNA Insertionslinien.

Gen	AGI	Linie	Mutagen	Referenz/Quelle
<i>bpm2</i>	At3g06190	S_082349	T-DNA	NASC
<i>bpm5</i>	At5g21010	N_567244	T-DNA	NASC
<i>bpm5</i>	At5g21010	N_538471	T-DNA	NASC
<i>bpm6</i>	At3g43700	N_060136	T-DNA	NASC
<i>bpm6</i>	At3g43700	N_618816	T-DNA	NASC
<i>rap2.4</i>	At1g78080	N_520767	T-DNA	NASC
<i>cul3a/ cul3b</i>	At1g26830/ At1g69670	<i>cul3^{hyp}</i>	T-DNA	AG Genschik (CNRS, Straßburg)/ Thomann et al., 2009

2.1.4 Nährmedien, Selektion, Plasmide

Alle beschriebenen Medien und Lösungen wurden für 20 min bei 120°C (1 bar) autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden gegebenenfalls sterilfiltriert.

2.1.4.1 Nährmedien und Selektion - Bakterien

Für die Standardanzucht von *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* wurde in dieser Arbeit LB-Medium (10 g/l Trypton, 6 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) verwendet (Sambrook et al., 2001), wobei für die Herstellung von Festmedien final 1,5% Agar zugesetzt wurde. Im Allgemeinen wurde *E. coli* bei 37°C angezogen, *A. tumefaciens* bei 28°C. Zur Selektion auf die rekombinanten Plasmide wurde LB-Medium mit Antibiotika gemäß Tabelle 6 versetzt. Ampicillinresistenzen

wurden durch Carbenicillin selektiert, einem Strukturanalog von Ampicillin, welches in Kulturen deutlich stabiler als dieses ist. Antibiotika-Stammlösungen mit Wasser als Lösungsmittel wurden über einen 0,4µm Filter sterilfiltriert. Mit Ausnahme von Hygromycin (Lagerung bei 4°C) wurden die Stammlösungen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Nach der Transformation (Elektroporation oder Hitzeschock) wurden die Zellen in SOC Medium (SOB Medium mit 20mM Glucose; Hanahan, 1983) aufgenommen, welches sich wie folgt zusammensetzt: 20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂ und 10mM MgSO₄. Steriles MgCl₂, MgSO₄ und Glucose wurden nach dem Autoklavieren des Basismediums zugegeben.

Für Dauerkulturen wurde 1ml einer gut durchwachsenen ÜN Kultur mit 500µl sterilem 70% Glycerin gut gemischt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 6: Antibiotika-Stammlösungen.

Substanz	1000x Stammlösung	Lösungsmittel
Carbenicillin	50 mg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	34 mg/ml	Ethanol
Gentamycin	25 mg/ml	H ₂ O
Hygromycin B	50mg/ml	H ₂ O
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O
Rifampenicillin	50 mg/ml	DMSO
Spectinomycin	50 mg/ml	H ₂ O
Tetracyclin	10 mg/ml	Ethanol

2.1.4.2 Nährmedien und Selektion - *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* wurde in dieser Arbeit das Vollmedium YPD (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glucose, pH 5,8) und das Minimalmedium SD (6,7 g/l YNB, 20 g/l Glucose, pH 5,8) verwendet (Sambrook et al., 2001). Die Glucose wurde separat als 40 % Stammlösung autoklaviert und anschließend den Medien zugesetzt. Festmedium enthielt final 1% Agar. Hefen wurden grundsätzlich bei 30°C angezogen. Zur Selektion auf die rekombinanten Plasmide wurde SD-Medium mit Aminosäuren gemäß Tabelle 7 versetzt. Die Aminosäure-Stammlösungen wurden über einen 0,4µm Filter sterilfiltriert und wurden bei 4 °C (H, L, T) bzw. RT gelagert. Für Autoaktivierungstests wurde dem SD-Medium 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT, kompetitiver Inhibitor des *HIS3* Genproduktes, Sigma) in verschiedenen Konzentrationen zugefügt.

Tabelle 7: Aminosäure-Stammlösungen für Hefemedien.

Aminosäure	Abkürzung	10x Stammlösung	Lösungsmittel
L-Histidin HCl	H	2 mg/ml	H ₂ O
L-Leucin	L	10 mg/ml	H ₂ O
L-Tryptophan	T	2 mg/ml	H ₂ O
Uracil (pH 8,5; NaOH)	U	2 mg/ml	H ₂ O

2.1.4.3 Nährmedien und Selektion - *Arabidopsis thaliana*

Für die Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur wurde das von Estelle und Somerville (1987) beschriebene ATS Medium verwendet. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 8 festgehalten. Für Festmedium wurden final 0,8% Agar zugegeben. Um auf transgene Pflanzen zu selektieren, wurden in Abhängigkeit des verwendeten Plasmids dem Festmedium entsprechende Antibiotika zugesetzt (Kanamycin, Hygromycin; siehe Tabelle 6, gleiche Endkonzentrationen) bzw. die Pflanzen auf eine Herbizidresistenz für BASTA® getestet. BASTA® (Aventis Crop Science, Germany) ist der Handelsname für Glufosinat-Ammonium bzw. Phosphinothricin (L-Homoalanin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure), und wirkt als L-Glutamat Struktur analogon. Es inhibiert die Glutaminsynthetase, und führt sowohl zu Glutaminmangel, als auch zu einer Anhäufung von Ammonium in einer für die Pflanzen letalen Konzentration. 0,1 % BASTA® wurde auf Keimlinge mit vegetativen Blättern mittels einer Sprühflasche appliziert, was zu einem Absterben nichtresistenter Pflanzen innerhalb von 3-4 Tagen führt. Dementsprechend wurde die Behandlung nach 4-5 Tagen wiederholt. Phosphinothricin (20 µg/ml final) kann direkt dem Medium für Sterilkulturplatten hinzugefügt werden, da es von Keimlingen über die Wurzel aufgenommen werden kann.

Tabelle 8: ATS Medium für *A. thaliana*.

Chemikalie	Stammlösung	finale Konzentration
KNO ₃	1M	5 mM
KH ₂ PO ₃ (pH 5,5)	1M	2,5 mM
MgSO ₄	1M	2 mM
Ca(NO ₃) ₂	1M	2 mM
Fe-EDTA (Sigma EDFS)	20 mM	50 µM
Mikroelemente	1000x	1x
70 mM H ₃ BO ₃		
14 mM MnCl ₂		
500 µM CuSO ₄		
1 mM ZnSO ₄		
1 nM Na ₂ MoO ₄		
10 mM NaCl		
0,1 nM CoCl ₂		

2.1.4.4 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsvektoren sind in Tabelle 12 im Anhang aufgeführt. Plasmidkarten sind entweder dem Begleitheft des Herstellers (Invitrogen, Clontech), den angegebenen Referenzen oder dem Anhang (Abbildung 48) zu entnehmen. Die Funktionsweise der Klonierung nach GatewayTM ist in der entsprechenden Literatur von Invitrogen nachzulesen.

2.2 Allgemeine Methoden

Die Arbeiten mit Bakterien und Hefezellen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden Nukleinsäuren und Proteine während der Arbeiten auf Eis gekühlt. Grundlegende molekularbiologische Methoden und Arbeitsabläufe, die im Folgenden nicht gesondert erklärt sind, wurden gemäß Sambrook et al. (2001) bzw. dem Methodenbuch „Current Protocols in Molecular Biology“ durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1 Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*

Mit einer ÜN-Vorkultur (LB-Medium mit Antibiotikum, siehe Tabelle 6) wurden 200-400ml Hauptkultur (SOB-Flüssigmedium) 1:100 angeimpft (37 °C, Schüttler). Nach dem Erreichen einer $OD_{595} = 0,4 - 0,6$ wurde die Flüssigkultur in Zentrifugenbecher aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Das Sediment wurde mittels einer gekühlten Glaspipette in 0,5 Vol. des Ausgangsvolumens eiskaltem FSB-Puffer (10 mM KMES pH6,2, 500 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 500 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 M RbCl, 10 % Glycerin) resuspendiert, 15-30 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Das neue Pellet wurde wiederum in 3 ml eisgekühltem FSB resuspendiert, 105 µl DMSO zugegeben und der Ansatz gründlich durchmischt. Nach 15 min Inkubation bei 0 °C wurden weitere 105 µl DMSO hinzupipettiert, das Ganze zügig gemischt, in Mikrozentrifugationsgefäßen aliquotiert (je 200 µl), und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut, ca. 20 min mit 50-100 ng der entsprechenden Plasmid-DNA inkubiert (auf Eis) und anschließend ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden direkt im Anschluß für 2 min auf Eis gestellt, 800 µl SOC-Medium (siehe Nährmedien und Selektion) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 45-60 min im 37° C-Schüttler wurden die Zellen pelletiert (1 min, 13.000 rpm), in 300 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und 100 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen (siehe Nährmedien und Selektion).

2.3.2 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Mit einer ÜN-Vorkultur in LB-Medium mit Antibiotikum (siehe Tabelle 6) wurde 1 Liter Hauptkultur (1:100 in LB-Medium) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte $OD_{595} = 0,5-1,0$ geschüttelt. Die Kultur wurde nach 15 min Inkubation auf Eis abzentrifugiert (15 min, 4.000 rpm, 4 °C), die Zellen in 1Liter eisgekühltem bidestilliertem Wasser gewaschen und sofort abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit 500 ml und einmal mit 20 ml eisgekühltem bidestilliertem Wasser wiederholt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2-3 ml 10 % Glycerin (sterilfiltriert) gut resuspendiert, in 50 µl Aliquots in 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren, und anschließend bei -70 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 10-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 50 µl eisgekühltem bidestilliertem Wasser aufgefüllt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand pipettiert und ein Puls mit einer Spannung von 1,8 kV gegeben (Pulser, Bio-Rad). Direkt nach dem Puls wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben, der Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Gemisch 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden rund 100 µl des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.3.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 2 ml Kultur angeimpft (LB-Medium mit Antibiotika) und über Nacht angezogen. Die Kultur wurde komplett zu 200 ml LB-Flüssigmedium pipettiert und diese Hauptkultur bis zu einer optischen Dichte $OD_{595}=0,3$ geschüttelt. Die Zellen wurden nun in 50 ml Röhrchen aufgeteilt, pelletiert (20 min, 4000 rpm, 4 °C), und anschließend jedes Pellet in 20 ml sterilem und eisgekühltem 1 mM HEPES (pH 7)

resuspendiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde jedes Pellet in 2 ml eisgekühltem 10 % Glycerin (sterilfiltriert) gelöst und die Zellsuspension möglichst zügig in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Lagerung bei -70°C). Für die Elektroporation von *A. tumefaciens* wurden Küvetten mit 2 mm Elektrodenabstand benutzt, ein Puls von 2,5 kV gegeben, und je Ansatz 20µl und 50µl des kompletten Ansatzes ausplattiert.

2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein Standardprotokoll zur alkalischen Lyse angewandt (modifiziert nach Birnboim und Doyle, 1979). Diese Form der Aufreinigung von Plasmid-DNA ermöglichte eine Ausbeute von durchschnittlich 50 µg DNA pro ml Bakterienkultur. 2ml einer ÜN-Kultur (LB-Selektionsmedium) wurden abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I (25 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8) mit der Pipette gut resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung II (10 % SDS (w/v), 200 mM NaOH) und mehrmaligem Invertieren sollte der Ansatz aufgrund der Lyse der Zellen klar werden. Nun wurden 150 µl Lösung III (3 M Natriumacetat pH 5,2) hinzu pipettiert, der Ansatz vorsichtig gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde ohne Störung des Pellets in ein neues 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt, die DNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm) sedimentiert. Das Präzipitat wurde nun zweimal mit 700 µl 70 % EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl bidestilliertem Wasser gelöst. In einigen Fällen wurde die Plasmidaufreinigung mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für eine Extraktion von Plasmiden aus Kulturen >10 ml wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) gemäß dem aktuellen Handbuch benutzt.

2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Eine 4 ml ÜN-Kultur wurde abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 1xTE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) mit 15 mM NaCl resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min wurde der Ansatz wiederum abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weitere Plasmidisolation wurden die Lösungen und Säulen eines Plasmidminipräparationskits (Invitex, Berlin) verwendet. Die Zellen wurden in

250 µl Lösung I resuspendiert und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Lysozym (20 mg/ml, Sigma) zugegeben, der Ansatz mit einem Vortexer gut durchmischt und für 15 min auf 37 °C erhitzt. Nun wurden 250 µl Lösung II hinzu pipettiert, die Mischung invertiert und 15 min in einem 70 °C Heizblock inkubiert. Für die Proteinfällung wurden 350 µl Lösung III zugegeben, der Ansatz kurz gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und im Anschluß 10 min bei 13000rpm abzentrifugiert (4 °C). Ab diesem Schritt wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNA nach Herstellerangaben über eine Säule aufgereinigt.

2.3.6 DNA-Aufreinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung der durch PCR amplifizierten DNA, sowie die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel, Düren). Die Quantifizierung und die Qualitätskontrolle von DNA und RNA erfolgten photometrisch (Spectrophotometer, Beckman, USA) oder gegebenenfalls durch Agarosegelelektrophorese.

2.3.7 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die genomische DNA von *A. thaliana* wurde für mehrere Ansätze benötigt, z.B. die Analyse von Insertionsmutanten und die Sequenzamplifikation von Promotoren. Unter Verwendung des hier beschriebenen Protokolls nach Fulton et al. (1995) kann DNA aus jeglichen Geweben der Pflanze gewonnen werden.

Das Pflanzenmaterial wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Stahlkugel (1,5 mm) geerntet, mittels einer Retschmühle (2 min, 30 Hz) in 200 µl DNA-Präparationspuffer zerkleinert, und nach Zugabe weiterer 550 µl Präparationspuffer 30-120min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 750 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach dem Abzentrifugieren der Proben (5 min, 13000 rpm) wurden 500 µl der oberen Phase sauber in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 400 µl 2-Propanol pipettiert und die Proben invertiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm) wurde das entstandene Pellet zweimal mit je 700 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die Menge der so gewonnenen DNA wurde je nach Bedarf photometrisch bestimmt und bei -20 °C gelagert.

DNA-Präparationspuffer (frisch)

2,5 Teile	DNA-Extraktionspuffer
2,5 Teile	Kernlysepuffer
1 Teil	5 %N-Laurolylsarcosyl
0,33 %	(w/v) Natriumdisulfit

DNA-Extraktionspuffer

350 mM	Sorbitol
100 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
5 mM	EDTA (pH 8)

Kernlysepuffer

200 mM	Tris
50 mM	EDTA (pH 8)
2 M	NaCl
2 %	CTAB

2.3.8 RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial

Für RT-PCR Analysen (2.3.9) wurde RNA aus Pflanzenmaterial mit dem NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Northern-Blot Analysen (2.3.10) wurde die RNA aus 1 g Rosettenblätter wie folgt extrahiert: Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde in einem stickstoffgekühlten Mörser fein zerrieben und in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 2 ml Phenol und 2 ml Tris/HCl (1 M, pH 9) durch Vortexen mindestens 1 min gemischt. Die Suspension wurde bei 4000 rpm 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1,5 ml 3 M Natriumacetat wurde mit 96 % Ethanol auf 14 ml aufgefüllt, der Ansatz durch mehrmaliges Schwenken gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Präzipitat getrocknet und anschließend in 600 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Die Suspension wurde mit 200 µl 10 M Lithiumchlorid gemischt und die RNA über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C) und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.3.9 Semiquantitative RT-PCR

Um die Mengen spezifischer Transkripte in RNA-pools vergleichen zu können, aber auch um cDNA für Klonierungen zu amplifizieren, wurde die reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) genutzt. Hierzu wurde die aufgereinigte RNA (2.3.8) als Matritze für das OneStep RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden) eingesetzt, und ein PCR-Programm nach Empfehlungen des Kits verwendet.

2.3.10 Northern-Blot Analyse

2.3.10.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA und Northern-Blottin

Für die Auftrennung der RNA (2.3.8) wurde ein Agarosegel mit 1,2 % Agarose, 1x MEN Puffer und 20 % Formaldehyd verwendet. Vor der Auftragung wurden die RNA Proben (15-20 µg in max. 20 µl) mit 1 Volumen Formamid, je 0,5 Volumen Formaldehyd und 1x MEN-Puffer, und 0,2 µl Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gemischt, für 15 min bei 58 °C denaturiert, und mit 6x DNA-Ladepuffer (40 % Saccharose in 1xTE, Bromphenolblau), versetzt. Bis zur Beladung des Gels wurden die Proben auf Eis gelagert. Das Gel lief bei 60 V für etwa 5-6 Stunden in 1x MEN Puffer. Die Übertragung der RNA auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond, GE Healthcare) erfolgte über Nacht durch Kapillartransfer mit 10x SSC als Transferpuffer. Die noch feuchte Membran wurde durch UV-Licht fixiert (*crosslinking*) und anschließend trocken bei RT gelagert.

10x MEN Puffer (pH 7)		20x SSC (pH 7,2)		6x DNA-Ladepuffer	
200 mM	MOPS	3 M	NaCl	100,0 mM	EDTA, pH 8,0
50 mM	Natriumacetat	0,3 M	Natriumcitrat	43,0% (v/v)	Glycerin
10 mM	EDTA			0,5% (w/v)	Bromphenolblau
				0,2% (w/v)	Xylencyclanol

2.3.10.2 Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Northern-Hybridisierung

Als sequenzspezifische Sonden für die Northern-Hybridisierung wurden mit [α -³²P] (Amersham, Freiburg) markierte dsDNA-Fragmente eingesetzt, die mit dem Prime-It® Random Primer Labeling Kit (Stratagene, USA) nach Anleitung hergestellt wurden. Als Matritze dienten aufgereinigte cDNA Fragmente (2.3.6) der zu untersuchenden Gene (Tabelle 13 Anhang). Die markierte DNA wurde mit NICKTM Columns (Sephadex G-50 DNA Grade; Amersham, Freiburg) von nicht eingebauten radioaktiv markierten Nukleotiden gereinigt.

Die Nylonmembran wurde zunächst in 20 ml Hybridisierungslösung (250 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 7 % SDS, 1 mM EDTA pH 8, 1 % BSA) für 60 min bei 65 °C vorhybridisiert und die Lösung im Anschluß verworfen. Für die Hybridisierung wurde das komplette Volumen der aufgereinigten Sonde zu 20 ml Hybridisierungslösung gegeben und darin die Membran über Nacht unter ständiger Rotation bei 65 °C inkubiert. Im Anschluß wurde nicht gebundene Sonde durch 60 min Rotation in Waschlösung I (1x SSC, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA) und anschließend in Waschlösung II (0,5x SSC, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA) bei

65 °C entfernt. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie. Die Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak X-O-mat) erfolgte in einer Filmkassette bei -70 °C.

2.3.11 Klassische Klonierung und Gateway™ Klonierungen

Je nach verwendetem Zielvektor wurde das Prinzip der klassischen Klonierung (Verdau durch Restriktionsendonukleasen, Ligation) oder das Gateway™ Klonierungssystem (Invitrogen) verwendet. In Tabelle 12 ist das verwendete System für jedes Plasmid angegeben. Im Anhang sind zusätzlich die Klonierungsstrategien der klassisch klonierten Plasmide aufgeführt (Abbildung 48). Die Enzyme (Tabelle 2) wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.12 Proteininteraktionstest in *S. cerevisiae* mit dem Yeast Two-Hybrid-System

In dieser Arbeit wurden Hefen der Art *S. cerevisiae* für das sogenannte Yeast Two-Hybrid-System (Y2H, Fields und Song, 1989) verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen. In diesem Falle wurde eines der zu untersuchenden Proteine mit der DNA-Bindedomäne des *E.coli* LexA Repressorproteins (*pBTM116-D9-GW*) und das zweite Protein mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (*pACT2-GW*) fusioniert. Die rekombinanten Plasmide vermitteln für sich genommen in Hefe Auxotrophien für bestimmte Aminosäuren (Tabelle 12 im Anhang). Interagierende Proteine ermöglichen durch die Etablierung eines aktiven Transkriptionsfaktors zusätzliche Auxotrophien, auf die selektiert werden kann.

2.3.12.1 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*

Das folgende Protokoll wurde von Dr. Hakan Dortay nach Gietz und Woods (2002) modifiziert. Kompetente *S. cerevisiae* wurden für jede Transformation frisch hergestellt, da Hefezellen bereits bei Temperaturen unter 20°C den Stoffwechsel relativ schnell einschränken, was die Kompetenz stark beeinträchtigt.

Eine frische Kolonie des zu transformierenden Stammes wurde zum Animpfen einer 30 ml ÜN-Kultur (YPD flüssig) genutzt (30 °C, Schüttler). Etwa 5-10 ml dieser Kultur wurden am nächsten Tag zu 100 ml YPD Flüssigmedium in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen gegeben, so daß die OD₆₀₀ dieser Hauptkultur bei 0,2-0,3 lag. Um die Hefezellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu ernten, wenn die Zellwände besonders dünn sind, wurde die Hauptkultur bis zu zur OD₆₀₀=0,7-0,9 angezogen und dann in zwei 50 ml

Röhrchen bei 2000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden zusammen durch mehrmaliges Schwenken in 15 ml Mix I (5 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM LiAc, 1 M Sorbitol, 0,5 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen in 15 ml Mix I wurden die Zellen wieder pelletiert und das entstandene Sediment in 2,5 ml Mix I mit einer 1 ml Pipette gründlich resuspendiert. Die Zellsuspension war somit bereit für die Transformation.

In dieser Arbeit wurde *Salmon Sperm* DNA (10 mg/ml, Invitrogen bzw. Sigma) als Träger-DNA benutzt, um die Transformationsrate zu erhöhen. Um diese in ihrer Einzelstrangform benutzen zu können, wurde die DNA kurz vor ihrer Verwendung denaturiert (10 min, 95 °C), mit dem Vortexer gut durchmischt und auf Eis abgekühlt. Für jeden Transformationsansatz wurden 1-2 µg Plasmid in maximal 8 µl bidestilliertem Wasser verwendet), die in einem 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß vorgelegt wurden. Hierzu wurden 15 µl der vorbereiteten Träger-DNA pipettiert und die Ansätze bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Je Transformation wurden 50 µl der kompetenten Hefezellen mit der vorbereiteten DNA und 700 µl Mix II (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM LiAc, 40 % PEG-4000, 1 mM EDTA) gemischt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 30 °C wurden je 30 µl DMSO hinzu pipettiert, die Ansätze 30 s auf dem Vortexer gemischt und dann für 20 min ein Hitzeschock (42 °C) gegeben. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (3 min, 4000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert. Von jeder Transformation wurden 100µl auf eine Platte mit SD-Selektivmedium ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Das Medium richtete sich hierbei nach den verwendeten Plasmiden (Tabelle 12).

Tabelle 9: Selektionsmedien für *S. cerevisiae* (L40ccU3) im Y2H System.

Plasmid	Selektionsmedium	Zugebene Aminosäuren
<i>pACT2-GW</i>	SDI-L	H, U, T
<i>pBTM116-D9-GW</i>	SDI-T	H, U, L
<i>pACT2-GW/pBTM116-D9-GW</i>	Test auf Transformation: SDII	H, U
	Test auf Interaktion: SDIV	keine

2.3.12.2 Y2H- screening einer cDNA-Expressionsbibliothek

Für die Suche nach Interaktoren in einer Expressionsbibliothek (cDNA-Bank) im *prey*-Vektor *pACT2-GW* wurden entsprechende Hefestämme mit dem *bait*-Vektor *pBTM116-D9-GW* verwendet, die zuvor auf SDI-T Selektionsmedium frisch angezogen worden waren. Die Hefe

wurde in 100 ml Hauptkultur angezogen und kompetent gemacht (2.3.12.1). Allerdings betrug die $OD_{600}=0,9$ und das finale Pellet wurde in 1 ml Mix I gelöst.

In einem 50 ml Falconröhrchen wurden 50 µg der cDNA-Bank (2.3.12.3) Aufreinigung einer Expressionsbibliothek) mit 500 µl denaturierter Träger-DNA (2.3.12.1) gemischt. Nach der Zugabe des kompletten Ansatzes kompetenter Hefezellen und 7 ml Mix II (2.3.11.1), wurde die DNA-Hefezellsuspension für 30 min bei 30 °C inkubiert, 900 µl DMSO zugegeben, durch Vortexen gemischt, und anschließend für 20 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Während des Hitzeschocks wurde das Röhrchen einmal geschwenkt, um eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu erreichen. Die Zellen wurden nun pelletiert (4 min, 4000 rpm), der Überstand verworfen und das Sediment in 4 ml sterilem bidestilliertem Wasser fein resuspendiert. Um die Transformationsrate bestimmen zu können, wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes festgehalten und jeweils 2 µl und 10 µl (in 70 µl bidestilliertem Wasser) auf SDII Medium ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde auf vier große Platten (22x22 cm) mit SDIV Medium aufgeteilt und unter Benutzung von sterilen Glaskugeln (Durchmesser 4 mm, Roll and Grow Plating Beads, Q-Biogene) ausplattiert. Alle Platten wurden 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Gut gewachsene Klone (Primärpositive) wurden anschließend auf frisches SDIV Medium mit 0, 5 oder 10 mM 3-AT übertragen, um eine Autoaktivierung auszuschließen. Hierfür wurden Mikrotiterplatten mit 96 Löchern durch UV-Bestrahlung sterilisiert und mit 50 µl sterilem bidestilliertem Wasser pro Loch beladen. Mit sterilen Zahnstochern wurden die Kolonien auf die Mikrotiterplatte übertragen und im Wasser leicht resuspendiert. Mit einem abflammbaren Metallstempelblock mit 48 Spitzen wurden nun die Hefezellen auf die verschiedenen Medien gestempelt und die Platten für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.12.3 Amplifizierung und Aufreinigung einer Expressionsbibliothek

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-screen wurde eine aus einer Col-0 Wurzelzellkultur hergestellte cDNA-Bank von Prof. Koncz (MPI Köln) verwendet, die in den *prey*-Vektor pACT2-GW kloniert wurde (Tabelle 16). Um die für die Hefetransformation benötigten Mengen an DNA zu erhalten, mußte die als gelöste Plasmid-DNA vorliegende cDNA-Bank zunächst in hochkompetente *E. coli* transformiert werden, um sie so zu amplifizieren, und die Plasmide anschließend wieder extrahieren zu können.

Für die Transformation der cDNA-Bank wurden gekaufte elektrokompetente TOP10 *E.coli* Zellen der Firma Invitrogen (Tabelle 3) verwendet, da eine Transformationsrate von

mindestens 10^7 erreicht werden sollte. 50 μ l der Zellen wurden 30 min mit 10 ng der cDNA-Bank auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert (2.3.1). Der Transformationsansatz wurde mit SOC-Medium auf 20 ml aufgefüllt, 30 min bei 37 °C inkubiert und jeweils 1 ml auf eine Platte (22x22cm) mit LB-Selektionsmedium ausplattiert (insgesamt 20 Platten), wofür pro Platte 10 sterile Glaskugeln (Durchmesser 4 mm, Roll & Grow Plating Beads, Sigma) benutzt wurden. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Es wurden pro Platte etwa 500.000-700.000 Einzelkolonien erhalten, welche mit Hilfe einer 96er Mikrotiterplatte vom Medium abgenommen wurden. Im Anschluß erfolgte eine Maxipräparation der Plasmid-DNA mit einem Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen, den Angaben des aktuellen Handbuches folgend. Das finale Volumen der aufgereinigten cDNA-Bibliothek betrug 1ml.

2.3.12.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Um die im Y2H-screen (2.3.12.2) gefundenen Interaktoren zu identifizieren, mußte die entsprechende Plasmid-DNA extrahiert werden. Da die Primärpositiven zwei Plasmide enthielten, wurden Proben der entsprechenden Hefen von SDIV Medium mit 5 mM 3AT in 10 ml SDI-L Selektionsmedium übertragen, um auf den Interaktor im *prey* Vektor zu selektieren. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C und unter starkem Schütteln wurde die Kultur abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und das Pellet in 200 μ l Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) TritonX-100) resuspendiert. Die Suspension wurde dreifach durch Ultraschall homogenisiert (Bandelin Sonoplus mit Sonotrode UW 2070; 100 %, 10 Pulse). Anschließend wurden 200 μ l eines Gemischs Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:25:1) und 0,3 g Glaskugeln (Durchmesser 425-600 μ m, Sigma) zugegeben und der Ansatz für 2 min auf dem Vortexer gemischt. Nach der Sedimentierung des Zelldebris durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde die wäßrige Phase des Überstandes in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt und mit 200 μ l Isopropanol und 25 μ l 3 M Natriumacetat versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min (13000 rpm, 4°C) zentrifugiert, das Pellet zweimal mit je 200 μ l 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 20 μ l bidestilliertem Wasser gelöst.

2.3.12.5 Analyse der Plasmide aus dem Hefescreen

50 ng der gewonnenen Plasmid-DNA wurden in *E.coli* transformiert (2.3.2). Da es nicht möglich war, die Klone mittels PCR zu analysieren, wurde von je drei Kolonien die Plasmid-DNA isoliert (2.3.4) und einer Restriktionsfragmentierung mit dem Enzym *BglII* (4 h, 37 °C) unterzogen. Dieses Enzym schneidet die komplette GatewayTM-Kassette des Vektors pACT2-GW (Abbildung 48) heraus, inklusive der darin enthaltenen cDNA. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Klone mit in etwa gleich großen Fragmenten bzw. Verdauemustern wurden in Gruppen zusammengefaßt. Je einer der drei Klone aus dem *BglII*-Verdau wurde für einen Doppelverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* verwendet (4 h, 37 °C). Beide Enzyme erkennen kurze Sequenzen von nur vier Basenpaaren, die relativ häufig auftreten. Die Idee war, gleiche Klone durch das Auftauchen gleich großer Restriktionsfragmente in beiden Ansätzen zu finden, um anschließend möglichst unterschiedliche Klone mittels Sequenzierung endgültig zu identifizieren.

2.3.13 Zielgerichtete Plasmid-Mutagenese

Die Einführung einer Punktmutation wurde mit Hilfe des QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) nach Herstellerangaben vorgenommen. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 13 im Anhang aufgeführt.

2.4 Pflanzenanzucht und -transformation

2.4.1 Samensterilisation und Sterilkultur *A. thaliana*

Für Sterilkulturen wurde die Oberfläche der Samen 15-20 min in einer Sterilisationslösung (0,1 % Natriumhypochloritlösung, 0,001 % TritonX-100) geschüttelt und anschließend unter der Sterilbank dreimal mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 0,1 % steriler Agarose resuspendiert und für zwei Tage im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die sterilen Samen konnten so mit Hilfe einer 1000 µl Pipette und einer 1 ml Pipettenspitze auf entsprechendem Medium ausgebracht werden bzw. für die Anzucht in Flüssigkultur in 25-150 ml Erlenmeyerkolben mit flüssigem ATS gegeben werden. Wenn nicht anders vermerkt, wurden Platten bzw. Kolben anschließend bei 19-21°C unter Langtagbedingungen kultiviert. Kolben wurden währenddessen zusätzlich geschwenkt.

Wurzel- und Hypokotyllängen wurden ausgehend von Fotografien mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) quantifiziert.

2.4.2 Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen in Erde

Um *A. thaliana* in Erde anzuziehen, wurden die entsprechenden Samen unbehandelt auf feuchter Erde (2:2:1 P-Erde:T-Erde:Perliet) ausgebracht und die Töpfe bzw. Schalen drei Tage lang mit lichtdurchlässigen Hauben abgedeckt, da *Arabidopsis* zu den Lichtkeimern zählt und um die benötigte Feuchtigkeit zu halten.

2.4.3 Stabile Transformation von *A. thaliana* durch Agrobakterien

Um eine durch *A. tumefaciens* vermittelte stabile Transformation von *A. thaliana* Pflanzen zu erreichen, wurde die sogenannte *floral dip* Methode (Clough und Bent, 1998) angewendet.

Eine 200 ml Kultur transgener Agrobakterien wurde zwei Tage bei 28 °C angezogen und anschließend in großen Zentrifugenbechern pelletiert (20 min, 3500 rpm). Die Bakterien wurden in Infiltrationsmedium (5 % Saccharose, 2,2 % (w/v) MS-Medium und 0,03 % (v/v) Silwet L-77) resuspendiert, und im Anschluß Blüten und Knospen von Col-0 Pflanzen für ca. 30 sec darin getunkt. Nach dem Tunken wurden die Pflanzen ÜN abgedeckt gelagert. Die Prozedur wurde nach 7 Tagen wiederholt, um die Transformationsrate zu erhöhen.

2.4.4 Kreuzung von *A. thaliana* Pflanzen

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Blüten der Mutterpflanze mit Hilfe einer Pinzette die noch unreifen Staubblätter entfernt. Unter Zuhilfenahme eines Binokulars wurden nun reife Staubgefäße des männlichen Partners über den Stempel vorbereiteten Blüte der Mutterpflanze geführt.

2.4.5 Topfanzucht und Transformation von *N. benthamiana* Pflanzen

Die Samen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerdemann-Knörk) wurden auf Erde ausgebracht und innerhalb von zwei Tagen im 30 °C Inkubator zur Keimung gebracht. Anschließend wuchsen die Pflanzen bei 25 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkel).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen ist deren Expression in Fusion mit einem Fluoreszenzprotein, wie z.B. GFP (*green fluorescent protein*), welches bei Anregung mit UV-Licht und entsprechenden Filtern am Mikroskop sichtbar gemacht werden kann. In dieser Arbeit wurden transgene Agrobakterien in *N. benthamiana* durch Infiltration der Blätter mit einer Spritze eingebracht, wie es in Sparkes et al. (2006) beschrieben wurde. Für den Infiltrationspuffer wurde je nach Verfügbarkeit das Trinatriumorthosphat durch Magnesiumchlorid ersetzt. Ziel war die transiente Expression der zu untersuchenden Proteine in Fusion mit GFP in den epidermalen Blattzellen des Tabaks, vermittelt durch *A. tumefaciens*. Die Vorteile liegen vor allem in der schnellen Expression innerhalb von 2-4 Tagen nach Infiltration und in der hohen Transformationsrate im Vergleich zur Infiltration von *Arabidopsis* oder dem Beschuss von Geweben z.B. mit DNA-beschichteten Goldpartikeln (*biolistic bombardment*). Außerdem offeriert das System die Möglichkeit zur zeitweisen Expression von Proteinen, deren stabile Überexpression möglicherweise toxisch bzw. letal für die Pflanze wäre.

Zunächst wurden die entsprechenden transgenen Agrobakterien generiert (2.3.3). Diese tragen ein Ti-Plasmid, dessen T-DNA (Tumor-DNA) das zu untersuchende GFP-Fusionprotein unter Kontrolle des 35S-Promotor codierte (Tabelle 12, Abbildung 48). Zusätzlich wurden in gleicher Konzentration Agrobakterien in die Blätter eingebracht, die ein Plasmid zur Expression des *silencing suppressors* p19 trugen (Voinnet et al., 2003; Sparkes et al., 2006). Für die Infiltration wurden große gesunde Blätter von 4-6 Wochen alten Pflanzen benutzt. Die Oberfläche der abaxialen Seite eines Blattes wurde an ein bis zwei Stellen zwischen den Blattrippen mit einer Rasierklinge leicht verletzt, um die Infiltration zu erleichtern. Mit einer Spritze (ohne Nadel) konnte nun die Bakteriensuspension in das Blatt gepresst werden. Nach 2-3 Tagen unter Standardbedingungen (2.4.7) wurden die Blätter für mehrere Tage auf GFP-Expression hin untersucht.

2.4.6 Qualitativer Nachweis der GUS-Aktivität durch histologische Färbung

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pCB308 bot die Möglichkeit, das β -Glucuronidase-Gen (*uidA*) unter die transkriptionelle Kontrolle des Promotors eines zu untersuchenden Genes zu stellen. Wurde die Glucuronidase exprimiert, konnte ihre Aktivität mittels einer Färbelösung nachgewiesen werden, die als Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucoronid) enthielt. Die Lokalisation des entstehenden blauen Reaktionsproduktes im

Gewebe zeigt spezifisch die Expressionsorte des GUS-Gens und somit stellvertretend des Gens von Interesse an. Zu testende Pflanzen bzw. Gewebe wurden mit der XGluc-Färbelösung (0,05 % (w/v) X-Gluc, 0,5 % (v/v) DMF, 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 2 mM EDTA, 0,2 % TritonX-100) bedeckt, 30-60min durch Anlegen eines Vakuums infiltriert und ÜN in der Färbelösung belassen. Anschließend wurden die Proben zunächst mit 70%igem, dann mit 100%igem Alkohol entfärbt. Anhand der Veränderung der Färbungsintensität konnte auch semiquantitativ die Stärke der Promotoraktivität unter verschiedenen Versuchsbedingungen verglichen werden.

2.4.7 Mikroskopie, DAPI-Färbung

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Dokumentation der GUS-Färbungen und der GFP-Lokalisationsanalysen wurden im Franceschi Microscopy and Imaging Center der Washington State University (Pullman, USA) erstellt. Im Einzelnen wurden folgende Geräte mit der zugehörigen Software benutzt: Zeiss LSM 510 META (Konfokalmikroskop), Leica Wild M5A Stereomicroscope (Lichtmikroskop), Leica Wild M420 Macroscope (Binokular), und Jenoptik ProgRes C12plus (Digitalkamera).

Für eine DAPI-Färbung wurden Blattscheiben mit GFP-Signal für 60min in einer Färbelösung mit 10 µg/ml DAPI und 0,1 % Triton-X100 inkubiert, anschließend die überschüssige Lösung abgenommen und die Proben erneut mikroskopisch untersucht.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

Frisches Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und je nach Menge weiter verarbeitet. Kleine Mengen wurden in einem 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß mit einer Stahlkugel und 100 µl Protein-Extraktionspuffer in der Retschmühle (3 min, 30 Hz) zerkleinert, während größere Proben unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurden und anschließend in ausreichendem Volumen Protein-Extraktionspuffer gelöst. Nach 15-30 min Inkubation auf Eis wurden die Extrakte in einer Tischzentrifuge pelletiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.4.2).

Protein-Extraktionspuffer

100 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
0,2 %	Igepal
1 mM	PMSF
10 µM	MG132

2.5.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Als Expressionsvektoren wurden pDEST15 und pGEX-2TK (Tabelle 12) verwendet. Die Bakterienkulturen wurden entsprechend der jeweiligen optimalen Expressionsbedingungen (Tabelle 15) in LB-Selektionsmedium mit 2 % Glucose angezogen und mit final 1 mM IPTG induziert. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in GST-Extraktionspuffer (50mM Tris pH 8,0 250mM KCl, 1mM EDTA, 0,2 % TritonX-100, 1mM DTT, 1mM PMSF) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (Sonopuls HD60, Bandelin electronics, Deutschland). Das Zelldebris wurde durch erneutes Zentrifugieren (15 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert und der Überstand mit Gluthationgekoppelten Agarosebeads (Sigma) für 3 Stunden auf Eis geschwenkt. Anschließend wurden die an die Glutathionmatrix gekoppelten Proteine 5x 10 min mit je 1 ml GST-Lysispuffer gewaschen. Für eine Elution der GST-Fusionsproteine von der Matrix wurde die benötigte Menge in Elu

2.5.3 Proteinbestimmung und SDS-PAGE

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Hierzu wurden 2 µl einer Probe mit 998µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) gemischt und nach fünf Minuten die OD₅₉₅ gemessen. Anhand einer BSA-Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration im Anschluß berechnet.

Vor der Gelbeladung wurden die Proben mit 4x SDS-Ladepuffer (40 % Glycerin, 20 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6 % SDS, 500 µl β-Mercaptoethanol, 0,5 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert, dann 2 min auf Eis abgekühlt. Je nach erwartetem Molekulargewicht der Proteine erfolgte die elektrophoretische Auftrennung durch 8-15 %igen kontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Mini-SDS-Gelapparaturen; Bio-Rad, München). Für die Elektrophorese wurde 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS) verwendet.

Um Qualität und Menge aufgereinigter GST-Proteine (2.5.2) zu überprüfen, wurden die Proteine durch eine Silberfärbung nach Rabilloud et al. (1988) sichtbar gemacht.

2.5.4 Western-Blot Analyse

Für eine spätere Immunodetektion der Proteine wurden nach der SDS-PAGE (2.4.3) die Proteine durch einen Western-Blot aus der Gelmatrix auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen. Vor dem Aufbau des Blots wurde das Gel 5 min in bidestilliertem Wasser und anschließend 5 min in Blotpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris) äquilibriert. Je nach Anzahl der Gele wurde für den Transfer die Mini Trans-Blot® (ÜN, 50mA, 4 °C) oder die Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (ÜN, 70mA, 4 °C) der Firma Bio-Rad (München) verwendet.

Die Immunodetektion wurde in 50 ml Röhrchen unter ständiger Rotation vorgenommen. Die Membran wurde 60 min geblockt (5 % fettfreie Trockenmilch in T-PBS), 90 min mit dem primären Antikörper inkubiert (1:1000-1:2000 in T-PBS), zweimal 5 min mit T-PBS gewaschen, 120 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1:2000-1:3000 in T-PBS), und abschließend dreimal je 10 min mit T-PBS gewaschen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 gelistet. Der Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe wurde durch das SuperSignal West Pico Detektionskit (Pierce, USA) nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Chemolumineszenz wurde abschließend durch die Exponierung gegen einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat) detektiert.

Sollte die Membran weiteren Immunodetektionen unterzogen werden, wurden die Antigen-Antikörperkomplexe durch 2x 7 min Inkubation mit Strip-Puffer (25 mM Glycin, 1 % SDS) dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in PBS (T-PBS ohne Tween) gewaschen und war bereit für weitere Behandlungen.

T-PBS

73 mM	NaCl
43 mM	Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O
30 mM	KCl
15 mM	KH ₂ PO ₄
0,1 %	Tween-20

2.5.5 DNA-Protein Interaktionen

Die Bindung von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen (2.5.2) an eine spezifische DNA-Sequenz wurde durch einen Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) getestet. Die

benötigte Sequenz wurde von genomischer DNA (2.3.7) amplifiziert (Primer Tabelle 13 im Anhang) und ist in Abbildung 43 angegeben. Alle benötigten Puffer, sowie die nativen Polyacrylamidgele wurden jeweils frisch hergestellt. Die Gele (8x8x0,01 cm) wurden bereits vor der Beladung 30-60 min bei 100V in 0,5x TBE elektrophoriert, um das enthaltene APS zu entfernen. Ein Reaktionsansatz umfaßte 25 µl. 100 ng der aufgereinigten DNA (2.3.6) wurden bei Raumtemperatur in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 2,5 µl EMSA-Puffer (2,5 mM HEPES pH7,5, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µM EDTA pH 8) gemischt. Das aufgereinigte und von Agarosebeads eluierte GST-Fusionsprotein (2.5.2) wurde in verschiedenen Mengen zugegeben und der Ansatz 20 min inkubiert. Anschließend wurde zügig nativer 2x Ladepuffer (10% Glyzerin, 100 mM EDTA pH 8) hinzupipettiert und der komplette Reaktionsansatz auf ein 6 % natives Acrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese in 0,5x TBE Puffer wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt.

2.5.6 Protein-Protein Interaktionen

2.5.6.1 In vitro Transkription/Translation

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde der *TNT[®]T7 Quick for PCR DNA Kit* von Promega Hierbei wurden durch PCR amplifizierte cDNA-Sequenzen mit vorgeschaltetem T7-Promotor direkt für eine gekoppelte Transkription/Translation in Retikulozytenlysate (Kaninchen) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben entweder radioaktiv unter Einsatz von 10 µCi [³⁵S] Methionin (Amersham, Freiburg), oder nicht radioaktiv unter Verwendung von greenLysin (Promega, Mannheim). Radioaktiv: Die Trenngele wurden im Anschluß an eine SDS-PAGE (2.5.3) durch Anlegen eines Vakuums (Vakuumpumpe, Brand GmbH, Deutschland) für 60 min bei 60°C auf 3mm Whatmanpapier getrocknet (Geltrockner, Zabona AG, Schweiz). Die durch *in vitro* Transkription/Translation [³⁵S]-markierten Proteine wurden anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Kodak, X-Omat). Nicht radioaktiv: Die Produkte wurden nach SDS-PAGE mittels eines Phosphoimagers (Typhoon 9400, GE Healthcare) visualisiert.

2.5.6.2 in vitro - Interaktionstest

Um die Interaktion eines *in vitro* translatierten Proteins (2.5.6.1) mit einem aufgereinigten und an Agarosebeads immobilisierten GST-Fusionsprotein (2.5.2) zu testen, wurden 20µl eines Translationsansatzes mit 15-30 µl GST-Fusionsprotein an Agarosebeads und 180 µl

Pulldown-Puffer drei Stunden unter Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert (4000 rpm, 1 min, 4 °C), 5x 10 min mit jeweils 1 ml Pulldown-Puffer gewaschen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach 2 min auf Eis wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Signale verlief wie unter 2.5.6.1 beschrieben.

2.5.6.3 Interaktionstests in Pflanzenextrakt

Für diesen Ansatz wurden 3-5 mg Gesamtproteinextrakt (2.5.1) transgener Pflanzen und 15-30 µl aufgereinigtes GST-Fusionsprotein (2.5.2) in 1-1,2 ml Reaktionsvolumen verwendet. Der Reaktionsansatz wurde drei Stunden auf Eis unter schwenken inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert (4000 rpm, 1 min, 4 °C), 5x 10 min mit jeweils 1 ml Extraktionspuffer (2.5.1) gewaschen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach 2 min auf Eis wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Es schloß sich eine Western-Blot-Analyse (2.5.4) an.

3. ERGEBNISSE

3.1 Sequenzanalysen der BPM Familie

In *Arabidopsis thaliana* wurden 80 BTB-Proteine identifiziert. Hierzu gehört auch die Familie der BTB/POZ-MATH Proteine (BPM), bestehend aus sechs Mitgliedern, die BPM1 bis BPM6 genannt werden (Weber et al., 2005). Die entsprechenden Gene sind sich in Größe und Struktur sehr ähnlich: Die *open reading frames* (ORF; RNA kodierende Bereiche) haben eine relativ einheitliche Länge von 2012 bp bis 3180 bp, und beinhalten jeweils vier Exons und drei Introns (Tabelle 10). Für alle Mitglieder wurden in Datenbanken *Expressed Sequence Tags* (ESTs) gefunden, deren Häufigkeit von BPM1 (72) zu BPM6 (17) hin abnimmt. Die kodierten Proteine haben ein kalkuliertes molares Gewicht von 44 bis 51 kDa.

Tabelle 10: Informationssammlung zu den sechs *Arabidopsis* BPM Proteinen und den kodierenden Genen
AGI - annotierte Position des Gens im *Arabidopsis* Genom; ORF - Größe des *open reading frame*; cDNA - Länge des klonierten cDNA-Bereiches; ESTs - expressed sequence tags; AA - Anzahl der Aminosäuren des translatierten Genproduktes; Promotor - Länge der klonierten Promotorsequenz (www.Arabidopsis.org).

Name	AGI	ORF (bp)	Introns	kodierender Bereich (bp)	ESTs	AA	molares Gewicht	Promoter (bp)
BPM1	At5g19000	2528	3	1224	72	408	44,1 kDa	900
BPM2	At3g06190	2623	3	1221	36	407	45,1 kDa	1500
BPM3	At2g39760	3180	3	1227	46	409	44,9 kDa	940
BPM4	At3g03740	2931	3	1398	44	467	51,0 kDa	1500
BPM5	At5g21010	2673	3	1233	34	411	45,2 kDa	1200
BPM6	At3g43700	2012	3	1248	17	416	45,7 kDa	1580

Wie dem Alignment der Aminosäuresequenzen in Abbildung 4 zu entnehmen ist, tragen die BPM Proteine im N-terminalen Bereich die MATH-Domäne (IPR002083 MATH) und C-terminal die BTB-Domäne (IPR013069 BTB/POZ). Beide Motive sind hochgradig konserviert und vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Albagli et al., 1995; Takahashi et al., 2002). Hervorzuheben ist ein relativ variabler Bereich innerhalb der BTB-Domäne (schwarz gerahmt). Die BPM4 Sequenz besteht an dieser Stelle zu >60 % aus Serinresten, während BPM5 und BPM6 sechs zusätzliche Aminosäuren aufweisen, die BPM1 und BPM2 fehlen und möglicherweise eine Rolle bei der Spezifität der BTB-Bindefähigkeiten spielen.

Im Bereich des N- bzw. C-Terminus zeigen die BPM eher flexible Sequenzen und voneinander abweichende Sequenzlängen, wobei BPM4 in beiden Bereichen durch viele zusätzliche Aminosäuren hervorsteicht.

In Abbildung 4 wurden zusätzlich zwei einzelne Positionen rot bzw. blau gerahmt, die konservierten Positionen der BTB-Domäne im humanen PLZF Protein (AAD03619) entsprechen. Diese wurden von Melnick et al. (2002) aufgrund von Deletions- und Mutageneseansätzen als essentiell für die Dimerisierung des PLZF beschrieben, und sind z.B. auch in den BTB-MATH Proteinen MEL-26 (AAC63596) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und dem menschlichen SPOP (CAA04199) Protein konserviert (Abbildung 49 im Anhang). In früheren Versuchen konnte bereits am Beispiel des BPM1 Proteins ein Verlust sowohl der Homodimerisierung, als auch der Interaktion mit dem *Arabidopsis* Cullin CUL3A bei Austausch der entsprechenden Asparaginsäure gegen Alanin (BPM1^{D204A}) gezeigt werden (Weber et al., 2005). Das Aspartat ist positionell in allen sechs Mitgliedern der BPM Familie konserviert. Bei der zweiten Aminosäure handelt es sich im Falle des PLZF Proteins um Arginin. Außer für BPM4 findet sich an dieser Stelle in den BPM ein Lysin, welches wie Arginin zu den basischen Aminosäuren zählt.

Die Aminosäuresequenzen der BPM Proteine weisen starke Homologien zueinander auf, mit Identitäten zwischen 47 % und 83 %, und Ähnlichkeiten von 61 bis 89 % (Abbildung 5A). Ein besonders hoher Homologiegrad läßt sich zwischen BPM1 und BPM2 (Identität 83,3 %), aber auch zwischen BPM5 und BPM6 (Identität 76 %) erkennen. In einem ungewurzelten phylogenetischen Stammbaum bilden dementsprechend jeweils BPM1 und BPM2, sowie BPM5 und BPM6 eine Gruppe. BPM3 und BPM4 bilden eigene Untergruppen, wobei BPM3 näher mit der BPM1/2 Gruppe verwandt ist, BPM4 hingegen mit der BPM5/6 Gruppe (Abbildung 5B).

Für die pflanzliche MATH-Domäne wurden bisher keine konservierten Aminosäuren beschrieben, die für spezielle Proteininteraktionen essentiell wären. Für CeMEL-26 und HsSPOP wurde der Verlust der Substratbindung durch Mutationen innerhalb der MATH-Domäne gezeigt (Luke-Glaser et al., 2007; Zhuang et al., 2009). Die betreffende Position ist jedoch nicht in den *Arabidopsis* BPM Proteinen konserviert (Abbildung 50 im Anhang). Zusätzlich ist speziell dieser Sequenzbereich im Vergleich mit CeMEL-26 und HsSPOP von geringerer Homologie, so daß hierüber kein Rückschluß auf etwaige Interaktionsmuster und Funktionen geschlossen werden kann.

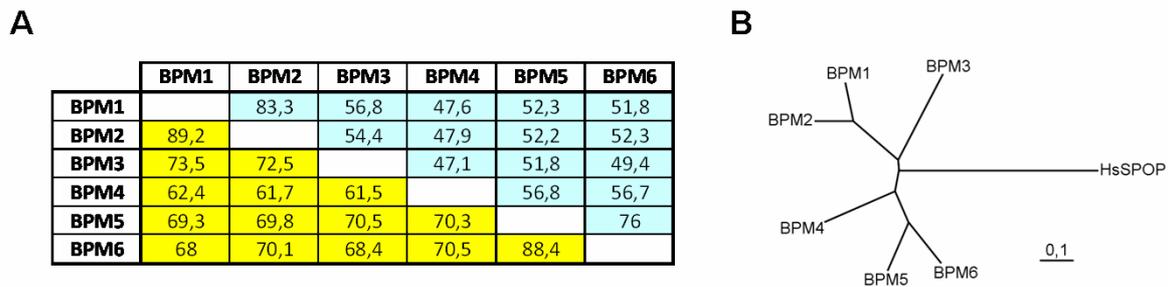


Abbildung 5: Phylogenetische Verhältnisse innerhalb der BPM Familie.

A) Identitäten (gelb) und Ähnlichkeiten (blau) der BPM Proteine in *Arabidopsis*. Es wurden die Programme CLUSTALW2 (EBI, Larkin et al., 2007) und MatGAT2.02 (Campanella et al., 2003) verwendet (Substitutionsmatrix BLOSUM62). B) Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum der *Arabidopsis* BTB-MATH Familie unter Einbeziehung des menschlichen SPOP Proteins, erstellt aus einem Alignment der vollständigen Aminosäuresequenzen mit ClustalW2 und TreeView32 (Page, 1996).

Aufgrund der starken Sequenzhomologien innerhalb der BPM Familie wurde davon ausgegangen, daß sich die sechs Mitglieder dieser Proteinfamilie in ihren Interaktionsmustern und ihrer Funktion redundant verhalten könnten.

3.2 Interaktionsanalyse innerhalb der BPM Proteinfamilie und mit CUL3 Proteinen

Trotz des hohen Homologiegrades innerhalb der Familie wurden Unterschiede im Interaktionsmuster der BPM Proteine nachgewiesen. Versuche, die während der Diplomarbeit durchgeführt wurden, hatten zum Ergebnis, daß BPM1 und BPM3 mit den *Arabidopsis* Cullinen CUL3A (At1g26830; Q9ZVH4) und CUL3B (At1g69670; Q9C9L0) interagieren können, nicht aber BPM5 und BPM6 (Weber et al., 2005). Diese Studien wurden durch weitere Tests mit dem *Yeast Two-hybrid* System (Y2H; siehe 2.3.12) ergänzt. Die Ergebnisse dieses Ansatzes sind in Abbildung 6 zusammengefaßt. Die Übersicht zeigt die gegeneinander getesteten BPM und Cullin Proteine, wobei SDII Medium der Selektion der Hefen auf Transformation diente (links) und das Hefewachstum auf SDIV Medium eine Interaktion der getesteten Proteine anzeigte (rechte Matrix; siehe 2.1.4.2). Die Hefeexperimente ergaben, daß BPM1, BPM2, BPM3 und BPM4 Homodimere bilden können, BPM5 und BPM6 nicht. Außerdem konnten die BPM Proteine bis auf Ausnahmen untereinander assoziieren; nur die Paarungen BPM2/6 und BPM5/6 zeigten keine Interaktionen.

Für BPM5 und BPM6 konnte in Hefe auch keine Interaktion mit den zwei *Arabidopsis* CUL3 Homologen CUL3A und CUL3B festgestellt werden, wohingegen BPM1, BPM2, BPM3 und

BPM4 mit beiden Proteinen interagieren konnten. Die Proteine BPM5 und BPM6 sind innerhalb der BPM Familie phylogenetisch am ähnlichsten und konnten als einzige im Y2H-System weder Homodimere bilden, noch mit CUL3A/B interagieren. Sie nehmen somit innerhalb der BPM Gruppe eine Sonderstellung ein. Zwischen CUL3A und CUL3B konnten im Rahmen dieser Experimente keine Unterschiede im Interaktionsverhalten festgestellt werden.

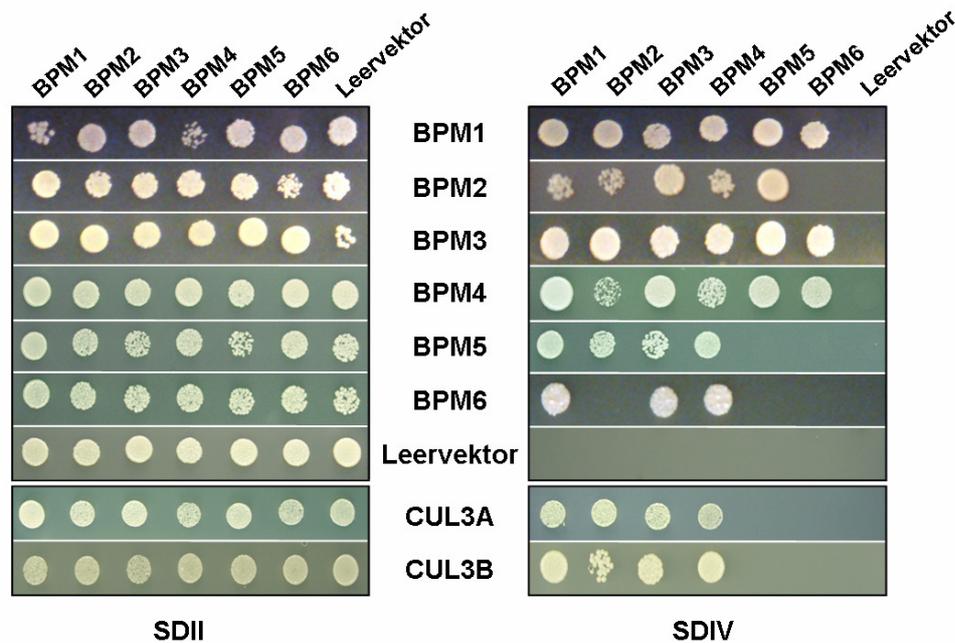


Abbildung 6: Ergebnisse der Interaktionsstudien BPM/BPM und BPM/CUL3 in Hefe.

Die BPM Proteine wurden in einer Matrix gegeneinander auf Interaktionen getestet. Die linke Matrix zeigt als Kontrolle der gelungenen Transformation das Hefewachstum auf SDII Medium. Rechts ist die Selektion auf Interaktion (SDIV Medium) zu sehen. Die BPM Proteine 1 bis 4 können Homodimere bilden, BPM5 und 6 zeigen diese Interaktion nicht. Zusätzlich sind die BPM Proteine in der Lage, mit Mitgliedern ihrer Familie zu interagieren, außer in den Kombinationen BPM2/6 und BPM5/6. Untere zwei Zeilen: Die BPM Proteine 1 bis 4 interagieren in Hefe mit den *Arabidopsis* Cullinen CUL3A und CUL3B. BPM5 und 6 zeigten keine Interaktion. Der Leervektor diente als Negativkontrolle.

Um die gefundenen Interaktionen durch die Verwendung eines weiteren Systems zu bestätigen, sollten *Pulldown*-Experimente mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteinen durchgeführt werden (siehe 2.5.6.). Hierzu wurden zunächst die cDNAs der *BPM* in den induzierbaren Expressionsvektor pDEST15 bzw. pGEX-2TK (Tabelle 12 im Anhang) kloniert. Die GST-Fusionsproteine wurden in den *E. coli* Stämmen BL21Star bzw. Rosetta2 exprimiert (Tabelle 3; Expressionsbedingungen Tabelle 15) und über GST-Agarose aufgereinigt (GST:BPM; siehe 2.5.2). Als Negativkontrolle wurde parallel exprimiertes und

aufgereinigtes GST verwendet. Abbildung 7A zeigt beispielhaft die für die Interaktionsanalysen verwendeten GST-Fusionsproteine nach SDS-PAGE und Silberfärbung (siehe 2.5.3).

Die Interaktion von BPM1 mit CUL3A und CUL3B wurde in diesem System ausführlich in Weber et al. (2005) beschrieben. Auf der Grundlage dieser früheren Ergebnisse und den Interaktionsstudien in Hefe, wurde für die weiteren Experimente stellvertretend CUL3A verwendet.

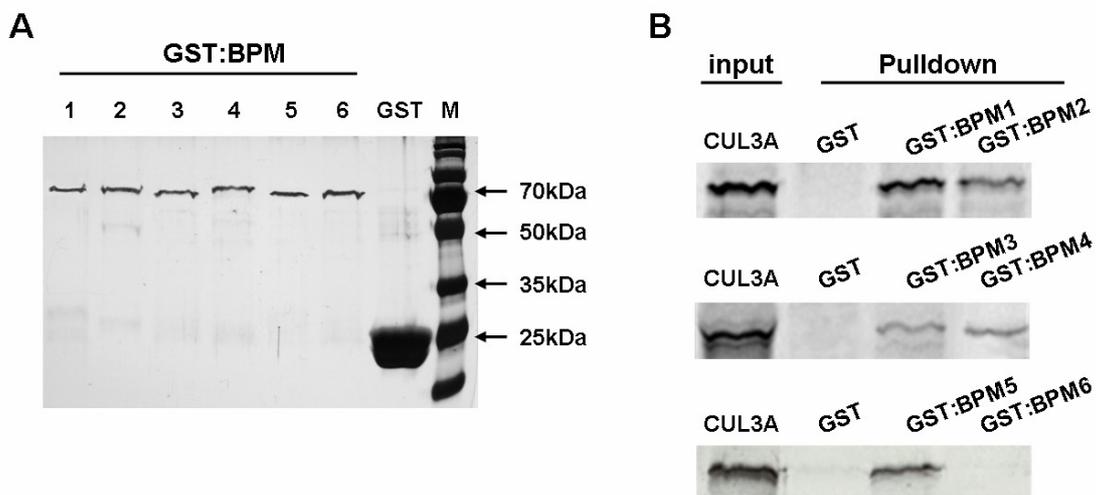


Abbildung 7: BPM Proteine können als GST-Fusionsproteine *in vitro* translatiertes CUL3A Protein copräzipitieren.

A) Mit Silber gefärbtes SDS-PAGE Gel. Es wurden Proben von an Agarose gekoppelten GST-Fusionsproteinen (BPM1-6) aufgetragen, sowie GST. M - Proteingrößenstandard. B) Das *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte CUL3a wurde von den GST-Fusionsproteinen BPM1-5 gebunden und präzipitiert, nicht jedoch von GST:BPM6 oder GST allein. Input - 1µl des eingesetzten CUL3A Translationsproduktes.

In Abbildung 7B sind Ausschnitte der Autoradiographien der entsprechenden *in vitro* Pulldown-Experimente zu sehen. Man erkennt für jeden Pulldown-Ansatz ein deutliches Signal des angebotenen radioaktiv markierten CUL3A Proteins (Input). Die mit *Pulldown* überschriebenen Spalten zeigen die Ergebnisse der Versuche, CUL3A nach Inkubation mit GST:BPM bzw. GST zu präzipitieren. Ein Signal für CUL3A wurde für die Versuchsansätze mit GST:BPM1 bis -4, aber auch für GST:BPM5 detektiert. Im Gegensatz zum Versuchsansatz in Hefe kann BPM5 hier mit CUL3A interagieren. GST:BPM6 war als einziges BPM Protein nicht in der Lage, CUL3A zu binden, was mit den Hefeergebnissen übereinstimmte.

3.3. Suche nach BPM- Interaktoren mittels Y2H cDNA library screen

Um, der Beantwortung der Frage nach der biologischen Funktion der BPM Proteine in Pflanzen näher zu kommen, wurden weitere Interaktionspartner dieser Proteine gesucht. Da sowohl die BTB- als auch die MATH-Domäne Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, wurde eine hohe Bandbreite an Interaktoren erwartet. Der Nachweis einer Interaktion der BPM Proteine mit CUL3A und CUL3B unterstützt die Hypothese, daß BPM Proteine als Substratadapter von CUL3 E3-Ligasen fungieren. Es wurden daher zusätzlich Interaktionspartner speziell der MATH-Domäne der BPM Proteine gesucht, da diese potentielle Substrate einer CUL3/BPM E3-Ligase darstellen würden. Als Methode für die aktive Suche nach BPM Interaktoren wurde das Durchmustern (*screening*) einer cDNA Expressionsbank mit Hilfe der Y2H Technik gewählt (siehe 2.3.12).

3.3.1 Auswahl und Erstellung der Y2H *bait*-Konstrukte

Es wurden zwei unabhängige *Y2H cDNA library screens* durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde BPM3 (pBTM-116-D9; GAL4-BD; Tabelle 12 im Anhang) als sogenannter Köder bzw. *bait* verwendet, da das Protein bereits zuvor starke Interaktionen in Y2H Ansätzen zu anderen BPM und auch CUL3A und CUL3B zeigte (Weber et al., 2005). Als Ergebnis dieses Experimentes wurden sowohl Interaktoren der BTB- als auch der MATH-Domäne erwartet. Um verstärkt Interaktionspartner der MATH-Domäne identifizieren zu können, wurde im zweiten *screen* ein Konstrukt ohne funktionale BTB-Domäne benötigt. Hierzu wurde in *BPM1* durch gerichtete Mutagenese das 189. Basentriplett von TTG (Lysin) in TAG (Stop) geändert. Das Konstrukt wurde im Folgenden als BPM1¹⁻¹⁸⁹ bezeichnet (Abbildung 8). Die Verwendung eines partiellen Proteins wie BPM1¹⁻¹⁸⁹ warf Fragen nach dessen korrekter Tertiärstruktur und Bindungsfunktionalität auf. Gefundene Interaktoren sollten dementsprechend auch mit einem vollständigen BPM1 getestet werden. Die Prüfung der cDNA-Bank auf Interaktoren mit zwei verschiedenen BPM Proteinen bot zusätzlich die Möglichkeit, die bisher beobachteten Übereinstimmungen in den Interaktionsprofilen der BPM Proteine weiter zu beleuchten.

Untersuchungen des Verwandtschaftsgrades zwischen BPM1 und BPM3 zeigten, daß die beiden Proteine zu fast 57% identisch sind (Abbildung 5A). Um die Verwandtschaft speziell der MATH-Domänen der BPM Proteine zu vergleichen, wurde ein Alignment der

entsprechenden Sequenzabschnitte durchgeführt. Die kalkulierten Identitäten/Ähnlichkeiten sind in Abbildung 8B zusammengefasst. Demnach sind BPM1 und BPM3 in diesem Abschnitt zu etwa 67% identisch. Der Vergleich der reinen annotierten MATH-Domäne beider Proteine (BPM1³⁸⁻¹⁵⁰, BPM3²⁹⁻¹⁴¹) ergab sogar eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 77%. Ein hoher Anteil übereinstimmender Interaktionspartner war zu erwarten.

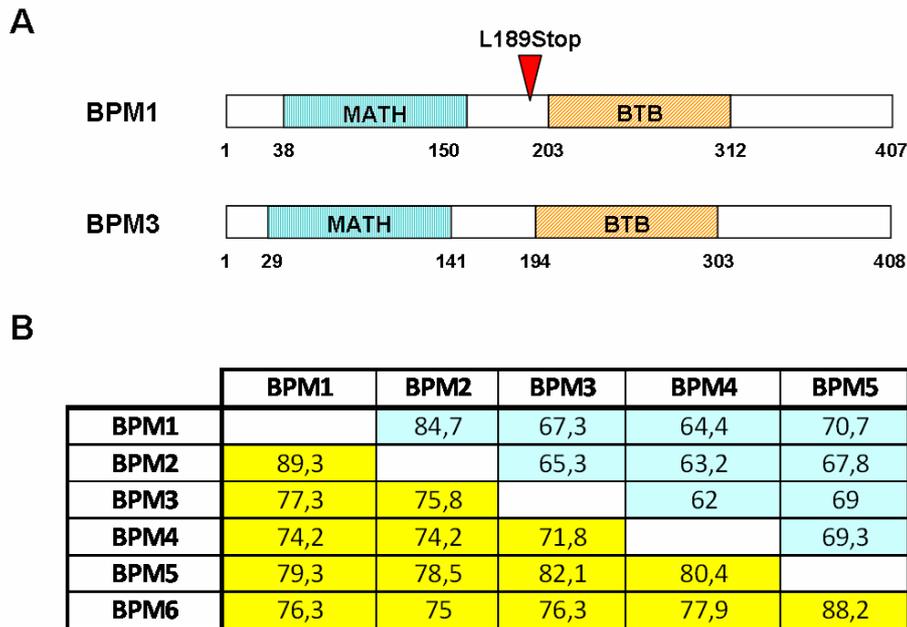


Abbildung 8: Diagramm der im Hefe-screen verwendeten Konstrukte und Sequenzanalyse der MATH-Domäne der BPM Proteine.

A) Schematische Darstellung der Struktur der beiden in den Hefe-screens verwendeten Proteine, wobei im ersten Diagramm die Mutation L189Stop durch ein Dreieck markiert ist. Zahlen - Aminosäurepositionen. B) Tabelle der berechneten Identitäten (blau) und Ähnlichkeiten (gelb) nach Alignment der MATH-Domänen der BPM (BPM1¹⁻¹⁵⁰, BPM2¹⁻¹⁴⁹, BPM3¹⁻¹⁴¹, BPM4¹⁻¹⁶³, BPM5¹⁻¹⁴⁵, BPM6¹⁻¹⁵²). Es wurden die Programme CLUSTALW2 (EBI, Larkin et al., 2007) und MatGAT2.02 (Campanella et al., 2003) verwendet (Substitutionsmatrix BLOSUM62).

3.3.2 Vorversuche und Durchführung des Hefe-screens

In einem Vorversuch wurden verschiedene cDNA-Banken (Tabelle 16) mittels einer PCR mit genspezifischen Primern daraufhin getestet, ob *BPM1*, *BPM3* und ein 3'-terminaler Bereich von *CUL3A* amplifiziert werden konnten (Abbildung 9A). Mit diesem Versuchsansatz sollte festgestellt werden, ob in den Ausgangsgeweben, die zur Herstellung der cDNA Banken dienten, die Komponenten potentieller CUL3-BPM E3 Ligasen exprimiert wurden.

Für die Hefe-*screens* wurde die cDNA-Bank einer Wurzelzellkultur von Prof. Dr. Koncz (MPI Köln; siehe 2.3.12.3) ausgewählt, da hier sowohl die *BPM* als auch ein Teilstück von *CUL3A* amplifiziert werden konnten, und außerdem die Bank mit dem verwendeten pACT2-Vektor die höchste Kompatibilität zum bereits verwendeten Y2H-System aufwies. Die Hefe-*screens* wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (2.3.12.2). Die ca. 300 primär positiven Hefeklone wurden auf SDIV Selektionsmedium mit 5 mM bzw. 10 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) auf die Stärke der Interaktion getestet. Auf Medium mit 5 mM 3-AT wuchsen insgesamt 235 Klone, auf 10 mM 45 Klone. Von den 235 Klonen, die auf 5 mM 3-AT wuchsen, wurden die *prey*-Plasmide isoliert, in *E. coli* transformiert und nach Extraktion durch eine Restriktionsanalyse weiter bestimmt (Abbildung 9B; siehe 2.3.12.4, 2.3.12.5). Basierend auf möglichst unterschiedlichen Restriktionsmustern wurden 83 *prey*-Klone ausgewählt und exemplarisch zur Sequenzierung gegeben.

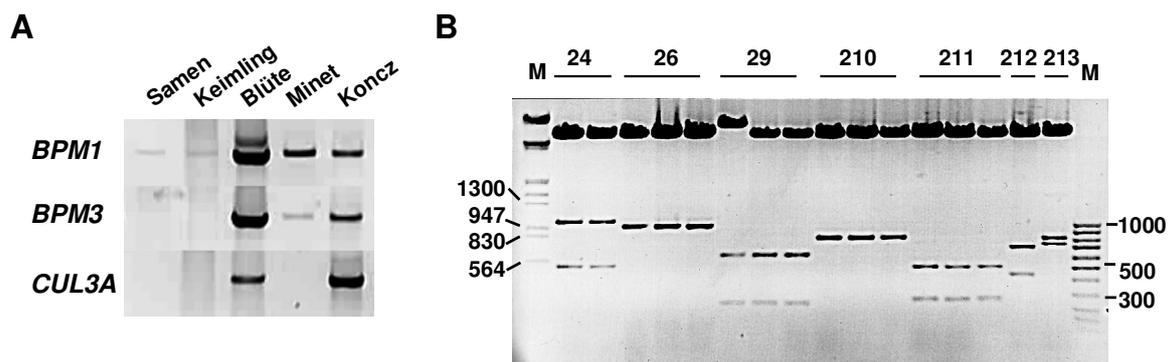


Abbildung 9: Test PCR auf verschiedene cDNA-Banken und Restriktionsverdau der cDNA Fragmente aus dem Y2H-screen.

A) Fünf cDNA-Banken [Samen, Keimling, Blüte, Minet (Keimling), Koncz (Wurzelzellkultur)] wurden per PCR-Analyse auf *BPM1*, *BPM3* und ein *CUL3A* 3'-Fragment untersucht. B) Beispielhafter Restriktionsverdau von drei Plasmiden je Hefeklon mit *BglIII/EcoRI/XbaI*. M - Größenmarker [bp].

Die durch die Sequenzierungen identifizierten cDNA sind in Tabelle 11 zusammengefaßt, welche im Folgenden kurz erläutert werden soll: In Spalte 1 wurden die Nummern von exemplarischen Hefeklonen aufgelistet (i-Nr). Durch die Anwendung der Software TAIR BLAST 2.2.8 (www.arabidopsis.org) konnten mittels der erhaltenen Sequenzen die den cDNA-Fragmenten entsprechenden AGI (*Arabidopsis Genome Initiative*) Nummern identifiziert werden (Spalte 2). Die anschließende Literaturrecherche ergab teilweise annotierte Namen der Genprodukte, die mit den entsprechenden Referenzen in Spalte 3 aufgelistet sind. Weiterführende Informationen sind in den Spalten 9 (annotierte Domänen)

und 10 (Beschreibung des Proteins bzw. der Domänenfunktion) angegeben. Die vierte Spalte gibt die Gesamtzahl der cDNA-Fragmente mit gleicher identifizierter AGI Nummer und korrektem Leseraster an. Die beiden folgenden Spalten zeigen an, wie oft das jeweilige Gen im entsprechenden Hefe-*screen* identifiziert wurde. Hierbei steht grün für eine Interaktion, rot für „keine Interaktion“.

Ein Teilergebnis der *screening*-Experimente war die partielle Überlappung der gefundenen Interaktoren für BPM1 und BPM3: Die Sequenzierung der 83 sequenzierten Hefeklone ergab 25 verschiedene cDNAs, 21 im BPM3-*screen* und 8 im Hefe-*screen* mit BPM1¹⁻¹⁸⁹. Vier der cDNAs wurden in beiden Ansätzen gefunden.

Die sequenzierten Plasmide wurden im Anschluß für weitere Y2H-Studien verwendet. Diese hatten zum Ergebnis, daß alle Interaktionspartner der BPM1-MATH-Domäne auch mit BPM3 interagieren können (Spalten 7 und 8, grün hinterlegt), aber einige der im BPM3-*screen* gefundenen Interaktoren nicht mit BPM1¹⁻¹⁸⁹ (rot hinterlegte Zellen). Dies galt unter anderem für BPM4 und BPM5, was früheren Ergebnissen entspricht, wonach die Interaktionen innerhalb der BPM-Familie durch die BTB-Domäne vermittelt werden. Die übrigen vier Interaktoren (At3g02090 [β -MPP], At5g63320, At3g25910, At3g53540), die nicht mit BPM1¹⁻¹⁸⁹ interagierten, zeigten im Test gegen das vollständige (*full length*) BPM1 eine Interaktion. Dies deutet daraufhin, daß diese Interaktionspartner ebenfalls eine BTB-Domäne benötigen, um sich mit einem BPM-Protein zusammenzulagern. Diese Proteine wurden nicht weitergehend untersucht. Insgesamt sind 25 Proteine identifiziert worden, die sowohl mit BPM1 als auch BPM3 interagieren können. Sechs dieser Interaktoren binden die BTB-Domäne, darunter zwei Mitglieder der BPM-Familie. Die gefundenen Interaktionen sollten unabhängig durch Pulldown-Versuche bestätigt werden. Hierzu wurden die gefundenen cDNA-Fragmente in den GST-Expressionsvektor pDEST15 (Tabelle 12, Expressionsbedingungen Tabelle 15) kloniert und als GST-Hybridproteine in *E. coli* Zellen (Rosetta2) exprimiert (siehe 2.5.2). Die partielle BPM1¹⁻¹⁸⁹ cDNA wurde *in vitro* translatiert und dabei radioaktiv mit [³⁵S] Methionin markiert (siehe 2.5.6).

Tabelle 11: Übersicht der Interaktoren von BPM3 und BPM11-189.

Die durchnummerierten Spalten 1-10 haben folgenden Inhalt: 1 - Klonnummer (beispielhaft); 2 - der ermittelten Sequenz des Hefeklons zugeordnete AGI Nummer, 3 - ggf. publizierter Name des Genproduktes und Referenz. 4 - Gesamtzahl der durch Sequenzierung für die jeweilige cDNA gefundenen Klone; 5/6 - Positive des Hefescreen mit BPM3 bzw. BPM1¹⁻¹⁸⁹ (grün) mit der Anzahl der identifizierten Klone. 7/8 - Ergebnisse des direkten Y2H-Ansatzes mit BPM3 bzw. BPM1¹⁻¹⁸⁹ (grün - Interaktion, rot - keine Interaktion); 9/10 - ggf. in der TAIR Datenbank annotierte Domänen/Proteinfamilien (Quelle: www.Arabidopsis.org).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
i-Nr	AGI	Identität, Referenz		BPM3	SCREEN BPM11-189	BPM3	DIREKT BPM11-189	Domäne	Beschreibung
1-4	At1g79080	RAP2.4; Okamura et al., 1997	33	15	18			AP2	CBF/DREB, Transkriptionsfaktor
3-27	At1g22190		1	1				AP2	CBF/DREB, Transkriptionsfaktor
1-3	At4g05420	DDB1a; Schroeder et al., 2002	2		2			WD40	UV-damaged DNA-binding, CUL4 Interaktor
1-8	At5g17800	MYB56; Riechmann et al., 2000	13	11	2			MYB	R2R3 type, Transkriptionsfaktor
3-39	At3g15210	ERF4; Fujimoto et al., 2000	2	2				AP2	ERF, Transkriptionsfaktor
3-28	At3g20310	ERF7; Song et al., 2005	1	1				AP2	ERF, Transkriptionsfaktor
3-83	At1g53170	ERF8; Ohta et al., 2001	1	1				AP2	ERF, Transkriptionsfaktor
1-71	At5g13180	VNI2; Yamaguchi et al., 2010	1		1			NAM	no apical meristem protein
1-81	At1g01470	LEA14; Singh et al., 2005	1		1			LEA	late embryogenesis abundant protein
3-99	At3g54320	WRI1; Russka et al., 2002	1	1				2x AP2	ovule development protein
3-104	At3g02090	β-MPP UE; Eubel et al., 2003	1	1					Metalloendopeptidase
3-105	At5g63320	NPX1; Kim et al., 2009	1	1				Bromodomain	DNA-Bindung, Transkriptionsrepressor
1-12	At3g11600		3	1	2				
3-31	At4g11420	eIF3A; Burks et al., 2001	1	1				PCI/PINT	euk. Translationsinitiationsfaktor
3-43	At4g18040	eIF4E; Rodriguez et al., 1998	3	3				eIF-4E	euk. Translationsinitiationsfaktor
3-63	At3g03740	BPM4; Weber et al., 2005	2	2				BTB, MATH	Proteinbindung
3-29	At5g21010	BPM5; Weber et al., 2005	1	1				BTB, MATH	Proteinbindung
3-34	At1g49475		3	3				B3	Transkriptionsfaktor
1-15	At2g45590		2		2				Proteinkinase
3-82	At5g13260		1	1					
3-88	At3g25910		1	1				Zinc finger/C2H2	
1-2	At2g40085		4	1	3				
3-37	At3g53540		3	3					
3-61	At1g12120		1	1				DUF863	pflanzenspezifisch
3-64	At3g13000	DUF547; Riechmann et al., 2000	1	1				DUF547	Transkriptionsfaktor

Sechs der ausgewählten Interaktoren konnten gut in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Weitere Interaktoren wurden teilweise von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe untersucht. Die *in vitro* Pulldown-Versuche (siehe 2.5.6.2) mit diesen Proteinen bestätigten die in Hefe gefundenen Interaktionen. Abbildung 10 zeigt deutliche Signale des präzipitierten BPM1¹⁻¹⁸⁹ Proteins für die Interaktoren 1-4 (RAP2.4; *Related to APETALA2.4*), 3-27 (At1g22190), 3-83 (ERF8; *Ethylene Response Factor 8*), 3-99 (WRI1; *Wrinkled1*), 3-104 (MPPBETA; *mitochondrial processing peptidase beta*) und 3-37 (At3g53540). GST wurde als Negativkontrolle verwendet.

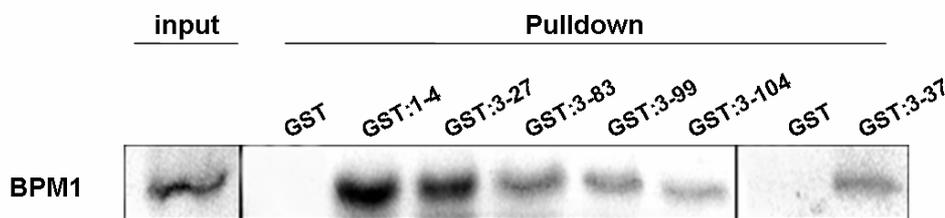


Abbildung 10: Die partiellen Interaktoren präzipitieren als GST-Fusionsproteine das *in vitro* translatierte BPM1¹⁻¹⁸⁹ Protein.

Das *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte BPM1¹⁻¹⁸⁹ wurde von den GST-Fusionsproteinen gebunden und präzipitiert, nicht jedoch von GST allein. Input - 1 µl des eingesetzten BPM1¹⁻¹⁸⁹ Translationsproduktes.

Bei Betrachtung der unter den 25 Interaktoren vertretenen Proteinfamilien fiel eine Häufung von DNA-Bindedomänen auf. Unter den elf Interaktoren mit potentieller DNA-Bindungsaktivität besitzen sechs Proteine eine, bzw. im Falle von WRI1 (*Wrinkled1*; At3g54320) zwei APETALA2-Domänen. Es fanden sich außerdem ein MYB-Transkriptionsfaktor des R2R3-Types (MYB56; At5g17800), ein Protein mit einer Bromodomäne (At5g63320), ein Zinkfinger-Protein des C2H2-Types (At3g25910), sowie ein Protein mit einer zwar unbekannt, durch ihre Struktur aber der DNA-Bindung zugeschriebenen Domäne (At3g13000; DUF547 [*domain of unknown function*]) unter den Bindungspartnern. Interessant speziell an der Bromodomäne ist ihr Auftreten in einigen Histonacetyltransferasen, wo das Motiv spezifisch acetylierte Histone bindet und so an der Chromatinremodellierung beteiligt ist (Zeng und Zhou, 2002). Zu den restlichen Interaktoren gehörte unter anderem das WD40 Protein DDB1a (At4g05420). Es wurde von Bernhardt et al. (2006) als Interaktor des Cullin Proteins CUL4 beschrieben, welches eine eigene Klasse von Cullin E3-Ligasen definiert.

3.4. BPM Proteine interagieren mit Proteinen der AP2/ERF Familie

Der am häufigsten identifizierte Interaktor war mit insgesamt 33 Klonen *Related to APETALA2.4* (*RAP2.4*; Tabelle 11). Der ORF dieses Gens umfaßt 1005 Basenpaare. Da keine Intronstruktur erkennbar war, wurde von einem 334 Aminosäuren großen Protein ausgegangen (www.Arabidopsis.org). *RAP2.4* besitzt eine *APETALA2* (AP2)-Domäne (IPR001471), charakterisiert als eine etwa 60 Aminosäuren umfassende hochkonservierte Sequenz mit DNA-Bindfunktion, die bisher hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in einigen Bakterien gefunden wurde (Okamoto et al., 1997; Riechmann und Meyerowitz, 1998; Riechmann et al., 2000; Sakuma et al., 2002; Magnani et al., 2004). Die AP2-Domäne definiert in *Arabidopsis* eine Klasse von etwa 150 Genen, die ein oder zwei AP2-Motive besitzen, und deren Genprodukte aller Wahrscheinlichkeit nach Transkriptionsfaktoren sind (Jofuku et al., 1994; Okamoto et al., 1997, Nakano et al., 2006). *RAP2.4* gehört mit einer einzelnen AP2-Domäne zur größten Familie, der *Ethylene Response Factor* (ERF) Familie mit 122 Mitgliedern (Abbildung 11). Innerhalb dieser ERF-Familie wird *RAP2.4* der Unterfamilie der *Cold Response Element Binding Factor* (CBF) / *Dehydration Response Element Binding* (DREB) Proteine zugeordnet. Zusätzlich wurde *At1g22190* als BPM3 Interaktor identifiziert, und nachträglich auch als Interaktor von BPM1 bestätigt (Tabelle 11). In einer aktualisierenden Genomanalyse aller AP2-Transkriptionsfaktoren durch Nakano et al. (2006) wurde *At1g22190* als nächster Verwandter von *RAP2.4* innerhalb der DREB Unterfamilie identifiziert. Der neuen Nomenklatur folgend gehören beide Interaktoren der Gruppe I an, mit insgesamt zehn Mitgliedern (Abbildung 13A).

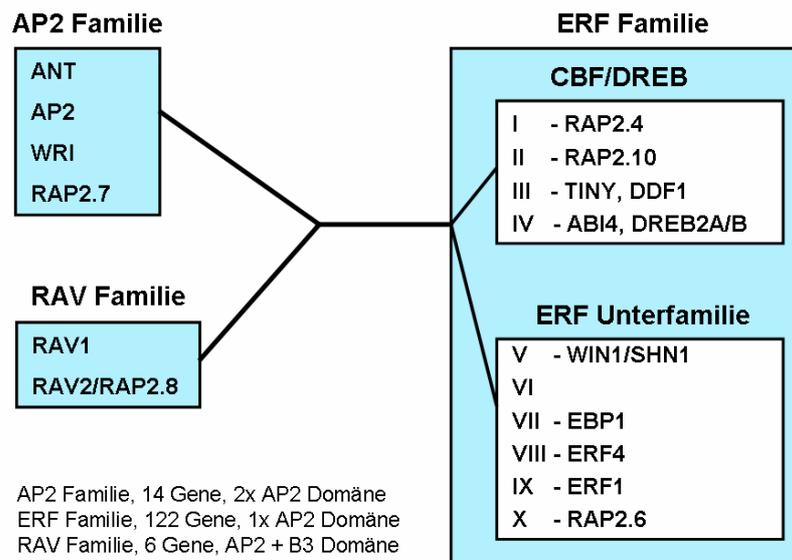


Abbildung 11: Phylogenetische Gruppierung der *Arabidopsis* Proteine mit APETALA2-Domäne.

Die APETALA2-Proteine werden in drei Familien unterteilt (blau hinterlegt): Die Mitglieder der AP2-Familie besitzen zwei AP2-Domänen, die der RAV-Familie eine AP2- und zusätzlich eine B3-Domäne (Nakano et al. 2006). Die deutlich größere ERF-Familie umfaßt die zwei Unterfamilien CBF/DREB und ERF. Der Interaktor RAP2.4 positioniert sich innerhalb der Gruppe I. Für die einzelnen Gruppen sind ggf. die Namen publizierter Vertreter angegeben.

3.4.1 RAP2.4 interagiert spezifisch mit den sechs BPM Proteinen

Die Ergebnisse der Hefe-*screens* ergaben eine Interaktion von RAP2.4 mit zwei der sechs BPM Proteine, wobei die Bindung über die MATH-Domäne vermittelt wurde (siehe 3.3.1). In Anbetracht einer prozentualen Identität der MATH-Domänen der BPM von mindestens 64% (im Vergleich mit BPM1; Abbildung 8B) schien es möglich, daß auch die anderen *Arabidopsis* BPM Proteine Bindungen mit RAP2.4 eingehen können. So wurde als nächstes die vollständige *RAP2.4* cDNA in den Expressionsvektor pDEST15 (Vektorkarte im Anhang) kloniert, und das GST-Fusionsprotein in Rosetta2 Zellen exprimiert (Expressionsbedingungen im Anhang). Das aufgereinigte GST-Hybridprotein diente anschließend für *in vitro* Pulldown-Experimente mit den restlichen Mitgliedern der *Arabidopsis* BPM Familie (Abbildung 12A). Wie die in Abbildung 12B gezeigten Resultate verdeutlichen, ist die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor innerhalb der BPM Familie unspezifisch. Somit sind alle sechs BPM Proteine potentielle Interaktoren von RAP2.4 *in planta*.

Das Ergebnis implizierte aber auch die Möglichkeit einer breiteren Interaktion von RAP2.4 mit der MATH-Domäne anderer Proteine. Für *Arabidopsis* sind zurzeit 59 MATH-Proteine annotiert. Eine phylogenetische Analyse basierend auf der Aminosäuresequenz der MATH-Domäne zeigte At1g65050 als nächstverwandtes Protein der BPM (Oelmüller et al., 2005). Das MATH-Protein wurde daher ebenfalls *in vitro* translatiert und auf eine Interaktion mit RAP2.4 getestet. In einem Pulldown-Experiment mit GST:RAP2.4 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 12B), was darauf hindeutet, daß die Interaktion von RAP2.4 mit der MATH-Domäne der BPM Proteine spezifisch ist.

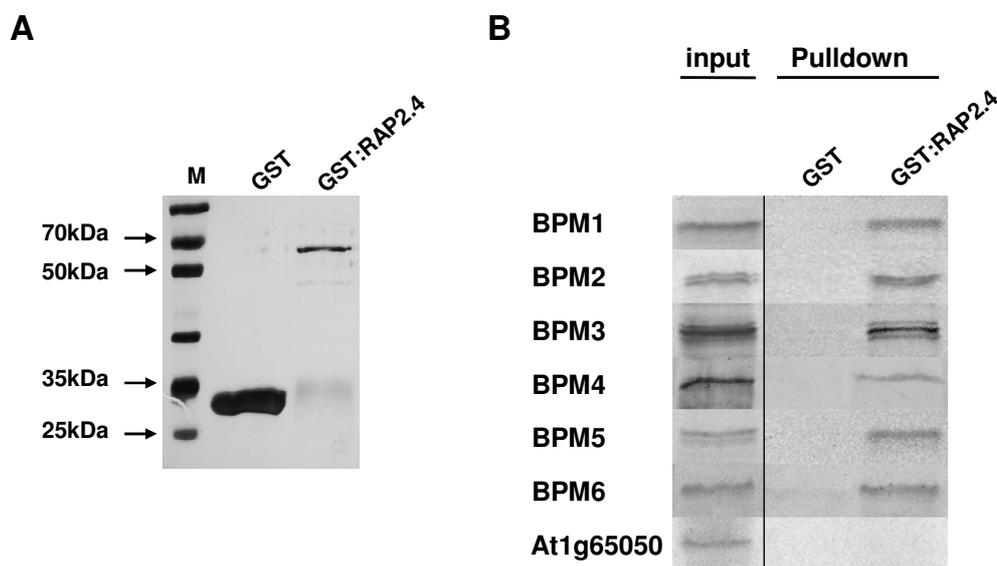


Abbildung 12: RAP2.4 interagiert im *in vitro* Pulldown-Experiment mit allen BPM, aber nicht mit einem nah verwandten MATH-Protein.

A) SDS-PAGE und Silberfärbung aufgereinigter GST bzw. GST:RAP2.4 Proteine, die für die folgenden Pulldown-Ansätze verwendet wurden. B) Pulldown-Experimente *in vitro* translaterter BPM Proteine und At1g65050 (Input; 3µl) mit GST:RAP2.4. GST wurde als Negativkontrolle verwendet.

3.4.2 BPM Proteine binden spezifisch verschiedene AP2-Proteine

Eine weitere Frage war, ob die BPM Proteine weitere Mitglieder der Gruppe I der DREB Proteine binden können. Wie dem Kladogramm in Abbildung 13A zu entnehmen ist, wurde von jeder Untergruppe der CBF/DREB Gruppe I ein Vertreter ausgewählt, um damit Interaktionsversuche mit BPM1 durchzuführen. In Abbildung 13A sind diese mit einem Stern gekennzeichnet. Drei der Proteine (At1g36060, At2g20880, At2g22200) erwiesen sich als starke Autoaktivierer im Hefesystem (Abbildung 13C). Auf Selektionsmedium mit 20mM

3-AT konnte die Autoaktivierung der Vektorkontrolle unterdrückt werden. Da auf diesem Medium auch die Interaktion mit BPM1 verloren ging, wurde dieses Ergebnis als fehlende Interaktion interpretiert. Für At4g39780 und At4g13620 konnte in Hefe eine Interaktion mit BPM1 festgestellt werden. Im *in vitro* Translationsystem (FluoroTect™ Green_{Lys}; siehe 2.5.6) konnten At4g39780, At4g13620 und At1g36060 exprimiert werden. Diese drei Proteine wurden mit GST:BPM1 getestet (Abbildung 13B). Während At4g39780 und At4g13620 mit GST:BPM1 präzipitiert wurden, war für At1g36060 kein Signal erkennbar.

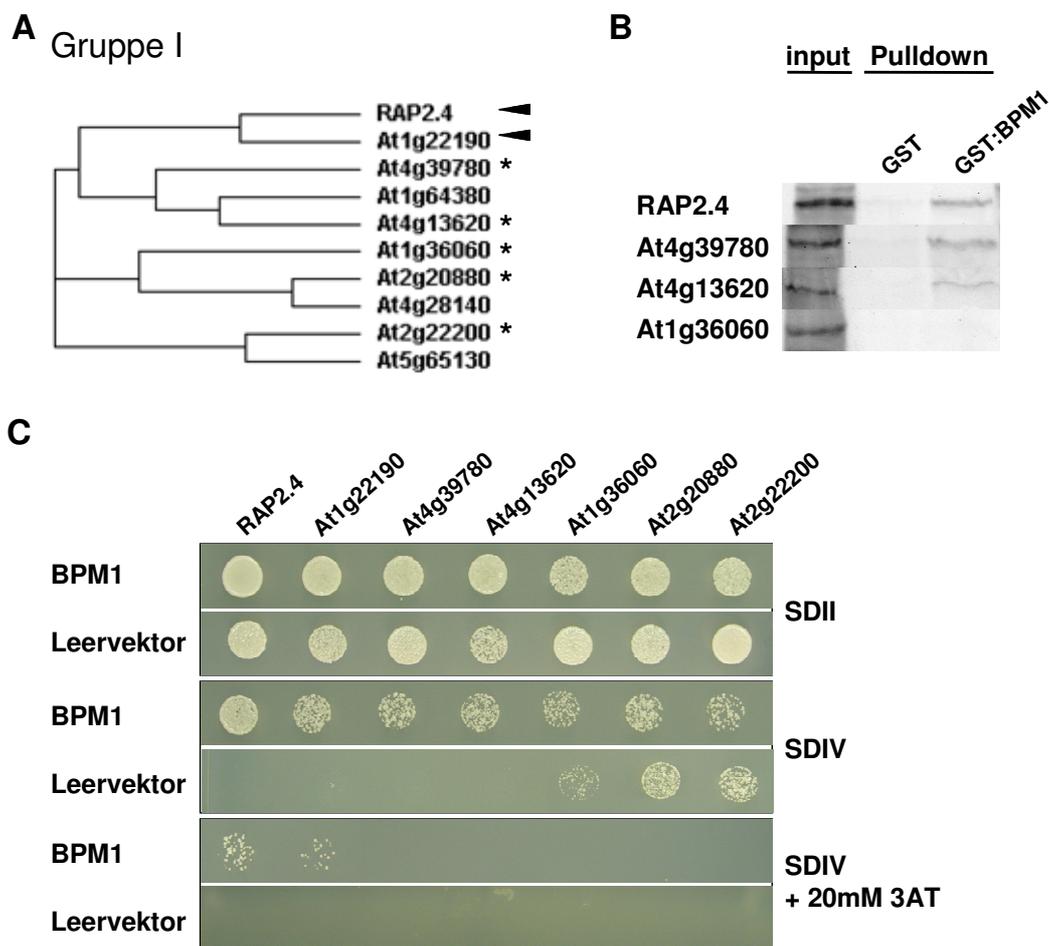


Abbildung 13: BPM1 interagiert spezifisch mit mehreren Mitgliedern der Gruppe I der CBF/DREB Proteine.

A) Phylogenetischer Stammbaum der Gruppe I der CBF/DREB Familie. Die beiden mit Dreiecken markierten Mitglieder wurden im Hefe-screen gefunden (Tabelle 11). Die mit einem Stern markierten Proteine dienen Interaktionstests. B) Nachweis der Interaktion verschiedener AP2-Proteine mit BPM1 durch Pulldown-Experimente von *in vitro* translatierten AP2-Proteinen mit GST:BPM1. C) Y2H-Interaktionstest der AP2-Proteine gegen BPM1 und den Leervektor auf verschiedenen Selektionsmedien. At1g36060, At2g20880 und At2g22200 zeigten eine starke Autoaktivierung der Leervektor-Kontrolle.

Auch wenn an diesem Punkt keine Aussage für die restlichen Mitglieder der Gruppe I getroffen werden konnte, bedeutete das Ergebnis eine Einschränkung der Interaktion der MATH-Domäne von BPM1 auf einige Mitglieder dieser Gruppe.

Der hier gezeigten Spezifität der Interaktion von BPM Proteinen mit AP2-Proteinen innerhalb der Gruppe I stehen die Ergebnisse des Hefe-*screens* gegenüber: Im Y2H-*screen* wurden verschiedene Interaktoren aus unterschiedlichen Gruppen der AP2 Superfamilie identifiziert. At3g15210 (ERF4), At3g20310 (ERF7) und At1g53170 (ERF8) gehören wie RAP2.4 mit einer einzelnen AP2-Domäne der ERF Familie an und darin der Gruppe VIII (Abbildung 11; Nakano et al., 2006). Der Interaktor At3g54320 (WRI1) mit zwei AP2-Domänen ist Mitglied der AP2 Familie, der auch das namensgebende Protein APETALA2 und der ebenso bekannte Vertreter AINTEGUMENTA (ANT) angehören (Nakano et al., 2006). Die Ergebnisse zeigen, daß die Interaktion der BPM- mit AP2-Proteinen nicht auf eine bestimmte Gruppe beschränkt ist, innerhalb einer Gruppe jedoch spezifisch sein kann.

3.4.3 RAP2.4 bildet Homo- und Heterodimere

Ein zusätzliches Ergebnis der Y2H-Studien war die Homodimerisierung von RAP2.4 (Abbildung 14A). Die Interaktion RAP2.4/RAP2.4 wurde durch ein *in vitro* Pulldown-Experiment bestätigt (Abbildung 14B).

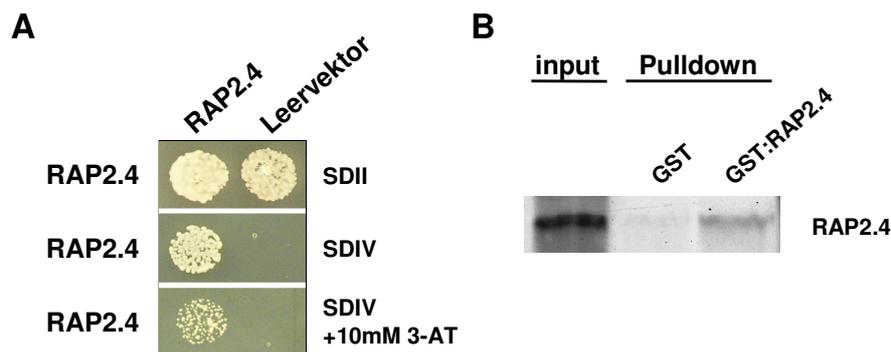


Abbildung 14: RAP2.4 bildet Homodimere im Y2H- und *in vitro* Translationssystem.

A) RAP2.4 bindet im Y2H-System RAP2.4. Als Kontrolle wurde der jeweilige Leervektor eingesetzt.
 B) Nachweis der RAP2.4/RAP2.4 Interaktion durch Pulldown-Experimente von *in vitro* translatiertem RAP2.4 (input) mit GST:RAP2.4. GST wurde als Negativkontrolle verwendet.

Es ergab sich die Frage, ob diese Interaktion mit der Interaktion RAP2.4/BPM in Konkurrenz steht. Hierzu sollte zunächst herausgefunden werden, welche Bereiche beider Proteine für die

jeweilige Bindung verantwortlich sind. Außerdem könnten durch die Identifikation der miteinander interagierenden Motive in den BPM, sowie in den APETALA-Proteinen Vorhersagen über weitere noch nicht identifizierte Interaktoren getroffen werden.

3.4.4 Die BPM/RAP2.4 Interaktion erfolgt zwischen der MATH-Domäne und einem N-terminalen Bereich von RAP2.4

Der Hefe-*screen* mit BPM1¹⁻¹⁸⁹ zeigte, daß bei der Bindung von RAP2.4 die BTB-Domäne des BPM1 Proteins keine Rolle spielte. Außerdem interagierte RAP2.4 in Y2H- und *in vitro* Pulldown-Experimenten mit allen sechs Mitgliedern der BPM Familie. Dies bedeutete einerseits, daß aus eventuellen Sequenzunterschieden der BPM keine Rückschlüsse auf den interagierenden Bereich gezogen werden konnten. Andererseits konnte im weiteren experimentellen Ansatz BPM1 stellvertretend verwendet werden, um den die Bindung von RAP2.4 vermittelnden Bereich einzugrenzen.

Das Translationsprodukt BPM1¹⁻¹⁸⁹ enthält die MATH-Domäne umgebende, zusätzliche Sequenzen (vergleiche Abbildung 4 und Abbildung 8). Der N-Terminus der BPM-Proteine vor der MATH-Domäne hat eine variable Länge von 31-49 Aminosäuren und ist weniger stark konserviert. Da RAP2.4 trotz dieser Variabilität mit jedem der sechs BPM Proteine interagieren konnte, schien es unwahrscheinlich, daß hier das entscheidende interaktionsvermittelnde Motiv liegt. C-terminal der MATH-Domäne enthält BPM1¹⁻¹⁸⁹ einen Bereich von 37 Aminosäuren, der im vollständigen Protein die beiden Protein-Protein-Interaktionsdomänen verbindet. Dieser Abschnitt ist unter den BPM Proteinen stark konserviert, im MATH-Protein At1g65050 jedoch nicht vorhanden. Es wurde deshalb *in vitro* ein weiteres partielles BPM1 Protein exprimiert, dem dieser Bereich fehlte, und das nur die ersten 151 Aminosäuren umfaßte (BPM1¹⁻¹⁵¹; Abbildung 15A).

Der Präzipitationsansatz der T7 Produkte BPM1, BPM1¹⁻¹⁸⁹ und BPM1¹⁻¹⁵¹ ergab für GST:RAP2.4 jeweils ein eindeutiges Signal (Abbildung 15B). Für alle Ansätze wurden GST:RAP2.4 bzw. GST (Negativkontrolle) aus einer Aufreinigung verwendet, wobei GST im Überschuß eingesetzt wurde. Der Versuch, weitere C-terminal verkürzte Fragmente von BPM1 zu testen, schlug fehl, da deren Expression weder im T7 System, noch als GST-Fusionsprotein etabliert werden konnte. Daher wurde ein Konstrukt erstellt, dem die ersten 87 Aminosäuren fehlten (Abbildung 15A). Im Pulldown-Experiment konnte GST:RAP2.4 das Teilprotein BPM⁸⁸⁻⁴⁰⁷ präzipitieren (Abbildung 15C).

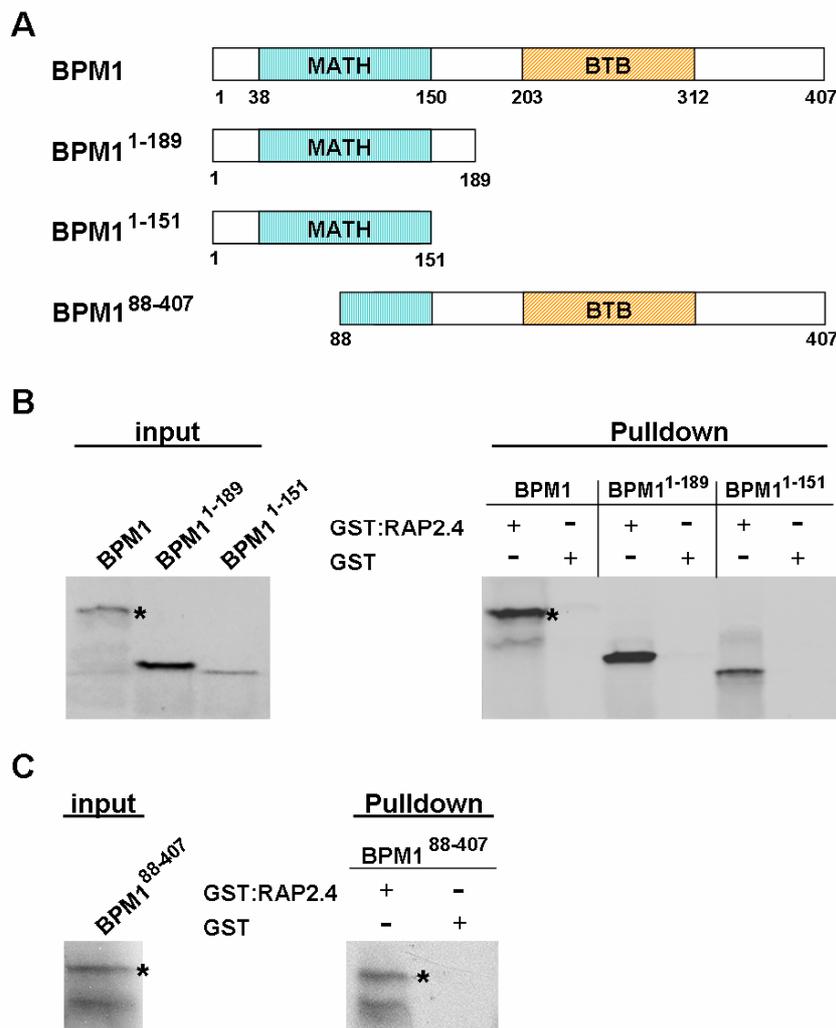


Abbildung 15: Kartierung des Bindemotivs für die Interaktion BPM/RAP2.4 im BPM1 Protein.

A) Verwendete *in vitro* translatierte partielle BPM1 Proteine mit Aminosäurepositionen. B) Links sind die Signale der verwendeten BPM1-Fragmente zu sehen (Input). Rechts sind die Ergebnisse der Präzipitationsansätze mit GST:RAP2.4 abgebildet (GST als Negativkontrolle). C) Das Fragment BPM1⁸⁸⁻⁴⁰⁷ lieferte zwei Translationsprodukte, die beide von GST:RAP2.4 präzipitiert wurden. (*-Signal mit erwarteter Laufhöhe).

Über die für die Bindung der MATH-Domäne von BPM1 verantwortliche Region des RAP2.4 Proteins konnten ebenfalls bereits Rückschlüsse aus den Y2H-Ergebnissen gezogen werden: Die Sequenzierung der isolierten *prey*-Plasmide ergab häufig, daß die codierten cDNAs nur fragmentarisch kloniert wurden, und 5'-Bereiche fehlten. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, daß die fehlenden Aminosäuren für eine Interaktion mit den BPM Proteinen nicht von Belang waren. Im Falle von RAP2.4 betraf dies die ersten 59 Aminosäuren. Auch der sehr hohe Konservierungsgrad der AP2-Domäne sprach gegen diesen Bereich als alleiniges interagierendes Motiv, denn dies hätte bedeutet, daß ein Großteil

der über 140 AP2 Proteine unspezifisch mit den BPM Proteinen interagieren würden. Da mit At1g36060 jedoch bereits ein mit RAP2.4 eng verwandtes Protein keine Interaktion zeigte, schien dies unwahrscheinlich.

Durch Informationen über den interagierenden Bereich im RAP2.4 Protein sollten Hinweise zur Funktion der RAP2.4/BPM Interaktion besonders hinsichtlich der Wirkung von RAP2.4 als Transkriptionsfaktor erlangt werden. Zusätzlich könnten mit dem entsprechenden Wissen Voraussagen zu weiteren Bindungspartnern der *Arabidopsis* BPM Familie getätigt werden.

Im Folgenden wurden verschiedene Deletionsvarianten von RAP2.4 im T7-System exprimiert und mit GST:BPM1 getestet (siehe 2.5.6). Da bereits im Y2H-*screen* N-terminal verkürzte Fragmente von RAP2.4 auftraten, wurden fortführend kürzere Versionen von RAP2.4 getestet, denen die ersten 116, 125 bzw. 134 Aminosäuren fehlten (Abbildung 16). Während die Deletion der ersten 125 Aminosäurereste (RAP2.4¹²⁵⁻³³⁴) keinen Einfluß auf die Interaktion zeigte, konnte für das Konstrukt RAP2.4¹³⁴⁻³³⁴ keine Interaktion nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden C-terminal deletierte RAP2.4 Versionen untersucht. Auch das kleinste partielle Protein RAP2.4¹⁻²¹⁴, welches direkt hinter der AP2-Domäne endete, zeigte eine Bindung von BPM1.

Die erzielten Ergebnisse legen nahe, daß das von BPM1 erkannte Motiv im mittleren Teil von RAP2.4, um den Bereich der Aminosäurereste 125-134 lokalisiert ist. Ob jedoch zusätzlich umgebende Strukturen für diese Bindung nötig sind, wäre nur durch Interaktionsstudien weiterer Konstrukte, wie z.B. RAP2.4¹⁻¹³⁵ oder mit mutagenisierten Varianten von RAP2.4 zu ermitteln. Es wurde versucht, Fragmente von RAP2.4 mit partieller bzw. fehlender AP2-Domäne zu testen. Die Expression dieser Proteine konnte jedoch weder im T7 System, noch als GST-Fusionsprotein etabliert werden.

Aus den Kartierungsversuchen kann geschlossen werden, daß die getestete Interaktion BPM1/RAP2.4 von der zweiten Hälfte der MATH-Domäne des BPM1 Proteins vermittelt wird, und ein der AP2-DNA-Bindedomäne vorgelagerter Bereich des RAP2.4 Proteins erforderlich ist. Eine Rolle der AP2-Domäne bei der Assoziation von RAP2.4 und BPM1 kann nicht ausgeschlossen werden.

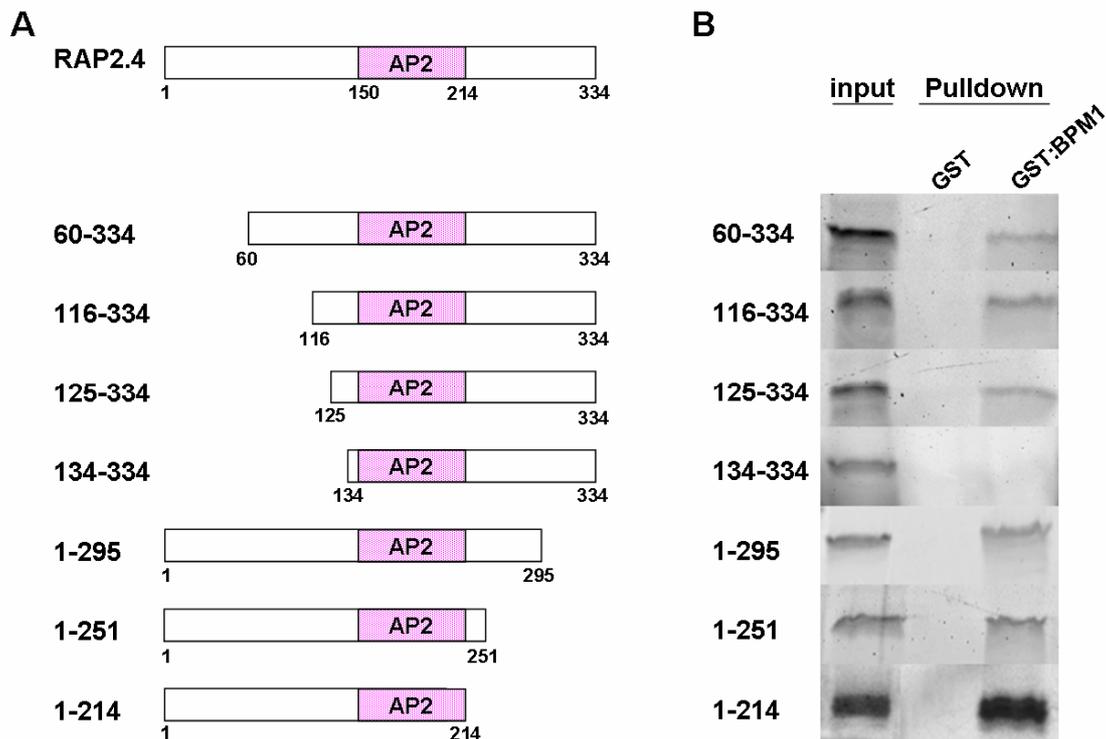


Abbildung 16: Kartierung des Bindemotivs für die Interaktion BPM/RAP2.4 im RAP2.4 Protein.

A) Balkendiagramm des Proteins RAP2.4 in voller Länge. Die Zahlen kennzeichnen Aminosäurepositionen. Die annotierte AP2-Domäne umfaßt die Aminosäuren 150-214. Darunter: Auflistung der für die Kartierung verwendeten partiellen Proteine. B) Ergebnisse der *in vitro* Pulldown-Experimente der partiellen RAP2.4 Proteine mit GST:BPM1 (GST als Negativkontrolle). RAP2.4¹³⁴⁻³³⁴ wurde durch GST:BPM1 nicht präzipitiert.

3.5 Herstellung von Überexpressionspflanzen

Transgene Pflanzen, die das zu untersuchende Protein konstitutiv und stark exprimieren, sollten verschiedene experimentelle Ansätze ermöglichen: Erstens können auf diese Weise Interaktionsstudien, wie z.B. Co-Immunopräzipitation, Pulldown-, oder *crosslinking*-Experimente durchgeführt werden, sofern die entsprechenden Antikörper zur Verfügung stehen. Zweitens kann eine erhöhte Menge bzw. verstärkte Aktivität des jeweiligen Proteins zu einem Phänotyp führen, der möglicherweise Rückschlüsse auf die biologische Funktion zuläßt.

Um eine Überexpression der eingebrachten cDNA in der Pflanze zu erreichen, wurde diese unter die Kontrolle des CaMV35S Promotors (35S) gestellt. Die jeweiligen cDNAs wurden außerdem mit einem Reporter gen transkriptionell fusioniert, dadurch wurde ein Nachweis der Hybridproteine in den Pflanzen durch kommerzielle Antikörper möglich.

Es wurden Überexpressionskonstrukte von *RAP2.4*, den sechs *BPM* und *CUL3A* hergestellt und in *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col0) transformiert (siehe 2.4.3). Für jede genannte cDNA wurden sowohl Fusionskonstrukte mit einem vierfachen myc- (pGWB18) bzw. dreifachen HA-Epitop (pGWB15), als auch mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP; pK7WGF2) generiert (Tabelle 12 im Anhang). Zusätzlich wurden C-terminale Fusionskonstrukte mit GFP (pK7FWG2) kloniert und transformiert. Von transgenen Pflanzen wurde Gesamtprotein extrahiert (siehe 2.5.1) und durch Westernblot und anschließende Immunodetektion die Expression des jeweiligen Hybridproteins getestet (2.5.4). Konnte ein Hybridprotein nachgewiesen werden, wurde die Überexpression des Gens für jeweils zwei unabhängige Linien zusätzlich durch RT-PCR bestätigt (siehe 2.3.9). Hierbei wurde sowohl semiquantitativ die Überexpression getestet (genspezifische Primer), als auch spezifisch die Expression der fusionierten cDNA (Vektorprimer in Kombination mit genspezifischem Primer). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 13 im Anhang aufgeführt.

Obwohl für mehrere Konstrukte durch Selektion auf entsprechendem Medium transgene Pflanzen isoliert wurden, konnten nur für *35S:3xHA:RAP2.4* und *35S:GFP:BPM4* Pflanzen mit eindeutiger Expression etabliert werden (Tabelle 15 im Anhang). In Abbildung 17 sind für die verschiedenen Konstrukte jeweils beispielhaft Ergebnisse eines Westernblots mit anschließender Immunodetektion des Col0 Wildtyps (wt) und drei transgenen Linien, sowie ein Gelbild der RT-PCR auf aus Rosettenblättern des Wildtyps und zweier transgener Pflanzen gewonnener RNA zusammengestellt. Beim Westernblot in Abbildung 17A für *35S:3xHA:RAP2.4* fällt neben dem als HA:RAP2.4 (ca. 40 kDa) identifizierten Signal eine zweite Bande auf, die auch beim Wildtyp zu sehen ist. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um multimere Strukturen der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Rubisco, ca. 52 kDa). Das Protein kann in Blättern einen mengenmäßigen Anteil von über 50 % ausmachen, und wurde daher wahrscheinlich allein aufgrund seiner Menge vom anti-HA Antikörper (Tabelle 2, siehe 2.5.4) unspezifisch erkannt. Ein anderes Bild zeigte sich für GFP:BPM4 - die Immunodetektion mit einem anti-GFP Antikörper ergab zwei Signale bzw. Banden, die der Wildtyp nicht zeigt (Abbildung 17B). Aufgrund ihrer Laufhöhe wurde die untere Bande als GFP:BPM4 (ca. 80 kDa) identifiziert. Die obere Bande entspricht möglicherweise einem Interaktionsprodukt von GFP:BPM4 - denkbar wäre z.B. ein Homodimer.

Die *35S:3xHA:RAP2.4* Pflanzenlinien bereiteten in den Folgegenerationen bezüglich Selektivität und stabiler Expression immer wieder Probleme. Daher wurde für *RAP2.4* zusätzlich ein Konstrukt *RAP2.4:4xmyc* durch mehrstufige PCR und anschließende klassische

Klonierung hergestellt und in den binären Vektor pCB302-3 (Primer Tabelle 13; 2.3.11; Abbildung 48 im Anhang) unter die Kontrolle des 35S-Promotors kloniert. Unter Verwendung eines monoklonaren anti-myc Antikörpers (Tabelle 2) konnten erneut mehrere unabhängige transgene Pflanzenlinien identifiziert werden (Abbildung 17C), die sich in ihrer Expression als stabil erwiesen.

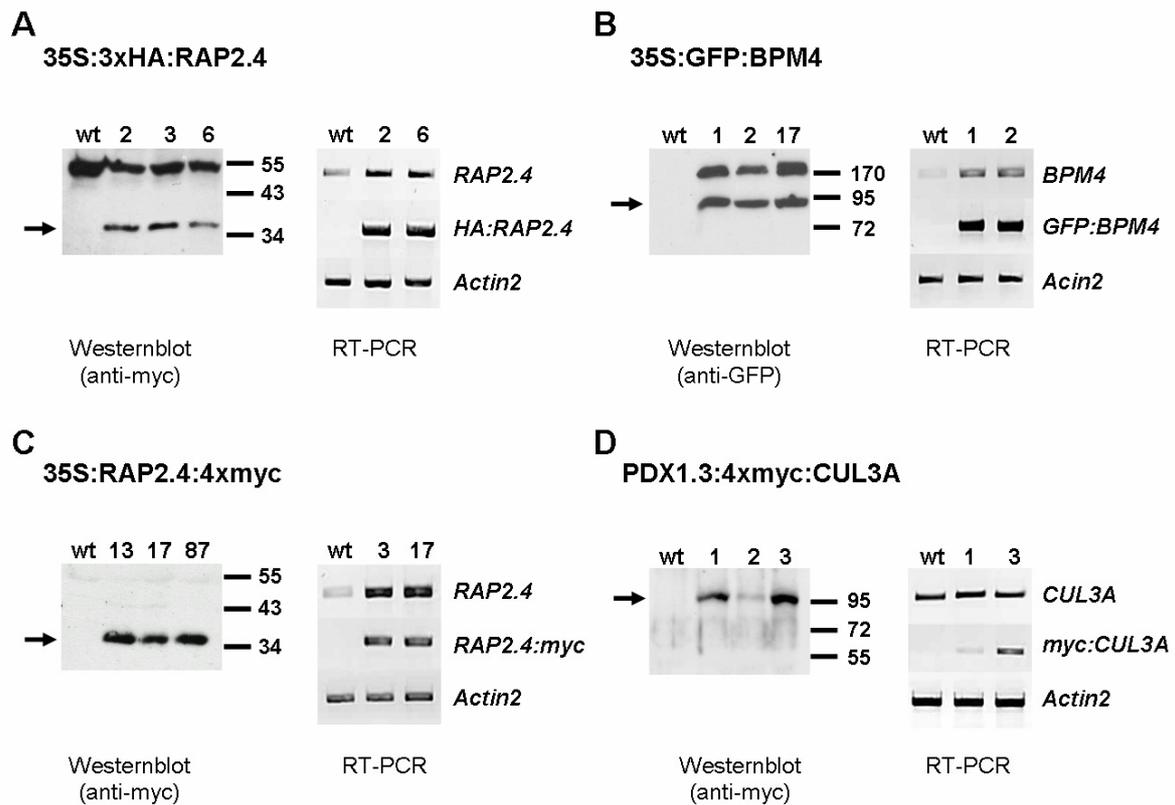


Abbildung 17: Nachweis der Überexpression verschiedener Hybridproteine in *A. thaliana* auf Protein- und RNA-Ebene.

Für jedes Konstrukt (A-D) ist jeweils links der Ausschnitt eines Immunoblots auf Gesamtprotein des Wildtyps (wt) und drei transgener Linien zu sehen (Balken rechts – Größenmarker [kDa]). Der Pfeil auf der linken Seite kennzeichnet das Signal des jeweiligen erwarteten monomeren Hybridproteins. Jeweils rechts ist das Ergebnis einer RT-PCR auf Wildtyp-RNA und zwei ausgesuchte transgene Linien gezeigt. Es wurden genspezifische Primer verwendet (jeweils Zeile 1), bzw. ein genspezifischer Primer in Kombination mit einem vektorspezifischen Primer (Zeile 2). Als Kontrolle diente *Actin2* (At5g09810; Zeile 3). Es wurden folgende kDa-Zahlen für die Hybridproteine berechnet: A) 3xHA:RAP2.4 = 40kDa; B) GFP:BPM4 = 80kDa; C) RAP2.4:4xmyc = 42kDa; D) 4xmyc:CUL3A = 92kDa.

Nachdem es nicht möglich war, *CUL3A* in Pflanzen unter dem 35S-Promotor konstitutiv zu exprimieren, wurde als alternativer Ansatz der 35S-Promotor des Vektors pGWB18 durch den Promotor des *PDX1.3* Gens (At5g01410) ersetzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.E. Leuendorf, Abbildung 48 im Anhang). Der Promotor *PDX1.3* zeigte eine starke Aktivität in Keimlingen, Rosettenblättern und caulinen Blättern (Wagner et al., 2006). In für *PDX1.3:4xmyc:CUL3A* transgenen Pflanzen konnte in mehreren unabhängigen Linien myc:CUL3A detektiert werden (Abbildung 17D). Diese wurden später für Interaktionsstudien verwendet.

Die verschiedenen Überexpressionslinien zeigten keine offensichtlichen Veränderungen in ihren morphologischen Merkmalen oder ihrer Entwicklung.

3.5.1 Interaktionsstudien mit *in planta* exprimierten Hybridproteinen

3.5.1.1 Pulldown-Experimente mit 35S:GFP:BPM4 Pflanzenextrakt (*A.thaliana*)

Für die Pulldown-Versuche wurden an Glutathion-Agarose gekoppelte GST-Fusionsproteine mit Gesamtproteinextrakt von Rosettenblättern der 35S:GFP:BPM4 Pflanzen inkubiert (siehe 2.5.6.3). Nach mehrmaligem Waschen, SDS-PAGE und anschließendem Westernblot wurde versucht, durch Verwendung eines anti-GFP Antikörpers das GFP-BPM4 Protein nachzuweisen. Die Experimente ergaben zunächst eine klare Präzipitation von GFP:BPM4 mit GST:BPM4, GST:BPM5 und GST:BPM6 (Abbildung 18A und C), was den Ergebnissen der Hefeinteraktionsstudien in Abbildung 6 entspricht. Für BPM1, BPM2 und BPM3 konnte hingegen kein Signal detektiert werden (Abbildung 18A und B), obwohl in Hefe Interaktionen gezeigt wurden (siehe Abschnitt 3.2). Eine Interaktion von RAP2.4 mit BPM4 wurde ebenfalls zuvor durch *in vitro* Pulldown-Experimente gezeigt (Abschnitt 3.4.1), konnte mit GFP:BPM4 jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 18A).

Der Pulldown mit GST:CUL3A (Abbildung 18D) erzeugte ein starkes Signal für GFP:BPM4 (Pfeil), zusätzlich aber auch eine weitere höhere zweite Bande (zwei Sterne), bei etwa 130kDa. Bei genauerer Betrachtung ist das Signal des Pulldowns mit GST:CUL3A eine Doppelbande, was auf eine modifizierte Form von GFP:BPM4 hinweist. Die Interaktion wurde zuvor im Y2H-System und durch *in vitro* Ansätze gezeigt (Abschnitt 3.2).

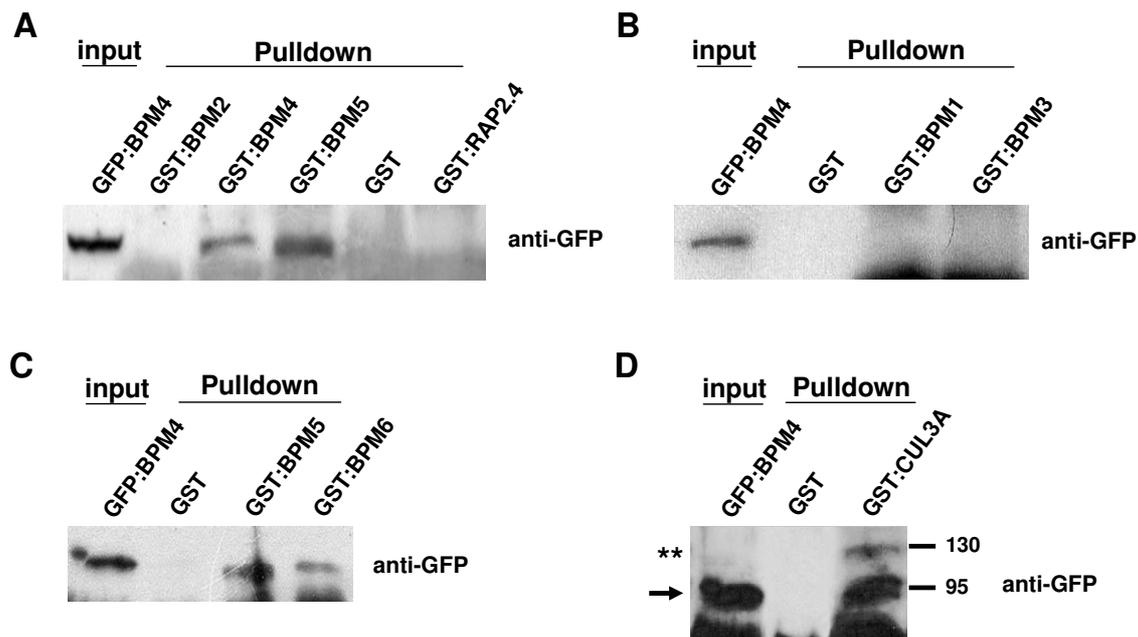


Abbildung 18: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen in transgenen 35S:GFP:BPM4 Arabidopsis Pflanzen.

A) Verschiedene GST-Fusionsproteine von BPM können in Pflanzen exprimiertes GFP:BPM4 präzipitieren. B) GST:CUL3A kann GFP:BPM4 binden (Pfeil = Signal erwarteter Laufhöhe, ** = höhermolekulare Bande, Größenmarker [kDa]). GST als Negativkontrolle.

3.5.1.2 Pulldown-Experimente mit PDX1.3:myc:CUL3A Pflanzenextrakt (*A. thaliana*)

In Abbildung 19A ist das Ergebnis eines Pulldown-Ansatzes in PDX1.3:myc:CUL3A Pflanzenextrakt gezeigt. Es ist deutlich ein Signal für die Präzipitation von myc:CUL3A mit GST:BPM1, aber auch mit GST:RAP2.4 zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigte, daß GST:BPM1 mit *in planta* exprimiertem CUL3A Protein interagieren kann, was vorangegangene Ergebnisse aus Y2H-Experimenten und Ansätzen mit *in vitro* translatierten Proteinen bestätigte. Eine Interaktion von CUL3A mit RAP2.4 wurde im Hefesystem nicht beobachtet (Abbildung 19B). Eine direkte Interaktion zwischen RAP2.4 und CUL3A ist aufgrund der Domänenstruktur der beiden Proteine nicht zu erwarten bzw. funktional erklärbar. Vielmehr spricht die Präzipitation von myc:CUL3A durch GST:RAP2.4 für eine Komplexbildung, die potentiell durch endogene BPM Proteine hergestellt wird, und dem Modell einer CUL3-BPM-RAP2.4 E3 Ligase entsprechen würde.

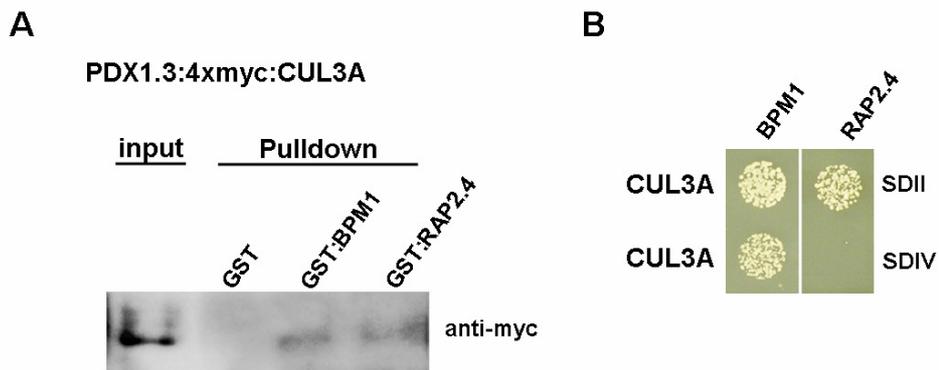


Abbildung 19: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen in transgenen *PDX1.3:4xmyc:CUL3A* Arabidopsis Pflanzen.

A) GST:BPM1 und GST:RAP2.4 waren in der Lage myc:CUL3A zu präzipitieren. GST wurde als Kontrolle verwendet. B) Im Y2H-Versuch interagieren CUL3A und BPM1, aber nicht CUL3A und RAP2.4.

3.5.1.3 Pulldown-Experimente in *35S:RAP2.4:myc* Pflanzenextrakt (*N. benthamiana*)

Das *35S:RAP2.4:4xmyc* Konstrukt wurde auch für die transiente Expression in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) verwendet (siehe 2.4.5). Drei Tage nach der Infiltration wurden die entsprechenden Blätter geerntet und der Proteinextrakt für Copräzipitationsexperimente (siehe 2.5.6.3) genutzt. Wie in Abbildung 20 erkennbar ist, konnte RAP2.4:myc durch GST:BPM1 und GST:RAP2.4, aber nicht GST präzipitiert werden.

Die Pulldown-Experimente mit GST-Hybridproteinen in Pflanzenextrakten bestätigten zu großen Teilen die zuvor im Y2H-System und in *in vitro* Pulldown-Experimenten gefundenen Interaktionen (BPM4/BPM4, BPM4/BPM5, BPM4/BPM6, BPM4/CUL3A, CUL3A/BPM1, RAP2.4/BPM1 und RAP2.4/RAP2.4). In einigen Fällen (BPM4/BPM1, BPM4/BPM2, BPM4/BPM3 und BPM4/RAP2.4) konnte eine Interaktion nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurde myc:CUL3A durch GST:RAP2.4 präzipitiert, was für ein vermittelndes Protein im Pflanzenextrakt, und somit eine Komplexbildung *in planta* spricht.

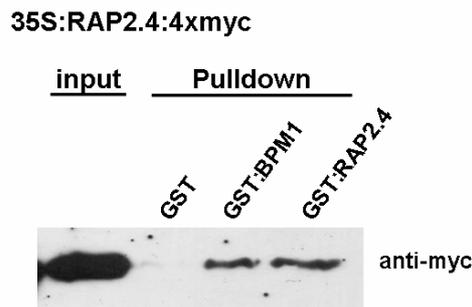


Abbildung 20: Pulldown-Experimente von GST-Fusionsproteinen mit transient exprimiertem RAP2.4:myc Protein.

Sowohl GST:BPM1 als auch GST:RAP2.4 können transient in Tabakblättern exprimiertes RAP2.4:myc binden. GST wurde als Negativkontrolle verwendet.

3.5.2 Untersuchungen zur Proteinestabilität von RAP2.4:myc und GFP:BPM4

Die *Arabidopsis* BPM Proteine sind potentielle Substratadaptoren von CUL3-E3 Ligasen, und der Transkriptionsfaktor RAP2.4 ist aufgrund seiner Interaktion mit der MATH-Domäne von BPM1 ein mögliches Substrat einer CUL3-BPM-E3 Ligase. Die verfügbaren transgenen Linien *35S:GFP:BPM4* und *35S:RAP2.4:myc* wurden daher zusätzlich verwendet, um die Stabilität der Hybridproteine in Abhängigkeit vom 26S Proteasom zu testen. Hierzu sollte durch die Zugabe von Cycloheximid (CHX, in Ethanol gelöst) die Translation gehemmt und der Anteil des Hybridproteins am Gesamtproteingehalt durch Westernblot-Analyse in einer Zeitreihe bestimmt werden. Um herauszufinden, ob ein eventueller Abbau tatsächlich von der Aktivität des 26S Proteasoms abhängig ist, wurden zum Vergleich Proben zusätzlich mit dem spezifischen Proteasomhemmer MG132 (in DMSO gelöst) behandelt. Für die Experimente wurden jeweils fünf zehn Tage alte Keimlinge aus Sterilkultur (siehe 2.4.1) in eine 5 ml Flüssigkultur (ATS, siehe 2.1.4.3) transferiert und final 10 µM CHX bzw. 100 µM MG132 hinzugefügt. Um die Wirksamkeit des MG132 zu garantieren, wurden die entsprechenden Proben mit einem Vorlauf von fünf Stunden inkubiert, erst dann wurde das CHX zugegeben und die Zeitreihe gestartet. Als Kontrolle wurde eine Probe mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt.

Um die Aufnahme der Chemikalien in die Pflanzenzellen und ihre Wirksamkeit zu testen, wurde ein Teil der behandelten Keimlinge für eine RNA-Extraktion verwendet und eine RT-PCR (siehe 2.3.9) auf das Markergen *IAA5* (At1g15580) durchgeführt (Tabelle 13). Die Transkription von *IAA5* wird durch einen instabilen Repressor verhindert, dessen Abbau

durch das 26S Proteasom kontrolliert wird. Die Zugabe von CHX blockiert die Synthese des Repressors und induziert so die Expression von *IAA5* (Theologis et al., 1985). Eine gleichzeitige Blockierung der Degradation des Repressors durch Zugabe von MG132 erhöht die Stabilität vorhandener Repressorproteine, wodurch die *IAA5* Transkription wiederum gehemmt wird. In Abbildung 21 ist deutlich eine Hochregulation der *IAA5* Transkriptmenge bei Zugabe von CHX zu erkennen. Die zusätzliche Behandlung mit MG132 hebt diesen Effekt auf.

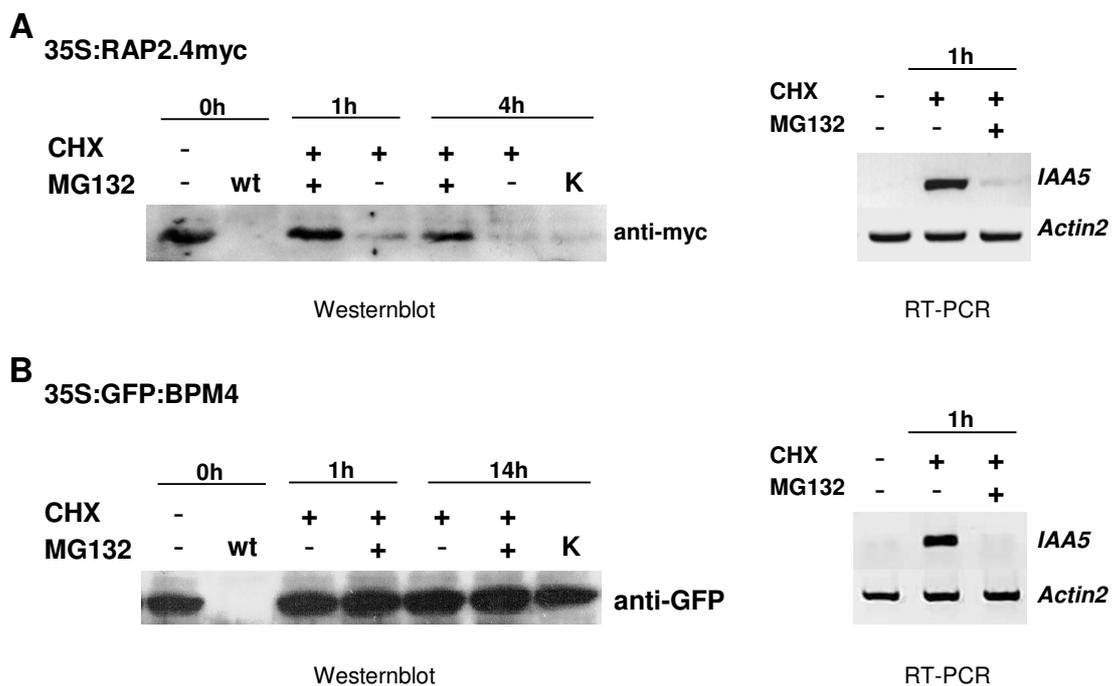


Abbildung 21: Test der Proteinstabilität RAP2.4:myc und GFP:BPM4 in Abhängigkeit vom 26S Proteasom.

Zehn Tage alte Keimlinge wurden mit Cycloheximid (CHX) bzw. MG132 behandelt, und zu verschiedenen Zeitpunkten beprobt. A) Links: Immunoblot der behandelten 35S:RAP2.4:myc Keimlinge 1h und 4h nach Zugabe von CHX (je 30µg Gesamtprotein; die 34 kDa Bande des Größenstandards ist markiert). Rechts: RT-PCR auf RNA der behandelten Keimlinge. B) Links: Immunoblot der behandelten 35S:GFP:BPM4 Keimlinge, beispielhaft nach 1h und 14h Behandlung. Rechts: RT-PCR auf RNA der behandelten Keimlinge. K - DMSO als Kontrolle für MG132.

RAP2.4 erwies sich als sehr kurzlebiges Protein. Bei einer Auftragung von 30 µg Gesamtprotein je Probe konnte bereits nach einer Stunde eine starke Abnahme des detektierbaren Signals festgestellt werden (Abbildung 21A). Keimlinge, die zusätzlich mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt wurden, zeigten in der Immunodetektion auch nach vier Stunden eine gut detektierbare Menge an RAP2.4:myc Protein. Es konnte demnach

durch die Inhibierung des 26S Proteasoms der Abbau des RAP2.4myc Proteins aufgehoben werden. GFP:BPM4 zeigte nach 14h keine Änderung in der detektierbaren Proteinmenge (Abbildung 21B). Längere Inkubationszeiten wurden nicht getestet.

Um tatsächlich eine Verknüpfung zwischen dem Abbau von RAP2.4 und einer CUL3-E3 Ligase herstellen zu können, müßte eine Stabilisierung des RAP2.4 Proteins in *cul3*-Mutanten gezeigt werden. Da laut bisherigem Wissensstand die beiden *Arabidopsis* CUL3 Proteine CUL3A und CUL3B funktional redundant sind, müßte für den beschriebenen Ansatz eine Doppelmutante verwendet werden. Die kombinierte Ausschaltung beider Gene ist jedoch embryolethal (Thomann et al., 2005). Um diesem Problem beizukommen, kreuzten Thomann et al. (2009) eine beschriebene *cul3b-1* Nullmutante (GABI_003D02) mit einem mutierten Allel von *CUL3A cul3a-3* (SALK_012973; Abbildung 22A). Die *cul3a-3* Mutanten produzieren nicht nur deutlich weniger Transkript, sondern das synthetisierte Protein ist in einer spezifischen Modifikation gestört: Aktive Cullin-E3 Ligasen benötigen eine zyklische Modifikation/Demodifikation mit dem ubiquitinähnlichen Protein *Related to Ubiquitin* (RUB; für einen Überblick Bosu und Kipreos, 2008). Das mutierte CUL3A Protein ist hyper-rubyliert und weniger zugänglich für eine Derubylieung, weshalb man davon ausgehen kann, daß das vorhandene CUL3A in seiner Funktion weitgehend gestört ist. Homozygote *cul3b-1/cul3a-3* Pflanzen, des Weiteren *cul3-hypomorph* (*cul3^{hyp}*) genannt, zeigen verschiedene Störungen in ihrer Entwicklung, sind aber vital und fertil. Samen dieser Doppelmutante wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. P. Genschik (IBMP-CNRS Institute, Straßburg). Der korrekte Genotyp der Pflanzen wurde grundsätzlich durch PCR bestimmt (Abbildung 22B). Um die veröffentlichten Transkriptlevel einmalig zu bestätigen, wurde eine RT-PCR auf zwei homozygote Linien mit den in Abbildung 22A angegebenen Primern durchgeführt (Abbildung 22C, Primersequenzen Tabelle 13). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 13 im Anhang aufgelistet.

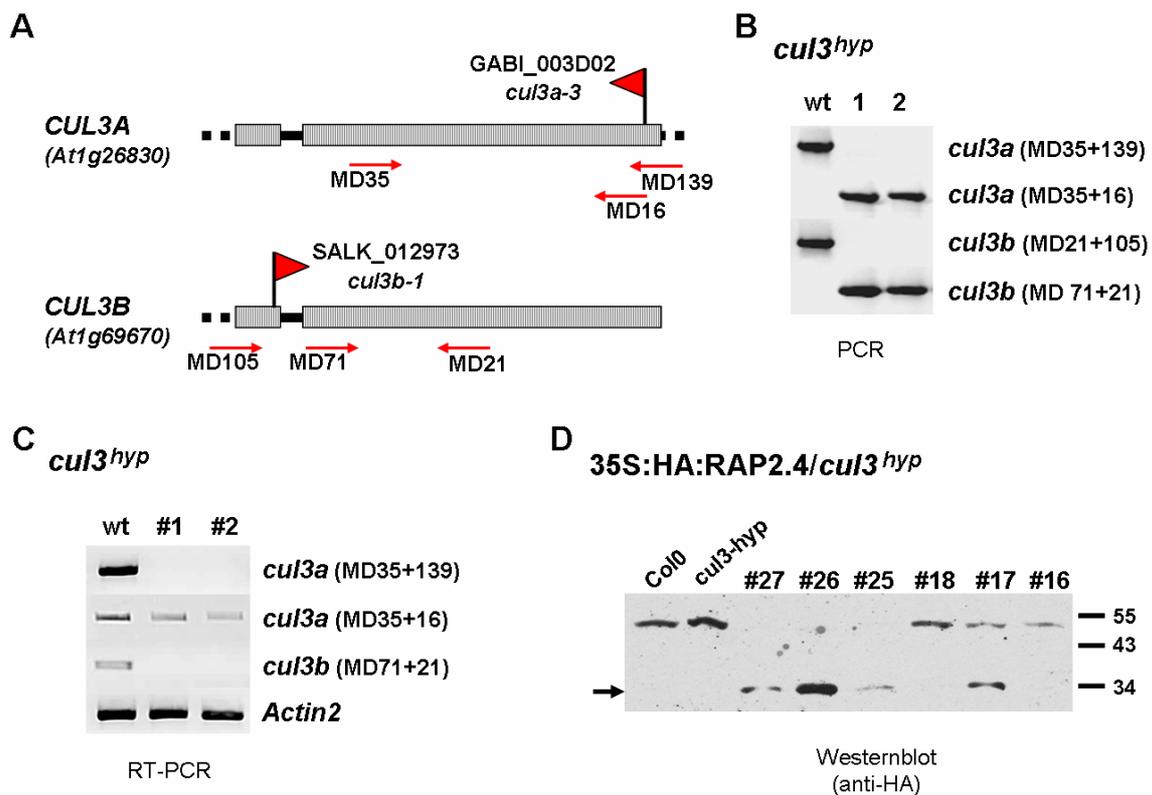


Abbildung 22: Generierung transgener Pflanzen 35S:HA:RAP2.4/*cul3^{hyp}*.

A) Genstruktur von *CUL3A* und *CUL3B* mit Lage der T-DNA Insertionen *cul3a-3* und *cul3b-1*. Zusätzlich sind die zum Nachweis des *cul3^{hyp}* Genotyps verwendeten Primer (rote Pfeile) angegeben. B) Gelbild der PCR zum Nachweis des *cul3^{hyp}* Genotyps. C) RT-PCR zum Nachweis der Expression *CUL3A/CUL3B* im *cul3^{hyp}* Hintergrund. D) Immunoblot einiger Linien 35S:HA:RAP2.4/*cul3^{hyp}* (T1 Generation). Pfeil - erwartete Laufhöhe HA:RAP2.4 laut Größenstandard [kDa].

Es konnte bestätigt werden, daß für ein verkürztes *CUL3A* Transkript gebildet wurde, während *CUL3B* Transkript nicht nachgewiesen werden konnte. Pflanzen mit *cul3^{hyp}* Genotyp wurden mit homozygoten Linien 35S:RAP2.4:*myc* und 35S:HA:RAP2.4 gekreuzt (siehe 2.4.4). Durch Westernblot-Analyse konnten in der T1 Generation transgene Linien 35S:HA:RAP2.4/*cul3^{hyp}* mit Expression des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 22D). Es konnte jedoch kein Versuch zu einer veränderten Stabilität des RAP2.4 Proteins durchgeführt werden.

3.6 Subzelluläre Lokalisation

3.6.1 Subzelluläre Lokalisation der BPM Proteine

Im Zuge der Charakterisierung der BPM Familie sollte auch die Lokalisation der Proteine in der Zelle untersucht werden, da sie entscheidend für die Funktion der Proteine sein kann. Zunächst wurde versucht, stabile transgene *Arabidopsis* Pflanzen für *35S:GFP:BPM* (*pK7F2WG*) bzw. *35S:BPM:GFP* (*pK7FWG2*) zu generieren, um sie anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren. Für BPM1, BPM2, BPM4 und BPM5 wurden transgene Pflanzen auf antibiotikahaltigem Medium selektiert (Tabelle 15). Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, konnten aber durch Westernblot-Analysen außer für BPM4 keine Pflanzen identifiziert werden, die GFP Fusionsproteine konstitutiv exprimierten. Alle transgenen Linien wurden auch mikroskopisch auf Fluoreszenz untersucht (siehe 2.4.7), ebenfalls mit negativem Ergebnis.

Als alternativer Ansatz wurde der Nachweis der transienten Expression in Tabakblättern gewählt (siehe 2.4.5). Hierfür wurden sowohl N- als auch C-terminalen Fusionskonstrukte verwendet. Für die anschließende Analyse der Lokalisation in Blattepidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* wurde die konfokale Lasermikroskopie eingesetzt (siehe 2.4.7). Das fluorophore GFP Protein wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt und die Emission im Bereich 510-550 nm (Maximum 514nm) abgenommen. Das GFP-Signal ist in den folgenden Abbildungen in grüner Farbe dargestellt. Zusätzlich wurde teilweise die von den Chloroplasten ausgehende Autofluoreszenz bei 550-650 nm abgenommen, um eventuelle Kolokalisationen erkennen zu können, sowie Größenverhältnisse aufzuzeigen. Die Autofluoreszenz ist in den Abbildungen als rotes Signal zu sehen. Es wurde für keines der untersuchten Proteine eine Kolokalisation mit den Chloroplasten gesehen.

Die transiente Expression von GFP:BPM1 und GFP:BPM2 ergab eine exklusive Lokalisation im Nukleus (Abbildung 2323A und Abbildung 24A). Die Kernidentität konnte durch eine Färbung der DNA in den Zellkernen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bestätigt werden (Abbildung 23B und Abbildung 24B; siehe 2.4.7). Der DAPI-Farbstoff bindet vorzugsweise doppelsträngige DNA und zeigt dann bei Anregung mit 358 nm ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 461 nm, was als blaues Signal gezeigt wird.

Bei starker Vergrößerung der Nuklei mit GFP-Signal war zu erkennen, daß es sich nicht um ein gleichmäßig diffuses Signal handelte, sondern um mehrere helle Punkte (Abbildung 23C und Abbildung 24C). Bei Verwendung der C-terminalen Fusionskonstrukte war die punktuelle Lokalisation noch deutlicher erkennbar (Abbildung 23D und Abbildung 24D).

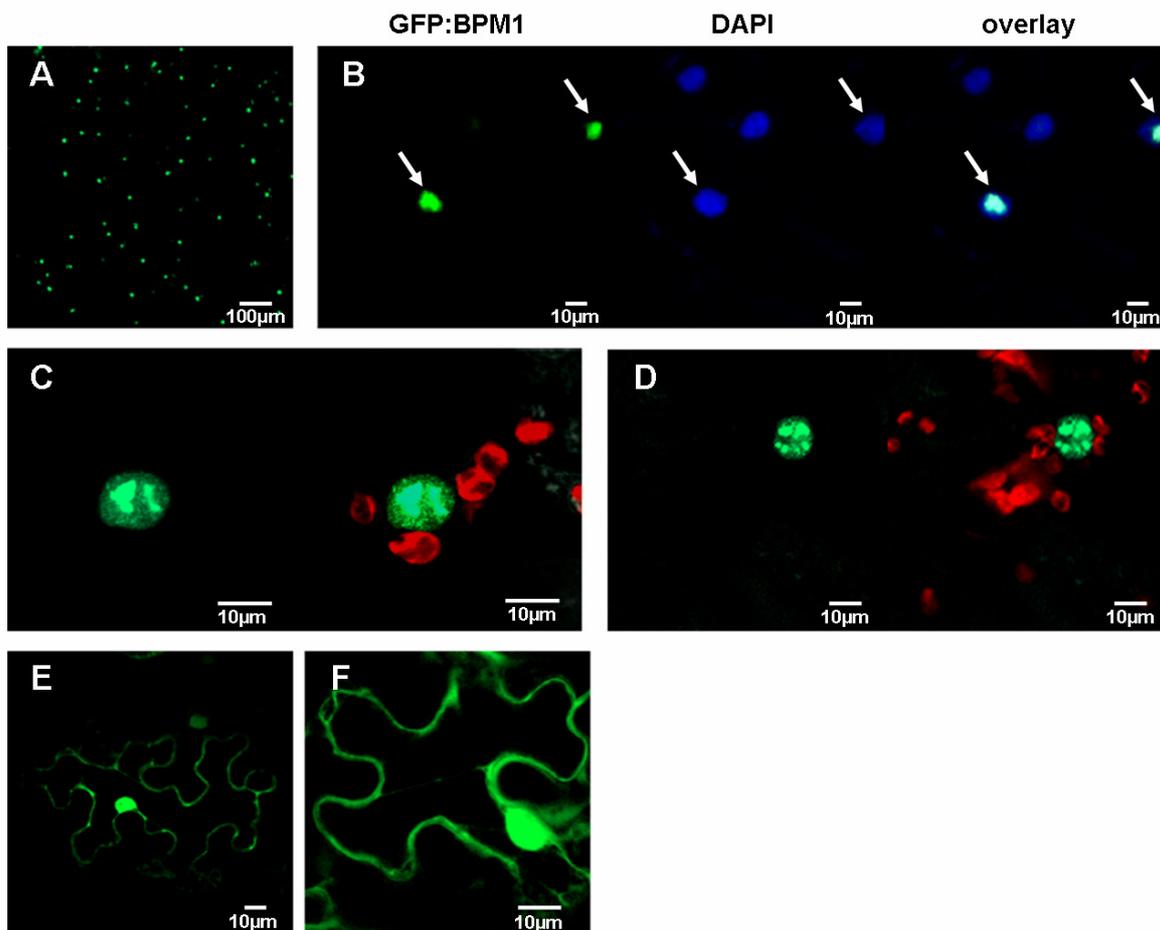


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von GFP:BPM1 in Epidermiszellen von *N. benthamiana*.

A) Übersichtsaufnahme eines größeren Blattausschnittes mit GFP:BPM1 als punktuell Signal (grün). B) GFP:BPM1 ist exklusiv im Nukleus lokalisiert. Die Signale des GFP:BPM1 und der durch DAPI blau gefärbten Nuklei zeigten im *overlay* eine deutliche Kollokalisierung. Es sind sowohl Kerne mit (Pfeile) als auch ohne GFP:BPM1-Signal zu erkennen. C) Detailaufnahmen eines Nukleus mit N-terminaler GFP-Fusion und (D) mit C-terminaler GFP-Fusion (rot – Autofluoreszenz Chloroplasten) E) GFP:BPM1¹⁻¹⁸⁹ ist im Nukleus und im Cytosol detektierbar.

Die BPM Proteine enthalten kein typisches Kernlokalisationsignal. Für das BTB-Zinkfinger-Protein HsBCL6 wurde von Dhordain und Mitarbeitern (1995) gezeigt, daß für eine korrekte Kernlokalisierung eine funktionale BTB-Domäne benötigt wird. Um zu untersuchen, ob die BTB-Domäne von BPM1 für dessen Kernlokalisierung verantwortlich ist, wurde auch das

zuvor verwendete Protein BPM1¹⁻¹⁸⁹ (siehe Abbildung 15) als GFP-Hybridprotein getestet. Die transiente Expression dieser Variante ohne BTB-Domäne ergab einen Verlust der exklusiven Kernlokalisierung (Abbildung 23E, F). Das Protein konnte sowohl im Nucleus als auch extranukleär detektiert werden. Im Kern verlor das Signal zusätzlich das für das vollständige BPM1 Protein beobachtete Fleckenmuster und wurde diffus.

GFP:BPM2 wurde ebenfalls ausschließlich in Nuclei detektiert, was wiederum durch DAPI-Färbungen bestätigt wurde (Abbildung 24).

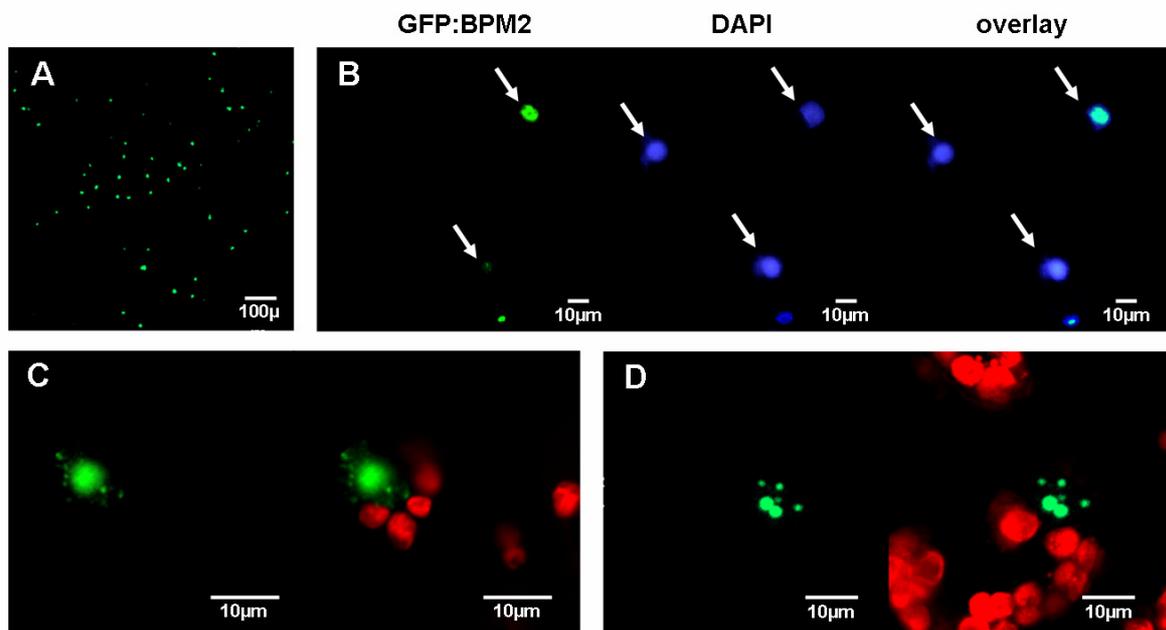


Abbildung 24: Transiente Expression von GFP:BPM2 in Epidermiszellen von *N. benthamiana*.

A) GFP:BPM2 zeigt in der Übersicht ein punktförmiges Signal (grün). B) DAPI-Färbungen betätigten die exklusive Lokalisation von GFP:BPM2 im Nucleus. Es sind sowohl Kerne mit (Pfeile) als auch ohne GFP-Signal zu erkennen. C) Detailaufnahmen eines Nucleus mit N-terminaler GFP-Fusion und (D) mit C-terminaler GFP-Fusion.

Die vornehmliche Kernlokalisierung von GFP:BPM1 und GFP:BPM2 steht im Kontrast zu den restlichen BPM Mitgliedern. GFP:BPM3, GFP:BPM5 und GFP:BPM6 waren sowohl im Kern als auch außerhalb erkennbar (Abbildung 25). Das Signal im Kern zeigte jedoch keine weitere Differenzierung.

GFP:BPM4 konnte als einziges BPM nur im Cytosol detektiert werden (Abbildung 26A, B). Zunächst wurden die Wurzeln transgener *Arabidopsis* Linien mikroskopisch analysiert, die stabil GFP:BPM4 exprimierten (siehe Abschnitt 3.5). In Übereinstimmung mit den Daten der transienten Expression wurde GFP:BPM4 nur außerhalb des Kerns beobachtet (Abbildung

26C). Zusätzlich wurde GFP:BPM4 gleichzeitig mit dem Tonoplast Marker TPK1:mRFP (Latz et al., 2007) exprimiert. Das *overlay* der beiden Emissionssignale zeigte teilweise Übereinstimmungen. Die C-terminalen Fusionskonstrukte zeigten für BPM3, BPM4, BPM5 und BPM6 keine Unterschiede in Lokalisation oder subzellulärer Verteilung der Proteine (nicht gezeigt).

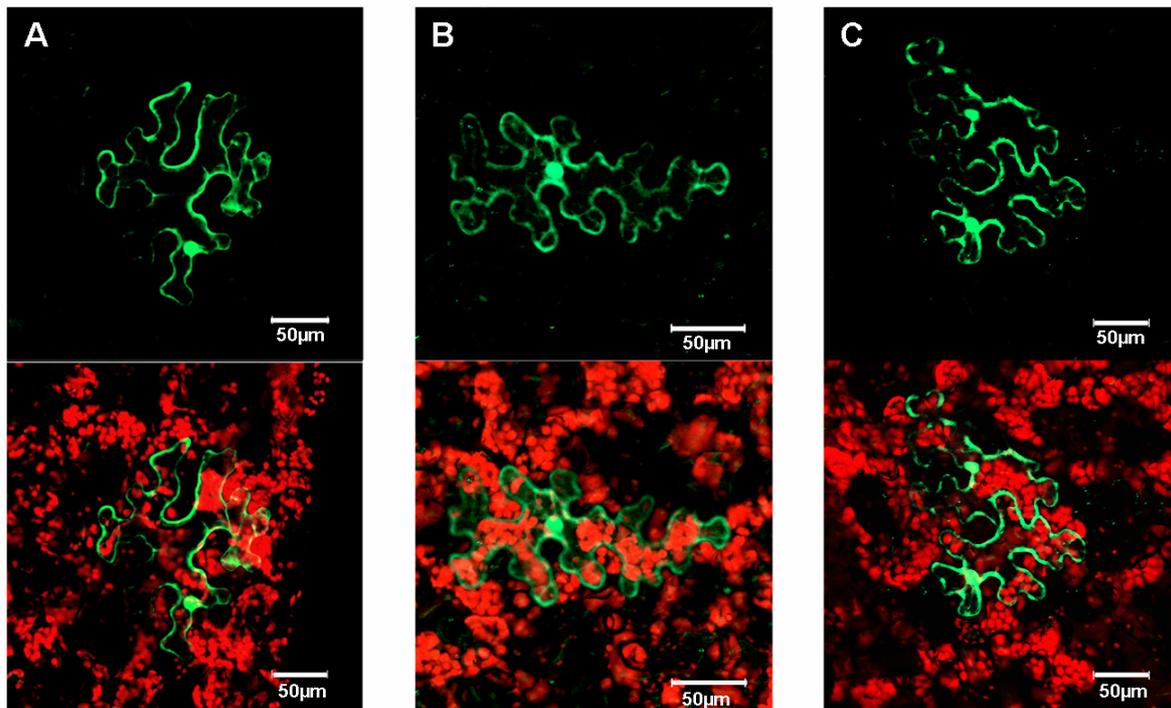


Abbildung 25: Transiente Expression von BPM3, BPM5 und BPM6 als GFP-Fusionsproteine in Epidermiszellen von *N. benthamiana*.

A) GFP:BPM3, B) GFP:BPM5 und C) GFP:BPM6 zeigen eine Lokalisation sowohl im Nucleus als auch außerhalb.

Die beobachteten Divergenzen in der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine entsprechen in ihrer Verteilung den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der BPM Familie (Abbildung 5). Die nächstverwandten Proteine BPM1/BPM2, sowie die Gruppe BPM5/BPM6 zeigen jeweils die gleiche Lokalisation, wohingegen BPM4 phylogenetisch wie auch in seiner Lokalisation isoliert ist. Zusammen mit dem unterschiedlichen Interaktionsverhalten der BPM Proteine untereinander (Abschnitt 3.2), weisen diese Ergebnisse zum ersten Mal auf funktionale Unterschiede innerhalb der BPM-Familie hin.

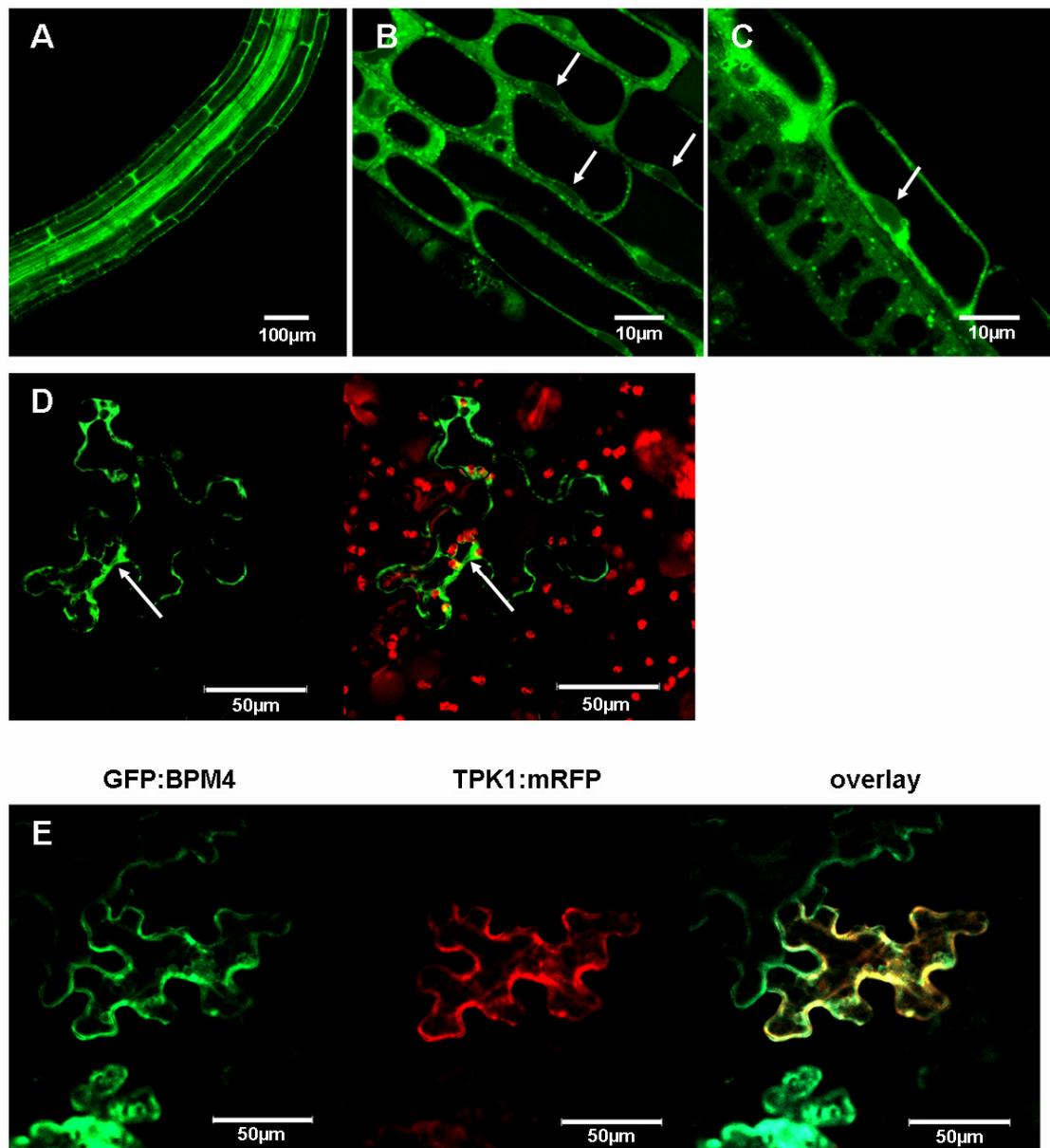


Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisation von GFP:BPM4.

A-C) Die Aufnahmen von *Arabidopsis 35S::GFP:BPM4* Keimlingswurzeln zeigten eine Lokalisation des Fusionsproteins außerhalb des Kerns (Pfeile markieren Nuklei). D) Bei transienter Expression in Epidermiszellen von *N. benthamiana* wurde GFP:BPM4 in extranukleären Bereichen lokalisiert (grün = GFP, rot = Autofluoreszenz) E) Das grüne Signal des GFP:BPM4 zeigte eine teilweise Kolkalisation mit TPKi:mRFP (Tonoplast-Marker; rot), was im overlay als gelbes Signal detektiert wurde.

3.6.2 Subzelluläre Lokalisation des BPM-Interaktors RAP2.4

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde RAP2.4 als Interaktor der BPM1 MATH-Domäne identifiziert (Abschnitt 3.4.4) und ist Zielprotein des Ubiquitin-Proteasom-Weges (Abschnitt 3.5.2), welcher in Cyto- und Nukleoplasma in eine Vielzahl von biologischen Prozessen eingreift. Als Transkriptionsfaktor wurde für RAP2.4 eine Lokalisation im Kern erwartet, obwohl das Programm PredictNLS (Cokol et al., 2000) in der Proteinsequenz kein klassisches Kernlokalisierungssignal finden konnte. RAP2.4 wurde ebenfalls als GFP-Fusionsprotein in Tabak transient exprimiert. Das Hybridprotein konnte ausschließlich in Nuklei detektiert werden (Abbildung 27). Im Gegensatz zu BPM1 und BPM2 (Abbildung 23, Abbildung 24) zeigte GFP:RAP2.4 eine gleichmäßige Verteilung im Kern. Die Organellenidentität konnte wiederum durch DAPI-Färbung (blau) bestätigt werden (Abbildung 27).

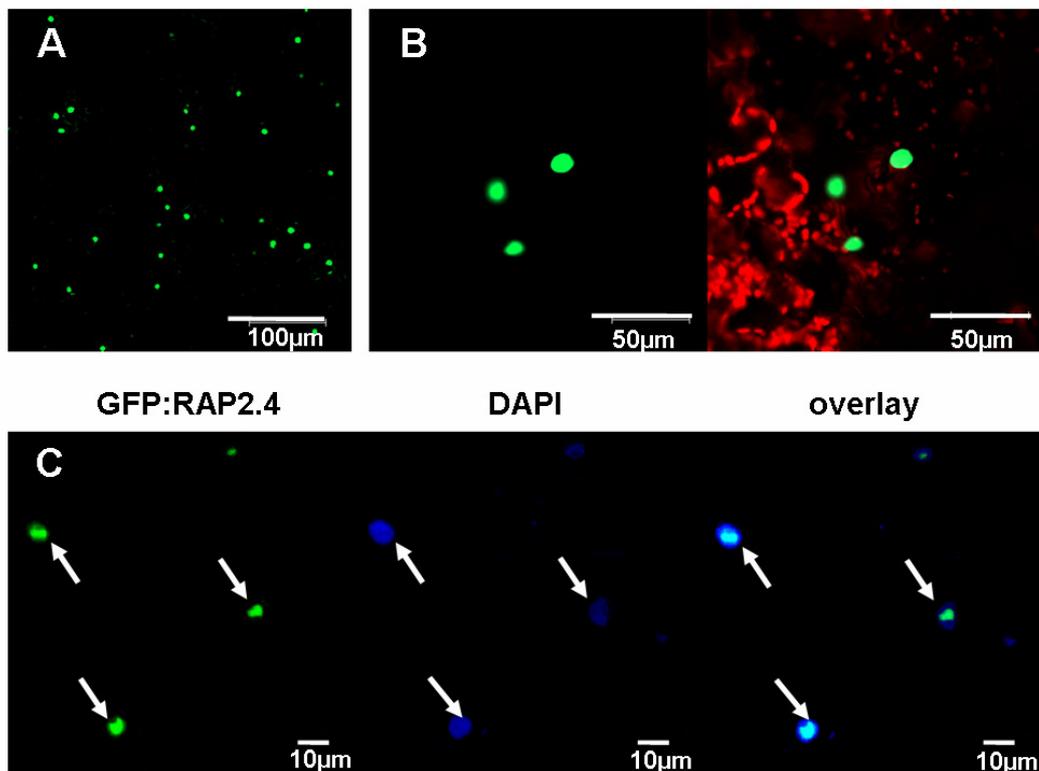


Abbildung 27: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur transienten Expression von GFP:RAP2.4 in Epidermiszellen *N. benthamiana*.

A) RAP2.4 ist im Nucleus lokalisiert und B) zeigt ein diffuses Signal. C) DAPI-Färbung von Nuclei mit (Pfeile) und ohne GFP:RAP2.4-Signal. Das *overlay* bestätigt die Kernlokalisierung von GFP:RAP2.4.

Die Experimente haben gezeigt, daß nur BPM4 unter Standardbedingungen nicht im Zellkern lokalisiert ist.

3.6.3 Subzelluläre Lokalisation des BPM-Interaktors CUL3A

Die Interaktion der BPM Proteine über ihre BTB-Domäne mit CUL3A wurde in Y2H-Ansätzen, in *in vitro* und *in planta* Pulldown-Experimenten nachgewiesen. Die Lokalisation des *Arabidopsis* CUL3A Proteins in der Zelle wurde bisher jedoch nicht gezeigt. Das Cullin stellt die potentielle zentrale Untereinheit einer entsprechenden CUL3-BPM E3 Ligase dar. Dementsprechend schien es sinnvoll, CUL3A ebenfalls in die Lokalisationsstudien mit einzubeziehen.

Wie GFP:BPM3, GFP:BPM5 und GFP:BPM6 wurde GFP:CUL3A sowohl im Kern, als auch außerhalb detektiert (Abbildung 28). Die Verteilung des GFP-Signals im Nukleus wirkte gleichmäßig. Dieses Ergebnis geht konform mit Daten von Shen et al. (2007), die die Lokalisation des murinen CUL3-Homologs und der Proteasom-Untereinheit 20S in neuronalen Kortexzellen im Nukleus und im somatischen Cytoplasma zeigen konnten.

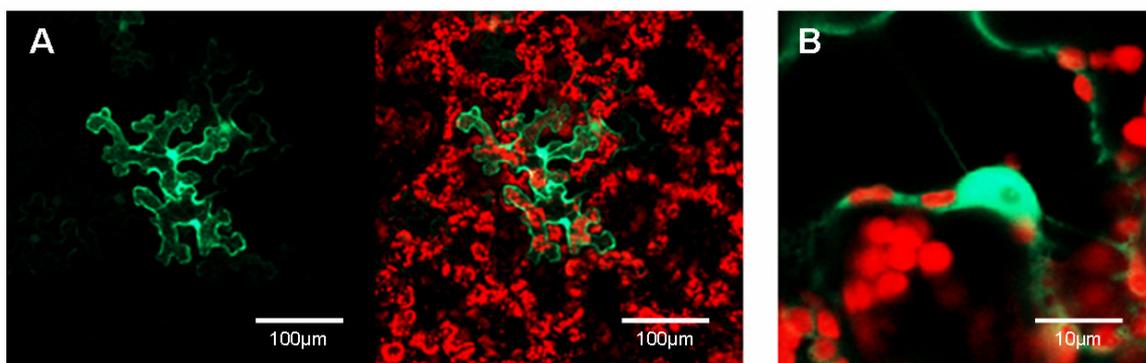


Abbildung 28: Transiente Expression von GFP:CUL3A in *N. benthamiana* Epidermiszellen.

A) Das GFP:CUL3A Signal (grün) konnte sowohl im Zellkern, als auch außerhalb detektiert werden, und kolokalisiert nicht mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot). B) Die GFP:CUL3A Verteilung im Zellkern erscheint diffus.

3.7 Expressionsanalysen

Ein weiterer experimenteller Ansatz war die Analyse der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression der *BPM* Gene. Die so gewonnenen Informationen zu überlappenden oder distinkten Expressionsmustern sollten neue Aussagen über etwaige funktionale Unterschiede innerhalb der *BPM* Familie ermöglichen, sowie über den Vergleich mit der Expression von *RAP2.4* weitere Hinweise zur Interaktion *BPM/RAP2.4 in planta* liefern.

Um die Expression eines Gens zu untersuchen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zunächst wurden unter Verwendung des Vektorplasmids pCB308 (Abbildung 48, Tabelle 12) Plasmide hergestellt, in denen das Markergen *uidA*, welches eine β -Glucuronidase (GUS) kodiert, unter die transkriptionelle Kontrolle eines der Promotoren der *BPM* Gene (Tabelle 10) bzw. des *RAP2.4* Promotors (1500 bp) gestellt ist. Die verwendeten Oligonukleotide und die Klonierungsstrategien sind im Anhang zu finden (Tabelle 13, Abbildung 48). Die Konstrukte wurden in *Arabidopsis* Pflanzen transformiert, und die Expression durch eine GUS-Färbung (siehe 2.4.6) sichtbar gemacht. Die so erhaltenen Daten zur gewebe- und entwicklungspezifischen Expression der *BPM* Gene und *RAP2.4* wurden unter anderem mit den Expressionsdatenbanken des eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca>; Winter et al., 2007) verglichen. Zusätzlich wurden die Promotorsequenzen mit dem Programm PLACE Web Signal Scan (Prestridge, 1991; Higo et al., 1999) auf das Vorkommen bekannter regulatorischer Elemente untersucht.

3.7.1 Analyse der *BPM* Expression anhand von Promotor:GUS Pflanzen

Die *BPM* Promotoren wurden in den Vektor pCB308 eingebracht und mit diesen Konstrukten Pflanzen des Ökotyps Col0 transformiert (siehe 2.4.3). Es wurden pro Konstrukt mindestens 10 unabhängige transgene Linien durch BASTA-Selektion identifiziert (siehe 2.1.4.3), und durch histologische Färbungen (siehe 2.4.6) die Aktivität des *uidA*-Genproduktes nachgewiesen. Zum einen sollte so ein möglicher Einfluß des Insertionsortes der T-DNA des verwendeten Vektors minimiert werden, zum anderen die Reproduzierbarkeit der gefundenen Expressionsmuster gesichert werden. Die Analyse der GUS Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit mit T3 Pflanzen der generierten Linien durchgeführt. Gefärbt wurden drei und

fünf Tage alte Keimlinge, angezogen in Sterilkultur, sowie Rosettenblätter, cauline Blätter, Wurzeln, Blüten und Schoten von 4-6 Wochen alten in Erde gewachsenen Pflanzen.

Die Analyse der verschiedenen Promotor Linien (*BPM:GUS*) ergab vor allem Unterschiede in der Expressionsstärke. Bereits die drei Tage alten Keimlinge zeigten für *BPM2*, *BPM5* und *BPM6* deutlich stärkere Promotoraktivität als für die restlichen *BPM* Gene. Diese Tendenz blieb über die verschiedenen Entwicklungsstufen hinweg konstant.

3.7.1.1 Expression BPM1

Die Linien *BPM1:GUS* zeigten in Keimlingen nur eine schwache Promotoraktivität im Bereich der Hydathoden der Kotyledonen (Abbildung 29), sowie eine deutliche Färbung der Stipulae. Die Rosettenblätter der erwachsenen Pflanzen waren ebenfalls an den Hydathoden färbbar, außerdem im Leitgewebe des Blattes, zum distalen Ende des Blattes hin stärker werdend. In der Blüte waren reife Pollen deutlich angefärbt. Eine lichtmikroskopische Aufnahme ließ gefärbte Pollen auch innerhalb der Pollensäcke erkennen. Eine schwache Promotoraktivität konnte außerdem im Receptaculum und dem Stigma nachgewiesen werden. In Schoten war die Promotoraktivität auf den oberen Schotenstiel beschränkt. Die *BPM1:GUS* Pflanzen wiesen eine Färbung in der gesamten Primärwurzel, mit etwas stärkerer Färbung im Zentralzylinder auf. Zusätzlich hoben sich die Austrittspunkte der Lateralwurzeln durch eine besonders starke Intensität der Färbung hervor.

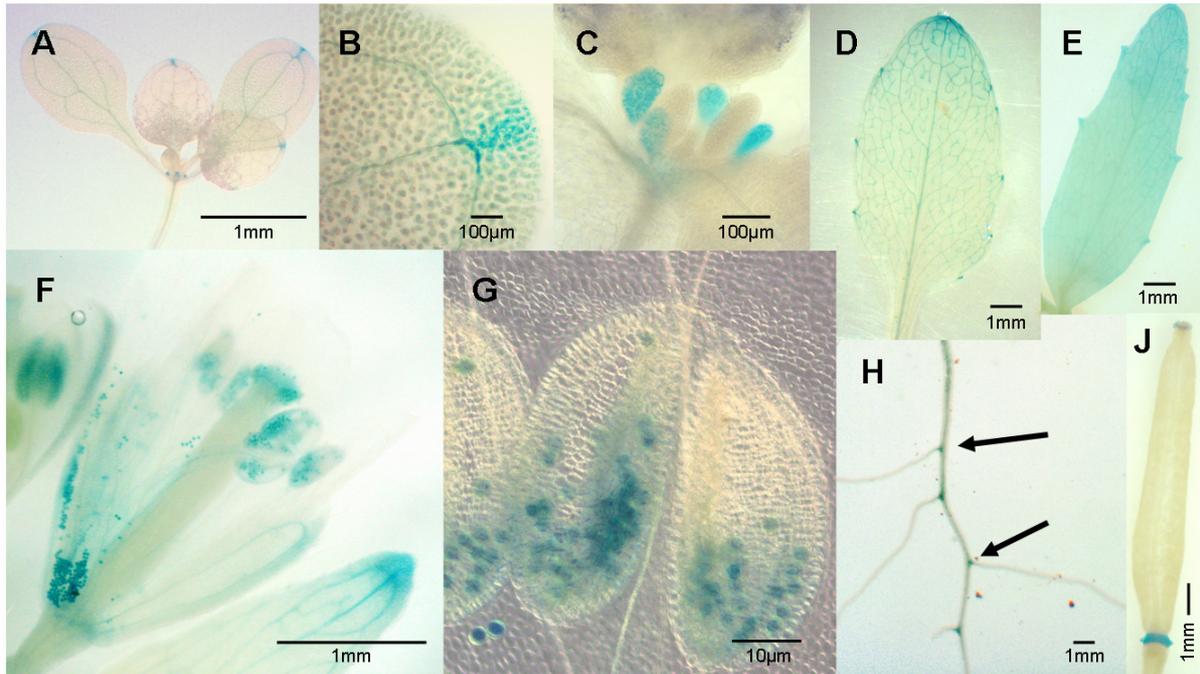


Abbildung 29: Expressionsanalyse transgener *BPM1:GUS* Pflanzen.

(A-C) Die Hydathoden und Stipulae von fünf Tage alten Keimlingen zeigten eine deutliche Blaufärbung, ebenso das vaskuläre Gewebe der Rosettenblätter (D), sowie die komplette Blattspreite cauliner Blätter (E). In Blüten war die Expression auf die Pollen beschränkt (F, G). H) Die Primärwurzel war durchgehend gefärbt, die stärkste Expression war jedoch in Zellen an den Austrittspunkten lateraler Wurzel zu erkennen (Pfeile). J) Gelbe Schoten zeigten eine leichte Promotoraktivität am oberen Schotenstiel und an der Schotenspitze.

3.7.1.2 Expression *BPM2*

Die *BPM2:GUS* Linien zeigten grundsätzlich eine stärkere GUS-Expression. Bereits drei Tage alte Keimlinge zeigten eine deutliche Promotoraktivität in Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzelspitze und Wurzelhaaren (Abbildung 30). In sieben Tage alten Keimlingen war die Färbung differenzierter im Leitgewebe der Kotyledonen und Primärblätter zu lokalisieren, und auch in den Stipulae an der Rosettenbasis. In den Wurzeln konnte die Promotoraktivität in der Primärwurzel im Bereich des Zentralzylinders dokumentiert werden, sowie in älteren Pflanzen in den Lateralwurzeln bzw. jungen Lateralwurzeln, aber nicht mehr in entwickelten Lateralwurzeln. Auffällig war außerdem eine punktuelle Färbung von Wurzelhaaren im Übergangsbereich von der Wurzel zum Hypokotyl (Abbildung 30K). Die Rosettenblätter adulter Pflanzen waren sowohl in der Blattspreite als auch der Petiole diffus blau, jedoch trat die Färbung des Leitgewebes stärker hervor. In caulinen Blättern war eine geringe Promotoraktivität, hauptsächlich in den Blattspitzen zu sehen. In Blüten waren wie bei *BPM1* die reifen Pollen deutlich angefärbt, die *BPM2:GUS* Pflanzen zeigten aber in den

Blütenständen zusätzlich in verschiedenen Organen eine Promotoraktivität: Eine deutliche Blaufärbung war in den Sepalen und Petalen, sowie den Stamina und dem Stigma befruchteter Blüten zu erkennen. Auch der Blütenboden, sowie Teile der Samenanlage zeigten eine starke Promotoraktivität für *BPM2*. In gelben Schoten war die Expression auf den oberen Blattstiel und die Schotenspitze beschränkt.

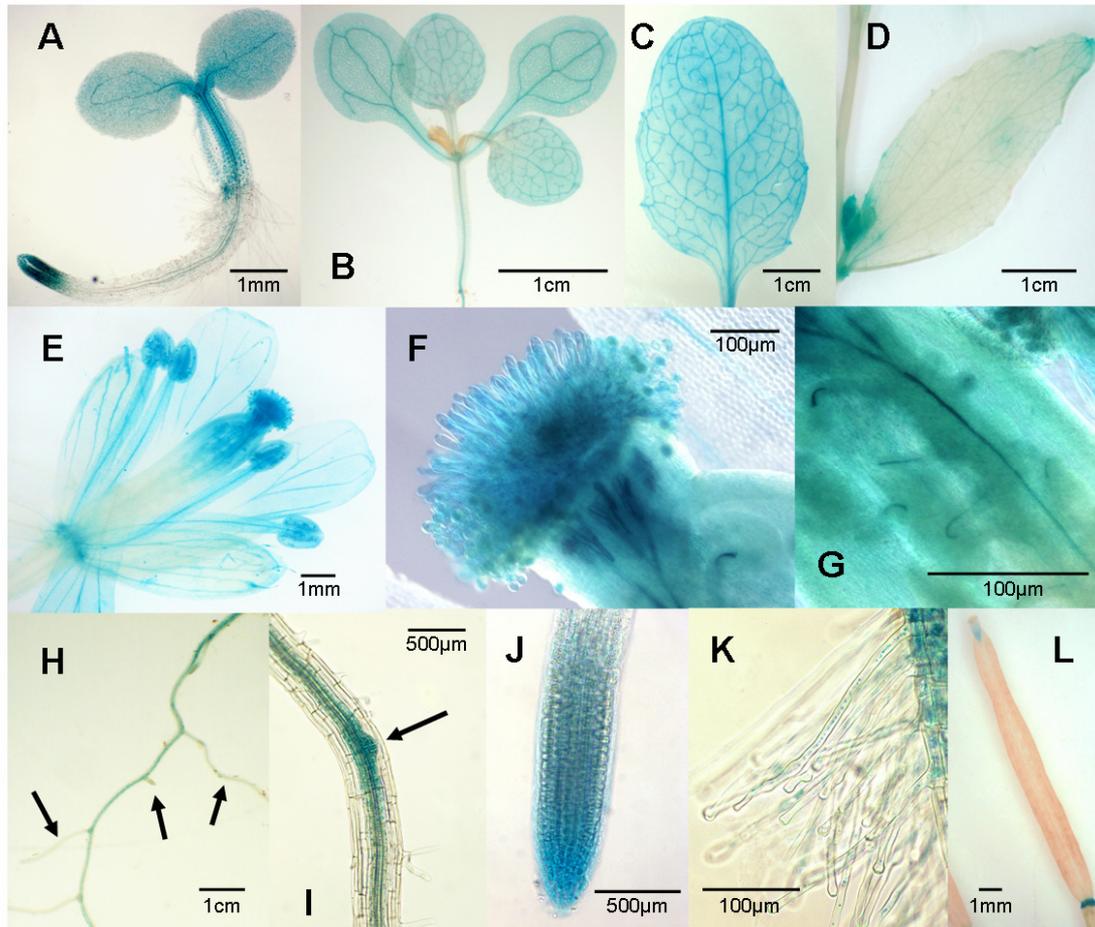


Abbildung 30: Expressionsanalyse *BPM2:GUS*.

A) Drei Tage alte Keimlinge zeigten GUS-Färbung in Kotyledonen, Hypokotyl und Wurzelspitze. B) Sieben Tage alter Keimling mit starker Expression im vaskulären Gewebe. C) Expression in Rosettenblättern und D) in caulinen Blättern. E) In Petalen, Stamen, Blütenboden und im oberen Teil des Pistills wurde Promotoraktivität detektiert. F) Nahaufnahme eines Stigmas. G) Samenanlagen. H) GUS-Färbung der Primärwurzel im vaskulären Gewebe. Keine Färbung in Lateralwurzeln (Pfeile) I) Starke Expression in junger Lateralwurzel (Pfeil) und (J) der Spitze der Primärwurzel. K) Die Wurzelhaare im Übergangsbereich zum Hypokotyl zeigten eine punktuelle Expression. L) Gelbe Schoten waren an der Abszissionszone und der Spitze gefärbt.

3.7.1.3 Expression *BPM3*

Die Expression des *uidA* Gens unter dem *BPM3* Promotor war insgesamt äußerst schwach. In drei Tage alten Keimlingen konnte keine Promotoraktivität detektiert werden, in sieben Tage alten Keimlingen nur in den Stipulae (Abbildung 31). In Rosettenblättern war die Expression im vaskulären Gewebe zu erkennen, ebenso etwas schwächer in caulinen Blättern. In den untersuchten Blüten war die Blaufärbung auf die Stamina und das Stigma begrenzt. Die Promotoraktivität war außerdem in der Wurzelspitze der Primärwurzel nachweisbar, aber auch in den Spitzen der Lateralwurzeln.

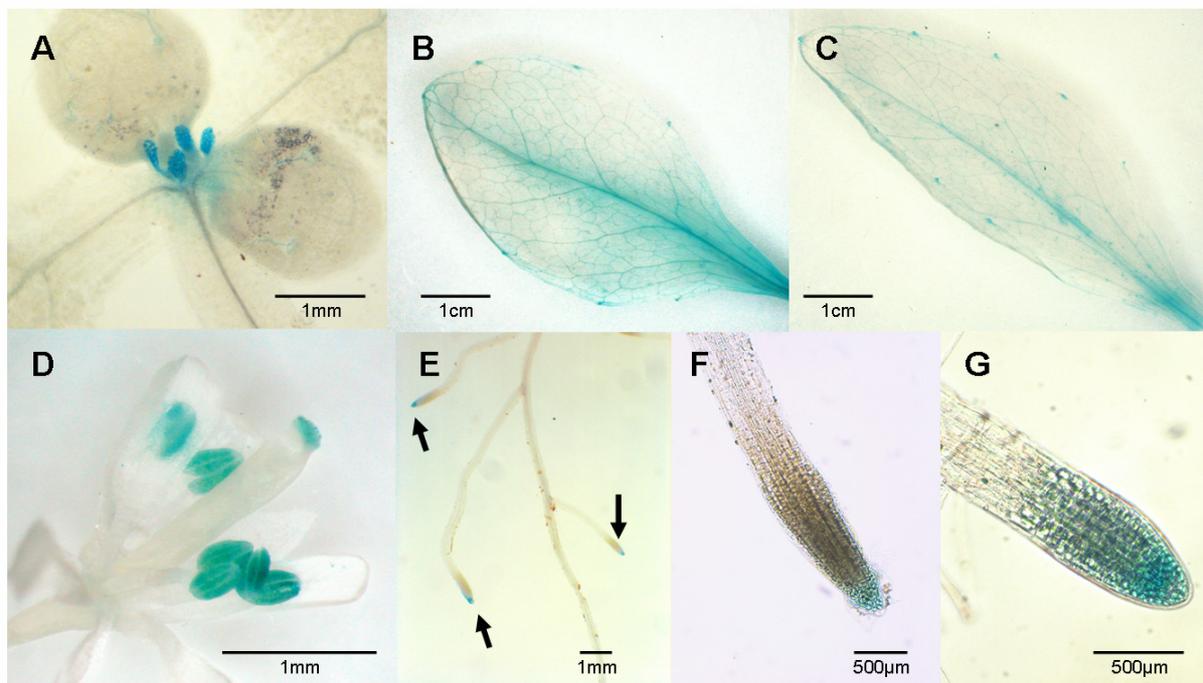


Abbildung 31: Expressionsanalyse *BPM3:GUS*.

A) Drei Tage alter Keimling mit GUS-Färbung der Stipuli. B,C) Rosettenblätter und cauline Blätter zeigten Promotoraktivität im medianen Hauptstrang und der Petiole. D) In Blüten war die Färbung spezifisch in den Antheren und der Narbe zu sehen. E-F) In den Wurzeln waren die Spitzen sowohl der Lateralwurzeln (E-Pfeile; G) als auch der Primärwurzel (F) erkennbar gefärbt.

3.7.1.4 Expression *BPM4*

Abbildung 32 dokumentiert die Analyse der *BPM4:GUS* Pflanzen, die insgesamt nur eine äußerst schwache Expression zeigten. In Keimlingen war die Promotoraktivität auf die Stipulae begrenzt. In adulten Pflanzen war die Aktivität im abaxialen Leitgewebe, und hier vor allem im medianen Hauptstrang der Rosettenblätter detektierbar, wohingegen cauline Blätter keine GUS-Expression zeigten. In den Blüten war die Färbung auf die Antheren, die Pollen und das Stigmata begrenzt. An älteren Blütenständen konnte oftmals eine Blaufärbung der Blütenstiele beobachtet werden. In den Wurzeln wurde GUS-Expression vor allem im Bereich von Lateralwurzeln und den Achsen ausgebildeter Lateralwurzeln dokumentiert, begrenzt auf die Perizykelzellen. Zusätzlich zeigten die Primärwurzeln eine schwache Färbung der Wurzelhaube.

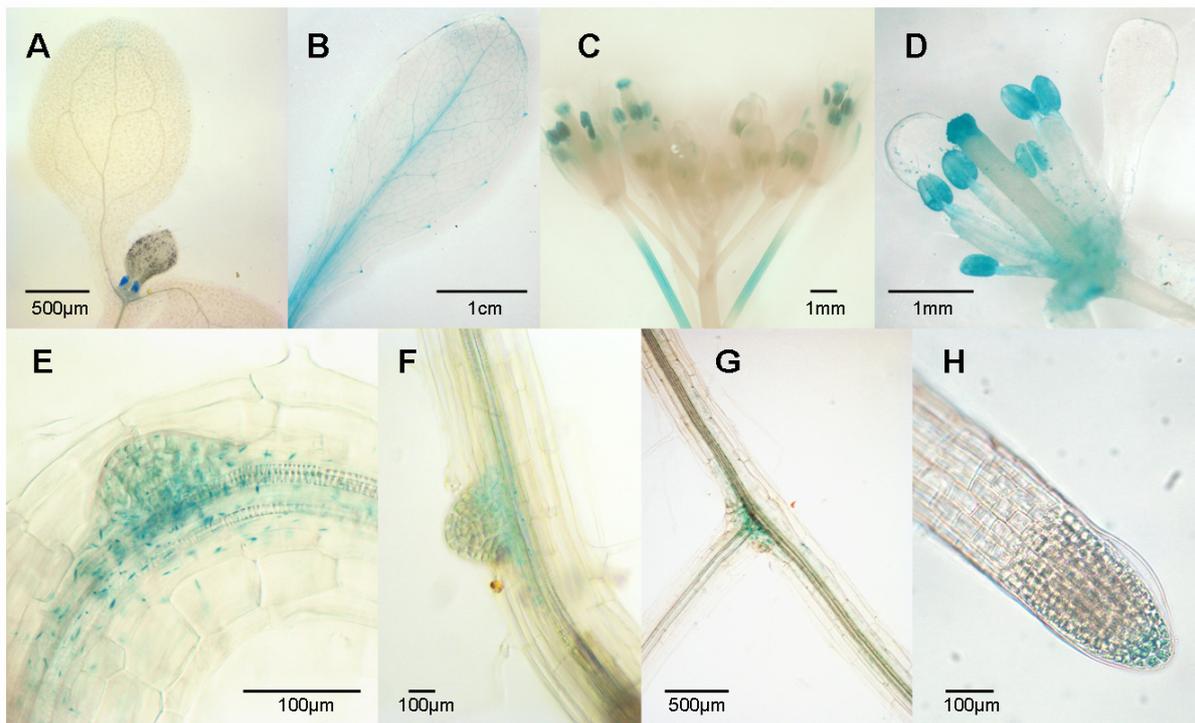


Abbildung 32: Expressionsanalyse *BPM4:GUS*.

A) Keimling mit Promotoraktivität in den Stipulae. B) Rosettenblatt mit gefärbtem medianem Hauptstrang. C, D) In Blütenständen waren Stigmata, Antheren und Pollen, sowie Teile der Blütenstiele erkennbar gefärbt. E-H) In Wurzeln wurde die Expression entlang der Primärwurzel und deren Wurzelhaube detektiert. Perizykelzellen der Lateralwurzeln und Wurzelverzweigungen zeigten eine stärkere Färbung.

3.7.1.5 Expression BPM5

Die Aktivität des *BPM5* Promotors fiel, ähnlich wie für *BPM2*, insgesamt sehr stark aus, und erstreckte sich auf alle getesteten Gewebe (Abbildung 33). Von drei Tage alten Keimlingen waren sowohl die Kotyledonen, ausgehend von den Hydathoden an den Spitzen, als auch das Hypokotyl färbbar. Während hier noch keine Expression in der Wurzel zu erkennen war, konnte bei sieben Tage alten Keimlingen eine Promotoraktivität sowohl in der Wurzelspitze der Primärwurzel, als auch in Perizykelzellen sich entwickelnder Lateralwurzeln detektiert werden. Die Rosettenblätter und auch cauline Blätter zeigten eine gleichmäßige Färbung, während eine Expression im Stengel vor allem zu den Blütenständen hin nachgewiesen werden konnte. Die Expression in den Blüten war im vaskulären Gewebe der Sepale besonders stark. Bei der Färbung vollständiger Blütenstände blieben nur geschlossene Knospen ungefärbt. In Schoten konnte die Promotoraktivität in den Schotenhüllen, insbesondere dem Leitgewebe, sowie dem oberen Bereich des Schotenstengels gezeigt werden. Anhand der geöffneten Schote ließ sich die GUS-Färbung auch im Replum dokumentieren.

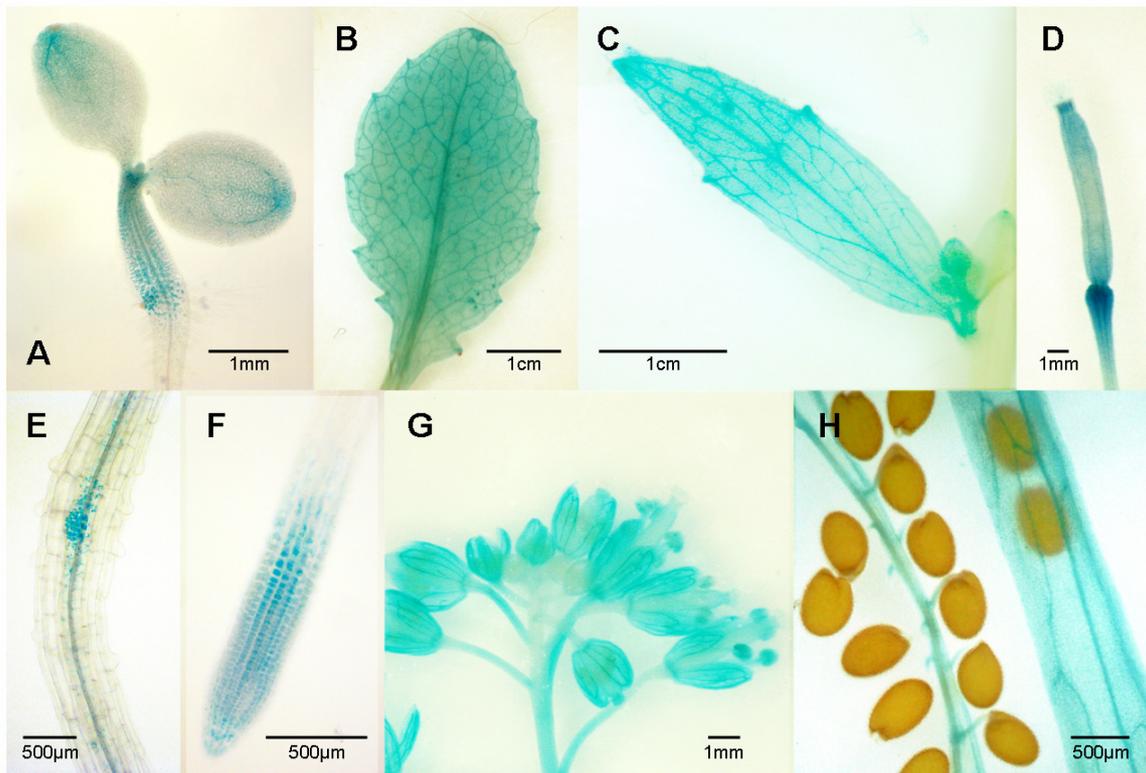


Abbildung 33: Expressionsanalyse *BPM5:GUS*.

A) Drei Tage alte Keimlinge mit Färbung des vaskulären Gewebes der Kotyledonen und des Hypokotyls. B,C) Rosettenblätter und cauline Blättern zeigten Färbung im vaskulären Gewebe und restlicher Blattspreite. D,H) Junge Schoten zeigten die stärkste Promotoraktivität im oberen Schotenstiel, aber auch die Schotenhüllen und das Replum waren gefärbt. In der Wurzel von sieben Tage alten Keimlingen und älteren Pflanzen sah man eine Färbung in (E) Lateralwurzelnanlagen (Perizykelzellen) und (F) der Primärwurzelspitze. G) Infloreszenzen zeigten eine starke Expression in Blütenstielen, Kelchblättern und Stamina.

3.7.1.6 Expression *BPM6*

Die *BPM6:GUS* Linien zeigten als einzige bereits als drei Tage alte Keimlinge eine Expression im Leitgewebe der Kotyledonen und der Primärwurzel (Abbildung 34). In den Rosettenblättern erstreckte sich die Promotoraktivität ausgehend von der Petiole über die gesamte Lamina. In den Blütenständen zeigte sich die Expression altersabhängig: In jungen Blüten war die Narbe deutlich blau gefärbt, während der Blütenboden und die Leitgewebe der Kelchblätter eine schwache Färbung zeigten.

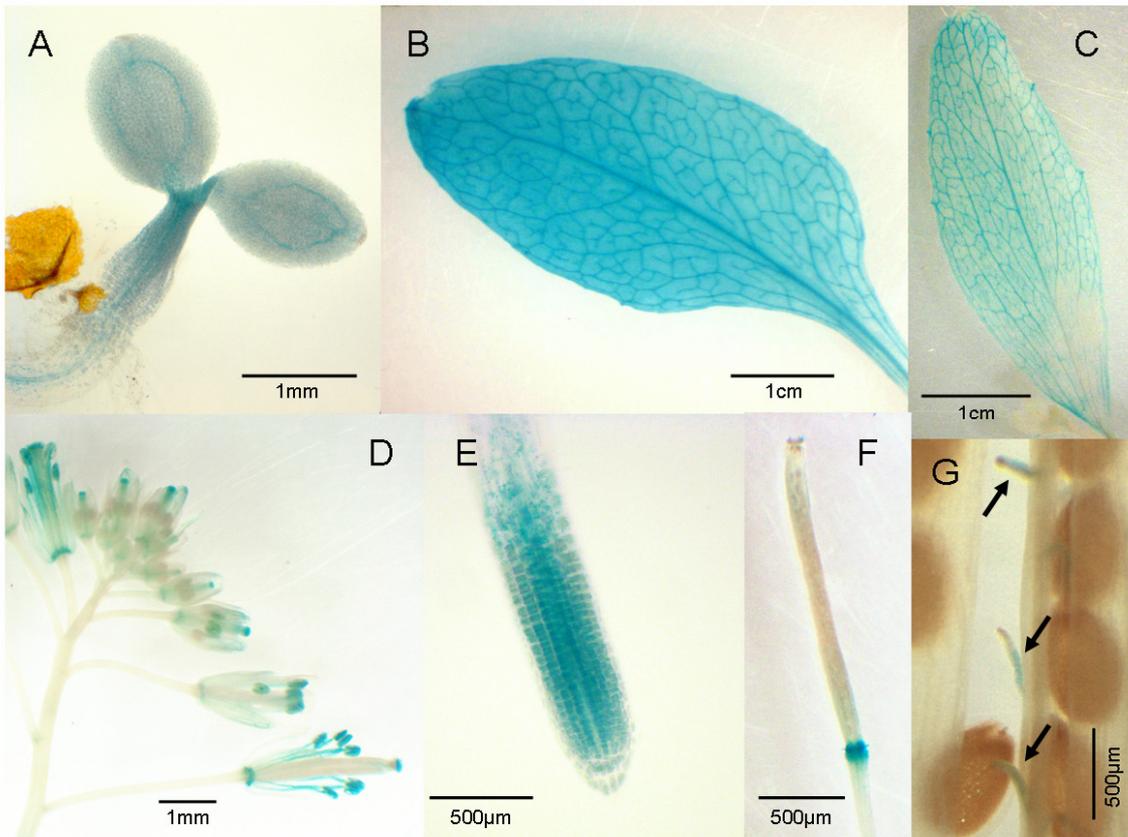


Abbildung 34: Expressionsanalyse *BPM6:GUS*.

A) Drei Tage alter Keimling mit starker Promotoraktivität. B) In Rosettenblättern zeigte sich eine starke Expression in der gesamten Lamina und dem Petiolus. C) In caulinen Blättern fiel die Expression deutlich schwächer aus und war vor allem im Leitgewebe detektierbar. D) In Blüten begann die *GUS* Expression in frühen Stadien in Receptaculum und Stigma, in älteren Blüten waren zunächst die Antheren und später auch die Filamente gefärbt. E) In Wurzeln zeigten ausschließlich die Wurzelspitzen der Primärwurzeln eine Promotoraktivität. F) Gelbe Schoten zeigten eine Färbung des oberen Schotenstiels. G) Die Pfeile kennzeichnen eine schwache Aktivität im Funiculus.

In älteren Blüten nimmt die Färbungsintensität im Blütenboden zu, die Stigmata zeigen weiterhin eine starke Promotoraktivität, wohingegen die Färbung der Kelchblätter abnimmt. Hinzu kommt jedoch eine deutliche Aktivität in den Stamina, zuerst in den Antheren, dann auch in den Filamenten. Die Schoten zeigten im Bereich des oberen Schotenstiels und der Abszissionszone eine Färbung.

3.7.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Promotor:GUS Analysen der BPM Gene

Die Promotor:GUS Analysen ergaben für alle *BPM* Promotoren eine Aktivität in verschiedenen meristematischen Zellen der Wurzeln: Unter der Kontrolle der Promotoren von *BPM2*, *BPM3*, *BPM4*, *BPM5* und *BPM6* wurde die *uidA* Expression in den Spitzen der Primärwurzeln detektiert; *BPM1*, *BPM2*, *BPM4* und *BPM5* zeigten eine Färbung der Lateralwurzeln bzw. junger Lateralwurzeln. In den Spitzen von Lateralwurzeln konnte nur für *BPM3:GUS* eine Aktivität nachgewiesen werden.

In Keimlingen konnte eine breite Promotoraktivität für *BPM2*, *BPM5* und *BPM6* festgestellt werden. Die Keimlinge zeigten jeweils eine Blaufärbung insbesondere des Leitgewebes, ausgehend von der oberen Wurzel, im Hypokotyl und in den Kotyledonen bzw. Primärblättern. *BPM2:GUS* Keimlinge wiesen zusätzlich eine besonders starke Färbung der Wurzelspitze auf.

In oberirdischen Geweben war die Promotoraktivität aller *BPM* besonders stark in Pollen zu erkennen. *BPM1*, *BPM2*, *BPM5* und *BPM6* zeigten zusätzlich eine Färbung der Filamente und der Kelchblätter. Allein der *BPM2* Promotor bewirkte eine *uidA* Expression in den Kronblättern. Für alle *BPM* konnte eine Färbung in den Rosettenblättern und - mit Ausnahme von *BPM4* - in caulinen Blättern detektiert werden. In den Blättern war die Färbung vor allem im medianen Hauptstrang und dem Leitgewebe stark. Die restliche Blattspreite zeigte vor allem für die Promotoren mit grundsätzlich starker Aktivität - *BPM2*, *BPM5* und *BPM6* - ebenfalls eine Blaufärbung. In Schoten konnte kaum Aktivität festgestellt werden. Die Blaufärbung beschränkte sich hauptsächlich auf den oberen Schotenstiel bzw. die Abszissionszone und die Schotenspitze. *BPM5:GUS* Pflanzen zeigten außerdem eine Färbung der Schotenhüllen und des Replum, während in Schoten der *BPM6:GUS* Pflanzen eine schwache Färbung der Funiculi zu erkennen war.

Die *BPM* zeigten weitreichende Überlappungen in ihrer Expression, aber auch stellenweise Besonderheiten. Die Promotoren sind über die gesamte Entwicklung der Pflanze hinweg aktiv, unterscheiden sich jedoch erheblich in der Stärke der Aktivität.

3.7.1.8 Expression *RAP2.4*

Als Interaktor der BPM Proteine sollte auch die Expression von *RAP2.4* getestet werden, da man davon ausgeht, daß interagierende Gene bzw. Proteine zeitgleich und möglichst in den gleichen Geweben exprimiert werden sollten. Daher wurde eine Sequenz von 1502 bp im 5'-Bereich vor dem ORF von *RAP2.4* als Promotor in den Vektor pCB302-3 kloniert (Vektorkarte im Anhang).

Die *uidA* Expression unter dem *RAP2.4* Promotor zeigte tatsächliche weitreichende Überlappungen (Abbildung 35). In drei Tage alten Keimlingen waren die Kotyledonen, der obere Teil des Hypokotyls und der obere Bereich des Zentralzylinders der Wurzel deutlich gefärbt. Die Färbung der Rosettenblätter ergab eine starke Promotoraktivität in der Blattspreite und dem vaskulären Gewebe. Auffällig war jedoch das Fehlen einer Aktivität in älteren Bereichen der Mittelrippe. Die caulinen Blätter dagegen zeigten eine Färbung der gesamten Lamina. In Blüten konnte eine Färbung in den Pollen detektiert werden. Die Promotoraktivität in den Schoten fiel sehr gering aus. Eine Färbung wurde aber sowohl an der Basis der Schote, deren Spitze und sehr schwach auch in den Karpellen gesehen. Zusätzlich zeigte der Zentralzylinder der Wurzel eine Promotoraktivität, wohingegen in den Wurzelspitzen von Primär- und Lateralwurzeln keine Aktivität nachgewiesen werden konnte.

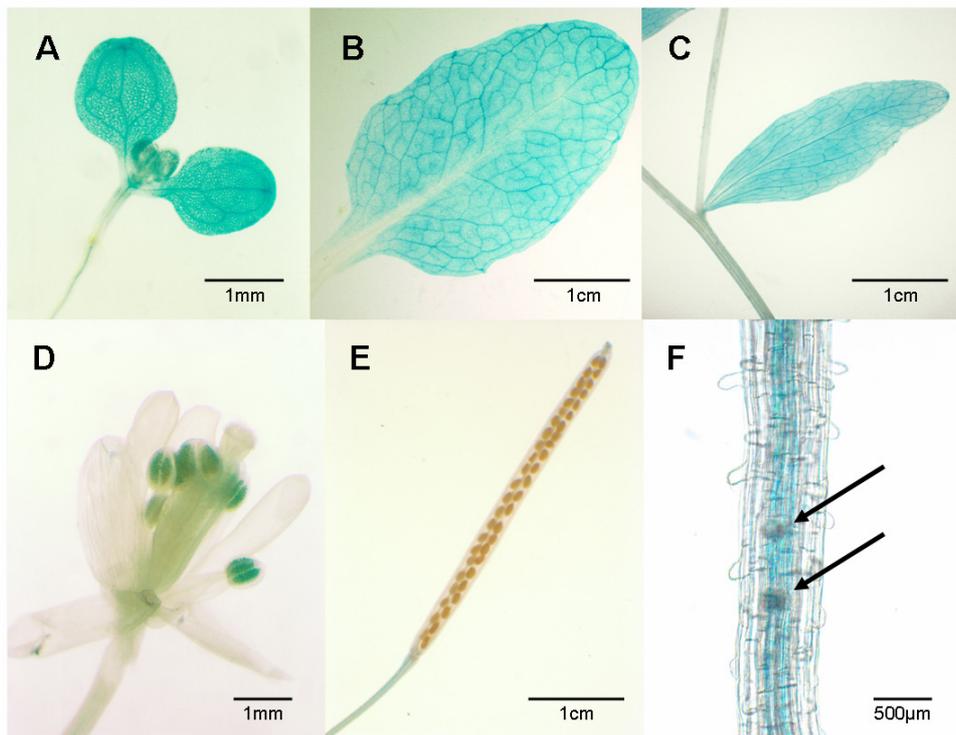


Abbildung 35: Expressionsanalyse *RAP2.4:GUS*.

A) Drei Tage alter Keimling mit GUS-Färbung der Wurzel und der Kotyledonen. B) Rosettenblatt mit Färbung des vaskulären Gewebes der Blattscheide. Petiolus und ältere Teile der Mittelrippe blieben ungefärbt. C) Caulines Blatt. D) Blüte mit gefärbten Pollen. E) Schoten zeigten eine sehr schwache Färbung im Stiel, der Spitze und den Karpellen. F) Nahaufnahme eines Abschnittes der Primärwurzel eines Keimlings mit deutlicher Färbung des Zentralzylinders. Die Lateralwurzelanlagen zeigten keine Färbung (Pfeile).

Die Aktivität des *RAP2.4* Promotors überlappte mit den beobachteten Expressionsmustern der *BPM:GUS* Pflanzen sowohl im Keimlingsstadium, als auch in adulten Pflanzen (Folgeblätter, Pollen, Zentralzylinder der Primärwurzel). Divergenzen zeigen sich im Fehlen der *RAP2.4* Expression speziell im unteren Bereich des Hypokotyls, sowie im medianen Hauptstrang der Rosettenblätter.

3.7.2 RT-PCR Analyse

Um die Ergebnisse der GUS Färbungen zu verifizieren, wurde zusätzlich eine RT-PCR Analyse auf RNA verschiedener Gewebe (siehe 2.3.9) durchgeführt. Während der Promotor:GUS Ansatz indirekt die Promotoraktivität sichtbar macht, liefert die RT-PCR einen semiquantitativen Nachweis der Expression der Gene auf RNA Ebene.

Für die RNA Extraktion wurden Proben von etwa vier Wochen alten, auf Erde unter Standardbedingungen angezogenen Pflanzen (siehe 2.4.2) des Wildtyps (Col0-0), bzw. sieben Tage alte Keimlinge aus Sterilkultur (siehe 2.4.2) verwendet. Es wurden grüne Rosettenblätter verschiedenen Alters, grüne Schoten und geöffnete Blüten geerntet.

In Abbildung 36A wurden die Ergebnisse der RT-PCR auf verschiedene Gewebe zusammengefaßt (Primer Abbildung 13 im Anhang). Wenn auch teilweise extrem schwach, wie z.B. für *BPM4* in Stengel und Wurzel, konnten alle sechs BPM in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Wie zuvor die GUS-Färbungen zeigte auch die RT-PCR für *BPM1*, *BPM3* und *BPM4* eine sehr schwache Expression, für *BPM6*, *BPM5* und *BPM2* eine gute bis starke Expression. Ebenso übereinstimmend mit den Ergebnissen der GUS-Färbung ähneln sich die Expressionsmuster, wobei die RNA Level für cauline Blätter, Schoten und Stengel am niedrigsten ausfielen. Die Stärke der Grundexpression ist nicht korreliert mit der Gruppierung im Stammbaum der Genfamilie (vergleiche Abbildung 5B).

BPM1 Transkript konnte mittels RT-PCR insgesamt nur schwach nachgewiesen werden, am stärksten jedoch in den Schoten, Keimlingen, Blüten und Wurzeln. Mit der RT-PCR wurde das *BPM2* Transkript vor allem in Rosettenblättern, Keimling und Wurzel detektiert. Jedoch war die Transkriptmenge in den anderen Geweben nur geringfügig kleiner. Die RT-PCR für *BPM3* zeigte nur sehr wenig Amplifikat, mit einem ähnlichen Muster wie *BPM1*. Das meiste Transkript konnte in Keimlingen, Blüte und Wurzel nachgewiesen werden. Die Expression von *BPM4* war auch in der RT-PCR kaum nachweisbar. In Abbildung 36 ist daher für *BPM4* jeweils ein Gelbild gezeigt, für das die doppelte Auftragsmenge der RT-PCR Reaktion verwendet wurde. *BPM5* zeigte in der RT-PCR wie auch schon im GUS-Ansatz eine starke Expression in allen getesteten Geweben, besonders jedoch in Blüten und Wurzeln. Die Expression von *BPM6* war in Keimlingen am stärksten, aber auch in Rosettenblättern, Blüten und Wurzeln gut detektierbar.

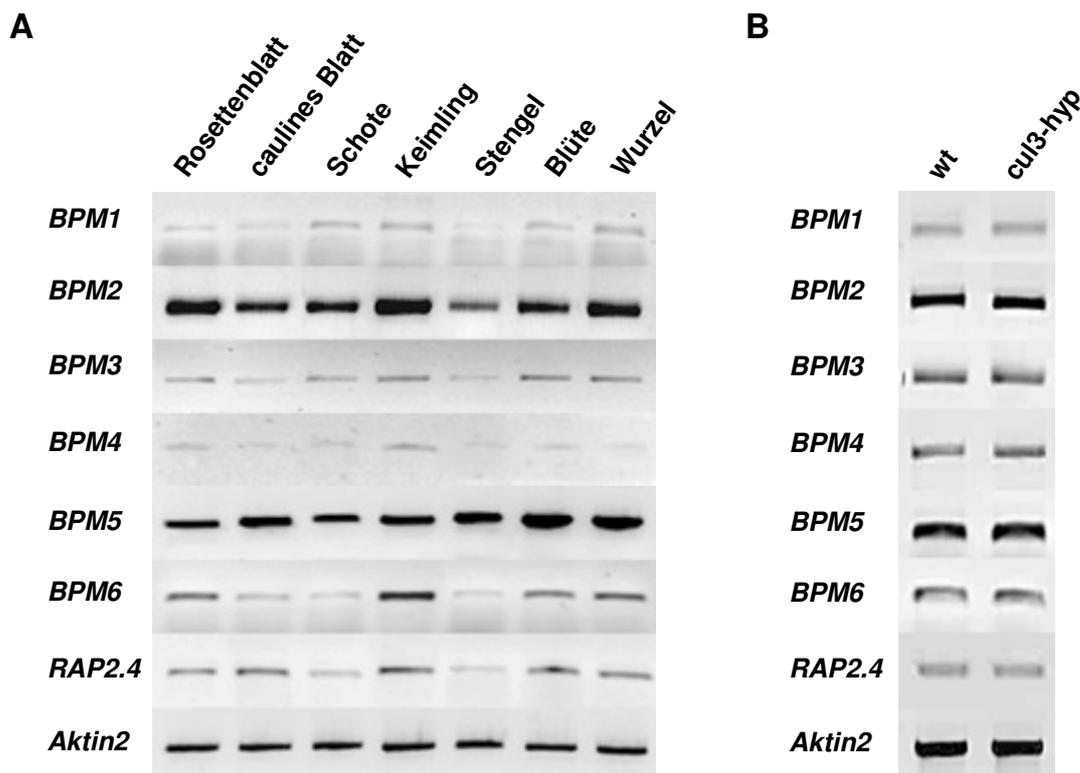


Abbildung 36: RT-PCR Analyse der Expression von *BPM* und *RAP2.4* im Wildtyp und in *cul3^{hyp}*.

A) Die für die RNA-Extraktion verwendeten Gewebeproben wurden von vier bis fünf Wochen alten, in Erde gewachsenen Wildtyppflanzen genommen (Rosettenblätter, cauline Blätter, gelbe Schoten, Stengelabschnitte, geöffnete Blüten, Wurzeln), bzw. für „Keimling“ fünf Tage alte Keimlinge aus Sterilkultur geerntet. B) Es wurde die RNA von sieben Tage alten Keimlingen (*Col-0* und *cul3^{hyp}*) aus Sterilkultur verwendet.

Zusätzlich wurde die basale Expression der *BPM* Gene und *RAP2.4* in der *CUL3*-Doppelmutante *cul3^{hyp}* (siehe Abbildung 22) durch semiquantitative RT-PCR überprüft. Es konnten keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR unterstützen die Beobachtungen der GUS-Färbungen. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von *BPM2* und *BPM5* unter Standardbedingungen deutlich stärker ist als die der vier anderen *BPM* Gene. Wie die sechs Mitglieder der *BPM* Familie, ist auch der Interaktor *RAP2.4* ebenfalls über die gesamte Entwicklung und in allen getesteten Geweben exprimiert.

3.8 Untersuchungen von Insertionsmutanten für BPM2, BPM5, BPM6 und RAP2.4

Hinweise auf die Funktion eines Proteins, z.B. während der Entwicklung einer Pflanze oder bei Reaktionen der Pflanze auf Umwelt- und Stressfaktoren, können auch durch die sogenannte reverse Genetik ermittelt werden. Hierbei werden Pflanzen mit einer Mutation im Zielgen analysiert. Resultiert daraus der Verlust der Expression bzw. die Synthese eines nicht funktionalen Genproduktes, lassen sich aus den Phänotypen der Pflanzen Rückschlüsse auf die biologische Funktion des zu untersuchenden Gens ableiten. Eine Möglichkeit, *Arabidopsis* Mutanten herzustellen, ist die durch Agrobakterien vermittelte T-DNA Mutagenese, wobei die Insertion der T-DNA zufällig im Genom stattfindet, und stabil an die Folgegeneration weitergegeben wird. Der erste Schritt der Analyse ist die Genotypisierung durch PCR, wobei die Randsequenzen (*border*) der T-DNA des verwendeten Vektors als Positionsgeber genutzt werden. Auf der Suche nach Insertionsmutanten wurde der Katalog des Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (<http://arabidopsis.info/>) herangezogen. Man erhält dort Samen der segregierenden T3 Generationen.

3.8.1 Identifizierung von *bpm* Mutanten

Es wurden verschiedene Insertionslinien erworben und genotypisiert. In Abbildung 37A sind die Genstrukturen der einzelnen *BPM* und eventuell annotierte *splicing*-Varianten dargestellt, wobei anzumerken ist, daß während der gewebespezifischen Expressionsanalysen (Abschnitt 3.7.4) nie verschiedene *splicing*-Produkte detektiert wurden. Die Abbildung zeigt außerdem die Positionen der Insertionen im Genom der nebenstehenden Samenlinien an. Die Richtung der Fähnchen entspricht der 5'-3'-Orientierung des Ergebnisses der Sequenzierung durch den Anbieter NASC mit einem *left border*-Primer, spezifisch für die zur Mutagenese verwendete T-DNA (pROKII, Baulcombe et al., 1986). Für *BPM2* wurde die Linie SALK_082349 (*bpm2-1*) mit einer Promotorinsertion ermittelt, für *BPM5* die beiden Linien SALK_067244 (Insertion 1. Exon, *bpm5-1*) und SALK_038471 (Insertion 2. Exon, *bpm5-2*), und für *BPM6* SALK_618816 (*bpm6-1*) mit einer Insertion im 5'-UTR-Bereich. Die einzige für *BPM1* möglicherweise relevante Linie SALK_031057 (Insertion 5'-UTR) war nicht erhältlich. Die beiden Linien für *BPM3* (SALK_072848, Insertion 3. Intron) und *BPM4* (SAIL_304.D12, Insertion 3'-UTR) wurden der Arbeitsgruppe Genschik (IBMP-CNRS Institute, Straßburg) bereits zuvor analysiert und nicht als Nullmutanten kommuniziert.

Die PCR-Genotypisierung der verschiedenen Linien erfolgte unter Verwendung des für die *left border* des Vektors pROKII spezifischen Primers LBa1 (Abbildung 13 im Anhang), in Kombination mit genspezifischen Primern auf genomische DNA (siehe 2.3.7, Tabelle 13 im Anhang). Es konnten für *bpm2-1*, *bpm5-1*, *bpm5-2* und *bpm6-1* homozygote Linien generiert werden (Abbildung 37B-E).

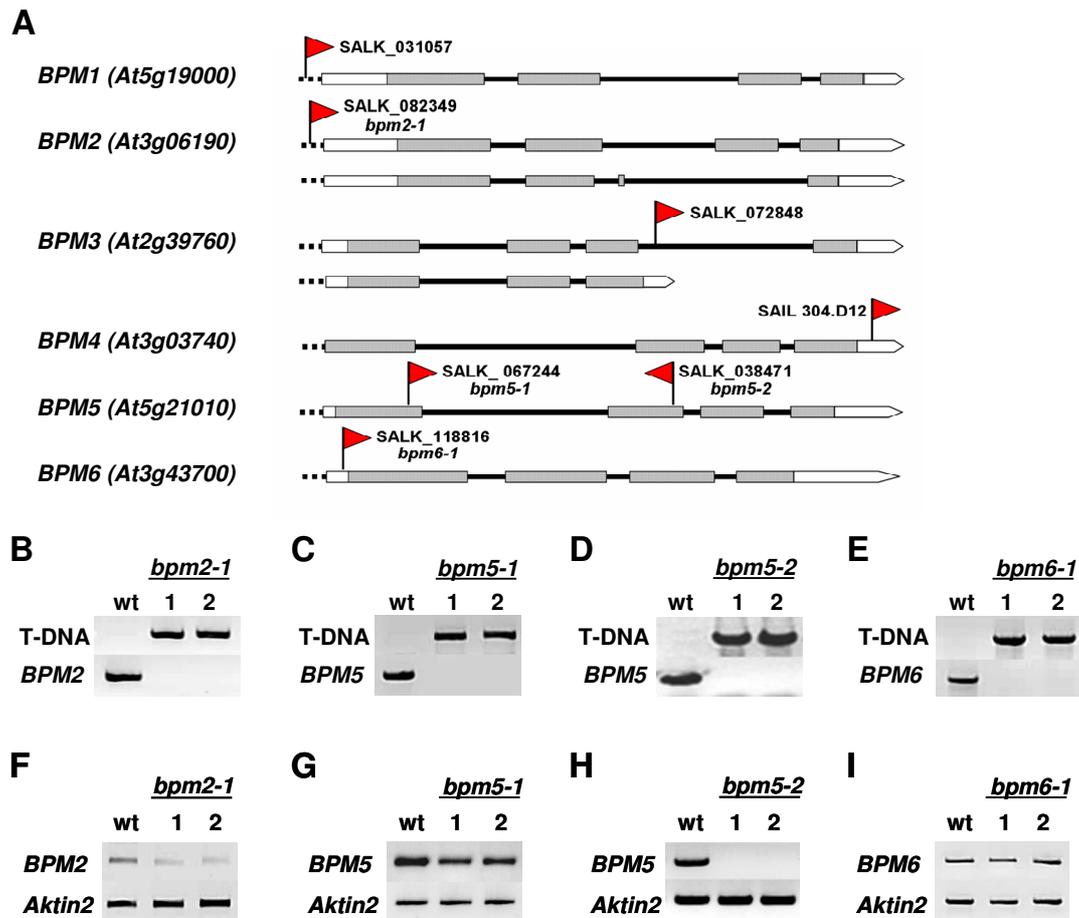


Abbildung 37: Genotypisierung und Expressionsanalyse von BPM-Insertionsmutanten

A) Genstruktur der *BPM*-Leserahmen und Positionierung der annotierten Insertionen der nebenstehenden Mutanten. Weiße Kästchen zeigen UTR-Bereiche an, schraffierte Kästchen Exon-Sequenzen. Durchgängige und gestrichelte schwarze Linien stehen für Introns bzw. Promotorbereiche. Die Fähnchen geben die 5'-3'-Ausrichtung der Insertion im Genom an, wobei das Fähnchen aus der *left border* der T-DNA herausragt.

B-E) Genotypisierung der Insertionslinien durch PCR-Analyse, unter Verwendung des T-DNA Primers LBa1 und genspezifischer Primer (obere Reihe) bzw. gen- oder promotor-spezifischen Primern (untere Reihe).

F-I) Expressionsanalyse (RT-PCR) homozygoter Insertionslinien.

Um die Auswirkungen auf die Expression des entsprechenden Gens zu untersuchen, wurde von jeweils zwei homozygoten Pflanzen Gesamt-RNA extrahiert und mit genspezifischen Primern (Tabelle 13 im Anhang) eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Abbildung 37F-I).

Für die Insertionspflanzen *bpm5-1* konnte eine verringerte Transkriptmenge *BPM5* nachgewiesen werden, und für *bpm5-2* kein *BPM5* Transkript (Abbildung 37F). Die homozygoten *bpm5-2* Pflanzen wurden als Nullmutanten für weitere Untersuchungen verwendet. Die Ergebnisse der RT-PCR für die Linie *bpm2-1*, mit einer Insertion etwa 340 bp oberhalb des annotierten Startcodons, zeigten geringfügig weniger Transkript im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise ist hier durch die Insertion der Zugang zu cis-regulatorischen Elementen erschwert. Die RT-PCR Analyse der *bpm6-1* Pflanzen ergab eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expressionsstärke. Die *bpm2-1* und *bpm6-1* Pflanzen zeigten keine auffälligen Phänotypen in ihrer Entwicklung und wurden nicht weiter untersucht.

Insgesamt ist die äußerst geringe Zahl an Insertionen im Bereich der *BPM* Gene auffällig. Die Promotorinsertion *bpm2-1*, sowie die 5'-UTR-Insertion der Linie *bpm6-1* zeigten keine hinreichenden Auswirkungen auf die Expression des jeweiligen Gens. Die einzigen Insertionslinien für *BPM3* und *BPM4* sind ebenfalls keine Nullmutanten. Möglicherweise konnten aufgrund der biologischen Funktion der betroffenen *BPM* keine Mutanten generiert werden.

3.8.2 Ergänzender Versuchsansatz zum Ausschalten von *BPM1* und *BPM4* durch *antisense* Konstrukte

Bei der Suche nach möglichen *knock out* Mutanten konnten für *BPM1* bis 4, sowie *BPM6* keine Samenlinien mit Insertion innerhalb des jeweiligen Leserrahmens in Exonbereichen gefunden werden. Ein alternativer Ansatz, um in Pflanzen die Aktivität eines Gens gezielt auszuschalten, ist das stabile Einbringen sogenannter *antisense* Konstrukte. Eine kurze RNA (ca. 200 bp Länge) mit einer komplementären Sequenz (*antisense*) zum auszuschaltenden Transkript (mRNA, *sense*) wird in der Pflanze exprimiert. Hybridisieren die Sequenzen, blockiert diese Duplex-Struktur die Translation der mRNA. Dies kann durch Blockade des Ribosomenzugangs geschehen, außerdem werden solche doppelsträngigen RNAs in der Zelle von der RNAi (RNAinterference) Maschinerie erkannt und von speziellen Ribonucleasen abgebaut. Bei entsprechender Spezifität der gewählten Sequenz und in Abhängigkeit des

Verhältnisses zwischen Transkriptmenge des Konstrukts und der endogenen Ziel-mRNA kann so ein Gen „zum Schweigen“ gebracht werden.

Die BPM-Familie kann in vier Gruppen eingeteilt werden mit BPM1 und 2 bzw. BPM5 und 6 in je einer Gruppe, bzw. BPM3 und BPM4 jeweils allein stehend (siehe Abbildung 5). Für den *antisense* Ansatz wurden BPM1 und BPM4 ausgewählt. BPM1 wurde zuvor sowohl im Hefe-*screen* (siehe Abschnitt 3.3), als auch zur Untersuchung der Interaktionsspezifität mit AP2 Proteinen (Abschnitt 3.4.2) verwendet. Außerdem lokalisierte GFP:BPM1, wie GFP:RAP2.4, ausschließlich im Zellkern (Abbildung 23). BPM4 nimmt in phylogenetischer Hinsicht eine relativ isolierte Position innerhalb der BPM Familie ein, mit Identitäten unter 50 % zu den restlichen BPM Mitgliedern (siehe Abbildung 5). GFP:BPM4 zeigte als einziges BPM Protein keine Kernlokalisierung (Abbildung 26).

Die Identifizierung spezifischer Sequenzbereiche zur Generierung der *antisense* Linien *asbpm1* und *asbpm4* erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms BLASTN 2.2.8 (Altschul et al., 1997). Das *asbpm1* Konstrukt umfaßt ein Fragment von 160 bp Länge, das den in *BPM1* verlängerten Sequenzbereich zwischen BTB- und MATH-Domäne umfaßt (702-858 bp, Abbildung 38A). Als Zielsequenz für *asbpm4* wurde die für *BPM4* spezifische 3'-terminale Extension (1215-1389 bp) bestimmt (Abbildung 38A). Die *antisense* Fragmente wurden in den Expressionsvektor pCB302-3 kloniert (Abbildung 38A, Tabelle 12-15 im Anhang), und die Plasmide durch Agrobakterien vermittelte Transformation stabil in Pflanzen eingebracht (siehe 2.4.3). Transgene Pflanzen wurden durch BASTA[®]-Selektion (siehe 2.1.4.3) identifiziert.

Obwohl für *asbpm1* etwa 20 transgene Pflanzen generiert wurden, konnte in keiner dieser Pflanzen die Expression des Transgens nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im Falle *BPM4* war der *antisense* Ansatz erfolgreich. Es wurden insgesamt 25 transgene Pflanzen durch Northern Blot Analyse (siehe 2.3.10) auf die Expression des Transgens und *BPM4* getestet. Das Ergebnis des Blots der Linien #1-12 ist in Abbildung 38B zu sehen. Als Sonde wurde der auch für das *antisense* Konstrukt verwendete 3'-terminale Sequenzabschnitt genutzt.

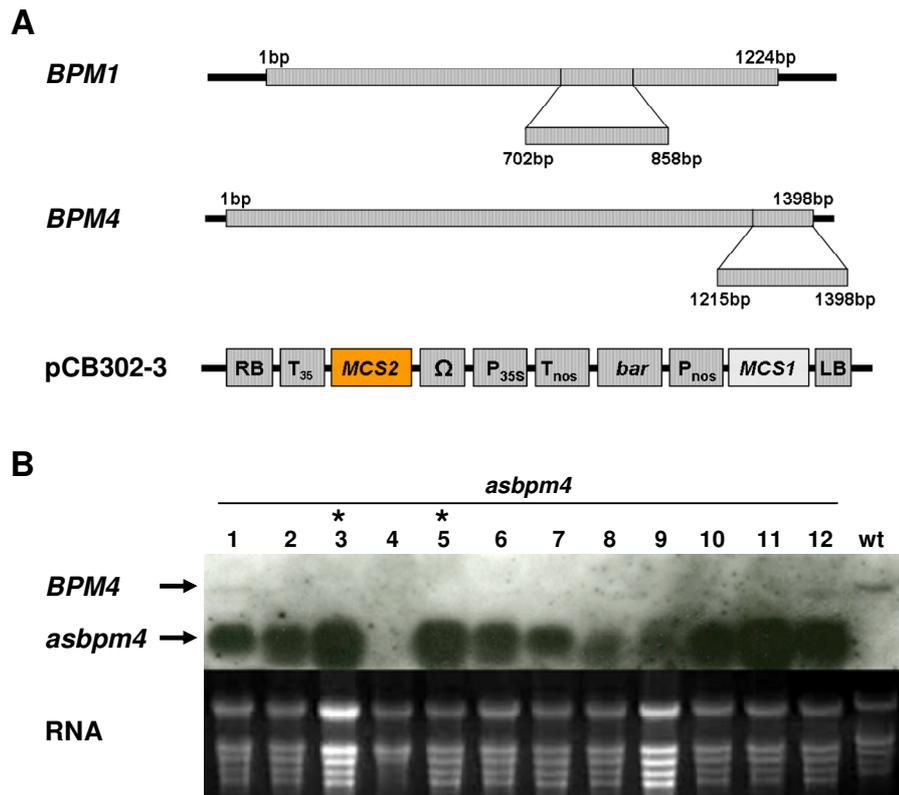


Abbildung 38: Schema der *antisense* Konstrukte *asbpm1* und *asbpm4* und Identifizierung von *asbpm4* *knock out* Mutanten.

A) Schematische Darstellung von *BPM1* und *BPM4* (cDNA). Die zur Erstellung der *antisense* Konstrukte benutzten Sequenzen sind vergrößert. Darunter ist der T-DNA Bereich des Vektors pCB302-3 abgebildet (korrigierte Annotierung gegenüber Xiang et al., 2004). Die *antisense*-Sequenzen wurden in die *MCS2* kloniert.

B) Northern Blot Analyse von 12 *asbpm4* transgenen Pflanzen und Col0 (wt). Die Linien *asbpm4* #3 und #5 (Sternchen) wurden für weitere Analysen ausgewählt.

Die Linien *asbpm4-3* und *asbpm4-5* zeigten eine starke *asbpm4* Expression und kein Signal für *BPM4*. Homozygote Nachkommen der Linien wurden durch RT-PCR nochmals auf *BPM4* Expression getestet und als Nullmutanten bestätigt (Abbildung 47 im Anhang). Homozygote Folgegenerationen dieser Pflanzen wurden für Versuche zur phänotypischen Analyse verwendet, zeigten im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen jedoch keine offensichtliche Änderung des Phänotyps in ihrer Entwicklung.

3.8.3 Identifizierung einer *rap2.4* Mutante

Im Hinblick auf die Interaktion der BPM Proteine mit dem Transkriptionsfaktor RAP2.4 und dem daraus zu schließenden funktionalen Zusammenhang wurde auch für *RAP2.4* eine Nullmutante gesucht. Die Insertionslinie SALK_020767 (*rap2.4-1*) wurde zur Homozygotie gebracht und der Verlust der *RAP2.4*-Expression durch RT-PCR bestätigt (Abbildung 39). Wie die Überexpressionspflanzen *RAP2.4:myc* zeigte auch die Linie *rap2.4-1* keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen.

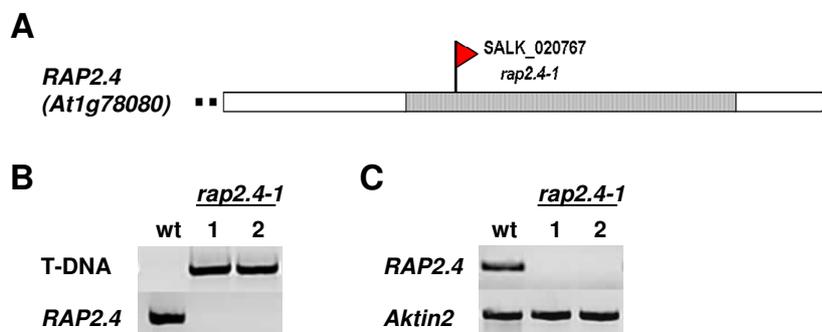


Abbildung 39: Genotypisierung und Expressionsanalyse *rap2.4-1*.

A) Schematische Darstellung des Gens *RAP2.4*. weiß = UTR, grau = Exon. B) PCR zur Verifizierung der T-DNA Insertion. C) RT-PCR zur Expressionsanalyse der Insertionsmutanten.

3.8.4 Vergleich von *asbpm4*, *bpm5-2*, *rap2.4-1* und *Col0* unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Weder die Insertionsmutanten *bpm5-2* und *rap2.4-1*, noch die *asbpm4* Pflanzen zeigten einen augenscheinlichen Phänotyp: Die Keimungsrate in Sterilkultur (siehe 2.4.1), beobachtet über 8 Tage, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten bzw. antisense Linien (A), wobei die Keimung hier und in den folgenden Experimenten durch den Austritt der Radikula definiert wurde. Außerdem waren sowohl die in Sterilkultur gezogenen Keimlinge, als auch die in Erde angezogen adulten Pflanzen (siehe 2.4.2) unter Standardbedingungen vom Wildtyp phänotypisch nicht zu unterscheiden (Abbildung 40B,C).

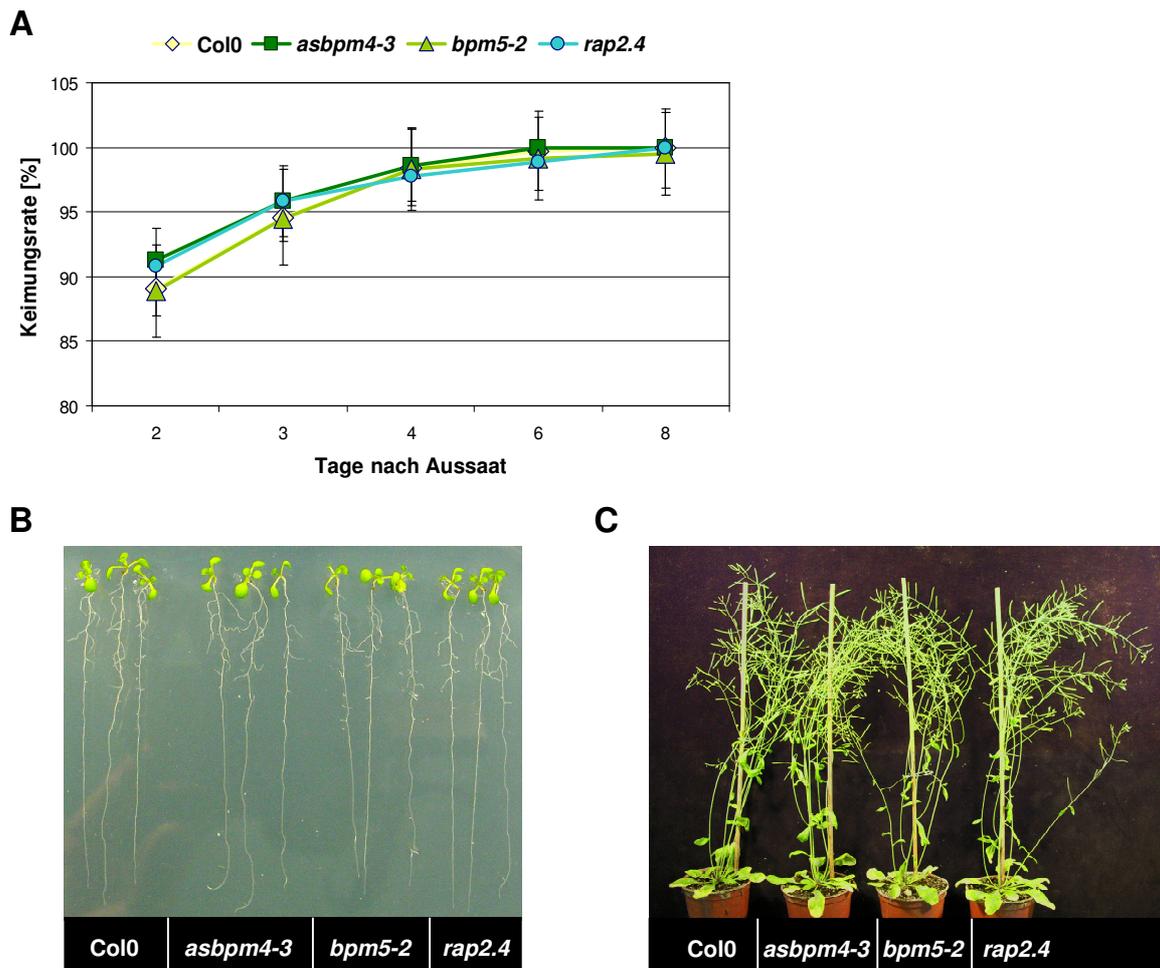


Abbildung 40: Phänotyp der Linien *asbpm4*, *bpm5-2* und *rap2.4* im Vergleich mit Wildtyp Col0.

A) Beobachtung der Keimungsrate in Sterilkultur über 8 Tage. B) 10 Tage alte Keimlinge, angezogen in Sterilkultur auf ATS-Medium. C) Adulte Pflanzen wurden nach vollendeter Blüte verglichen (ca. 5 Wochen). Alle Samen wurden vor der Aussaat 48 h bei 4 °C stratifiziert. Alle Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen bei 21-24 °C.

Da unter normalen Wachstumsbedingungen keine Änderung im Phänotyp der Mutanten beobachtet werden konnte, sollte veränderten physiologischen Reaktionen der Pflanzen durch verschiedene Behandlungen nachgegangen werden. Zunächst wurden die Daten des *Arabidopsis* eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca>) herangezogen, der eine Sammlung von Microarray-Datensätzen zu unterschiedlichsten Induktionsexperimenten, Entwicklungsstadien und Pflanzengewebe enthält.

Sowohl die Daten zu chemischen Behandlungen (z.B. mit Inhibitoren von Phytohormonen, Photosynthese und Proteasom), Phytohormonen (z.B. Auxin, Cytokinin), als auch aus biotischen und abiotischen Stressansätzen (z.B. Pathogene, Hitze, UV-Licht) ergaben keine

deutlichen Expressionsänderungen für eines der *BPM* Gene, wobei zu *BPM1* keinerlei Daten vorlagen.

Die Mitglieder der *BPM* Familie interagieren mit den *Arabidopsis* CUL3 Proteinen, welche eine Rolle in der Regulation der Ethylenbiosynthese spielen (Wang et al., 2004; Thomann et al., 2009). Die *cul3^{hyp}* Mutante akkumuliert das Enzym ACC-Synthase 5 (ACS5) und zeigt daher eine konstitutive Ethylenantwort (Thomann et al., 2009). Um die Ethylenantwort der Linien *asbpm4-3*, *bpm5-2* und *rap2.4-1* im Vergleich zum Wildtyp (Col0) zu untersuchen, wurde die Hypokotylllänge von fünf Tage alten etiolierten Keimlingen gemessen, die auf ATS Medium mit verschiedenen Konzentrationen 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC), einer Vorstufe von Ethylen, angezogenen wurden. Um eine gleichmäßige Keimung zu sichern, wurden die Samen nach der Sterilisation (siehe 2.4.1) zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend für 120 min ins Licht gestellt, bevor sie fünf Tage unter Lichtausschluß wuchsen. Wie die Abbildung 41A zeigt, konnten in diesem Versuch keine Unterschiede in der Ethylenantwort detektiert werden.

Des Weiteren wurde die Wirkung des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) auf das Keimungsverhalten der Mutanten getestet. Hierzu wurden die sterilisierten Samen zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend auf ATS-Medium mit 0 µM, 0,75 µM, 2 µM bzw. 5 µM ABA ausgelegt. Nach fünf Tagen wurden die Keimungsraten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Abbildung 41B zeigt eine graphische Darstellung der Keimungsrate in Prozent, bezogen auf die Zahl der ausgelegten Samen. Zum Vergleich wurden neben dem Wildtyp auch die Samen der ABA insensitiven Mutante *abi4-102* der Behandlung unterzogen. Der Graphik ist zu entnehmen, daß die Keimungsrate des Wildtyps und der Linien *asbpm4-3* und *bpm5-2* bei einer ABA-Konzentration von 2 µM auf ca. 60% absinkt, um bei 5 µM ABA gegen Null zu tendieren. Im Gegensatz dazu erreichte die Linie *abi4-102* auf Medium mit 2 µM ABA etwa 90% und auf 5 µM ABA noch etwa 40 % ihrer normalen Keimungsrate. Die *rap2.4-1* Linie reagierte signifikant insensitiver als der Wildtyp, aber sensitiver als die *abi4-102* Mutante: Die Keimungsrate lag auf Medium mit 2 µM ABA bei rund 90 % (Studentscher t-Test $p = 0,0008$), was vergleichbar mit *abi4-102* ist. Bei einer Konzentration von 5 µM ABA lag die Keimungsrate von *rap2.4-1* mit einem Mittelwert von 10 % unter der von *abi4-102* und nicht mehr signifikant ($p = 0,15$) über des Wildtyps.

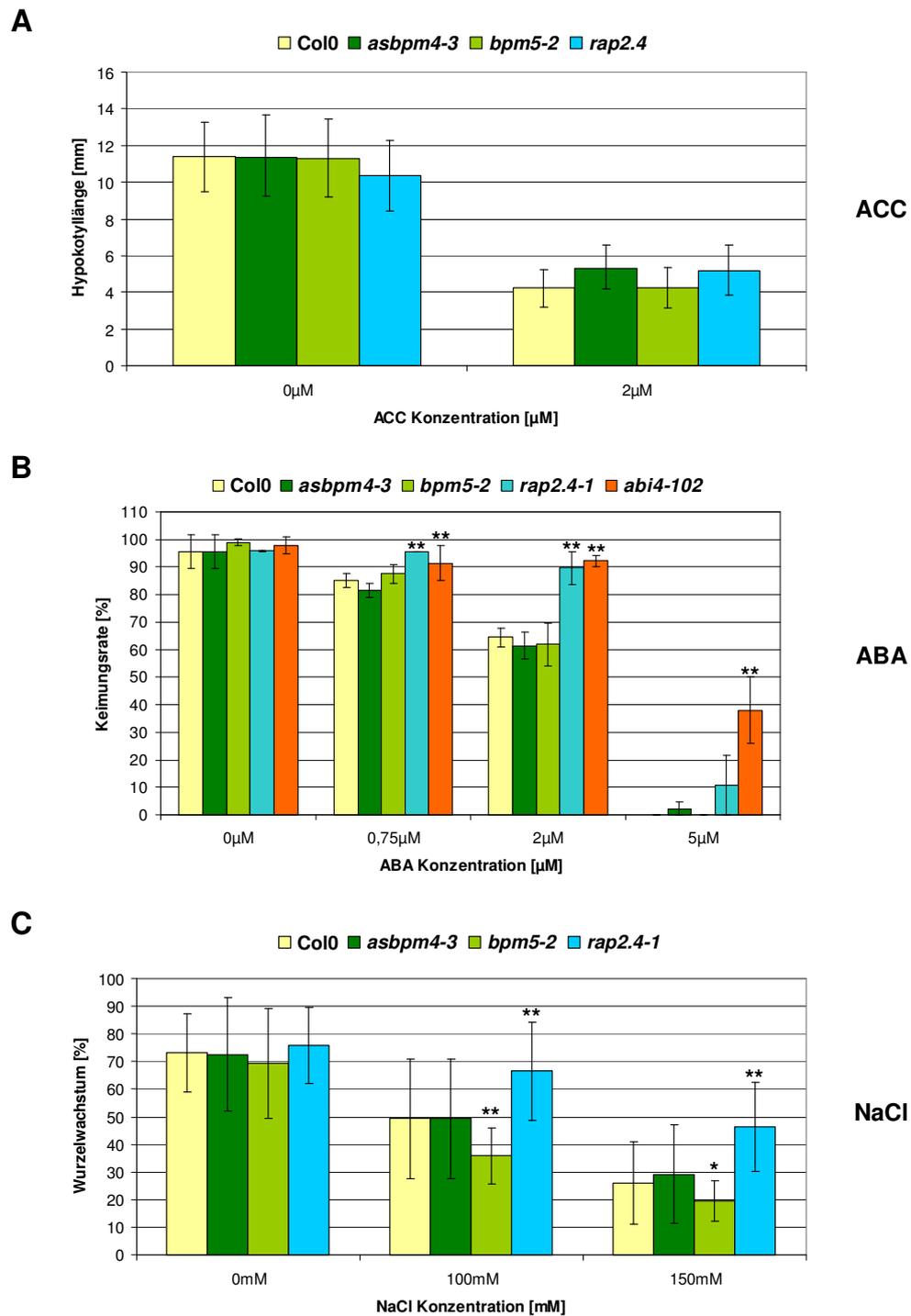


Abbildung 41: Quantitative Darstellung der Wirkung von ACC, ABA oder Salzstress auf die Mutanten *asbpm4*, *bpm5-2* und *rap2.4-1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0.

A) Messung der Hypokotyllängen nach fünf Tagen Wachstum in Dunkelheit auf Medium mit 0 bzw. 2 μM ACC. B) Graphische Auftragung des Keimungsverhaltens auf Medium mit 0 / 0,75 / 2 / 5 μM ABA. Die Werte zeigen den Mittelwert der Keimungsrate von 3 x 50 Samen nach 8 Tagen unter Langtagbedingungen (16/8h) und 22 °C. C) Vier Tage alte Keimlinge, angezogen auf ATS-Medium, wurden auf ATS-Medium mit 0 / 100 / 150 nM NaCl Konzentration umgesetzt und nach weiteren 7 Tagen die Wurzellängenzunahme gemessen. (Signifikanzbereich im Vergleich zum Wildtyp [t-Test]: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

Zusätzlich wurde die Reaktion der Pflanzen auf Salzstress überprüft. Hierfür wurden vier Tage alte Keimlinge auf ATS-Medium mit 0 mM, 100 mM oder 150 mM NaCl übertragen, die Wurzelspitze markiert, und nach weiteren sieben Tagen das Wurzelwachstum dokumentiert. Wie die Graphik in Abbildung 41C zeigt, waren die berechneten Standardabweichungen für diesen Versuchsansatz sehr hoch. Dennoch ergaben sich sowohl für *bpm5-2* als auch *rap2.4-1* signifikante Unterschiede zum Wildtyp: Während die Keimlinge der Linie *bpm5-2* deutlich sensibler als der Wildtyp auf Salz reagierten (Studentischer t-Test $p = 0,009$ bzw. $0,046$), zeigten die *rap2.4-1* Pflanzen eine Insensitivität im Vergleich zum Wildtyp ($p = 0,008$ bzw. $0,001$).

Die Analyse der Reaktion der Mutanten auf die verschiedenen angelegten Bedingungen zeigte, daß die Mutante *bpm5-2* sensitiv auf Salzstress reagiert. Des Weiteren zeigten *asbpm4* und *bpm5-2* jedoch keine Unterschiede in der Reaktion auf ACC, ABA oder Salzstress. Die Mutante *rap2.4-1* zeigte sowohl bei der Keimung auf ABA, als auch in der Reaktion auf Salzstress deutliche Unterschiede zum Wildtyp. In beiden Fällen reagierte *rap2.4-1* weniger sensitiv als der Wildtyp.

3.9 Induktionsanalysen durch RT-PCR

Unter Berücksichtigung der teilweise sehr schwachen Expression in den Promotor:GUS Analysen sollte die Regulation der Expression der *BPM* durch Induktionsversuche mit Keimlingen und anschließender RT-PCR untersucht werden. Um die Auswahl der zu testenden Bedingungen einzuschränken, wurde auf Daten der Publikation Lin et al. (2008) zum *BPM* Interaktor *RAP2.4* zurückgegriffen. Die Gruppe beschrieb eine Induktion des *RAP2.4* Gens durch Salz- (NaCl) und Trockenstress, wohingegen ABA, ACC und IAA (Indol-3-essigsäure) keine Wirkung zeigten. Für die Versuche zur Expressionsregulation der *BPM* Gene wurden Salzstress (NaCl), Trockenstress und osmotischer Stress (Sorbitol) ausgewählt. Die Expression von *RAP2.4* wurde im Rahmen der genannten Veröffentlichung nicht auf eine Induktion durch Sorbitol untersucht.

Um die unterschiedlichen Stressfaktoren zu testen wurden Keimlinge des Ökotyps Col0 in Sterilkultur auf ATS-Z-Medium angezogen und nach sieben Tagen den verschiedenen Stressvarianten ausgesetzt. Anschließend wurde das Expressionslevel der *BPM* und *RAP2.4* durch RT-PCR untersucht. Als Ansätze wurden zunächst osmotischer Stress (Sorbitol) und

hohe Salinität (NaCl) gewählt. Die sieben Tage alten in Sterilkultur gezogenen Keimlinge wurden hierfür in flüssiges ATS Medium überführt, welches mit 200 mM Sorbitol bzw. 200 mM NaCl versetzt war. ATS-Medium ohne Zusätze diente als Kontrolle. Nach sechs Stunden Inkubation wurden die Keimlinge geerntet.

Für den Trockenstressversuch wurden die Keimlinge auf den Petrischalen mit ATS Medium belassen und ohne Deckel einem steten Luftstrom bei Raumtemperatur ausgesetzt. Auch in diesem Ansatz wurden die Proben nach sechs Stunden geerntet, wobei die Keimlinge einen deutlichen Wasserverlust im Sinne schlaffer Blätter zeigten.

Die RT-PCR Analyse ergab für die Behandlung mit Sorbitol eine besonders deutliche Induktion der Gene *BPM1*, *BPM2*, und *RAP2.4* (Abbildung 42A). Eine schwächere Induktion war ebenfalls für *BPM3*, *BPM5* und *BPM6* zu erkennen. Die Expression von *BPM4* schien durch die Sorbitol-Behandlung nicht beeinflusst. Nach der Salzbehandlung waren die Transkriptmengen von allen untersuchten Genen außer *BPM6* erhöht, wobei der Anstieg für *BPM1*, *BPM4*, *BPM5* und *RAP2.4* besonders stark ausfiel. Trockenheit als Stressfaktor induzierte *BPM1*, *BPM2* und *BPM4*, wohingegen für *RAP2.4* keine deutliche Induktion nachweisbar war (Abbildung 42B).

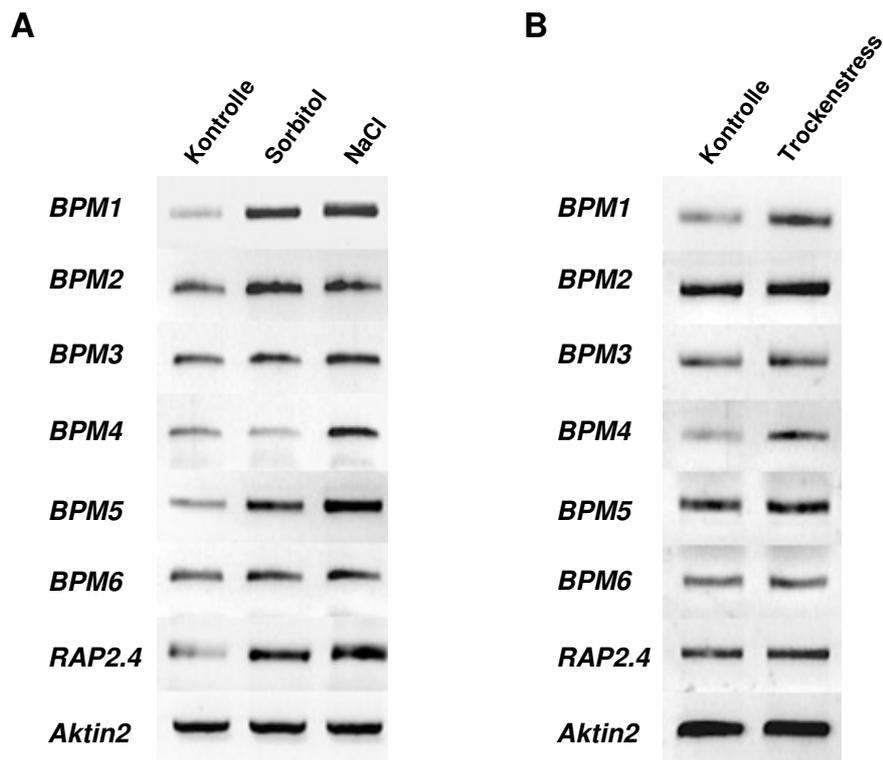


Abbildung 42: Semiquantitative RT-PCR auf sieben Tage alte Keimlinge nach verschiedenen Stressbehandlungen.

A) *BPM1*, *BPM2* und *RAP2.4* waren stark durch Salzstress (6 Stunden 200 mM NaCl) induzierbar, aber auch *BPM5* und *BPM6* zeigten einen leichten Anstieg der Transkriptmenge. Nach der Behandlung mit Sorbitol (200 mM, 6 h) waren *BPM1*, *BPM3*, *BPM4*, *BPM5* und *RAP2.4* deutlich induziert. B) *BPM1*, *BPM2* und *BPM4* zeigten eine Induktion durch Trockenstress (Laborbank, 6 h), wohingegen für *RAP2.4* keine deutliche Induktion nachweisbar war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die *BPM* Genfamilie durch verschiedene Stressvarianten induziert werden konnte, wobei *BPM1* und *BPM2* besonders stark positiv reguliert wurden. Die Expression von *RAP2.4* wurde sowohl durch Sorbitol als auch Salzstress erhöht. Es gibt demnach eindeutige Überlappungen in der Stressantwort. Der Trockenstress-Ansatz bei *RAP2.4* zeigte keine Wirkung, was möglicherweise an der Versuchsdurchführung lag, wohingegen *BPM1* und *BPM4* induziert werden. Möglicherweise ist die Induktion von *BPM1* und *BPM4* sensitiver oder schneller als die von *RAP2.4*.

3.10 EMSA Analysen

Wie unter Punkt 3.4 beschrieben, gehört RAP2.4 der Superfamilie der AP2-Transkriptionsfaktoren an. Das Protein besitzt eine einzelne AP2 DNA-Bindedomäne und wird der Untergruppe der CBF/DREB Proteine zugeordnet. Für einige AP2-Transkriptionsfaktoren wurde die spezifische Bindung an das *dehydration-responsive element/C-repeat* (DRE/CRT) *cis-acting* Element gezeigt, welches Teil vieler Promotoren stressinduzierbarer Gene ist (Riechmann und Meyerowitz, 1998; Sakuma et al., 2002). Um einen Einfluß der BPM/RAP2.4 Interaktionen auf die DNA Bindung von RAP2.4 zu untersuchen, sollte ein nicht-radioaktiver *Electro Mobility Shift Assay* (EMSA, siehe 2.5.5) mit aufgereinigtem GST:RAP2.4 Protein (siehe 2.5.2) etabliert werden. Auf diesem System aufbauend sollte dann ein kompetitiver Ansatz mit verschiedenen GST:BPM Proteinen folgen.

3.10.1 GST:RAP2.4 bindet *in vitro* an ein Fragment des *rd29A* Promotors

Als DNA-Fragment für die EMSA-Experimente wurde eine 120 bp lange Promotorregion des *Arabidopsis* Gens *rd29A* gewählt (Abbildung 43A, Tabelle 13). Diese Sequenz umfaßt die Motive zur Induktion durch Dehydrierung, hohe Salinität, niedrige Temperaturen, und Abscisinsäure (ABA). Im Speziellen sind dies das DRE Motiv (TA/GCCGACT) in einfacher Wiederholung, ein DRE Kernmotiv (GCCGAC), aber auch eine ABA-Responsive Element (ABRE; ACGTGG/TC) Sequenz (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994; Narusaka et al., 2003).

Zunächst wurden die Bedingungen für die Bindung von RAP2.4 an das im EMSA verwendete DRE-Element etabliert. Abbildung 43C zeigt einen Versuchsansatz mit ansteigenden Mengen GST:RAP2.4. Ziel war es zunächst, die Sensitivität des Ansatzes zu testen. Die eingesetzte DNA-Menge lag in den folgenden Versuchen zwischen 100 ng und 150 ng pro Ansatz. Die Inkubation mit 2 µg GST:RAP2.4 führte zu keiner erkennbaren Veränderung der DNA-Laufhöhe. Eine Inkubation der DNA mit 2,5 µg bzw. 3,2 µg GST:RAP2.4 bewirkte hingegen einen *shift* (Änderung der Laufhöhe) des DNA-Signals, wobei ein Hauptsignal und ein schwächeres und höheres Signal entstand (Abbildung 43C, Pfeile). Dies ist wahrscheinlich auf die Bildung höherer Komplexe zurückzuführen. Wie bereits in Abschnitt

3.4.3 gezeigt, ist RAP2.4 in der Lage, Homo- und Heterodimere zu bilden. Das gleiche EMSA-Experiment mit 3,2 µg GST bewirkte keine Retardation des Signals. Die hier gezeigten Ergebnisse sind der erste Nachweis der spezifischen Interaktion des RAP2.4 Proteins mit einer natürlich vorkommenden Promotorsequenz.

3.10.2 Die Mutagenese der AP2-Domäne führt zum Verlust der DNA-Bindung

Um die Spezifität und die Art der DNA-Bindung zu verifizieren, und um Artefakte des Versuchsaufbaus auszuschließen, wurde eine Punktmutation in RAP2.4 eingeführt (siehe 2.3.13), die zu einem Aminosäureaustausch innerhalb der AP2 DNA-Bindedomäne an Position 179 von Glycin zu Serin (RAP2.4^{G179S}) führte (Abbildung 43B). Diese Glycin Position ist in allen bekannten AP2 Proteinen konserviert. Die eingeführte Mutation entspricht der identifizierten Mutation der APETALA2 Mutante *ap2-1*, die im Vergleich zu anderen *ap2* Mutanten einen schwachen Phänotyp zeigt (Jofuku et al., 1994; Wakem und Kohalmi, 2003). Der partielle Funktionsverlust des Genproduktes wurde darauf zurückgeführt, daß der Austausch des Glycins durch Serin die Formung einer funktionalen amphipathischen α -Helix an dieser Stelle stört, was z.B. eine durch diese Sekundärstruktur vermittelte Protein-Protein-Interaktion verhindern könnte.

Während der EMSA mit 2,5 µg GST:RAP2.4 die erwartete DNA-Retardation zeigte, konnte die gleiche Menge GST:RAP2.4^{G179S} die DNA nicht binden (Abbildung 43D). Des Weiteren wurde im Kompetitivansatz RAP2.4 (2,5 µg) mit der zweifachen Menge mutagenisiertem RAP2.4 und DNA inkubiert, was zu einer deutlichen Abschwächung des Signals führte. Diese negative Wirkung deutet darauf hin, daß RAP2.4 als Dimer oder höherer Komplex an die DNA bindet, und die eingeführte Mutation die Interaktion der Proteine verhindert. GST hatte, obwohl im Mengenverhältnis 3:1 eingesetzt, keinen Einfluß auf die DNA-Bindung durch RAP2.4 (Abbildung 43F).

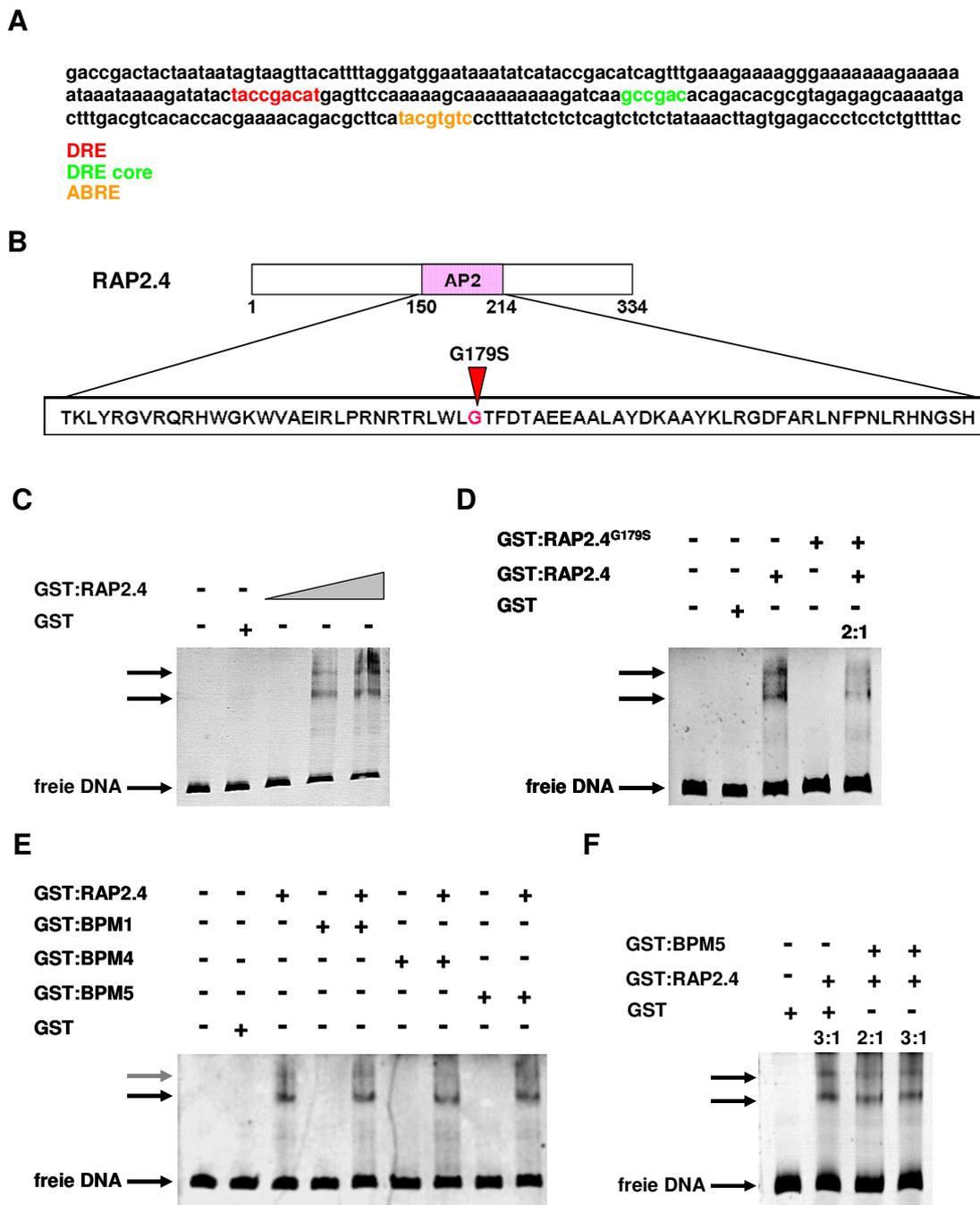


Abbildung 43: GST:RAP2.4 bindet *in vitro* spezifisch an ein rd29A Promotorfragment, unbeeinflusst von BPM Proteinen.

A) Sequenz des verwendeten Promotorfragments. Bekannte regulatorische Elemente sind farbig hervorgehoben (Erläuterungen im Text). B) Schematische Darstellung des RAP2.4 Proteins mit der Aminosäuresequenz der AP2-Domäne. Die eingeführte Mutation G179S wurde mit einem Dreieck markiert. C) EMSA mit ansteigender Menge GST:RAP2.4 (1,5/2,5/3,2µg) und GST (3,2µg) als Negativkontrolle. D) Das Wildtyp-GST:RAP2.4 kann das Promotorfragment binden, wohingegen das mutierte Protein GST:RAP2.4^{G179S} nicht dazu in der Lage ist. Die Zugabe des mutierten Proteins zu RAP2.4 im Verhältnis 2:1 schwächt das Retentionssignal deutlich ab. E) Kompetitives EMSA-Experiment: Die GST:BPM Proteine können selbst nicht die DNA binden. Ihre Zugabe zum EMSA-Ansatz mit GST:RAP2.4 im Verhältnis 2:1 zeigt keinen Einfluß auf die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors. F) Kompetitiver Ansatz mit ansteigender GST:BPM5 Menge.

3.10.3 Die Interaktion BPM/RAP2.4 hat *in vitro* keinen Einfluß auf die DNA-Bindung durch RAP2.4

In kompetitiven Experimenten mit rekombinanten BPM Proteinen sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Interaktion von BPM und RAP2.4 die DNA-Bindfähigkeit des Transkriptionsfaktors beeinflusst. In Abbildung 43E ist zu sehen, daß die Zugabe von BPM Proteinen im Mengenverhältnis 2:1 die Signalstärke der DNA-Retardation durch GST:RAP2.4 nicht verändert. Als zusätzliche Kontrolle wurden auch die eingesetzten GST:BPM Proteine auf DNA-Bindung getestet, in jedem Fall mit negativem Ergebnis (Abbildung 43E). Für BPM5 wurde der Ansatz bis zu einem Mengenverhältnis 3:1 weitergeführt, ebenfalls ohne sichtbare Änderung des Signals (Abbildung 43F). Dies bedeutet, daß die Interaktion BPM/RAP2.4 *in vitro* die DNA-Bindung durch RAP2.4 weder negativ noch positiv beeinflusst. Außerdem steht die BPM/RAP2.4 Interaktion nicht mit der Bildung von höheren RAP2.4 Komplexen in Konkurrenz.

4. DISKUSSION

In *Arabidopsis thaliana* kodieren rund 80 Gene für Proteine mit einer BTB-Domäne, von denen bisher nur wenige in ihrer Funktion beschrieben wurden (Tabelle 1). Die meisten *Arabidopsis* BTB-Proteine kombinieren die BTB-Domäne mit einer zweiten Domäne, die ihnen eine spezielle Funktion in der Zelle zuzuweisen scheint. BTB-NPH3 Proteine spielen z.B. eine Rolle bei der phototropen Signaltransduktion (Motchoulski and Liscum, 1999), BTB-Proteine mit Ankyrin- oder Armadillo-repeats sind Transkriptionsregulatoren (Cao et al., 1997; Ha et al., 2004; Hepworth et al., 2005; Norberg et al., 2005). Die BTB-TAZ Proteine nehmen eine wichtige Funktion während der Gametophytenentwicklung ein (Robert et al., 2009), wohingegen die BTB-TPR Proteine Schlüsselfaktoren der Ethylenbiosynthese darstellen (Wang et al., 2004).

Einige BTB-Proteine, wie NPR1 oder die BTB-TAZ Proteine, werden über den 26S Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Robert et al., 2009; Spoel et al., 2009). Vertreter anderer BTB-Familien wurden als direkte Interaktoren der Culline CUL3A und CUL3B (CUL3) identifiziert: ETO1, EOL1 und EOL2 (BTB-TPR; Wang et al., 2004), NPH3 (Pedmale und Liscum, 2007), sowie Vertreter der BTB-MATH Familie (Dieterle et al., 2005; Figueroa et al., 2005; Gingerich et al., 2005; Weber et al., 2005).

CUL3 Proteine definieren eine Klasse multimerer Ubiquitin E3-Ligasen, die über Substratadaptoren Zielproteine des 26S Ubiquitin-Proteasom-Weges binden, ubiquitinieren und der Proteolyse zuführen. Als Substratadaptoren oder -rezeptoren solcher CUL3 E3-Ligasen wurden in Säugern und *C. elegans* Mitglieder verschiedener BTB-Familien identifiziert, wobei in allen bisher beschriebenen Fällen die Substratbindung über die zweite Domäne des jeweiligen BTB-Proteins erfolgte (Furukawa et al., 2003; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). In *Arabidopsis* konnte die tatsächliche Komplexbildung einer CUL3 E3-Ligase mit einem BTB-Protein als Substratrezeptor bisher nur indirekt für ETO1 gezeigt werden. Dessen Interaktor ACS5 wird über den 26S Proteasom-Weg abgebaut, akkumuliert jedoch in *eto1* bzw. *cul3^{hyp}* Mutanten (Wang et al., 2004; Christians et al., 2009; Thomann et al., 2009).

Die *Arabidopsis* BTB-MATH (BPM) Proteinfamilie umfaßt sechs Mitglieder. Für insgesamt fünf der sechs BPM Proteine wurde bereits die Interaktion mit CUL3A/B getestet, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen (Dieterle et al., 2005; Figueroa et al., 2005; Gingerich et al., 2005; Weber et al., 2005). In der vorliegenden Dissertation wurden komplementierende

Interaktionsstudien durchgeführt, um der potentiellen Rolle der BPM Proteine als Substratadaptoren in CUL3 E3-Ligasen nachzugehen. Zusätzlich wurde eine detaillierte Charakterisierung der BPM Familie hinsichtlich Expression und subzellulärer Lokalisation vorgenommen.

4.1 Die Interaktoren der BPM Proteine

Die BPM Proteine besitzen eine N-terminale MATH und eine C-terminale BTB Domäne (Abbildung 4). Am BPM1 Protein konnte durch Deletions- und Mutageneseansätze beispielhaft bewiesen werden, daß die BTB-Domäne sowohl die Bindung von CUL3 vermittelt, als auch Dimerisationen der BPM Proteine untereinander (Weber et al., 2005). Unter Verwendung des Y2H Systems wurde nun gezeigt, daß BPM1-4 sowohl mit CUL3A und CUL3B interagieren, als auch homodimerisieren können (Abbildung 6). BPM5 und BPM6 zeigten diese Interaktionen nicht. In *in vitro* Pulldown Experimenten konnten jedoch die BPM 1 bis 5 CUL3A präzipitieren (Abbildung 7). Figueroa et al. (2005) zeigten in ähnlichen *in vitro* Pulldown-Experimenten zusätzlich eine Interaktion von BPM6 mit CUL3A. Solche widersprüchlichen Ergebnisse wurden unter anderem auch für ein Mitglied der BTB-TAZ Familie publiziert: Während Dieterle et al. (2005) und Gingerich et al. (2005) im Hefesystem keine Interaktion von BT2 mit CUL3 sahen, zeigten Figueroa et al. (2005) eine Präzipitation des *in vitro* translatierten BT2 Proteins durch CUL3A. Da inzwischen herausgefunden wurde, daß BT2 ein Substrat des Ubiquitin-Proteasom-Weges ist, spekuliert man über einen Adaptor, der die CUL3/BT2 Interaktion vermittelt (Robert et al., 2009). Ein ähnliches Bild „indirekter“ Interaktion wurde für NPR1 beobachtet (Spoel et al., 2009). Möglicherweise werden BPM5 und BPM6 ebenfalls über Adaptoren an CUL3 gebunden, z.B. durch BPM Proteine, die in der Lage sind, mit BPM5 und BPM6 Heterodimere zu bilden (Abbildung 6). Im Falle der BPM-Familie könnten auch Unterschiede in den experimentellen Abläufen zu gegensätzlichen Ergebnissen geführt haben. Festzuhalten bleibt eine partielle Übereinstimmung hinsichtlich der Fähigkeiten der BPM Proteine zur Assoziation mit BTB- und nicht-BTB-Proteinen.

Über die zweite Domäne der BPM ist in Pflanzen wenig bekannt: Die MATH-Domäne ist durch ihre Homologie zu Meprinen und TRAF Proteinen definiert worden (siehe Kapitel 1.7; Uren und Vaux, 1996), in Pflanzen wurden jedoch weder Meprine noch TRAF Proteine identifiziert (Zapata et al., 2001). In TRAF Proteinen ist das MATH-Motiv für die homomere

Trimerisierung und die TNF-Rezeptorbindung nötig, bei den Meprinen vermittelt sie die homomere Tetramerisierung (Baker und Reddy, 1996; Arch et al., 1998; Sunnerhagen et al., 2002). Die Homo- und Heterodimerisation findet innerhalb der BPM-Familie über die BTB-Domäne statt (Weber et al., 2005). Somit stellte sich die Frage nach Interaktoren der MATH-Domäne.

In Y2H-*screenings* wurden 25 verschiedene Bindungspartner für BPM3 bzw. BPM1¹⁻¹⁸⁹ identifiziert (Tabelle 11). In reziproken Interaktionsstudien konnte festgestellt werden, daß alle diese Proteine eine Bindung mit beiden BPM eingehen. Für sechs der Interaktoren wurde beispielhaft die Interaktion in *in vitro* Pulldown-Experimenten bestätigt (Abbildung 10). Von insgesamt 25 Klonen interagierten 6 spezifisch mit der BTB-Domäne. Neben BPM4 und BPM5 gehörte zu dieser Gruppe auch das erst vor kurzem beschriebene Protein NPX1 (nuclear protein X1; Kim et al., 2009). NPX1 ist in verschiedene ABA-abhängige Prozesse als Transkriptionsrepressor involviert. Außerdem interagiert es mit TIP (TCV-interacting protein), einem NAM/ATAF/CUC (NAC) Transkriptionsfaktor der pflanzlichen Pathogenabwehr (Ren et al., 2005). Für einige NAC Proteine wurde ein 26S Proteasom-abhängiger Abbau gezeigt (Olsen et al., 2005).

In der Gruppe der die MATH-Domäne bindenden Proteine fanden sich außerordentlich viele Proteine mit DNA-Bindedomäne, darunter wiederum vor allem Proteine mit einer APETALA2 (AP2) DNA-Bindedomäne. AP2-Transkriptionsfaktoren wurden als wichtige Faktoren pflanzlicher Entwicklungsprozesse beschrieben, aber auch als Regulatoren stressinduzierter Gene (Nakano et al., 2006; Saleh et al., 2006). Die in den Y2H-Studien identifizierten AP2-Transkriptionsfaktoren gehören verschiedenen Familien und Unterfamilien an (Abbildung 11): RAP2.4 und sein nächster Verwandter At1g22190 gehören zur Gruppe I der CBF/DREB Proteine, während ERF4, ERF7 und ERF8 Mitglieder der Gruppe VIII der ERF-Unterfamilie sind. Das Protein WRI1 besitzt zwei AP2 DNA-Bindedomänen und wird daher der AP2-Familie zugeordnet. Es kontrolliert die Expression verschiedener plastidärer Gene der Fettsäuresynthese, und spielt eine entscheidende Rolle im Fettsäuremetabolismus während der Samenreifung (Baud und Lepinec, 2009; Baud et al., 2009; Maeo et al., 2009).

Die scheinbar unspezifische Bindung der BPM Proteine mit Vertretern verschiedener Subfamilien der AP2-Transkriptionsfaktoren wurde durch Interaktionstest mit Mitgliedern der CBF/DREB Familie Gruppe I (RAP2.4, At1g22190) untersucht und widerlegt. Für

mindestens eines der Proteine konnte keine Interaktion mit BPM1 nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Unter Verwendung des *in vitro* Pulldown-Systems konnte die Interaktion von RAP2.4 mit allen BPM Proteinen nachgewiesen werden. Eine solche Übereinstimmung von BTB-Proteinen hinsichtlich ihrer Bindungsmöglichkeiten wurde bereits früher für die BTB-TPR Familie beobachtet. Jedes der drei BTB-TPR Proteine ETO1, EOL1, EOL2 kann als Substratrezeptor einer CUL3 E3-Ligase das Substrat ACS5 binden (Wang et al., 2004; Christians et al., 2009). Eines der nächstverwandten Proteine mit MATH-Domäne At1g65050 (Oelmüller et al., 2005) konnte RAP2.4 nicht binden. Somit ist die Interaktion mit RAP2.4 spezifisch für das MATH-Motiv der BPM-Familie.

Des Weiteren wurde MYB56 als BPM Interaktor gefunden, ein Transkriptionsfaktor der mehr als 100 Gene umfassenden *Arabidopsis* R2R3-Myb Familie. Die bisher zu diesem Protein vorliegenden Expressionsdaten lassen eine Funktion des Proteins in der Vermittlung verschiedener Stressantworten und bei der Aufrechterhaltung des apikalen Wurzelmeristems vermuten (Nawy et al., 2005; Yanhui et al., 2006).

DDB1a fungiert als Substratadaptor für eine CUL4 E3-Ligase (Bernhardt et al., 2006; Chen et al., 2006). Die Interaktion BPM/DDB1a könnte daher sowohl dem Abbau des DDB1a Proteins durch eine CUL3/BPM E3-Ligase dienen, als auch den CUL4-vermittelten Abbau der BPM Proteine als Substrate des 26S Proteasoms bedeuten. Zhang und Schroeder (2010) zeigten einen Abbau des HA-Epitop markierten DDB1a durch das 26S Proteasom. Dieser Abbau wurde durch die Überexpression von DET1, einem Interaktor von CUL4 und DDB1a, verstärkt. Ob der Abbau von DDB1a über eine CUL3 oder CUL4 E3-Ligase initiiert wird, bleibt durch zukünftige Arbeiten zu klären.

Die in den Y2H-*screens* gefundenen Interaktoren sind in der Mehrzahl Transkriptionsfaktoren, deren phylogenetische Vertreter mit Entwicklungs- und Wachstumsprozessen, aber auch mit der hormonellen Signaltransduktion, Stressantworten oder der Kontrolle der Zellidentität in Verbindung gebracht wurden. Insbesondere als potentielle Substratrezeptoren von Ubiquitin E3-Ligasen, sind BPM Proteine vermutlich Teil eines Mechanismus zur genauen Regulation verschiedener Stressantworten.

Um die beschriebenen Ergebnisse der Interaktionsstudien zu verifizieren, wurde versucht, sie durch Kopräzipitation von *in vitro* translatierten Proteinen oder *in planta* exprimierten

Hybridproteinen zu belegen. Die *in vitro* Experimente bestätigten weitestgehend die Y2H-Ergebnisse. So wurde die Assoziation der BPM Proteine mit CUL3A (Abbildung 7) und von BPM1¹⁻¹⁸⁹ mit verschiedenen Interaktoren der BPM-MATH Domäne (Abbildung 10) demonstriert. Auch die Interaktionen aller BPM mit RAP2.4 (Abbildung 12), von BPM1 mit Vertretern der CBF/DREB Gruppe I Proteine (Abbildung 13), sowie die Homodimerisation von RAP2.4 (Abbildung 14) konnten auf diese Art abgesichert werden.

In Pflanzenextrakt konnte nur ein Teil der in Hefe gezeigten Interaktionen bestätigt werden. Es wurden Extrakte von transgenen *35S::GFP::BPM4*, *PDX1.3::myc::CUL3A*, sowie *35S::RAP2.4::myc* Pflanzen verwendet. Während BPM4 in Hefe mit allen BPM Proteinen, CUL3A, sowie RAP2.4 dimerisieren kann, konnte für GFP:BPM4 eine Bindung von BPM4/BPM5/BPM6 und CUL3A, aber nicht von BPM1/BPM2/BPM3 oder RAP2.4 gezeigt werden (Abbildung 18). Möglicherweise zeigt sich hier eine der Phylogenie der BPM-Familie entsprechende Aufspaltung in der Bindungsaffinität möglicher Heterodimere, die erst durch die Verwendung des *in planta* exprimierten BPM4 Proteins zum Tragen kommen. Verantwortlich hierfür könnten stabilisierende bzw. destabilisierende Faktoren, wie z.B. Proteinmodifikationen sein.

Pulldown-Versuche mit Gesamtproteinextrakt von *35S::RAP2.4::myc* Pflanzen wurden für den Nachweis der Interaktionen BPM1/RAP2.4 und RAP2.4/RAP2.4 durchgeführt, beides mit positivem Ergebnis und in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen der Y2H-Experimente (Abbildung 20).

Da kein funktioneller CUL3-Antikörper zur Verfügung stand, und die Überexpression der CUL3 Proteine unter Kontrolle des 35SCMV Promotors nicht möglich scheint, war die transgene Expression von detektierbaren CUL3-Hybridproteinen in *Arabidopsis* ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit (Abbildung 17). Proteinextrakte *PDX1.3::myc::CUL3A* wurden in Co-Präzipitationsexperimenten mit GST:BPM1 und GST:RAP2.4 verwendet (Abbildung 19). Wie erwartet, konnte BPM1 das *in planta* exprimierte CUL3A binden. Obwohl RAP2.4 im direkten Interaktionsversuch in Hefe nicht mit CUL3A interagiert, konnte RAP2.4 ebenfalls myc:CUL3A präzipitieren. Wie bereits für NPR1 und die BT-Proteine besprochen, kann man ein solches Ergebnis als Hinweis auf eine Komplexbildung des präzipitierenden Proteins mit dem Zielprotein, vermittelt durch einen oder mehrere unbekannte Faktoren verstehen (Robert et al., 2009; Spoel et al., 2009). In diesem Fall wäre - unter Berücksichtigung der zuvor gezeigten Interaktionen CUL3A/BPM und BPM/RAP2.4 - das Modell eines Komplexes CUL3/BPM/RAP2.4 eine naheliegende Hypothese.

Eine Möglichkeit, um BPM Proteine als vermittelnde Faktoren einer CUL3A/RAP2.4 Assoziation zu identifizieren, wären z.B. Präzipitationsexperimente in *bpm* Mutanten, die einen Verlust der Präzipitation von CUL3A durch RAP2.4 zeigen. Wie in Kapitel 3.8 erläutert wurde, stehen zurzeit nur für BPM4 (*asbpm4*) und BPM5 (*bpm5-2*) Nullmutanten zur Verfügung. Da RAP2.4 in Hefe und in den *in vitro* Pulldown-Experimenten mit allen Mitgliedern der BPM Familie interagieren konnte, scheint es unwahrscheinlich, daß in Einzelmutanten bereits ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden könnte.

Eine andere Methode, um Komplexbildungen *in planta* aufzuzeigen, ist die Größenausschluß-Chromatographie. Hierbei werden Proteine aus Gesamtproteinextrakten nach ihrer Größe bzw. ihrem hydrodynamischen Volumen in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Werden hierbei Gesamtproteinextrakte verwendet, kann der Anteil verschiedener Proteine in einer Fraktion anschließend durch Westernblot-Analysen nachgewiesen werden.

Figuroa et al. (2005) führten Gelfiltrationsanalysen von Extrakten transgener Linien eines mit CUL3A interagierenden BTB-Proteins (At1g21780) durch. Die Verwendung eines CUL3A-spezifischen Antikörpers ermöglichte es ihnen, CUL3 in einer breiten Palette verschiedener Größenfraktionen, beginnend im Bereich des CUL3A Monomers (~85 kDa), bis zu hochmolekularen Fraktionen >700kDa zu detektieren. Überlappungen mit Fraktionierungen von At1g21780 als Hybridprotein (Monomer ~38 kDa) im Bereich von etwa 200-700 kDa, nachgewiesen durch einen myc-Antikörper, sprachen für eine Interaktion mit CUL3A *in planta*, und die Ausbildung hochmolekularer Komplexe unter Beteiligung der zwei Proteine. In weiteren Fraktionierungen eines Extraktes *TAP-RBX1* transgener Pflanzen untersuchten sie das Auftreten des E2-rekrutierenden, CUL3 bindenden RING-Proteins RBX1 (Dieterle et al., 2005; Figuroa et al., 2005; Weber et al., 2005). Dessen Assoziation mit dem Cullin ist Voraussetzung für eine funktionelle E3-Ligase. Sie detektierten das TAP-RBX1 Protein ebenfalls in Fraktionen von 250-670 kDa.

Einen CUL3/BPM/RAP2.4 Komplex *in planta* ohne spezifische Antikörper gegen die einzelnen Komponenten nachzuweisen, ist nur indirekt möglich. Im Gelfiltrationssystem würde dies die Verwendung von Hybridproteinen mit unterscheidbaren Markern voraussetzen. Da nur für BPM4 stabile Überexpressionslinien generiert werden konnten (Kapitel 3.5), und RAP2.4 in Pulldown-Experimenten GFP:BPM4 nicht präzipitieren konnte, wären unter den momentanen Bedingungen die *35S:RAP2.4:myc* Pflanzen zu verwenden, und ggf. als Kontrolle zu den Daten von Figuroa et al. (2005) die Linie *PDX1.3:myc:CUL3A*. Mit der Arbeitshypothese einer CUL3/BPM/RAP2.4 wäre es das Ziel eines solchen Experimentes,

RAP2.4 (Monomer ~36 kDa) in hochmolekularen Fraktionen, vorzugsweise im Bereich 250-670 kDa nachzuweisen, da in diesem Bereich auch RBX1 detektiert wurde, das für die Funktion einer CUL3 E3-Ligase essentiell ist.

4.2 Kartierung der BPM1/RAP2.4 Interaktion

Durch Experimente zur Kartierung der interagierenden Motive der BPM1/RAP2.4 Bindung wurden für die Interaktion essentielle Bereiche identifiziert. Diese liegen einerseits in einem Abschnitt im hinteren Teil der MATH-Domäne von BPM1 (Positionen 87-150) und andererseits N-terminal der AP2-Domäne (ab Position 125) von RAP2.4, wobei eine Funktion der AP2-Domäne bei der Assoziation nicht ausgeschlossen werden konnte.

Der für BPM1 identifizierte Bereich innerhalb der MATH-Domäne umfaßt auch Aminosäurepositionen, deren Mutation im HsSPOP Protein zum Verlust der Substratbindefähigkeit führen (Zhuang et al., 2009). als für die HsSPOP Substratbindung wichtige D130 und W131 (in BPM1 M138 und W139, Abbildung 50). Zhuang et al. (2009) zeigten eine Verringerung bzw. einen Verlust der Bindeaktivität durch die Mutationen D130A bzw. W131A. Im BPM1 Protein entsprechen diese Positionen M130 und W131. Beide Positionen sind in allen BPM konserviert. Erwähnenswert sind an dieser Stelle die Ergebnisse der Kristallisationsanalysen von Zhuang et al. (2009), die eine Bindung der verschiedenen Substrate durch ein HsSPOP-Homodimer postulieren. Hierbei wird das Dimer durch die BTB-Domäne vermittelt, aber auch die MATH-Domänen kommen in räumliche Nähe und nehmen beide an der Substratbindung teil. Aufgrund der Homologien zwischen HsSPOP und den *Arabidopsis* BPM Proteinen, und deren Fähigkeit zur Homodimerisation ist es wahrscheinlich, daß das beschriebene Modell auch auf die BPM-Substratbindung zutrifft. Möglicherweise liegt hierin auch ein Teil der Probleme der Interaktionsstudien mit BPM Proteinen mit N-terminaler Fusion, z.B. von GFP:BPM4.

Im Rahmen derselben Publikation wurde eine Konsensussequenz der SPOP-Substrate definiert. Dieses SBC-Motiv (SPOP binding consensus) lautet ϕ - π -S-S/T-S/T (ϕ -nicht-polar; π -polar). Es konnte in dieser Form in einigen der BPM Interaktoren gefunden werden, jedoch nicht im in dieser Arbeit kartierten Interaktionsbereich von RAP2.4. Die Versuche, ein ähnliches Konsensus-Motiv für BPM-Interaktoren zu finden, schlugen fehl.

4.3 Stabilitätsanalysen RAP2.4 und BPM4

Die E3-Ligasen sind Teil des 26S Ubiquitin-Proteasom-Weges. Sie binden über Substratrezeptoren Proteine, um sie mit Ubiquitin kovalent zu modifizieren. Als Folge werden diese Proteine in den meisten Fällen vom 26S Proteasom angebaut (Vierstra, 2009).

Ein Ansatz zum Nachweis einer CUL3/BPM/RAP2.4 E3-Ligase ist dementsprechend der Nachweis der Degradation des potentiellen Substratproteins durch das 26S Proteasom, in Abhängigkeit der Komplexkomponenten CUL3 bzw. BPM. Es konnte der schnelle Abbau des RAP2.4 Proteins gezeigt werden, sowie die Aufhebung dieses Vorganges durch den Inhibitor des 26S Proteasom-Weges MG132 (Abbildung 21). Um den Abbau des RAP2.4 Proteins in Zusammenhang mit einer CUL3/BPM3 E3-Ligase zu bringen, war eine zu untersuchende Hypothese, die Stabilisierung des Proteins in einer *cul3* bzw. in *bpm* Mutanten zu zeigen. Zu diesem Zweck wurden transgene Pflanzen *cul3^{hyp}/35S:HA:RAP2.4* generiert (Kapitel 3.5.2, Abbildung 22). Die entsprechenden Experimente zur Stabilität konnten aus zeitlichen Gründen jedoch nicht mehr vorgenommen werden.

Die funktionale Bandbreite der komplexen E3-Ligasen ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, mit verschiedenen Substratadaptoren zu interagieren. Hierzu müssen sich die Untereinheiten zusammenlagern, aber im Anschluß an eine erfolgte Ubiquitinierung auch wieder voneinander abspalten können. Eine Möglichkeit dies in der Zelle zu verwirklichen, ist der Abbau der „benutzten“ Substratadaptoren. Dieser kann durch autokatalytische Ubiquitinierung vermittelt werden (Galan und Peter, 1999), aber auch unabhängig vom 26S Proteasoms erfolgen (Zhang et al., 2005).

Die Stabilität des BPM4 Proteins konnte über 14 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 21). Möglicherweise ist in dieser Eigenschaft des BPM4 Protein auch eine Ursache zu suchen, warum für dieses Protein stabile Überexpressionspflanzen generiert werden konnten. Für BPM1, BPM2, BPM5 und BPM6 wurden durchaus transgene Pflanzen selektiert, eine Expression des jeweiligen Hybridproteins konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.5). Es ist denkbar, daß diese BPM sehr instabile Proteine sind, vielleicht sogar selbst Substrate des 26S Proteasoms darstellen. Ein möglicher Ansatz wäre in diesem Fall die Behandlung transgener Pflanzen mit einem starken Proteasominhibitor, um das rekombinante Protein nachweisen zu können, wie es beispielsweise für das RING Protein DRIP1 gezeigt wurde, welches als E3-Ligase den AP2-Transkriptionsfaktor DREB2A ubiquitiniert (Qin et al., 2008).

4.4 Die subzelluläre Lokalisation

CUL3 E3-Ligasen sind in Pflanzen noch nicht gut untersucht. Faßt man Experimente zur Lokalisation von BTB-MATH Proteinen verschiedener Spezies zusammen, ergaben diese eine Lokalisation der Komponenten in Kern oder Cytoplasma (Luke-Glaser et al., 2005; Kwon et al., 2006; Zhang^b et al., 2006). Die den *Arabidopsis* BPM Proteinen nächsten Verwandten sind die BTB-TAZ Proteine (Du und Poovaiah, 2004), aber auch die beiden BTB-Armadillo Proteine ARIA (Kim et al., 2004) und ABAP1 (Masuda et al., 2008). All diese Proteine sind auf verschiedene Arten in die Transkriptionskontrolle involviert und GFP-Analysen zeigten eine Kernlokalisierung.

Aufgrund der Verwandtschaft der BPM-Familie zu den genannten BTB-Proteinen wurde eine Lokalisation im Kern bzw. Cytosol erwartet. Kernlokalisierungssignale wurden in den BPM Aminosäuresequenzen nicht gefunden. Die Analyse von GFP-Fusionsproteinen, transient exprimiert in Tabakepidermiszellen, ergab für BPM1 und BPM2 eine exklusive Lokalisation im Kern (Abbildung 23 und Abbildung 24), BPM3, BPM5 und BPM6 wurden im Kern und im Cytoplasma beobachtet (Abbildung 25), während BPM4 ausschließlich im Cytoplasma detektiert wurde (Abbildung 26).

Ein fleckenartiges Verteilungsmuster von Proteinen im Kern, wie es für BPM1 und BPM2 beobachtet wurde, wird seit einiger Zeit als das Ergebnis einer funktionellen Kompartimentierung des Zellkerns verstanden (Dundr und Misteli, 2001; Spector, 2001; Lorković und Barta, 2004). Neben anderen Bereichen mit distinkten RNA/Protein-Zusammensetzungen wurden sogenannte *Speckles* identifiziert, die eine Ansammlung von Spleißfaktoren darstellen, aber auch Cajal-Körperchen, die unter anderem wahrscheinlich Orte der Zusammenlagerung von Transkriptionskomplexen sind (Lorković und Barta, 2004). Die Anordnung des GFP:BPM Signal in solchen *Speckles* könnte sich aus der Teilhabe der BPM Proteine an Transkriptionskomplexen ableiten.

Die Akkumulation in speziellen Bereichen des Zellkerns wurde unter anderem für Proteine verschiedener Spezies beobachtet, die Substratrezeptoren bzw. Substrate des 26S Proteasoms sind. Teilweise wurde diese spezifische Lokalisation erst durch zelluläre Signale, wie oxidativen Stress oder verschiedene Hormone erreicht (Hamann et al., 2002; Tao et al., 2005; Riera et al., 2006; Maezawa et al., 2008), was auch auf BPM Proteine zutreffen könnte.

Der Verlust der BTB-Domäne führte zu einer gleichmäßigen Lokalisation des BPM1 Proteins im Cytoplasma, sowie im Karyoplasma (Abbildung 23). Für das BTB-Zinkfinger Protein

HsBCL6 wurde gezeigt, daß die Lokalisation in spezifischen nukleären Punkten von einer intakten BTB-Domäne abhängt (Dhordain et al., 1995), ebenso für das murine DIP (de la Luna et al., 1999). Wahrscheinlich wird die spezifische Kernlokalisation von den homo- und heterodimeren Interaktionen der BTB-Domäne vermittelt. Um diese Hypothese genauer untersuchen zu können, wäre die Lokalisationsanalyse mutagenisierter BPM Proteine hilfreich, die nicht mehr homo- bzw. mit CUL3 heterodimerisieren können. Die in Weber et al. (2005) beschriebenen Mutationen der BTB-Domäne bewirken gleichzeitig einen Verlust der Homodimerisierung und der Bindung von CUL3A (Abbildung 45 im Anhang). Figueroa et al. (2005) identifizierten zwei Punktmutation in der BTB-Domäne des At1g21780 Proteins (I204A, Y242A), die nicht mehr mit CUL3A interagieren konnten, deren Fähigkeit zur Homodimerisierung jedoch nicht beeinflußt ist. Die Position I204 ist in BPM1 konserviert und könnte in weiteren Versuchen getestet werden. Die Mutation des entsprechenden Tyrosins (Y295A) verursachte einen Interaktionsverlust mit CUL3A und BPM1 (Weber et al., 2005).

GFP:CUL3A lokalisierte im Kern und im Cytoplasma (Abbildung 28), in Übereinstimmung mit der Aktivität des 26S Proteasomweges in beiden Zellkompartimenten. Das GFP:CUL3A Signal im Kern zeigte im Gegensatz zu BPM1 und BPM2 eine diffuse Verteilung. Kwon et al. (2006) konnten durch transiente Expression in HeLa-Zellen zeigen, daß die vorwiegend cytosolische Lokalisation des humanen CUL3 Proteins durch die parallele Expression des BTB-Substratadapters SPOP in den Kern, in „speckles“ verschoben wurde. Ähnliches läßt sich für AtCUL3A vermuten. Der Interaktor RAP2.4 wurde erwartungsgemäß im Nukleus detektiert (Abbildung 27). Die hier vorgelegten Ergebnisse zur Lokalisation der zwei Interaktoren der BPM-Familie unterstützen die Hypothese der Interaktion *in planta*, sowie die Möglichkeit der Komplexbildung einer CUL3/BPM/RAP2.4 E3-Ligase.

4.5 Die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression

Es wurden transgene Pflanzen hinsichtlich der Aktivität von Promotor:GUS Fusionen untersucht. Die Promotoren der Gene *BPM2* und *BPM5* *BPM6* zeigten eine besonders starke Aktivität, während die anderen *BPM* nur schwach exprimiert waren (Abbildung 29-34). Alle *BPM* Promotoren waren sowohl in der Wurzel, als auch in oberirdischen Organen aktiv, was grundsätzlich den Expressionsmustern der Interaktoren RAP2.4 (Abbildung 35) und CUL3A entspricht (Dieterle et al., 2005; Thomann et al., 2005; Weber et al., 2005). Es gibt

weitreichende Übereinstimmungen in der gewebespezifischen Expression für jedes BPM und den Interaktoren. Auf zwei Beispiele soll im Besonderen hingewiesen werden: In der Wurzel sind *BPM2*, *BPM4* und *BPM5* wie *CUL3A* (Dieterle et al., 2005; Weber et al., 2005) speziell in jungen Lateralwurzeln gut exprimiert. Dies könnte ein Hinweis auf die Funktion der BPM Proteine bei der durch Ethylen und Auxin gesteuerten Anlage und Ausbildung von Lateralwurzeln sein (Ivanchenko et al., 2008). Dieterle et al. (2005) zeigten für *CUL3A* zusätzlich eine GUS-Färbung der Primärwurzel im Leitbündel sowie der Spitze, wie es in dieser Arbeit für *BPM5* und *RAP2.4* bzw. *BPM2/3/5/6* beobachtet wurde. Des Weiteren sind alle *BPM*, *RAP2.4* und *CUL3A* in Pollen exprimiert (Dieterle et al., 2005; Thomann et al., 2005).

Durch RT-PCR Analyse auf cDNA des Ökotyps Columbia wurde die Expression der *BPM* Gene und *RAP2.4* in allen getesteten Geweben bestätigt (Abbildung 35). Auch dieses Ergebnis überlappt mit den für *CUL3A* publizierten Daten einer ubiquitären Expression (Dieterle et al., 2005).

Gingerich et al. (2005) veröffentlichten Daten einer Microarray Expressionsanalyse aller BTB Gene in verschiedensten Geweben (Abbildung 46 im Anhang). Demnach wären *BPM1* und *BPM6* die am schwächsten exprimierten Gene der *BPM*-Familie, *BPM3* hingegen das mit dem höchsten Expressionslevel. Insgesamt zeigt sich aber auch in diesem Experiment die ubiquitäre Expression, mit Ausnahme von *BPM1* und *BPM6*, deren Expression in Schoten und Samen unter dem Schwellenwert lagen.

4.6 Die Wirkung von ABA, ACC, NaCl, Sorbitol und Trockenstress

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu Interaktionen, Lokalisation und Expression wurde eine gewisse Redundanz hinsichtlich der Funktionen innerhalb der *BPM* Familie erwartet, so daß von keinen bzw. geringen Unterschieden zum Wildtyp ausgegangen wurde. Zur Untersuchung standen eine Insertionslinie *bpm5-2*, eine selbst generierte antisense Linie *asbpm4*, sowie die Mutante *rap2.4-1* im Vergleich mit dem Wildtyp Ökotyp Col0 (Kapitel 3.8). Die Mutanten zeigten in ihrer Entwicklung und Morphologie unter Standardbedingungen keine bemerkbaren Besonderheiten (Abbildung 40).

Eine Untersuchung der Ethylenantwort durch Messung der Hypokotyllänge vergeilter Keimlinge ergab keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Allerdings zeigten *rap2.4-1* Pflanzen auf Medium ohne ACC tendenziell ein kürzeres Hypokotyl, auf Medium mit

2 μ M ACC wiederum eine schwächere Ethylenantwort (Abbildung 41). Obwohl *RAP2.4* durch Ethylen nicht induziert wird, wurde für *RAP2.4* Überexpressionspflanzen eine verstärkte Ethylenantwort beobachtet: Die basale Expression des Ethylen-regulierten Gens *PR3* ist erhöht, und bei Zugabe von exogenem ACC ist die Induktion von *PR3*, *PR4* und *PDF1.2* im Vergleich zum Wildtyp verstärkt (Lin et al., 2008). Die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit Daten von Thomann et al. (2009), daß die Mutante *cul3^{hyp}* aufgrund eines erhöhten Ethylengehaltes eine konstitutive Ethylenantwort zeigt, fügt sich in die Hypothese, daß *RAP2.4* das Substrat einer CUL3 E3-Ligase ist. Die basale Expression der BPM Gene und *RAP2.4* ist in *cul3^{hyp}* Keimlingen nicht verändert (Abbildung 36).

Die Analyse der Keimungsrate zeigte für *rap2.4-1* Pflanzen eine signifikant erhöhte Insensitivität gegenüber ABA: Die Keimungsrate auf 2 μ M ABA entsprach in etwa der der *abi4-102* Mutante, während auf 5 μ M ABA die Keimungsrate der *rap2.4-1* Samen signifikant über der des Wildtyps, aber unter der von *abi4-102* Samen lag (Abbildung 41). Unter Standardbedingungen war die Keimungsrate der *rap2.4-1* Samen nicht verändert (Abbildung 40). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß in *rap2.4-1* Samen eine Störung des ABA-Signalübertragungsweges vorliegt, der nicht die normale Samenruhe beeinflusst. Die Expression von *RAP2.4* wird nicht durch ABA induziert, und dem Protein wurde eine Funktion als Transkriptionsaktivator zugeordnet (Lin et al., 2008). Dies bedeutet, daß die Funktion von *RAP2.4* im Wildtyp im Rahmen der keimungshemmenden Wirkung von ABA nicht durch eine Induktion der *RAP2.4* Expression erreicht wird, sondern daß das vorhandene Protein z.B. durch Modifikationen, Interaktionen oder Degradation in seiner Aktivität reguliert wird. *RAP2.4* könnte so die Expression ABA-induzierbarer Gene vermitteln, ohne selbst in seiner Expression durch ABA reguliert zu werden. Da im Falle einer ABA-vermittelten Hemmung der *RAP2.4* Funktion ein Fehlen des Proteins kaum Auswirkungen haben sollte, ist anzunehmen, daß in *rap2.4-1* Pflanzen die ABA-Signaltransduktion durch die fehlende Induktion eines *RAP2.4* Zielgens gestört ist.

Erwähnenswert ist an dieser Stelle die erhöhte Toleranz der *RAP2.4* Überexpressionspflanzen gegenüber Trockenstress (Lin et al., 2008). Trocken- und Salzstress, und damit einhergehender osmotischer Stress induzieren die ABA-Biosynthese (Zhang^a et al., 2006). Die Signaltransduktion des Hormons veranlaßt die Stressantwort auf verschiedenen Ebenen, z.B. die verstärkte Biosynthese des Osmolyts Prolin (Hare et al., 1999; Jia et al., 2002). Unter der Annahme, daß *RAP2.4* ein Teil der ABA-Signaltransduktion ist, würde eine erhöhte Menge des aktivierten Proteins eine verstärkte Stressantwort bedeuten. Zusätzlich wird *RAP2.4* durch Salz- und Trockenstress induziert (Lin et al., 2008). Am Beispiel der ABA-

insensitiven Mutante des AP2-Transkriptionsfaktors *ABI4* wurde gezeigt, daß ein Teil der Trockenstressantwort der Pflanzen ABA-unabhängig abläuft. RAP2.4 wird somit auf mehreren Ebenen und von verschiedenen Faktoren reguliert.

Die Sensitivität der *bpm*-Mutanten war nicht verändert. Zur Reaktion der *cul3^{hyp}* Mutante auf ABA bzw. Trockenstress liegen keine vergleichbaren Daten vor.

In einem Salzstressversuch wurde überraschend eine signifikante Insensitivität der *rap2.4-1* Pflanzen, sowie eine erhöhte Sensitivität der *bpm5-2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Abbildung 41). Bei einer Störung der durch Salzstress induzierten ABA-Signaltransduktion würde man eine verminderte Stressantwort und somit eine verringerte Stresstoleranz erwarten. Da die RAP2.4 Expression unabhängig von ABA durch Salz und osmotischen Stress induzierbar ist (Abbildung 42; Lin et al., 2008), könnte an dieser Stelle eine ABA-unabhängige Funktion von RAP2.4 zum Tragen kommen. Möglicherweise spielt hier die in *rap2.4-1* Pflanzen beobachtete verringerte Ethylenantwort eine Rolle. Ethylen wirkt durch Verstärkung der Auxin-Biosynthese unter Stressbedingungen als Inhibitor des Wurzelwachstums (Sharp et al., 1994; Ortega-Martinez et al., 2007; Swarup et al., 2007). Die Verkürzung der Primärwurzeln von *cul3^{hyp}* Pflanzen unter Standardbedingungen wurden teilweise auf den erhöhten Ethylengehalt der Pflanzen, aber auch auf Ethylen-unabhängige Effekte zurückgeführt (Thomann et al., 2009).

Das konträre Erscheinungsbild der *rap2.4-1* und der *bpm5-2* Mutanten könnte auf eine funktionale Verbindung hindeuten. Auf die Hypothese einer CUL3/BPM/RAP2.4 E3-Ligase Bezug nehmend könnte man an dieser Stelle spekulieren, daß der Phänotyp der *bpm5-2* Pflanzen sich aus dem Verlust der negativen Regulation des RAP2.4 Proteins im Rahmen eines Salzstress-Signalweges erklärt. Gleichzeitig kann man aufgrund der Vielzahl der möglichen BPM-Interaktoren von einem additiven Effekt in *bpm5-2* Pflanzen ausgehen.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, läßt sich eine Regulation der *RAP2.4* Expression und der *RAP2.4* Aktivität durch verschiedene Pflanzenhormone, wie ABA und Ethylen, aber auch durch abiotische Stressfaktoren, wie Trockenheit und hohe Salinität feststellen. Für die *BPM* Familie ließ sich eine Induktion mehrerer Mitglieder durch Salz- und Trockenstress, bzw. osmotischen Stress feststellen, in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Expressionsanalyse des *RAP2.4* Gens (Abbildung 42). Die *BPM/RAP2.4* Interaktion ist demnach möglicherweise ein regulierendes Element der durch *RAP2.4* vermittelten Stressantwort in verschiedenen Signalwegen.

4.7 Eigenschaften der RAP2.4 DNA-Bindung

In Gelretardations-Experimenten (EMSA) konnte die Bindung des RAP2.4 Proteins an den *RD29A* Promotor gezeigt werden (Abbildung 43). Es ergaben sich zwei spezifische Banden der retardierten DNA.

Der Verlust der DNA-Bindung durch eine in RAP2.4 eingeführte Mutation G179S wurde aufgrund der Ergebnisse eines kompetitiven Ansatzes mit wildtypischem RAP2.4 auf den Verlust der Homodimerisierung zurückgeführt. In diesen Experimenten verringerte die Zugabe von RAP2.4^{G179S} das Signal der durch RAP2.4 retardierten DNA, woraus zusätzlich geschlußfolgert wurde, daß RAP2.4 die DNA als Homodimer bindet. Die AP2 Domäne wird im Allgemeinen der DNA-Bindung zugeschrieben, wurde aber von Okamuro et al. (1997) als geteilte Domäne mit zwei spezifischen Motiven diskutiert (Abbildung 44 im Anhang): Im vorderen Bereich befindet sich das YRG-Motiv. Es ist sehr basisch und als das eigentliche DNA-bindende Element vorhergesagt. Da sich dieses Element in seiner Sequenz in den verschiedenen AP2-Gruppen unterscheidet, wird ihm eine Funktion bei der DNA-Sequenzspezifität zugeschrieben. Das hintere RAYD-Motiv enthält eine etwa 18 Aminosäuren umfassende Kernsequenz, die eine amphipathische α -Helix bildet. Die in RAP2.4 mutagenisierte Glycin Position liegt innerhalb des RAYD-Motivs, wurde in allen bekannten AP2 Proteinen gefunden, und als wichtig für die AP2 Funktion beschrieben (Jofuku et al., 1994; Wakem und Kohalmi, 2003). Die α -Helix Struktur des RAYD-Motivs könnte durch die hydrophobe Oberfläche direkt an der DNA-Bindung beteiligt sein, indem sie mit der großen Furche interagiert. Eine andere Hypothese sieht diesen Bereich als mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomäne, z.B. um Homo- und Heterodimere zu formen, wie es bei den MADS (MCM1, AG and ARG80, DEF A, and SRF) box Proteinen der Fall ist (Huang et al., 1996; Riechmann et al., 1996), oder auch für die Fos-Jun Transkriptionsfaktoren der Mammalier beschrieben wurde (Hai und Curran, 1991; O'Shea, 1992). Die Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren der eigenen Familie kann verschiedene Sequenzspezifitäten ermöglichen und so die Bandbreite der Zielgene erhöhen (Hai und Curran, 1991).

Da in den *in vitro* Versuchen die RAP2.4/DNA-Bindung weder von einer Interaktion BPM/RAP2.4 abhängig war, noch durch die Zugabe verschiedener BPM Proteine beeinflusst wurde, scheint unter diesen Bedingungen die Interaktion mit BPM Proteinen nicht in Konkurrenz mit der Homodimerisierung von RAP2.4 zu stehen.

4.8 Schlußfolgerungen und Ausblick

Ein grundlegendes Problem bei der Charakterisierung der BPM Genfamilie war und ist das Fehlen entsprechender *bpm* Mutanten. Ein möglicher Grund hierfür sind essentielle Funktionen der Proteine in Entwicklungsprozessen, wie sie z.B. für *CUL3A* und *CUL3B* beschrieben wurden (Figuroa et al., 2005; Thomann et al., 2005). Durch die zumindest partielle Redundanz der einzelnen Mitglieder reichen Einzelmutanten für konkrete Schlußfolgerungen nicht aus. Die Arbeitsgruppe von Prof. Genschik (CNRC IBMP, Straßburg) verfolgt hierzu seit einiger Zeit den Ansatz der artificial microRNA, um parallel die Expression mehrere BPM Mitglieder zu verringern (mündliche Kommunikation Dr. E. Lechner).

Analysen zur Koexpression der interagierenden Proteine könnten mehrere Fragestellungen angehen: Verändert eine Koexpression die hier beschriebene Lokalisation von RAP2.4? Hat die Koexpression von *BPMs* und *RAP2.4* einen Einfluß auf die Expression der Zielgene des Transkriptionsfaktors? Um letztere identifizieren zu können, wäre z.B. ein ChIP-Assay mit den 35S:RAP2.4:4xmyc Pflanzen möglich.

Der direkte Nachweis von CUL3-BTB-Substrat-Komplexen *in planta* ist bisher fehlgeschlagen. Ein Teilproblem ist wahrscheinlich die Homodimerisierung der einzelnen Untereinheiten, wie es von Zhuang et al. (2009) postuliert wurde. Der indirekte Beweis für den Abbau des RAP2.4 Proteins durch eine CUL3-BPM E3-Ligase ist durch die Generierung transgener 35S:HA-RAP2.4/*cul3^{hyp}* Pflanzen bereits vorbereitet.

Die Familie der ERF/AP2-Proteine ist eine der größten pflanzenspezifischen Familien von Transkriptionsfaktoren. Die Funktionen der bisher beschriebenen Mitglieder liegen vor allem in der Vermittlung diverser Stresstoleranzen (Okamoto et al., 1997; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 2001; Nakano et al., 2006; Lin et al., 2008), was ihre Regulation auch in agronomischer Hinsicht interessant macht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Superfamilie der BTB-Proteine ist definiert durch ein hochgradig konserviertes Protein-Protein-Interaktionsmotiv, genannt BTB/POZ (*Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad complex/POX Virus and Zink finger*), das oft in Kombination mit anderen Protein-, aber auch DNA-Bindedomänen auftritt. In Pflanzen und Tieren wurde die Assoziation von BTB-Proteinen mit Cullin3 Proteinen demonstriert. Als Untereinheiten multimerer Ubiquitin-Ligasen vermitteln CUL3-BTB Komplexe die hochspezifische Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau von Substratproteinen, wodurch sie regulierend in unterschiedlichste biologische Prozesse, wie Entwicklung, Zellzyklus und Pathogenantwort eingreifen. Das *Arabidopsis* Genom kodiert für zwei wahrscheinlich redundante CUL3 Proteine, die CUL3A und CUL3B genannt werden, und etwa 80 BTB-Proteine, die nach ihrer Domänen-Komposition in zehn Familien unterteilt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *Arabidopsis* BPM (BTB-MATH) Familie umfaßt sechs Mitglieder (61-89 % Identität der Aminosäuresequenzen), die die Fähigkeit zur Homo- und Heterodimerisation besitzen. Neben Interaktionen innerhalb der Familie können BPM1-5 zusätzlich mit CUL3 assoziieren. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß die BPM Proteine Substratadapter von modularen Ubiquitin E3-Ligasen mit CUL3 als zentrale Untereinheit sind. Die Aktivität solcher Komplexe mit CUL3- und BPM-Homologen wurde bereits für Säugetiere und *Ceanorhabditis elegans* gezeigt. Mittels Promotor:GUS Fusionskonstrukten und RT-PCR Analyse wurde die Expression der *BPM* Gene in allen untersuchten Geweben dokumentiert, und die Induktion der Expression einiger Mitglieder durch die Applikation von Salz, Osmotika bzw. Trockenstress aufgezeigt. Lokalisationsanalysen mit GFP-Fusionsproteinen ergaben eine Beschränkung der subzellulären Lokalisation der GFP:BPM Proteine auf den Nukleus und/oder das Cytoplasma. Auf der Suche nach Bindungspartnern und potentiellen Substratproteinen von CUL3-BPM E3-Ligasen wurden in zwei Y2H-screens eine Reihe von Transkriptionsregulatoren der ERF/AP2 (*Ethylene Response Factor/APETALA2*) Genfamilie als Interaktoren der BPM MATH-Domäne identifiziert. Einer dieser ERF/AP2-Transkriptionsfaktoren, RAP2.4 (At1g78080), wurde im Detail analysiert. Das Protein bindet spezifisch die MATH-Domäne der BPM Proteine, innerhalb der Familie aber unspezifisch alle Mitglieder. Durch die weitere Kartierung der Bindemotive konnten die interagierenden Proteinbereiche eingegrenzt werden. Allerdings wurde weder eine Beteiligung der AP2-Domäne an der BPM1/RAP2.4 Bindung

ausgeschlossen, noch ein Konsensusmotiv für mehrere BPM Interaktoren eindeutig identifiziert. Die Assoziation der BPM Proteine mit Vertretern verschiedener AP2-Familien, bei gleichzeitiger Bindungsspezifität innerhalb der RAP2.4-Unterfamilie, spricht jedoch für ein unabhängiges BPM-Bindemotiv.

Durch EMSA-Experimente wurde demonstriert, daß RAP2.4 *in vitro* den *RD29A* Promotor bindet, und daß diese Bindung nicht von einer Interaktion mit den BPM Proteinen beeinflusst wird. Experimente zur Stabilität des Transkriptionsfaktors zeigten außerdem, daß ein schneller Abbau des RAP2.4 Proteins *in planta* in Abhängigkeit vom 26S Proteasom erfolgt.

Beschränkt durch fehlende Nullmutanten in bekannten Stammsammlungen wurden *rap2.4-1*, *bpm5-2*, sowie während dieser Arbeit generierte *asbpm4* antisense Pflanzen mit dem Wildtyp verglichen. Es wurden keine grundsätzlichen Veränderungen in Morphologie oder Entwicklung beobachtet. Die Ergebnisse der Behandlungen mit Phytohormonen, Salz, Osmotika und Trockenstress gaben Hinweise auf einen funktionalen Zusammenhang von BPMs und RAP2.4 im Bereich der Stresstoleranz.

In ihrer Gesamtheit unterstützen die erzielten Ergebnisse die Annahme, daß die Funktion der BPM/RAP2.4 Assoziation die Rekrutierung des RAP2.4 Proteins in eine CUL3 E3-Ligase mit anschließender Ubiquitinierung von RAP2.4 ist. CUL3-BPM E3-Ligasen mit ERF/AP2 Transkriptionsfaktoren als Substratproteine würden einen neuen Regulationsmechanismus transkriptioneller Stressantworten darstellen.

6. SUMMARY

The superfamily of BTB proteins is defined by a highly conserved protein-protein-interaction motif BTB/POZ (*Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad complex/POX Virus and Zink finger*), often combined with a secondary protein- or DNA-binding domain. In plants and animals the association of BTB proteins with Cullin3 proteins was demonstrated. As subunits of multimeric Ubiquitin-ligases CUL3-BTB complexes mediate ubiquitination and subsequent degradation of substrate proteins, and by this regulating diverse biological processes like development, cell cycle and response to pathogens. The *Arabidopsis* genome encodes two putative redundant CUL3 proteins, called CUL3A and CUL3B, and approximately 80 BTB proteins that are subdivided into 10 families by the composition of their domains.

The BTB-MATH (BPM) family, analysed in this work, contains six members (61-89% identity in amino acid sequences) that are capable of forming homo- and heterodimers. Beside the interactions in between the family BPM1-5 can additionally assemble with the CUL3 proteins. These results led to the hypothesis that BPM proteins are substrate adaptors for modular ubiquitin ligases with CUL3 as the central scaffolding subunit. The activity of complexes with CUL3 and BPM-homologues was already shown in mammalia and *Ceanorhabditis elegans*. Using promoter:GUS fusion constructs and RT-PCR analysis the expression of *BPM* genes in all tested tissues was documented, and additionally the induction of some of the members by application of salt, osmotics and drought was uncovered. Localisation analysis with GFP fusion proteins showed a restriction of the subcellular localisation of BPM proteins to the nucleus and/or cytoplasm.

To search for binding partners and potential substrate proteins of CUL3-BPM E3-ligases two Y2H *screens* were performed, identifying several transcription regulators of the ERF/AP2 (*Ethylene Response Factor/APETALA2*) gene family as interactors of the BPM MATH-domain. One of these ERF/AP2 transcription factors, RAP2.4 (At1g78080), was analysed in detail. The protein binds specifically the MATH domain of BPM proteins, but within the BPM family with all members. By further mapping the binding motifs, the interacting areas of the proteins could be narrowed down. However, neither it could be excluded the participation of the AP2 domain, nor a clear consensus sequence for BPM interactors was identified. The assembling of BPM proteins with members of different AP2 families, along with the shown

high binding specificity within the subfamily of RAP2.4, argues for an independent BPM-binding motif.

Using EMSA assays it was demonstrated that *RAP2.4* is able to bind the *RD29A* promoter *in vitro* and that this interaction is not influenced by assembling with BPM proteins. Moreover the analysis of protein stability of the transcription factor revealed a rapid degradation of RAP2.4 by the 26S proteasome *in planta*.

Restricted by the lack of null mutants in the common seed collections *rap2.4-1*, *bpm5-2* and *asbpm4* antisense plants, generated during this project, were compared to wild type plants. No fundamental alterations in development or morphology were observed. Results of diverse treatments with phytohormones, salt, osmotics and drought gave hint to a functional link of BPMs and RAP2.4 in stress tolerance.

In summary, the achieved results support the assumption that the function of BPM/RAP2.4 assembling is the recruitment of RAP2.4 to a CUL3-based E3-ligase with subsequent ubiquitination of RAP2.4. CUL3-BPM E3-ligases would constitute a novel regulatory mechanism of transcriptional stress responses.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad KF, Engel CK, Prive GG (1998) Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 12132-1228

Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D. (1995) The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.*, 6(9): 1193-8

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1; 25(17): 3389-402

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - A family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.*, 12: 2821–2830

Baker SJ, **Reddy** PE (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12: 1–9

Banno H, **Chua** NH (2000) Characterization of the Arabidopsis Formin-Like Protein AFH1 and Its Interacting Protein. *Plant Cell Phys.*, 41(5):617-626

Bardwell VJ, **Treisman** R (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev*, 8: 1664–1677

Baud S, **Lepiniec** L (2009) Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of Arabidopsis. *Plant Phys Biochem.*, 47(6): 448-55

Baud S, Wuillème S, To A, Rochat, Lepiniec L (2009) Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant Journal*, 60: 933–947

Bauvois B (2001) Transmembrane proteases in focus: diversity and redundancy? *J Leukoc Biol.*, 70(1):11-7

Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the Ubiquitin system. *The EMBO Journal*, 20(7): 1630-1639

Bernard P, **Couturier** M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol.*, 226(3): 735-45

Bernhardt A, Lechner E, Hano P, Schade V, Dieterle M, Anders M, Dubin MJ, Benvenuto G, Bowler C, Genschik P, Hellmann H (2006) CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 47: 591-603

Bertenshaw GP, Turk BE, Hubbard SJ, Matters GL, Bylander JE, Crisman JM, Cantley LC, Bond JS (2001) Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J Biol Chem.*, 276(16): 13248-55

Birnboim HC, **Doly** J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513 - 1523

-
- Bosu DR, Kipreos ET** (2008) Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div.*, 18(3): 7
- Boyle P, Le Su E, Rochon A, Shearer HL, Murmu, Chu JY, Fobert PR, Charles Després** (2009) The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Protein NPR1 Interacts with the repression Domain of TGA2 to Negate Its Function. *The Plant Cell*, 21: 3700–3713
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254
- Bürkle L, Meyer S, Dortay H, Lehrach H, Heyl A** (2005) In vitro recombination cloning of entire cDNA libraries in Arabidopsis thaliana and its application to the yeast two-hybrid system. *Funct Integr Genomics*, 5: 175–183
- Calvin NM, Hanawalt PC** (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.*, 170(6): 2796-801
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J.** (2003) MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 4: 29
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X.** (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell.*, 88(1): 57-63
- Capron A, Serralbo O, Fülöp K, Frugier F, Parmentier Y, Dong A, Lecureuil A, Guerche P, Kondorosi E, Scheres B, Genschik P** (2003) The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell*, 15(10): 2370-82
- Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky A.** (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 243: 1576-1583
- Chen W, Zollman S, Couderc JL, Laski FA** (1995) The BTB domain of bric à brac mediates dimerization in vitro. *Mol Cell Biol.*, 15(6): 3424-9
- Chen H, Shen Y, Tang X, Yu L, Wang J, Guo L, Zhang Y, Zhang H, Feng S, Strickland E, Zheng N, Denga XW** (2006) Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *The Plant Cell*, 18: 1991-2004
- Chen H, Huang X, Gusmaroli G, Terzaghi W, Lau OS, Yanagawa Y, Zhang Y, Li J, Lee JH, Zhu D, Deng XW** (2010) Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell*, 22(1): 108-23
- Cheng Y, Qin G, Dai X, Zhao Y** (2007) NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci*, 104(47): 18825-18829
- Cheng Y, Qin G, Dai X, Zhao Y (2008) NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 21017-21022
- Cheung AY, Wu HM** (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell*, 16(1):257-69
- Christians MJ, Gingerich DJ, Hansen M, Binder BM, Kieber JJ, Vierstra RD.** (2009) The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant Journal*, 57(2): 332-45

-
- Ciechanover A** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life *EMBO J.*, 17: 7151 - 7160
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6): 735-43
- Cokol M, Nair R, Rost B** (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.*, 1(5): 411-5
- Collins T, Stone JR, Williams AJ** (2001) All in the Family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 21(11): 3609-3615
- David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A** (1998) Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene*, 16: 2549-2556
- de la Luna S, Allen KE, Mason SL, La Thangue NB** (1999) Integration of a growth-suppressing BTB/POZ domain protein with the DP component of the E2F transcription factor. *EMBO J.*, 18(1): 212-28
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ** (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 103(2): 351-61
- Deshaies RJ** (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 15: 435-67
- Deweindt C, Albagli O, Bernardin F, Dhordain P, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Leprince D** (1995) The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ.*, (12): 1495-503
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041): 441-5
- Dhordain P, Albagli O, Ansieau S, Koken MH, Deweindt C, Quief S, Lantoine D, Leutz A, Kerckaert JP, Leprince D.** (1995) The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation in vivo. *Oncogene*, 11(12): 2689-97
- Dhordain P, Albagli O, Lin RJ, Ansieau S, Quief S, Leutz A, Kerckaert JP, Evans RM, Leprince D** (1997) Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci*, 94(20): 10762-7
- Dieterle M, Thomann A, Renou JP, Parmentier Y, Cognat V, Lemonnier G, Müller R, Shen WH, Kretsch T, Genschik P.** (2005) Molecular and functional characterization of *Arabidopsis* Cullin 3A. *Plant Journal*, 41(3): 386-99
- Dikic I** (2003) Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 1178–1181
- Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong HJ, Wang ZY, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Chen Z, Zelent A, Chen SJ** (1996) Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α fusion protein. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 3624-3629
- Dong X** (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol.*, 7(5): 547-52

-
- Dow MR, Mains PE** (1998) Genetic and molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* gene, *mel-26*, a postmeiotic negative regulator of *mei-1*, a meiotic-specific spindle component. *Genetics*, 150: 119–128
- Du L, Poovaiah BW** (2004) A novel family of Ca²⁺/calmodulin-binding proteins involved in transcriptional regulation: interaction with fsh/Ring3 class transcription activators. *Plant Mol Biol.*, 54(4): 549-69
- Dundr M, Misteli T** (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.*, 356(Pt 2):297-310
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song T, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45:616-629
- Estelle MA, Somerville C** (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics MGG*, 206(2): 200-206
- Fields S, Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230): 245-6
- Figueroa P, Gusmaroli G, Serino G, Habashi J, Ma L, Shen Y, Feng S, Bostick M, Callis J, Hellmann H, Deng XW** (2005) *Arabidopsis* has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *Plant Cell*, 17(4):1180-95
- Finley D** (1994) Inhibition of Proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol. Cell Biol.*, 14: 5501-5509
- Frugis G, Chua NH** (2002) Ubiquitin-mediated proteolysis in plant hormone signal transduction. *Trends Cell Biol.*, 12: 308–311
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP** (2004) The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, 16(6): 1406-18
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD** (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3): 207-209
- Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y** (2003): Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol.*, 5: 1001-1007
- Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD** (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, 99(17): 11519-24
- Galan JM, Peter M** (1999) Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci*, 96(16): 9124-29
- Genschik P, Durr A, Fleck J** (1994): Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana sylvestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 244 (5): 548-556
- Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA** (2003) BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell*, 12: 783–790

-
- Gietz RD, Woods RA** (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology*, 350: 87-96
- Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, Ma L, Vierstra RD.** (2005) Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.*, 280(19): 18810-21
- Gingerich DJ, Hanada K, Shiu SH, Vierstra RD** (2007) Large-scale, lineage-specific expansion of a bric-a-brac/ tramtrack/broad complex ubiquitin-ligase gene family in rice. *Plant Cell*, 19(8):2329-48
- Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, Worm U, Droege A, Lindenberg KS, Knoblich M, Haenig C, Herbst M, Suopanki J, Scherzinger E, Abraham C, Bauer B, Hasenbank R, Fritzsche A, Ludewig AH, Buessow K, Coleman SH, Gutekunst CA, Landwehrmeyer BG, Lehrach H, Wanker EE** (2004) A Protein Interaction Network Links GIT1, an Enhancer of Huntingtin Aggregation, to Huntington's Disease. *Molecular Cell*, 15: 853-865
- Grunberg-Manago M** (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet.*, 33: 193-227
- Guo H, Ecker JR** (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 115(6):667-77
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC** (2004) BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 45(10):1361-70
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I** (2003) Multiple mono-ubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.*, 5: 461-466
- Hai T, Curran T** (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci*, 88(9): 3720-4
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, Kientz M, Jürgens G** (2002) The *Arabidopsis* BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.*, 16(13):1610-5
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 166: 558
- Hanahan D** (1985) In: *DNA Cloning*, 1:109-135
- Hare, PD, Cress WA, Van Staden J** (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 50: 413-434
- Hellmann H, Estelle M** (2002) Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, 297(5582): 793-7
- Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn GW** (2005) BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(5):1434-48
- Hernández-Muñoz I, Lund AH, van der Stoop P, Boutsma E, Muijers I, Verhoeven E, Nusinow DA, Panning B, Marahrens Y, van Lohuizen M** (2005) Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci* , 102(21):7635-40
- Hershko A, Ciechanover A** (1998) The ubiquitin system; *Annu Rev Biochem.*, 67: 425-79

-
- Higo K**, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.*, 27(1):297-300
- Hoatlin ME**, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood*, 94(11):3737-47
- Hofmann RM**, **Pickart CM** (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 96(5): 645-53
- Hoppe T** (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci.*, 30(4):183-7
- Huang H**, Tudor M, Su T, Zhang Y, Hu Y, Ma H (1996) DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell*, 8(1):81-94
- Huynh K.**, **Bardwell V.J.** (1998) The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene* 17, 2473-2484
- Ikeda F**, **Dikic I** (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.*, 9(6):536-42
- Inada S**, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, Sakai T (2004) RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 16(4):887-96
- Ivanchenko MG**, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 55(2):335-47
- Jia W**, Wang Y, Zhang S, Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot.*, 53(378): 2201-6
- Jofuku KD**, den Boer BG, Van Montagu M, Okamura JK (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, 6(9):1211-25
- Kane JF** (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol.*, 6(5):494-500
- Karimi M**, Inze D, Depicker A (2002). GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, 7:193-195
- Kazuhiro I** (2003) An Ubiquitin Ligase Recognizing a Protein Oxidized by Iron: Implications for the Turnover of Oxidatively Damaged Proteins. *J. Biochem*, 134(2): 175-182
- Kido M**, Yamanaka K, Mitani T, Niki H, Ogura T, Hiraga S (1996) RNase E Polypeptides Lacking a Carboxyl-terminal Half Suppress a mukB mutation in Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 178: 3917-3925
- Kile BT**, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ (2002) The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci.*, 27(5): 235-41
- Kim S**, Choi HI, Ryu HJ, Park JH, Kim MD, Kim SY (2004) ARIA, an Arabidopsis arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant Physiol.*, 136(3):3639-48

-
- Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowrya D, Gygi SP, Goldberg AL (2007)** Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem.*, 282(24):17375-86
- Kim MJ, Shin R, Schachtman DP (2009)** A nuclear factor regulates abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 151(3):1433-45
- Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, Sano S, Tokunaga F, Tanaka K, Iwai K (2006)** A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.*, 25(20):4877-87
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999)** A Novel Ubiquitination Factor, E4, Is Involved in Multiubiquitin Chain Assembly. *Cell*, 96: 635-644
- Koncz C, Schell J (1986)** The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, 204: 383-396
- Kurland C, Gallant J (1996)** Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol.*, 7(5):489-93
- Kwon JE, La M, Oh KH, Oh YM, Kim GR, Seol JH, Baek SH, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Joe CO, Chung CH (2006)** BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase. *J Biol Chem.*, 281(18):12664-72
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007)** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-8
- Latz A, Becker D, Hekman M, Müller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R (2007)** TPK1, a Ca(2+)-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant Journal*, 52(3):449-59
- Lee J, Zhou P (2007)** DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell.*, 26(6):775-80
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW (2008)** Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell.*, 20(1):152-67
- Lin RC, Park HJ, Wang HY (2008)** Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Mol Plant.*, 1(1):42-57
- Liu G, Holub EB, Alonso JM, Ecker JR, Fobert PR (2005)** An Arabidopsis NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant Journal*, 41(2):304-18
- Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, and Dreyfus M (1999)** The C-terminal Half of RNase E, Which Organizes the Escherichia coli Degradosome, Participates in mRNA Degradation but not rRNA Processing in vivo. *Mol. Microbiol.*, 33: 188-199
- Lorkovic ZJ, Barta A (2004)** Compartmentalization of the splicing machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci.*, 9(12):565-8

-
- Luke-Glaser S**, Pintard L, Lu C, Mains PE, Peter M (2005) The BTB protein MEL-26 promotes cytokinesis in *C. elegans* by a CUL-3-independent mechanism. *Curr Biol.*, 15(18):1605-15
- Luke-Glaser S**, Pintard L, Tyers M, Peter M (2007) The AAA-ATPase FIGL-1 controls mitotic progression, and its levels are regulated by the CUL-3-MEL-26 E3 ligase in the *C. elegans* germ line. *J Cell Sci.*, 120(Pt 18):3179-87
- Maeo K**, Tokuda T, Ayame A, Mitsui N, Kawai T, Tsukagoshi H, Ishiguro S, Nakamura K (2009) An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant Journal*, 60(3):476-87
- Maezawa S**, Hayano T, Koiwai K, Fukushima R, Kouda K, Kubota T, Koiwai O (2008) Bood POZ containing gene type 2 is a human counterpart of yeast Btb3p and promotes the degradation of terminal deoxynucleotidyltransferase. *Genes Cells.*, 13(5):439-57
- Magnani E**, Sjölander K, Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell*, 16(9):2265-77
- Maniatis T**, Fritsch E, Sambrook J (1998) *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Marchand P**, Volkmann M, Bond JS (1996): Cysteine mutations in the MAM domain result in monomeric meprin and alter stability and activity of the proteinase; *J. Biol. Chem.*, 271: 24236–24241
- Masson N**, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO Journal*, 20: 5197-206
- Masuda HP**, Cabral LM, De Veylder L, Tanurdzic M, de Almeida Engler J, Geelen D, Inzé D, Martienssen RA, Ferreira PC, Hemery AS (2008) ABAP1 is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. *EMBO J.*, 27(20):2746-56
- Mazzucotelli E**, Belloni S, Marone D, De Leonardis A, Guerra D, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo A (2006) The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr Genomics.*, 7(8):509-22
- Melnick A**, Ahmad KF, Arai S, Polinger A, Ball H, Borden KL, Carlile GW, Prive GG, Licht JD (2000): In-Depth Mutational Analysis of the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger BTB/POZ Domain Reveals Motifs and Residues Required for Biological and Transcriptional Functions. *Mol. Cell. Biol.*, 20(17): 6550-6567
- Melnick A**, Carlile G, Ahmad KF, Kiang CL, Corcoran C, Bardwell V, Prive GG, Licht JD (2002) Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol Cell Biol.*, 22(6):1804-18
- Mesmar J** (2009) Dissertation: An Investigation into the Role of Ubiquitination in Plant Immunity. University of Glasgow
- Minet M**, Dufour ME, LaCroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J*, 2: 417-422
- Molinier J**, Lechner E, Dumbliauskas E, Genschik P (2008) Regulation and role of *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet.*, 4(6):e1000093

-
- Mosesson** Y, Shtiegman K, Katz M, Zwang Y, Vereb G, Szollosi J, and Yarden Y (2003) Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J. Biol. Chem.*, 278: 21323–21326
- Motchoulski** A, **Liscum** E (1999) Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science*, 286(5441):961-4
- Mou** Z, Fan W, Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7):935-44
- Nakano** T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.*, 140(2):411-32
- Narusaka** Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal*, 34(2):137-48
- Nawy** T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN (2005) Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell*, 17(7):1908-25
- Norberg** M, Holmlund M, Nilsson O (2005) The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development*, 132(9):2203-13
- Oelmüller** R, Peškan-Berghöfer T, Shahollari B, Trebicka A, Sherameti I, and Varma, A (2005) MATH domain proteins represent a novel protein family in Arabidopsis thaliana, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction. *Physiol. Plant.* 124:152-166
- Okamoto** JK, Caster B, Villarroel R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.*, 94(13):7076-81
- Olsen** AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.*, 10(2):79-87
- Ortega-Martínez** O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L (2007) Ethylene modulates stem cell division in the Arabidopsis thaliana root. *Science*, 317(5837):507-10
- O'Shea** EK, Rutkowski R, Kim PS (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell*, 68(4):699-708
- Pearce** MJ, Mintseris J, Ferreyra J, Gygi SP, Darwin KH (2008) Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 322(5904):1104-7
- Pedmale** UV, **Liscum** E (2007) Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem.*, 282(27):19992-20001
- Perez-Torrado** R, Yamada D, Defossez PA (2006) Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *Bioessays*, 28(12):1194-202
- Pickart** CM, **Fushman** D (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol.*, 8(6):610-6

-
- Pickart** CM (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.*, 11: 1055-66
- Pickart** CM (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, 25: 544-8
- Pickart** CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70:503-33
- Pintard** L, Willis JH, Willems A, Johnson JLF, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, 425: 311-316
- Ponting** CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J, Winder SJ (1996) ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci.*, 21(1):11-13
- Prestridge** DS (1991) SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Comput Appl Biosci.*, 7(2):203-6
- Qin** F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 20(6): 1693-707
- Rabilloud** T, Carpentier G, Tarroux P (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6):288-91
- Raleigh** EA, Elbing K, Brent R (1989) Selected topics from classical bacterial genetics. *Curr Protoc Mol Biol.*, Wiley, New York, Vol. 1a, pp. 1.4.1-1.4.16
- Raleigh** EA, Murray NE, Revel H, Blumenthal RM, Westaway D, Reith AD, Rigby PW, Elhai J, Hanahan D (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucl. Acids Research*, 16: 1523.
- Read** MA (2000) Nedd8 Modification of Cul-1 Activates SCFTrCP-Dependent Ubiquitination of I β Ba *Molecular and Cellular Biology*, 20(7): 2326-2333
- Ren** T, Qu F, Morris TJ (2005) The nuclear localization of the Arabidopsis transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of Turnip crinkle virus. *Virology*, 331(2):316-24
- Riechmann** JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499):2105-10
- Riechmann** JL, Krizek BA, Meyerowitz EM (1996) Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci.*, 93(10): 4793-8
- Riechmann** JL, Meyerowitz EM (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem.*, 379(6): 633-46
- Riera** M, Redko Y, Leung J (2006) Arabidopsis RNA-binding protein UBA2a relocates into nuclear speckles in response to abscisic acid. *FEBS Letters*, 580(17):4160-5
- Robert** HS, Quint A, Brand D, Vivian-Smith A, Offringa R (2009) BTB AND TAZ DOMAIN scaffold proteins perform a crucial function in Arabidopsis development. *Plant Journal*, 58:109–121

-
- Rojas CA**, Eloy NB, Lima Mde F, Rodrigues RL, Franco LO, Himanen K, Beemster GT, Hemerly AS, Ferreira PC (2009) Overexpression of the Arabidopsis anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. *Plant Mol Biol.*, 71(3):307-18
- Roodbarkelari F**, Bramsiepe J, Weinl C, Marquardt S, Novák B, Jakoby MJ, Lechner E, Genschik P, Schnittger A (2010) Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreplication cycles in Arabidopsis trichomes. *Proc Natl Acad Sci.*, 107(34): 15275-80
- Ryals J**, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P, Uknes S (1997) The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell*, 9(3):425-39
- Saitou N**, **Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425
- Sakai T**, Wada T, Ishiguro S, Okada K (2000) RPT2. A signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12(2):225-36
- Sakuma Y**, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 290(3):998-1009
- Saleh A**, Lumeras V, Pages M (2006) Functional role of DRE-binding transcription factors in abiotic stress. In: Proceedings of the International Congress “In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”, 193-205
- Sambrook J**, Maniatis T, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition
- Schulman BA**, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ER, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP (2000) Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, 408: 381-386
- Sharp RE**, Wu Y, Voetberg GS, Saab IN, LeNoble ME (1994) Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Exp. Bot.*, 45:1743-1751
- Shen H**, Korutla L, Champiaux N, Toda S, LaLumiere R, Vallone J, Klugmann M, Blendy JA, Mackler SA, Kalivas PW (2007) NAC1 regulates the recruitment of the proteasome complex into dendritic spines. *Journal of Neurosci.*, 27(33): 8903-13
- Sherman F** (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 3-21
- Smalle J**, **Vierstra RD** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 555–590
- Sparkes IA**, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc.*, 1(4):2019-25
- Spector DL** (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci.*, 114(Pt 16):2891-3
- Spoel SH**, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell.*, 137(5):860-72

-
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Privé GG (2005)** Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.*, 6(10):R82
- Stogios PJ, Privé GG (2004)** The BACK domain in BTB-kelch proteins. *Trends Biochem Sci.*, 29(12):634-7.
- Sun ZW, Allis CD (2002)** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418(6893):104-8
- Sunmi K, Choi H, Ryu H, Park JH, Kim MD, Kim SY (2004)** ARIA, an Arabidopsis Arm Repeat Protein Interacting with a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, Is a Novel Abscisic Acid Signaling Component. *Plant Physiology*, 136: 3639-3648
- Sunnerhagen M, Pursglove S, Fladvad M (2002)** The new MATH: homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers. *FEBS Lett*, 530: 1-3
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ (2007)** Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell*, 19(7):2186-96
- Takahashi I, Kameoka Y, Hashimoto K (2002)** MacroH2A1.2 binds the nuclear protein Spop. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1591: 63– 68
- Tao LZ, Cheung AY, Nibau C, Wu HM (2005)** RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *Plant Cell*, 17(8): 2369-83
- Thelander M, Fredriksson D, Schouten J, Hoge JH, Ronne H (2002)** Cloning by pathway activation in yeast: identification of an Arabidopsis thaliana F-box protein that can turn on glucose repression. *Plant Mol Biol.*, 49(1):69-79
- Theologis A, Huynh TV, Davis RW (1985)** Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *Journal of Mol Biol.*, 183(1):53-68
- Thomann A, Brukhin V, Dieterle M, Gheyeselinc J, Vantard M, Grossniklaus U, Genschik P (2005)** Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant Journal*, 43(3):437-48
- Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbliauskas E, Parmentier Y, Kieber J, Scheres B, Genschik P (2009)** Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Genet.*, 5(1):e1000328
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000)** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.*, 19: 94-102
- Uren AG, Vaux L (1996):** TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.*, 21: 244–245
- Vierstra RD (1996)** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32: 275-302
- Vierstra RD (2003)** The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.*, 8: 135-142

-
- Vierstra RD** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10(6): 385-97
- Voinnet O**, Rivas S, Mestre P, 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 Journal*, 33(5):949-56
- Wagner S**, Bernhardt A, Leuendorf JE, Drewke C, Lytovchenko A, Mujahed N, Gurgui C, Frommer WB, Leistner E, Fernie AR, Hellmann H (2006) Analysis of the Arabidopsis *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis. *The Plant Cell* 18, 1722-1735
- Wakem MP**, **Kohalmi SE** (2003) Mutation in the *ap2-6* allele causes recognition of a cryptic splice site. *Journal of Experimental Botany*, 54(393): 2655-2660
- Wang KLC**, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature*, 428: 945-950
- Weber H**, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, Estelle M, Genschik P, Hellmann H (2005) Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b Form Complexes with Members of the BTB/POZ-MATH Protein Family. *Plant Physiology* 137(1):83-93
- Winter D**, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2, e718
- Xiang C**, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40: 711–717
- Xu L**, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, Vidal M, Elledge SJ, Harper JW (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, 425: 316-321
- Xu P**, **Peng J** (2008) Characterization of Polyubiquitin Chain Structure by Middle-down Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 80(9): 3438–3444
- Yamaguchi-Shinozaki K**, **Shinozaki K** (1994) A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *The Plant Cell*, 6:251-264
- Yoshida Y**, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T (2002) E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature*, 418: 438–442
- Zeng L**, **Zhou MM** (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters*, 513: 124-128
- Zhang DD**, Lo SC, Sun Z, Habib GM, Lieberman MW, Hannink M (2005) Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol. Chem.*, 280(34): 30091-99
- Zhang^a J**, Jia W, Yang J, Ismail AM (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97: 111–119
- Zhang^b Q**, Zhang L, Wang B, Ou CY, Chien CT, Jiang J (2006) A Hedgehog-Induced BTB Protein Modulates Hedgehog Signaling by Degrading Ci/Gli Transcription Factor. *Developmental Cell*, 10: 719–729

Zhang Y, Schroeder DF (2010) Effect of overexpression of Arabidopsis Damaged DNA-binding protein 1A on De-etiolated 1. *Planta*, 231:337–348

Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP (2002): Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416: 703–709

Zhong W, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET (2003) CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature*, 423: 885-889

Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, Waddell MB, Nourse A, Hammel M, Miller DJ, Walden H, Duda DM, Seyedin SN, Hoggard T, Harper JW, White KP, Schulman BA (2009) Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*, 36(1):39-50

Zollman S, Godt D, Prive GG, Couderc JL, Laski FA (1994) The BTB Domain, Found Primarily in Zinc Finger Proteins, Defines an Evolutionarily Conserved Family that Includes Several Developmentally Regulated Genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:10717–10721

8. ERFOLGTE PUBLIKATIONEN

Weber H, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, Estelle M, Genschik P, Hellmann H. (2005) *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol.*;137(1):83-93.

Weber H., Hano P., Hellmann H. (2007) The Charming Complexity of CUL3. *International Journal of Plant Developmental Biology*; 1(1), invited review

Weber H., Hellman H. (2009) *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal*; 276 (6624–6635)

9. DANKSAGUNG

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an meinen langjährigen Betreuer Hanjo Hellmann. Ich habe sehr viel gelernt, sehr viel gearbeitet und noch mehr Spaß gehabt - diese Mischung gefällt mir noch immer. Wenn es mal wieder um die Weltherrschaft geht, bin ich dabei!

Ich bedanke mich auch bei Prof. Thomas Schmülling für die Begutachtung meiner Arbeit, aber auch für die Leitung der „Angewandten Genetik“. Ich arbeite sehr gern in diesem Institut.

Meinen speziellen Dank richte ich an Prof. Wolfgang Schuster, der mir über die Jahre immer wieder in Fragen der Biochemie geholfen hat, sowie das Herz unseres (essentiellen) Computernetzwerkes darstellt.

In diesem Sinne auch dankbare Grüße an das „Team America“! Wir haben Großartiges geleistet und ihr habt einen Großteil dazu beigetragen, daß ich gern an die Zeit in Pullman zurückdenke. Ich kann nur sagen: Immer wieder gern!

An alle im Institut - ehemalige wie aktuelle Arbeitsbienen - ein großes Dankeschön für Diskussionen, Hilfestellungen, Kaffeepausen ...und vieles mehr. Ein spezieller Dank geht in diesem Sinne auch an die Gärtner, besonders an Frau Losensky!

Wie groß der Dank an meine Mutter ist, weiß sie hoffentlich schon. Ohne sie hätte ich es wohl nicht bis hierher geschafft. DANKE!

Für die seelische Unterstützung (und so vieles mehr) danke ich auch Dir, liebster Ard! Ich werde versuchen, Dir eine ebenso gute und hilfreiche Begleitung bei Deiner Masterarbeit zu sein.

10. ANHANG

Tabelle 12: Verwendete Plasmide.

Die Plasmide wurden nach ihrem Verwendungszweck sortiert. In der Beschreibung ist die verwendete Klonierungsform angegeben. ¹ Es ist jeweils die Resistenz in *E.coli* und die Auxotrophie in Hefe angegeben. ² Für die binären Pflanzenvektoren wurden die vermittelten Resistenzen in Bakterien/Pflanzen angegeben. MCS = *Multiple Cloning Site*;

Bezeichnung	Firma / Referenz	Beschreibung	Resistenz/ Auxotrophie
Klonierung			
pDONR201	Invitrogen TM	Gateway TM Entry-Vektor	Km
pDONR221	Invitrogen TM	Gateway TM Entry-Vektor	Km
pDONR207	Invitrogen TM	Gateway TM Entry-Vektor	Gm
pENTR	Invitrogen TM	Gateway TM Entry-Vektor	Amp
pCRII-TOPO / pCR2.1 TOPO	Invitrogen TM	TA-Klonierung	Km, Amp
Y2H Hefeexpression¹			
pACT2-GW	abgeleitet von pACT2 Clontech TM	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, <i>Prey</i> -Vektor für das Y2H System	Carb/Leucin, Histidin
pACT2-GW-leer		modifizierter Leervektor pACT2-GW für die Kontrolle auf Autoaktivierung im Y2H System	Carb/Leucin, Histidin
pBTM-116-D9-GW	abgeleitet von Goehler et al., 2004	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, <i>Bait</i> -Vektor für das Y2H System	Tet/Tryptophan, Uracil
pBTM-116-D9- GW-leer		modifizierter Leervektor pBTM-GW für die Kontrolle auf Autoaktivierung im Y2H System	Tet/Tryptophan, Uracil
Proteinexpression <i>E. coli</i>			
pDEST15	Invitrogen TM	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, N-terminale GST-Fusion	Amp
pGEX-2TK	Amersham Biosciences	N-terminale GST-Fusion, klassische MCS	Amp
binäre Pflanzenvektoren²			
pGWB15	Earley et al., 2006	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, N-terminale HA-Fusion, binär	Km, Hyg/Km, Hyg
pGWB18	Earley et al., 2006	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, N-terminale myc-Fusion, binär	Km, Hyg/Km, Hyg
(PDX1.3)pGWB18	abgeleitet von Earley et al., 2006	35S Promotor wurde durch den Promotor PDX1.3 ersetzt (Jan Erik Leuendorf)	Km, Hyg/Km, Hyg
pK7WGF2	Karimi et al., 2002	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, N-terminale GFP-Fusion	Spec/Km
pK7FWG2	Karimi et al., 2002	Gateway TM <i>Destination</i> -Vektor, C-terminale GFP-Fusion	Spec/Km
pCB302-3	Xiang et al., 1999	35S, binär, klassische MCS	Km/Basta®
pCB308	Xiang et al., 1999	GUS (<i>uidA</i>), binär, klassische MCS	Km/Basta®

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
Genspezifische Primer (cDNA)		
D19000FW	ATG GGC ACA ACT AGG GTC TGC	<i>BPM1</i>
D19000RW	TCA GTG CAA CCG GGG CTT CAC	
D06190FW	ATG GAC ACA ATT AGG GTT TC	<i>BPM2</i>
D06190RW	CTA ATG TAA CCG TTG CTT CAC	
D39760FW	ATG AGT ACC GTC GGA GGT ATA G	<i>BPM3</i>
D39760RW	CTA AGA CAC TGC TCG CAC TTC	
D03740FW	ATG AAA TCT GTC ATT TTC AC	<i>BPM4</i>
D03740RW	TCA ATC TTC TAG TTC TGC C	
D21010FW	ATG TCA GAA TCA GTG ATT CAG	<i>BPM5</i>
D21010RW	CTA GGT GGT TCG TTG TCT AAC	
D43700FW	ATG TCA AAG CTA ATG ACC AG	<i>BPM6</i>
D43700RW	CTA AGT GGT TCG CTG CCT GAC	
At1g78080FW	ATGGCAGCTGCTATGAATTTG	<i>RAP2.4</i>
At1g78080RW	CTAAGCTAGAATCGAATCCC	
At1g22190FW	ATGACAACCTTCTATGGATTTTAC	A-6 Gruppe
At1g22190RW	CTAATTTACAAGACTCGAAC	
ERF55_FW	ATGGCGGATCTCTTCGGTG	
ERF55_RW	TCACGATAAAATTGAAGCCC	
At2g22200_RW	TTAAGAATTGGCCAG	
At5g65130_RW	TCAGAAGAGTTTCTC	
At1g65050FW	ATGGGTCAAAGGCATCAG	MATH Protein
At1g65050RW	CTAAAAGAAGGGATGGttttatg	
740_406FW	ggccaattctcagacggtggagc	antisense <i>BPM4</i>
740_466RW	tcaatctctagtctgccattggg	
BPM1_702bpFW	CCCTTTAGGAGACCGAAATACC	antisense <i>BPM1</i>
BPM1_858bpRW	ctgagccacaagagtagac	
BPM1_200RW	TGGATAAAAAGTAGATTGCC	Northern Sonde
AtCul3FW	ATTTTCAGATAGAGGCGTTTAAAGCATCGA	<i>CUL3A</i> 5'UTR
AtCul3RW	TCAATGAGCGACTCGATTCTCTCTTTAT	<i>CUL3A</i> 3'UTR
AtCul3-5'	ATGAGTAATCAGAAGAAGAG	<i>CUL3A</i>
AtCul3-3'	TTAGGCTAGATAGCGGTA	
CUL3aRTPCRFW	gaactttacagaaatgcgta	
CUL3aRTPCRRW	gagtgttagaagccttgtatgt	
CUL3bRTPCRFW	gagctttacagaaacgcata	
CUL3bRTPCRRW	gcgtattcaatagcctagtctga	
MD16	tggttcacgtagtgggcatcg	
MD21	gcctagtctgaatcttactgaatac	
MD35	agacttcagaggagacaatgcgt	
MD71	gtggattgatgatatactcc	
MD105	ttctgattctacgattgatctaagg	
MD139	gtttctccatattgctggagatatccat	
genspezifische Gateway™-Primer		
atb1...	AAAAAGCAGGCTAT...	5'-Fusion
atb2...	AGAAAGCTGGGT ...	3'-Fusion
At4g39780atb1	AAAAGCAGGCTATATGGCAGCCATAG	A-6 Gruppe
At4g39780atb2	GAAAGCTGGGTTTAAAGATTCGGAC	
CUL3Battb1	AAAAAGCAGGCTATATGAGTAATCAGAAGAAGAG	<i>CUL3B</i>
CUL3Battb2	AGAAAGCTGGGTTTACGCTAGATAGCGGTA	
19000noStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCAGTGCAACCGGGCTTCAC	C-terminale
06190NoStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCaaATGTAACCGTTGCTTCAC	Fusion
39760noStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCaaGACACTGCTCGCACTTC	
03740NoStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCAATCTTCTAGTTCTGCC	
21010noStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCaaGGTGGTTTCGTTGTCTAAC	
43700NoStopatt2	AGAAAGCTGGGTcCaaAGTGGTTTCGCTGCCTGAC	
At1g78080NSatt2	AGAAAGCTGGGTcCaaAGCTAGAATCG	

Name	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
T7-Promotor für cDNA-Fusion (in vitro Transkription/Translation)		
T7...	TAATACGACTCACTATAGGGAGA...	5'-Fusion
T7CUL3A	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatgagtaatcagaagaagagg	
T7At1g22190	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatgacacttctatgg	A-6 Gruppe
T7At1g36060	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatggcggatctc	
T7At2g22200	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatggaaactgcttctc	
T7At5g65130	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatggctttaaacatg	A-6 Gruppe
T7At4g39780	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatggcagccatag	
T7BPM1wo87	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatgttcatagetcttgctag	N-terminale Deletion BPM1
T7RAP2.4_116FW	TAATACGACTCACTATAGGGAGAatgtctttctcgaatc	N-terminale
T7RAP2.4_134FW	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTGGATCTTG	Deletion RAP2.4
T7RAP2.4_125aalong	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGCCGTTACTGAT GAAGC	
T7_RAP2.4_60aa	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGATTACCCGGAT TC	
Deletion auf cDNA		
RAP2.4_134RW	AGAAAGCTGGGTCTAAGCGACTCCAG	
RAP2.4_149aa_RW	CTACGTCGGCTTCGAAG	C-terminale Deletion RAP2.4
RAP2.4_180aa_RW	CTAAGTCCCAAGCCAGAG	C-terminale Deletion RAP2.4
RAP2.4_642RW	ctacttagcgtcgactgagg	C-terminale Deletion RAP2.4 (214aa)
RAP_251Stopatt2	AGA AAG CTG GGT CTACGATTTGTCCTG	C-terminale Deletion RAP2.4
RAP_295Stopatt2	AGA AAG CTG GGT CTATCCAGCGGTG	C-terminale Deletion RAP2.4
att1_RAP2.4_60aa	aaaaagcagctatATGGTTATTACCCGGATTC	N-terminale Deletion RAP2.4
att2_RAP2.4_135RW	agaaagctgggtCTATCCAGCGACTCCAG	C-terminale Deletion RAP2.4
Vektor-spezifische Primer		
GAL4FW	atgaagctcctgtcctccatc	
M13FW	GTAAAACGACGGCCAG	
M13RW	CAGGAAACAGCTATGAC	
p35S_FW	GCTTTGAAGACGTGGTTGGAAC	
LbaI	tggtcacgtagtgggccatcg	
pGEX5'	gggctggcaagccacgttgggtg	
pGEX3'	ccgggagctgcatgtgcagagg	
GUS_Seq	TCACGGGTTGGGGTTTCTAC	
pGWB15+18_FW	GCTGTTATCACAAGTTTGTAC	
pK7-GFP-FW	CAGCTCGCCGACCACTACCAGC	
pCRII_BamHI_FW	GGATCCACTAGTAACGGCCG	
attB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT	
attB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT	
Promotoren		
P19000FW	tcgagacttctgcttctag	<i>BPM1</i>
P19000RW	CAACAATACAGAGATCCC	
P06190RW	caaacaaagacgagatcca	<i>BPM2</i>
P06190FW	CATCAACTTCACCAGGTCGC	
P39760FW	cattagcttgcgtgtgaagg	<i>BPM3</i>
P39760RW	CTCATGATCTCTTCGTCGTC	
P03740RW	tacacagaccaaaagcgacgg	<i>BPM4</i>
P03740FW	GAGATTTCCACCGTCACAAG	
P21010FW	gtctttccagatggatgaag	<i>BPM5</i>

Name	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
P21010RW	CTCCGTTTGAAATTCGCTGC	
P43700FW2	caaatgatgatgacgtggcgag	<i>BPM6</i>
P43700RW	TTGGATTCAGATGGAGAAGA	
PromRAP2.4FW	CACTCATAGTTTCTACTAATGGTAAC	<i>RAP2.4</i>
PromRAP2.4RW	GAACTAACCTCACCTGCTTG	

DRE-Element (EMSA)

AtDRE-FW	gaccgactactaataatagtaag
AtDRE-RW	gagagactgagagagataaagg

Klonierung pGEX-2TK (SmaI)

BPM1_FW_SmaI	CCCGGGAATGGGCACAACACTAG
BPM1_RW_SmaI	CCCGGGTCAGTGCAACCGGGGC
BPM5_FW_SmaI	CCGGGGAATGTCAGAATC
BPM5_RW_SmaI	CCCGGGCTAGGTGGTTC
RAP2.4_FW_SmaI	CCCGGGATGGCAGCTGCTAG
RAP2.4_RW_SmaI	CCCGGGCTAAGCTAGAATCG

Klonierung C-terminale Fusion 3xmyc Epitop (RAP2.4)

3XMYCRW	CTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTCCAGAT CCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCCAGATCCTCTTCA GAGATGAGTTTCTGCTC
---------	--

Mutagenese

19000STOP	GCCAGTTTCTAACTAGGGACAACAGTTGGG
c19000STOP	CCCAACTGTTGTCCCTAGTTAGAAACTGCC
RAP2.4_G179S	gactcgtctctggctTCGacttttgacacggcg
cRAP2.4_G179S	cgccgtgtcaaaagtCGAaagccagagacgagtc

Tabelle 14: Generierte stabil transgene Pflanzen.

Gen	Vektor	Selektion	Expression gezeigt
<i>BPM1</i>	pK7WGF2	Kanamycin	
<i>BPM2</i>			
<i>BPM4</i>			+
<i>BPM5</i>			
<i>BPM6</i>			
<i>RAP2.4</i>			
<i>BPM1</i>	pK7FWG2	Kanamycin	
<i>RAP2.4</i>	pGWB15	Kanamycin, Hygromycin	+
<i>Atlg22190</i>			+
<i>BPM1</i>	pGWB18	Kanamycin, Hygromycin	
<i>BPM2</i>			
<i>BPM5</i>			
<i>RAP2.4</i>			+
<i>BPM3</i>	pGWB14	Kanamycin, Hygromycin	
<i>RAP2.4-3xmyc</i>	pCB302-3	Basta®	+
<i>asbpm4</i>			+
<i>asbpm1</i>			

Tabelle 15: Expressionsbedingungen für GST-Fusionsproteine.

GST-Fusionsprotein	Vektor	E.coli	OD ₆₀₀	Induktionsdauer	Temperatur
BPM1	pDEST15	BL21	0,8	90-120min	37°C
BPM2	pDEST15	BL21	0,6	120min	
BPM3	pGEX-2T	Rosetta2	0,6	90-120min	
BPM4	pDEST15	Rosetta2	0,6	120min	
BPM5	pGEX-2T	Rosetta2	0,8	90min	
BPM6	pDEST15	Rosetta2	0,8	90min	
RAP2.4 / RAP2.4 ^{G179S}	pDEST15	Rosetta2	0,8	60min	
RAP2.4	pGEX-2T	Rosetta2	0,8	60-90 min	
RAP2.4 ¹⁻²⁹⁵ / RAP2.4 ¹⁻²⁵¹	pDEST15	Rosetta2	0,5	60min	
BPM1 ¹⁻¹⁸⁹					
GST	pGEX-2TK	DH5α	0,3	60-120min	
Fragmente aus Y2H-screen	pDEST15	BL21	0,6	90min	
CUL3A	pDEST15	BL21	1-2	5-7 Stunden (200ml)	RT

Tabelle 16: Verwendete cDNA-Banken.

Referenz	Bezeichnung und Beschreibung der cDNA-Bank
Bürkle et al., 2005	<p><u>Samen</u> RNA: <i>A. thaliana</i> Col-0 Samen und Primärblätter von 7-10 Tage alten Keimlingen Anzucht: Erde, 26 °C, 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus Vektor: pENTR1A (GatewayTM)</p> <p><u>Keimlinge</u> RNA: <i>A. thaliana</i> Col-0 Keimlinge; 5-7 Tage alt Anzucht: Flüssigkultur, 26 °C, 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus Vektor: pENTR1A (GatewayTM)</p> <p><u>Blüten</u> RNA: <i>A. thaliana</i> Col-0 Blüten Vektor: pENTR1A (GatewayTM)</p>
Minet et al., 1992	<p><u>Minet</u> RNA: <i>A. thaliana</i> C24 Keimlinge, 5-7 Tage alt Anzucht: Sterilkultur, 26 °C, 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus</p>
Koncz, MPI Köln	<p><u>Koncz</u> RNA: <i>A. thaliana</i> Col-0 Wurzelzellkultur Vektor: pACT2</p>

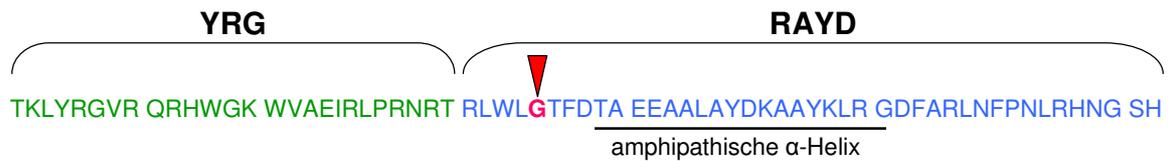


Abbildung 44: Zweiteiliger Aufbau der APETAL2-DNA-Bindedomäne.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der APETAL2-DNA-Bindedomäne des RAP2.4 Proteins. Das YRG-Motiv (grüne Buchstaben) ist sehr basisch und für die Sequenzspezifität der DNA-Bindung verantwortlich. Das RAYD-Motiv umfaßt eine amphipatische α -Helix, die als Modul zur Protein-Protein-Interaktion diskutiert wird. Der stark konservierte Glycinrest (rot) ist in *ap2-1* Pflanzen mutiert (G251S) und führt zu einem schwachen Phänotyp (Okamoto et al., 1997)

BPM1 (At5g19000)

```

1  MGTRVCSEV  SSGSSKLSLQ  SLTVSTSTTE  TVNGFHEFKI  CGYSLAKGVG
51  VGKYVASDTF  MGGYSWAIY  FYPDGKSPED  NSSYVSLFIA  LASEGADVRA
101 LFEFLTLDQS  GNGKHKVHSH  FGRALDSGPY  TLKYRGSMMW  YKRFFRRSSL
151 ESSDYLKENS  LLVRCRVGVV  KSVTEGPRYY  NIPVPVSNL  G  QQLGNLLESG
201 KGC D VVFQVD  GETFNAHKL  V  LATRSPVFNA  Q  LFGPLGDRN  T  KCIT I EDME
251 A P I F K V L L H F  I Y W D E L P D M Q  E L I G T D S T L A  S T L V A Q H L L A  A A D R Y A L E R L
301 K A I C E S K L C E  G V A I N T V A T T  L A L A E Q H H C L  Q L K A V C L K F V  A L P E N L K A V M
351 Q T D G F D Y L K E  S C P S L L T E L L  Q Y V A R L S E H S  V I V S G H R K E I  F A D G C D A S G R
401 R V K P R L H
  
```

Abbildung 45: Mutagenese der BTB-Domäne des BPM1 Proteins.

Es sind die Positionen von Aminosäuren verschiedener Mutagenese-Ansätze umrandet. Grau hinterlegt ist die BTB-Domäne. Die rot markierte Position ist das eingeführte Stopcodon (L189Stop), um den Verlust der BTB-Domäne herbeizuführen. Die blauen Positionen wurden beschrieben in Weber et al. (2005): D204A unterbindet die Homodimerisierung und die Interaktion mit CUL3A, während D293A und L297A keinen Einfluß hatten. Für die Position Y295 wurde von Weber et al. (2005) in der Umwandlung Y295A kein Einfluß auf BPM1-Interaktionen gezeigt. Figueroa et al. (2005) zeigten für die entsprechende Position in At1g21780 (Y242A) den Verlust der CUL3A Interaktion.

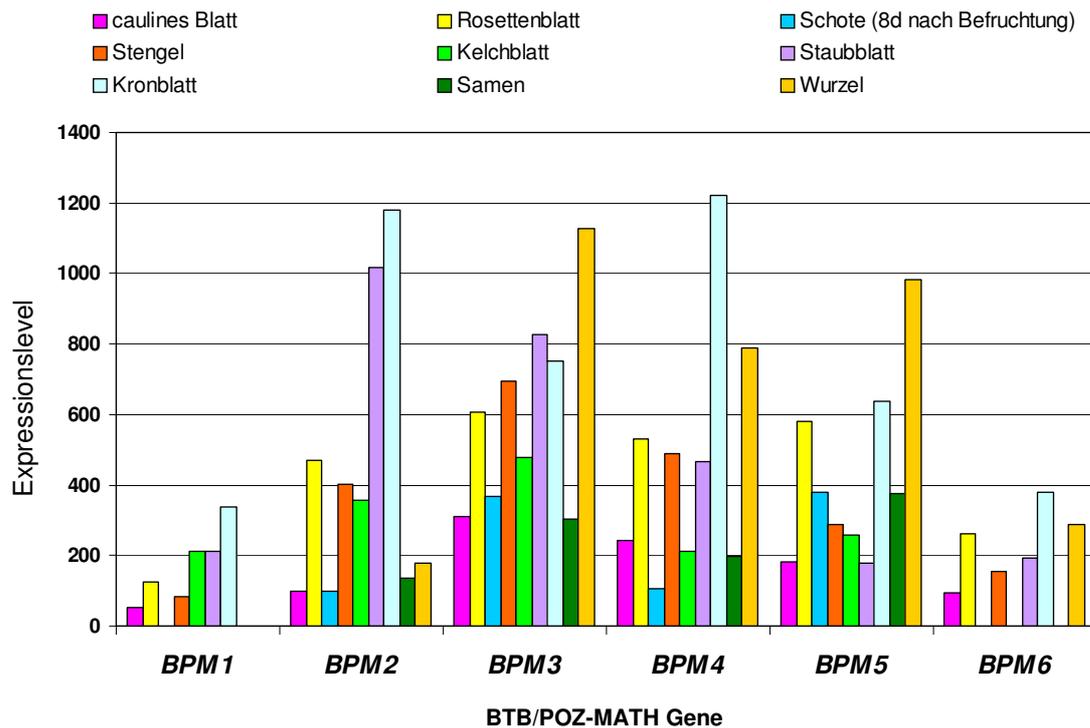


Abbildung 46: Auszug der gewebespezifischen Expressionsanalyse der BPM Genfamilie durch Gingerich et al. (2005).

Graphische Darstellung der in Gingerich et al. (2005) angegebenen Microarray-Daten zur gewebespezifischen Expression der *BPM* Gene (Median der Expressionslevel von 2-4 unabhängigen Experimenten; Auszug).

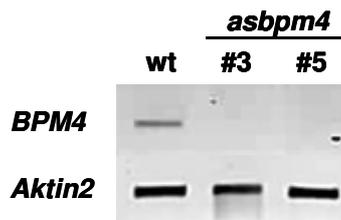


Abbildung 47: RT-PCR Bestätigung der *asbpm4* Nullmutante.

Es wurde eine RT-PCR auf RNA von Rosettenblättern zweier antisense Pflanzen (*asbpm4*#3 und #5) und des Wildtyps (Col-0) durchgeführt.

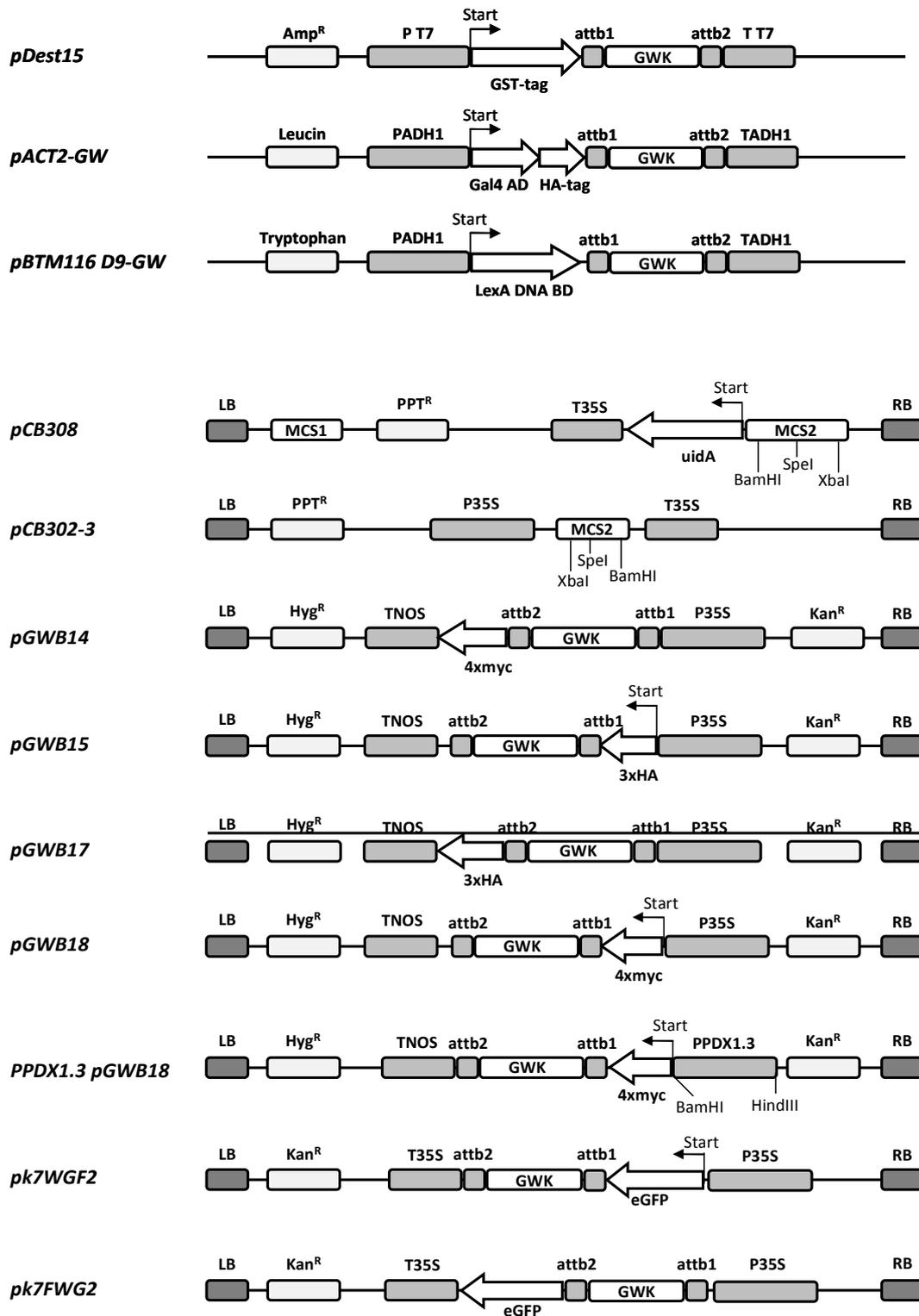


Abbildung 48: MCS und ggf. T-DNA Bereiche verwendeter Plasmide.

Dargestellt sind die für Klonierungen und transkriptionelle Fusion relevanten Bereiche der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (vergleiche Tabelle 12).

BPM1	GCDVVFQVDGETFNAKRLVLAATRSVVFNAQLFG-PLGDRNTKCIITIEDMEAPIFKVLLHF
BPM2	GADVTFEVDGETFPAKRLVLAARSVVFRAQLFG-PLRSENTNCIIIEDVQAPIFKMLLHF
BPM3	GCDIAFQVGDETYKAKKLLLAARSVVFRAQFFG-PIGNMNVDRIVIDDIEPSIFKAMLSF
BPM4	GSDITFNVSGEKFRARLVLAAARSVVFSEFLD-VTGEEDRD-IEVTDMEPKVFKALLHY
BPM5	GSDITFNIAGEKFLAKLVLAAARSVVFSSKFFS-EFEANMTE-VTINDLEPKVFKALLQF
BPM6	GSDVTFDVAGEKFAKRLVLAARSQFFRSMFYN-TLAENNSD-VVISDLEPKVFKALLHF
CeMEL-26	LCDFAINVNGKIIRAKKAVLAARSVVFNAMLTHQDTDEAKSSMMYINDMDYDVIYEMVYY
HsSPOP	FTDCCLCVAGQEFQAKKALLAARSVVFSSAMFEH-EMEESSKMRVEINDVEPEVFKEMMCF
HsPLZF	LCDVVIHVDSQEFHARRVFLACTSKMFEILFHR-----NSQHYTLDFLSPKTFQQILEY
	* : : . : ** : ** * . * : . . : . : : : :
BPM1	IYWDELPMQELIGTDS-----TLASTLVAQHLLAAADRYALE
BPM2	IYWDEMPDMQDLIGTDL-----KWA STLVAQHLLAAADRYALE
BPM3	IYTDVLPNVHEITGSTS-----ASSFTNMQHLLAAADLYDLA
BPM4	IYKDALIEDAE-SSSSSGS-----SVGPS-ASDTLAAKLLGAADKYKLP
BPM5	MYKDSLPEDEPATAHTFE-----RLKLSIYETLIVKVLAAADKYDLI
BPM6	MYKDSLPGDVEPLTAHSFD-----LLRPSIIDDTLIVKLLAAAE MYNLS
CeMEL-26	IYCGRCN-----KIDTDMATALLIAADKYRLE
HsSPOP	IYTGKA-----PNLDKMADLLAAADKYALE
HsPLZF	AYTATLQAKAEDLDDLLYAAEILEIEYLEEQCLKMLETIQASDDNDTEATMADGGAE EEE
	* : .
BPM1	RLKAICESKLCGVAINTVATTLALAEQHHC LQKAVCLKFVALPENLKAVMQTDGFDYL
BPM2	RLRTICESKLCESISINTVATTLALAEQHHC FQKAA CLKFIALPENLKAVMETDGFYDL
BPM3	RLKILCEVLLCEKLDVDNVATTLALAEQHFLQKAFCLFVASPA NLGAVMKSEGFKHL
BPM4	RLSLMCESVLCKDISVDSVANILALADRYNASALKSVCLKFAA--ENLIAVMRSDGFDYL
BPM5	RLRLLCESHICKGVSVKSVAKILALADRYNAKELKGVCLKFTA--ENLA AVLTDAYQQM
BPM6	RLRLLCESHICKGISISSVSKILALSDKYNASELKS SVLKFTA--ENLA AVLQTKAYEDL
CeMEL-26	ELKSHCEKYLVENININIENACSLLIIGDLYSAPKLRKRAVYIIL--ARPKNVTGTPGWEDI
HsSPOP	RLKVMCEDALCSNLSVENAAEILILADLHSA DQLKTQAVDFIN--YH ASDVLETSGWKSM
HsPLZF	DRKARYLKNIFISKHSSEESGYASVAGQSLPGPMVDQSPSVSTSFGLSAMSPTKAAVDSL
	: . . : . : . . . :
BPM1	KESCPSLLTELLQYVARLSEHSVIVSGHRK-----EIFAD-----GCDAS---
BPM2	KESCPSLLSELLEYVARLSEHSLTSSGHRK-----ELFAD-----GCDLN---
BPM3	KQSCPTLLSELNTVAAADKSSTSGQSNKK-----RSASSVL---GCDTTNVR
BPM4	REHCPQLQSELLKTVAGCEEEL-SGGGGKT-----RSVUGQFSDGGAETN---
BPM5	KDECVTLQSELLKAVAGHEEGSNSTGGAKS-----QSVWAQLSDGGGDTT---
BPM6	KDDCPNLQSELLKAVAGYDDTS-SGGGKKS-----QSVWAQLSNGG-ETS---
CeMEL-26	LKGHPNLITDIFSQIDRQSSTGATSSVSNL-----PGVPM DIPGITGNIV---
HsSPOP	VVSHPHLVAEAY-----RSLASAQC PFLGP-----PRKRLKQS
HsPLZF	MTIGQSLLQGTLPQAPGPEEPTLAGGGRH PGVAEVKTEMMQVDEVP SQDSPGAAESSISG
	* .
BPM1	--GRRVK-----PRLH-----
BPM2	--GRRVK-----QRLH-----
BPM3	QLRRRTR-----KEVRAVS-----
BPM4	--GRQAQTWGDINGGAERSQSVWVEVVNANGSGFNNDNNNSDDPMAELED-----
BPM5	--SRHVR-----QRTT-----
BPM6	--SRRVR-----QRTT-----
CeMEL-26	-----PPPSGL-----
HsSPOP	-----
HsPLZF	GMGDKVEERGKEGPGTPTRSSVITSARELHYG REESA EQVPPPAEAGQAPTGRPEHPA

Abbildung 49: Alignment der BTB-Domäne verschiedener BTB-Proteine.

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW2 (Larkin et al., 2007) erstellt. Dargestellt sind die BTB-Domänen der *Arabidopsis* BPM-Proteine, sowie Ce-Mel26, HsSPOP und HsPLZF. Durch einen roten (negative Ladung) bzw. blauen Rahmen (positive Ladung) wurden die nach Melnick et al. (2002) für die BTB-Homodimerisierung essentiellen Aminosäuren gekennzeichnet.

```

BPM1      FKICGYSLAKGVGVGKYVASDTFMVGG---YSWAIYFYPDGKSPEDNSSYVSIFFALASE
BPM3      FTIQGYSLAKGMSPGKFIQSDIFS VGG---YDWAIYFYPDGKNPEDQSSYISIFFALASD
CeMel-26  WTVKNFSHCY----QEYLENFVYLQRGDEQLTWSIKIYPKGNG-ENNKDFVFLCLNRVIN
SPOP      WTINNFSFCR-EEMGEVIKSSSTFSSGANDKLRVCLRVNPKGLD-EESKDYLSIYLLVSC
          :: :.* .      : : . : .      *.: . *. * . * : . . . : * : .

BPM1      -GADVPRALFELTLVDQSGNGKHKVHSHFGRALDSGPYTLKYRGSIMGYKRFFRPSLESS
BPM3      -SNDIPRALFELTLMQSGKHKVHSHFDRALEGGPYTLKYKGSIMGYKRFFKRSALETS
CeMel-26  NNVKAGKIGFKSQFKLRTAE-----NKDIEMR---IHPNPSHSOYVSYIKRDLVFPQ
SPOP      PKSEVRAKFKFSILNAKGE-----TKAMESQRAYRFVQGDIDGFKKFIKRDVLLDE
          .      : ..      : ::      . . . : : : * . * .

BPM1      D--YLKENSLLVRCRVGVVKSVTEGPRYYNIPVPSNLGQQLGNLLESG-----
BPM3      D--YLKDDCLVINCTVGVVVARLEGPKQYGLVPLPSNMGQGLKDLLDSEVGCDAIAFQV
CeMel-26  I---MPRDMIIVNVEIDVAVETIT-----TTNEPIQFEP-----
SPOP      ANGLLPDDKLTLFCEVSVVQDSVN-----IS--GQNTMMNVK-----
          : : : : : : . . .      : : :      : :

```

Abbildung 50: Alignment der MATH-Domänen von BPM1, BPM3 und CeMEL-26.

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW2 (Larkin et al., 2007) erstellt. Es sind Sequenzabschnitte im Bereich der MATH-Domäne von *Arabidopsis* BPM1 und BPM3, sowie von CeMEL-26 und HsSPOP zu sehen. Eingerahmt wurden Aminosäurepositionen, deren Mutation in CeMEL-26 oder HsSPOP eine Rolle bei der Substratbindung spielen (schwarz: Luke-Glaser et al., 2007; Zhuang et al., 2009; blau: Zhuang et al., 2009).