

**NUKLEOZYTOPLASMATISCHE PARTITIONIERUNG VON
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND RNA-BINDENDEN PROTEINEN
IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
(DR. RER. NAT.)

AN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT BIELEFELD

VORGELEGT VON
JULIA STARMANN
AUS GEORGMARIENHÜTTE

ANGEFERTIGT AM INSTITUT FÜR GENOMFORSCHUNG

BIELEFELD IM JULI 2008

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Weisshaar für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und das mir entgegengebrachte Vertrauen meine Arbeit am Lehrstuhl für Genomforschung durchführen zu können.

PD Dr. Thomas Merkle gilt ebenfalls mein ganz besonderer Dank, dafür, dass er mich während meiner Arbeit fachliche hervorragend betreut hat, mir ein tolles Thema zur Verfügung gestellt und mich unterstützt hat.

Bei PD Dr. Helge Küster bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ute Bürstenbinder, Sandra Niemeier, Melanie Kuhlmann und Angela Kralemann-Köhler möchte ich ganz besonders und von Herzen danken, für ihre Hilfe und Unterstützung nicht nur im Laboralltag. Sie waren einfach da als ich sie so sehr brauchte. Von Ute und Melli habe ich viele wertvolle Handgriffe für die Arbeit im Labor gelernt. Dr. Leonardo Alves Junior danke ich für sein fachliches Wissen und die damit verbundenen Denkanstöße. Dr. Katja Schmied danke ich sehr dafür, dass sie mich in meiner Anfangszeit unterstützt hat und geduldig meine zahllosen Fragen beantwortet hat. Bei Lena Schreiber bedanke ich mich für unsere durchaus erheiternde Zusammenarbeit im Labor. Ohne Lena wäre so mancher Morgen im Labor viel zu ruhig gewesen. Claudia Rubiano möchte ich danken für unsere wissenschaftlichen und anderen Gespräche.

Dr. Daniela Holtgräwe möchte ich ebenfalls ganz herzlich danken. Daniela hat mir sehr mit ihrer fachlichen Kompetenz geholfen, nicht nur während meiner Arbeit am Lehrstuhl für Genomforschung, sondern auch schon während unserer gemeinsamen Zeit in Osnabrück. Nicht zu vergessen sind unsere fruchtbaren Gespräche, während unserer Reisen zwischen Bielefeld und Osnabrück.

Darüber hinaus danke ich Katharina Isabella Köther, Tina Rössiger, Michèle Siek und Jasmin Schröder, die ich während meiner Arbeit betreut habe und die mit ihrem Engagement zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zu vergessen sind Dr. Gunnar Huep, Julian Brüggemann, Olli Jahns und Ingo Appelhagen, sowie Dr. Ralf Stracke und Dr. Martin Sagasser. Vielen Dank für die wissenschaftlichen und auch mal nicht-wissenschaftlichen Diskussionen.

Verena Düttmann und Raimund Hoffrogge danke ich für unsere außergewöhnlich gut funktionierende Fahrgemeinschaft und dass sie für mich da waren. Sie haben mich ganz hervorragend unterhalten auf unseren gemeinsamen Fahrten. Was mache ich nur ohne euch, auf meinen zukünftigen Arbeitswegen?

Meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders Birte, Frauke und Kai, möchte ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und ihre Geduld danken. Sie haben mir viel Kraft und Mut gegeben und sie waren da, als ich sie am meisten brauchte.

DANKE!

für meine familie, Birte, frau & Ute.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 REZEPTOR- UND SIGNAL- VERMITTELTEN KERNTTRANSPORT	1
1.2 KERNIMPORT UND KERNEXPORT	2
1.2.1 ARCHITEKTUR DES KERNEXPORTKOMPLEX	6
1.2.2 REGULATION DES KERNTTRANSPORTS DURCH RANGTP	9
1.2.3 WEITERE EXPORTREZEPTOREN IN PFLANZEN	11
1.3 REGULATION DER TRANSKRIPTION DURCH NUKLEOZYTOPLASMATISCHE PARTITIONIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	12
1.4 KERNEXPORT VON RNA DURCH RNA-BINDENDE PROTEINE	15
1.5 XPO1-INTERAGIERENDE PROTEINE (XIPs) IN <i>A. THALIANA</i>	18
1.5.1 GAMYB TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	19
1.5.2 POLY(A)-BINDENDE PROTEINE (PABP) UND CID-RNA-BINDENDE PROTEINE (CID-RBPs)	21
1.6 ZIEL DIESER ARBEIT	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 CHEMIKALIEN	24
2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.2.1 NÄHRMEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON BAKTERIEN	24
2.2.2 NÄHRMEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON HEFEN	25
2.2.3 ZELLSTÄMME	26
2.3 ANZUCHT VON PFLANZEN	26
2.3.1 OBERFLÄCHENSTERILISIERUNG VON SAMEN UND MEDIUM FÜR DIE ANZUCHT VON PFLANZEN	27
2.3.2 KREUZEN VON <i>A. THALIANA</i>	27
2.3.3 ENTFÄRZEN VON <i>A. THALIANA</i>	28
2.4 ARBEITEN MIT DNA	28
2.4.1 VEKTOREN	28
2.4.2 ISOLIERUNG VON CDNA AUS EINER CDNA-BIBLIOTHEK	28
2.4.3 AUFREINIGUNG UND ELUTION VON DNA AUS EINEM PCR-ANSATZ BZW. AUS EINEM AGAROSEGEL	29
2.4.4 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA IN EINEM AGAROSEGEL	29
2.4.5 RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	30

2.4.6	DEPHOSPHORYLIERUNGSREAKTION	31
2.4.7	HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	31
2.4.8	HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	32
2.4.9	LIGATION	33
2.4.10	TRANSFORMATION CHEMOKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN UND SELEKTION AUF AGARPLATTEN	33
2.4.11	TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN UND SELEKTION AUF AGARPLATTEN	33
2.4.12	ANZUCHT VON <i>E. COLI</i> IN FLÜSSIGMEDIEN	34
2.4.13	PLASMID-DNA PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i> IM MINIMABSTAB	34
2.4.14	PLASMID-DNA PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i> IM GROßMABSTAB	35
2.4.15	BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION IN EINER LÖSUNG	35
2.4.16	OLIGONUCLEOTIDE	35
2.4.17	FÄLLUNG VON DNA	36
2.5	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	36
2.5.1	STANDARD-PCR	36
2.5.2	<i>OVERLAP EXTENSION</i> PCR	37
2.5.3	KOLONIE-PCR	38
2.6	ARBEITEN MIT GENOMISCHER DNA	39
2.6.1	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZLICHEM GEWEBE	39
2.6.2	EINFACHE ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZLICHEM GEWEBE (<i>SHORTY PREP</i>)	40
2.6.3	PCR ZUR ANALYSE VON <i>SHORTY PREP</i> -DNA	40
2.7	DNA-SEQUENZIERUNG	41
2.8	ARBEITEN MIT RNA	41
2.8.1	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS PFLANZENMATERIAL MIT ANSCHLIEßENDER DNASE- BEHANDLUNG	41
2.8.2	AUFTRENNUNG VON RNA IN AGAROSE-FORMALDEHYDGELEN	42
2.8.3	REVERSE TRANSKRIPTION (RT)	42
2.8.4	RT-PCR REAKTION	43
2.9	HEFE <i>TWO-HYBRID</i> (Y2H) ANALYSE	43
2.9.1	DETEKTION VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN IM Y2H-SYSTEM	44
2.9.2	HEFETRANSFORMATION	44
2.9.3	INTERAKTIONSTEST AUF INDIKATORPLATTEN	45
2.9.4	QUANTIFIZIERUNG DER INTERAKTION ZWEIER PROTEINE MITTELS <i>ONPG-ASSAY</i>	46
2.10	HEFE <i>TWO-HYBRID</i>-SCREEN	47
2.10.1	SEQUENZIELLE TRANSFORMATION UND SELEKTION POSITIVER KOLONIEN	47
2.10.2	PLASMID-ISOLIERUNG AUS HEFEZELLEN („ <i>PLASMID-RESCUE</i> “)	48

2.10.3	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> MIT ISOLIERTEN HEFEPLASMIDEN	49
2.11	TABAK BY-2 ZELLKULTUR	50
2.11.1	PROTOPLASTIERUNG DER BY-2 ZELLKULTUR	50
2.11.2	TRANSFEKTION DER TABAK BY-2 PROTOPLASTEN	50
2.11.3	LOKALISATION VON GFP-FUSIONSPROTEINEN	52
2.12	BiFC (BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION)	52
2.12.1	KONSTRUKTION DER <i>SPLIT</i> -YFP-VEKTOREN UND KLONIERUNG DER CDNAS	52
2.12.2	ANALYSE DER BiFC-INTERAKTIONEN	53
2.13	EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)	53
2.13.1	HERSTELLUNG DES RADIOAKTIV MARKIERTEN DNA-FRAGMENTES	54
2.13.2	<i>IN VITRO</i> TRANSLATION DER PROTEINE	54
2.13.3	DNA-PROTEIN BINDUNGSASSAY	54
2.13.4	GELPRÄPARATION UND GELLAUF	55
2.13.5	GELANALYSE	56
2.14	<i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> VERMITTELTE TRANSFORMATION VON <i>A. THALIANA</i>	56
2.14.1	HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> -ZELLEN	56
2.14.2	TRANSFORMATION VON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> -ZELLEN	56
2.14.3	AGROBAKTERIEN-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON <i>A. THALIANA</i> (<i>FLORAL DIP</i>)	57
2.14.4	SELEKTION TRANSGENER <i>A. THALIANA</i> PFLANZEN	58
2.15	T-DNA INSERTIONSLINIEN UND GENERIERTE ÜBEREXPRIMIERENDE LINIEN	58
2.16	BIOINFORMATISCHE METHODEN	60
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>62</u>
3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM EXPORTREZEPTOR XPO1	62
3.1.1	ANALYSE VON T-DNA INSERTIONSLINIEN FÜR <i>xpo1a</i> UND <i>xpo1b</i>	62
3.2	ISOLIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN VON XPO1 MITTELS EINES HEFE <i>TWO-HYBRID</i> SCREENS	69
3.2.1	INTERAKTION VON MYB101 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES	70
3.2.2	QUANTITATIVE ANALYSE DER β -GALAKTOSIDASE AKTIVITÄT	72
3.2.3	<i>IN VIVO</i> LOKALISIERUNG VON MYB101 IN BY-2 PROTOPLASTEN	73
3.2.4	ANALYSE DES KERNEXPORTS VON MYB101 <i>IN PLANTA</i>	76
3.2.5	INTERAKTION VON HSF3 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES	80
3.2.6	INTERAKTION VON AtCTH MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES	82
3.3	FUNKTIONELLE ANALYSE VON MYB101	84
3.3.1	GENERIERUNG VON GAMYB DOPPELMUTANTEN PFLANZEN	88
3.3.2	GENERIERUNG EINER GAMYB TRIPPELMUTANTE	90

3.3.3	<i>IN VITRO</i> TRANSLATION SOWIE EMSA ZUM NACHWEIS EINES POTENTIELLEN <i>target</i> GENS FÜR MYB101	93
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER NES IN RNA BINDENDEN PROTEINEN	94
3.4.1	INTERAKTION VON CID11 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES	94
3.4.2	LOKALISIERUNG VON CID11 GFP-FUSIONSPROTEIN IN BY-2 PROTOPLASTEN UND IDENTIFIZIERUNG DER NLS IN CID11	96
3.4.3	ANALYSE DER SEQUENZEN VON PROTEINEN DER CID-RBP-FAMILIE	98
3.4.4	INTERAKTION VON AUSGEWÄHLTEN PROTEINEN DER CID-RBP FAMILIE MIT XPO1 UND <i>IN VIVO</i> LOKALISIERUNG IN BY-2 PROTOPLASTEN	100
3.4.5	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER NES IN PAB2 IM Y2H-SYSTEM	103
3.4.6	<i>IN VIVO</i> LOKALISIERUNG VON PAB2 IN BY-2 TABAKPROTOPLASTEN	104
3.4.7	DIMERISIERUNGSPOTENTIAL VON CID11 UND PAB2 IM BIFC-SYSTEM	106
3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER BISHER CHARAKTERISIERTEN NES IN PFLANZLICHEN PROTEINEN	107
4.	<u>DISKUSSION</u>	108
4.1	XPO1-ABHÄNGIGER KERNEXPORT REGULATORISCHER PROTEINE IN <i>A. THALIANA</i>	109
4.2	KERNEXPORT UND NES IN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	114
4.2.1	SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER NES- BZW. NLS MUTANTE VON MYB101	118
4.3	KERNEXPORT VON RNA	120
4.3.1	KERNEXPORT UND NES IN RNA-BINDENDEN PROTEINEN	121
4.3.2	KERNIMPORT UND NLS IN CID11	123
4.3.3	DIMERISIERUNG VON CID11 UND PAB2	124
4.3.4	KERNEXPORT VON mRNA	127
4.3.5	KERNEXPORT RIBOSOMALER UNTEREINHEITEN	128
4.3.6	ANALYSE EINER T-DNA INSERTIONSLINIE FÜR CID11	132
4.4	FUNKTIONALE ANALYSE VON MYB101	132
4.4.1	GARE MOTIV DES LFY-PROMOTOR ALS MÖGLICHE BINDESTELLE VON MYB101	134
4.4.2	MYB101 ÜBERNIMMT FUNKTIONEN IN DER ENTWICKLUNG DER FRUCHTBLÄTTER UND DER BILDUNG VON REIFEN POLLEN	135
4.5	PARTITIONIERUNG ALS REGULATION DER FUNKTION VON PROTEINEN	137
4.6	AUSBLICK	139
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	141
6.	<u>LITERATUR</u>	143

7. PUBLIKATIONEN	153
8. ANHANG	154
9. ABKÜRZUNGEN	162

1. EINLEITUNG

1.1 REZEPTOR- UND SIGNAL- VERMITTELTEN KERNTTRANSPORT

Der Transport von Makromolekülen zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma ist ein fundamentaler und essentieller Prozess in eukaryotischen Zellen. Die den Nukleus umgebene Kernhülle führt zur Kompartimentierung und trägt somit zur räumlichen Trennung von zellulären Vorgängen in eukaryotischen Zellen bei. Eine große Anzahl an Substraten muss zwischen Nukleus und Zytoplasma ausgetauscht werden. Nicht nur Kernproteine, wie Histone und Transkriptionsfaktoren, müssen vom Zytoplasma importiert werden, sondern auch tRNAs, rRNAs und mRNAs, die durch Transkription im Nukleus synthetisiert werden, müssen aus dem Nukleus exportiert werden, um ihre Aufgaben in der Translation wahrnehmen zu können. Die Kompartimentierung von Zellen trägt einerseits dazu bei, dass Eukaryoten eine enorme Menge an genetischen Informationen besser verarbeiten und andererseits, dass zelluläre Vorgänge dadurch deutlich besser reguliert werden können.

Der Transport von Proteinen und anderen Faktoren erfolgt über die Kernporenkomplexe (NPC, *nuclear pore complexe*), welche in die Kernhülle eingelagert sind (VASU und FORBES 2001). Die NPCs ragen durch die Kernhülle hindurch und ihre Anzahl variiert in abhängig von der Rate des nukleozytoplasmatischen Transports, der Größe und der synthetischen und proliferierenden Aktivität einer Zelle. In einer Hefezelle besitzt der Nukleus knapp 200 NPCs und in einer reifen *Xenopus* Oozyte können bis zu 5×10^7 NPCs auftreten (CORDES *et al.* 1995). Der Durchmesser des zentralen Kanals der NPCs beträgt etwa 38 nm (ALBER *et al.* 2007), was übereinstimmt mit der Größe von zu transportierenden Partikeln (PANTE und KANN 2002). Der Durchmesser einer gesamten NPC beträgt 98 nm mit einer Höhe von 37 nm (ALBER *et al.* 2007). Die dreidimensionale Struktur von NPCs weist eine oktagonale Symmetrie auf. Auf der zytoplasmatischen Seite der NPCs bilden filamentöse Strukturen eine Extension ins Zytoplasma. Im Gegensatz dazu bilden die NPCs auf der nukleären Seite eine korbähnliche Struktur aus. In Vertebraten haben die NPCs eine Molekularmasse von 125 MDa und bestehen aus 50 bis 100 verschiedenen Proteinen, die auch als Nukleoporine bezeichnet werden (VASU und FORBES 2001). In Hefen sind die NPCs deutlich kleiner und haben etwa eine Masse von 66 kDa (ROUT *et al.* 2000; ROUT und BLOBEL 1993). Spezielle Nukleoporine vermitteln in den NPCs direkt die Interaktion mit den Transportrezeptoren und besitzen meistens Phenylalanin-reiche Regionen mit einem charakteristischen Cluster aus hydrophoben und dazwischen liegenden hydrophilen Resten (z.B. FxFG oder GLFG, FG-Motive) (ROUT und WENTE 1994). Einige der Nukleoporinen treten innerhalb einer Kernpore in mehreren Kopien auf, häufig acht oder ein Vielfaches von acht, womit sich die oktagonale Symmetrie einer Kernpore erklären lässt. Ribbeck und Görlich (2002) postulierten, dass die

Permeabilität der NPCs möglicherweise durch die FG-Motive in den Nukleoporinen hervorgerufen wird. Es gibt verschiedene Modelle, die die Rolle der FG-Motive in Bezug auf die Permeabilität der NPCs versuchen zu erklären. Dazu gehören das „*virtual gating*“ und das „*oily spaghetti*“ Modell (MACARA 2001; ROUT *et al.* 2000). Die Permeabilität der NPCs kann durch Kerntransportrezeptoren überwunden werden, da sie hydrophober sind als die meisten löslichen Proteine und direkt mit den Phenylalanin-reichen Regionen der Nukleoporine interagieren können.

Die NPCs vermitteln einen bidirektionalen Transport zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma und übernehmen die Funktion einer besonders hoch selektiven Pforte, die die Passage von Molekülen auf zwei Arten zulässt: passive und erleichterte Diffusion (MATTAJ und ENGLMEIER 1998). Die passive Diffusion erfolgt schnell für Ionen, Metabolite und kleine Makromoleküle, wird aber ineffizienter, sobald das Molekulargewicht etwa 40 bis 60 kDa übersteigt. Moleküle mit einem noch höheren molekularen Gewicht können zwar im Prinzip auch in den Nukleus durch passive Diffusion gelangen, dieser Prozess kann jedoch einige Stunden in Anspruch nehmen. Im Gegensatz dazu ermöglicht die erleichterte Diffusion einen schnellen und effizienten Transport von sogar sehr großen Molekülen, wie z.B. ribosomalen Untereinheiten (PANTE und KANN 2002), und ist gleichzeitig gekoppelt mit der Zufuhr von metabolischer Energie, meist in Form von GTP, was den Transport gegen einen Konzentrationsgradienten erlaubt. Auch solche Proteine und RNAs, die kleiner als 40 bis 60 kDa sind (z.B. Histone und tRNAs), werden durch aktiven Transport durch die NPCs transloziert. Dadurch unterliegt dieser Prozess einer gewissen Kontrolle, läuft zusätzlich schneller ab und ermöglicht die Akkumulation gegen einen Konzentrationsgradienten. Die erleichterte, aktive Translokation erfordert die spezifische Interaktion zwischen dem zu transportierenden Molekül und den NPCs. Diese Interaktion wird über Transportrezeptoren vermittelt und lässt den Prozess zusätzlich selektiv werden.

1.2 KERNIMPORT UND KERNEXPORTE

Der nukleozytoplasmatische Transport ist Rezeptor- und Signal- vermittelt. Erste Hinweise auf das Vorhandensein von Signalen, die den Transport eines Moleküls induzieren, wurden von Dingwall *et al.* (1982) durch Studien der Akkumulation von Nucleoplasmin im Nukleus gefunden. Intaktes Nucleoplasmin wanderte schnell in den Nukleus nachdem es in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert wurde. Deletionsstudien an Nucleoplasmin resultierten in einer ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisierung, woraus geschlossen werden konnte, dass der deletierte Abschnitt für die Kernlokalisierung von Nucleoplasmin verantwortlich ist. Das erste Kernimportsignal (NLS, *nuclear localisation signal*) wurde für das *simian virus 40*

(SV40) *large-T* Antigen beschrieben (KALDERON *et al.* 1984; LANFORD und BUTEL 1984). Die Kernimportsignale des Nucleoplasmins und des SV40 gelten seither als Prototypen einer klassischen NLS in Proteinen und bestehen aus basischen Aminosäureresten (AS-Resten), meistens Lysin. Das Importsignal im SV40 besteht aus einem kurzen Abschnitt basischer AS-Reste und ist eine so genannte *monopartite* NLS. Im Gegensatz dazu wird die NLS im Nucleoplasmin als *bipartite* NLS bezeichnet, da sie aus zwei Bereichen mit basischen AS-Resten besteht (Tab. 1.1).

TAB. 1.1: SIGNALE FÜR DEN KERNIMPORT.

Sequenzen einer *monopartite* und einer *bipartite* NLS sind dargestellt sowie die Importin β -Bindedomäne im Importin α und die M9 Domäne, ebenfalls ein Signal für den Kernimport. SV, *simian virus*; IBB, Importin β Bindedomäne; hnRNP, Kernribonukleoprotein.

Signal	Sequenz	Funktion
SV40 large T antigen NLS	PKKKRKV	Kernimport
Nucleoplasmin bipartite NLS	KRPAAIKKAGQAKKKK	Kernimport
IBB Domäne von Importin α	RMRKFKNKGKDTAELRRRRV- EVSVELRKAKKDEQILKRRNV	Bindet an Importin β
hnRNP A1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGRSSGP- YGGGGQYFAKPRNQGGY	Gewährleistet schnelle Partitionierung

In weiteren Studien wurden Faktoren isoliert, die in den NLS-abhängigen Kernimport von Proteinen involviert sind. Dazu gehören Importin α , Importin β sowie zwei Mitglieder des RanGTPase Systems, Ran und *nuclear transport factor 2* (NTF2). Die Mitglieder der Importin β Superfamilie sind in die Mehrzahl von Kerntransportprozessen in eukaryotischen Zellen involviert und kommen in zwei Formen vor: Rezeptoren, die den Import vermitteln, die Importine, und solche für den Export, die Exportine (GORLICH und KUTAY 1999; MATTAJ und ENGLMEIER 1998; WEIS 1998). Zusammenfasst werden diese Transportrezeptoren auch als Karyopherine bezeichnet. Identifiziert wurden bisher 20 Proteine in Vertebraten und 14 in Hefen, die mit Importin β verwandt sind. Das Genom von *A. thaliana* enthält acht Gene und ein Pseudogen, die für Importin α Proteine kodieren, und weitere 17 Gene, die für Importin β Kerntransportrezeptoren kodieren (MERKLE 2001; MERKLE 2003). Die meisten der Importin β Transportrezeptoren in *A. thaliana* sind noch nicht charakterisiert. Der Prozess des Kerntransports ist in den verschiedenen Organismen konserviert.

Importin α bindet an die NLS in Proteinen und übernimmt die Aufgabe eines Adapters, der die Verbindung zwischen dem zu transportierendem Molekül und dem Transportrezeptor Importin β herstellt. Als Transportrezeptor vermittelt Importin β die Interaktion mit den Nukleoporinen der NPCs. Importin α besitzt eine Importin β -Bindedomäne (IBB, Tab. 1.1), über die die Interaktion zwischen den beiden Importinen stattfindet. Der trimere Importkomplex, bestehend aus Cargoprotein, Importin α und Importin β , wird über die NPCs ins Nukleoplasma transportiert und dissoziiert hier unter dem Einfluss von RanGTP. Da die Bindestellen für Importin α und RanGTP an Importin β überlappen, verdrängt die hohe Konzentration an RanGTP im Nukleus die Bindung zwischen Importin α und Importin β . Dies führt dazu, dass RanGTP und Importin β komplexieren und als Dimer zurück ins Zytoplasma gelangen (Abb. 1.1, A). Importin α wird durch den Exportrezeptor CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*) zurück ins Zytoplasma transportiert (KUTAY *et al.* 1997). CAS ist ebenfalls ein Mitglied der Importin β Familie und wurde ursprünglich als ein Faktor isoliert von dem angenommen wurde, dass er in Apoptose und Zellproliferation involviert sei, bevor sich jedoch herausstellte, dass es sich bei CAS um den Exportrezeptor von Importin α handelt.

Neben dem Kernimport von Proteinen hervorgerufen durch eine NLS, existieren auch noch andere Mechanismen, über die ein Import in den Nukleus erfolgen kann. Ein weiterer Importfaktor, der ebenfalls zur Importin β Familie gehört, ist der Rezeptor Transportin 1 (POLLARD *et al.* 1996). Dieser Rezeptor vermittelt in humanem Gewebe den Kernimport von Proteinen, die die so genannte M9 Domäne besitzen, welche in heterogenen Kernribonukleoproteinen (hnRNP) zu finden ist (SIOMI und DREYFUSS 1995; WEIGHARDT *et al.* 1995) (Tab. 1.1). In *A. thaliana* wurde Transportin 1 als ein Mitglied der Importin β Familie charakterisiert, welches das humane Transportin 1 funktional in einem *in vitro* Assay ersetzen kann (ZIEMIENOWICZ *et al.* 2003). In *A. thaliana* existieren drei Proteine, die eine M9 Domäne enthalten: AtRNP1, AtGRP7 und AtGRP8 (ZIEMIENOWICZ *et al.* 2003).

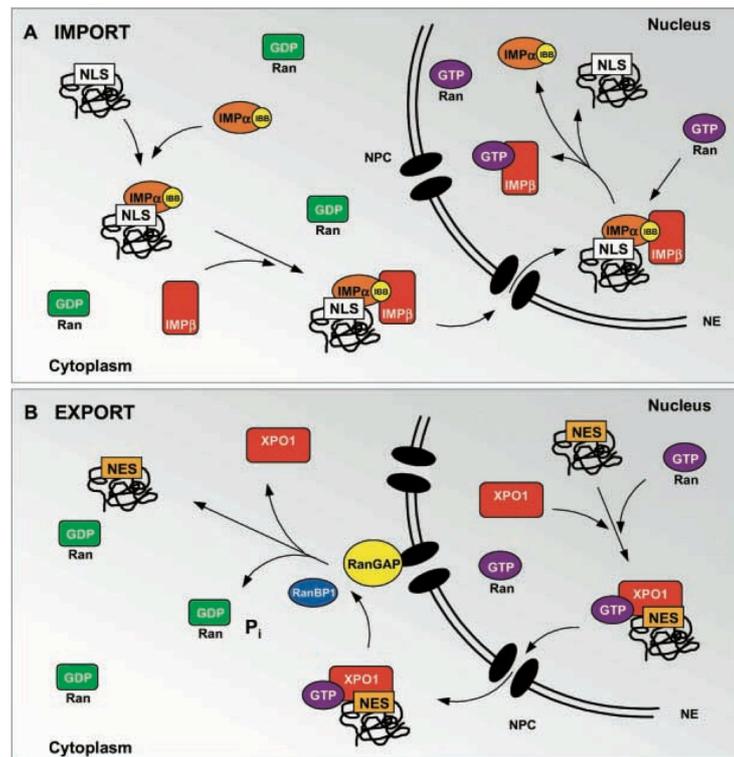


ABB. 1.1: KERNIMPORT UND KERNEXPORT VON PROTEINEN.

(A) Der Import von Proteinen, die eine NLS besitzen, erfolgt mittels Importin α , das die NLS in Proteinen erkennt, und Importin β , der Transportrezeptor, der die Bindung zu den Nukleoporen der NPCs vermittelt. Importin α ist ein Adapterprotein zwischen dem Cargosubstrat und Importin β und bindet über die IBB Domäne an den Transportrezeptor. Der trimere Komplex gelangt über die NPCs in den Nucleus, wo er durch die Aktivität von RanGTP dissoziiert und das Cargosubstrat wird in den Nucleus entlassen. (B) XPO1 bindet im Nucleus Proteine, die eine NES besitzen, in Kooperation mit RanGTP. Die Translokation erfolgt über die NPCs. Im Zytoplasma wird durch die Aktivität der beiden Proteine RanBP1 und RanGAP GTP an Ran hydrolysiert, wodurch der Exportkomplex dissoziiert und das Cargoprotein ins Zytoplasma entlassen wird. NPC, *nuclear pore complex*; IBB, Importin β -Bindedomäne; NE, *nuclear envelope*. (nach MERKLE 2001)

Exportin 1 (XPO1) ist ein Exportrezeptor der Importin β Familie, der Exportsignale oder spezifische Domänen in Cargosubstraten erkennt. Das Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*), an das XPO1 in seinen Substraten bindet, besteht aus einer Leucin-reichen Region (FORNEROD *et al.* 1997), und wurde als erstes für das HIV-Rev Protein und den Proteinkinase A Inhibitor PKI beschrieben (FISCHER *et al.* 1995; WEN *et al.* 1995). Anhand zahlreicher charakterisierter NES in diversen Proteinen ergibt sich folgende Konsensussequenz für eine NES: $\Phi X_{2-3} \Phi X_{2-3} \Phi X \Phi$ (BOGERD *et al.* 1996). Das Φ steht in diesem Fall für einen hydrophoben AS-Rest (L, I, V, F oder M) und das x ist stellvertretend

für einen beliebigen AS-Rest (BOGERD *et al.* 1996). Ein bioinformatisches Programm zur Analyse und Vorhersage von putativen NES in Proteinen wurde entwickelt (LA COUR *et al.* 2004). Aus 67 experimentell verifizierten NES ergibt sich das Sequenz Logo $L_{xx}L_{xL}$, welches auf 75 % der analysierten Exportsignale zutrifft. Lediglich 11 % der analysierten NES haben die Konsensussequenz $L_{xxx}L_{xL}$. Das Leucin kann aber auch durch die hydrophoben AS-Reste I, V, F oder M ersetzt werden.

1.2.1 □ ARCHITEKTUR DES KERNEXPORTKOMPLEX

Die Struktur von XPO1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch Röntgen-Kristallographie konnten jedoch Hinweise darauf gefunden werden, wie es zur Ausbildung eines Kernexportkomplexes kommen kann (PETOSA *et al.* 2004). Das kristalline Modell vom humanen XPO1 stellt den C-terminalen Bereich (AS-Reste 707 bis 1034) dar (Abb.1.2, A) und wird als CRM1^{CTR} bezeichnet. Durch vergleichende Analysen der Struktur von XPO1 mit Importin β und Transportin 1 (TRN1) wird postuliert, dass XPO1 aus 19 aufeinander folgenden HEAT (*huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A und TOR1*) Motiven besteht (Abb. 1.3, B). Ein einzelnes HEAT-Motiv besteht aus etwa 50 AS-Resten, die zwei antiparallele α Helices A und B ausbilden (ANDRADE und BORK 1995; ANDRADE *et al.* 2001). Die HEAT-Motive der C-terminalen Struktur korrespondieren zum HEAT-Motiv 13 in TRN1, weshalb die sechs Motive des kristallinen Modells von XPO1/CRM1 von 14 bis 19 durchnummeriert sind. Die HEAT-Motive eins bis drei in der Sequenz von XPO1 werden als CRIME Domäne bezeichnet (CRM1, Importin β , etc.) und sind in die Bindung von RanGTP involviert (VETTER *et al.* 1999). Der Bereich ab dem vierten HEAT-Motiv bis zum AS-Rest 707, ab dem das kristalline Modell beginnt, weist nur eine sehr geringe Identität zu Importin β und TRN1 auf, da in dieser Region die HEAT-Motive in XPO1 stark degeneriert sind. Eine Sequenzalignment von XPO1 und TRN1 Orthologen lässt darauf schließen, dass die HEAT-Motive acht bis 13 mit TRN1 verwandt sind. Die Struktur der HEAT-Motive sieben und acht A ist noch unklar (Abb. 1.3, A und B).

Im Bereich der AS-Reste 415 bis 600 liegt die so genannte zentrale konservierte Region, welche die HEAT Motive neun bis elf umfasst und als Bereich der putativen Ran-abhängigen NES Erkennung gilt (Abb. 1.2, B). Im Gegensatz zu den Importinen, die ihre Cargosubstrate durch Reste im Bereich der innen liegenden Oberfläche binden, scheint XPO1 Cargoproteine durch nach außen gerichtete AS-Reste zu binden (PETOSA *et al.* 2004). Das Cys528 befindet sich im Bereich der putativen NES-Erkennungsregion und kann Leptomycin B (LMB) kovalent binden, wodurch eine Interaktion von XPO1 mit der NES eines Cargoproteins

spezifisch inhibiert wird (KUDO *et al.* 1999). Der AS-Rest Glu429 erleichtert die Bindung von LMB. Die hydrophoben AS-Reste Leu525, Lys568 und Phe572 in der NES-Erkennungsregion von XPO1 sind vermutlich verantwortlich für die Interaktion mit den hydrophoben AS-Resten der NES des Cargoproteins (Abb. 1.2, B). Der Austausch der drei AS-Reste der putativen NES-Erkennungsregion zu Alanin verhindert die Bindung an die NES eines Cargosubstrats und zusätzlich wird die Bindung von Ran deutlich reduziert (PETOSA *et al.* 2004).

In die Bindung von RanBP3 sind die AS-Reste Pro411, Phe414, Arg474 und Glu478 involviert. Gly502 und Met545 grenzen an das Cys528 an. Phe986 entspricht Glu430 im XPO1 aus Hefen. Der Austausch E430K in Hefen resultierte in einem LMB hypersensitiven Hefestamm. Phe986 im humanen XPO1 ist jedoch räumlich zu weit vom Cys528 entfernt, als das es die Bindung von LMB beeinflussen könnte (PETOSA *et al.* 2004).

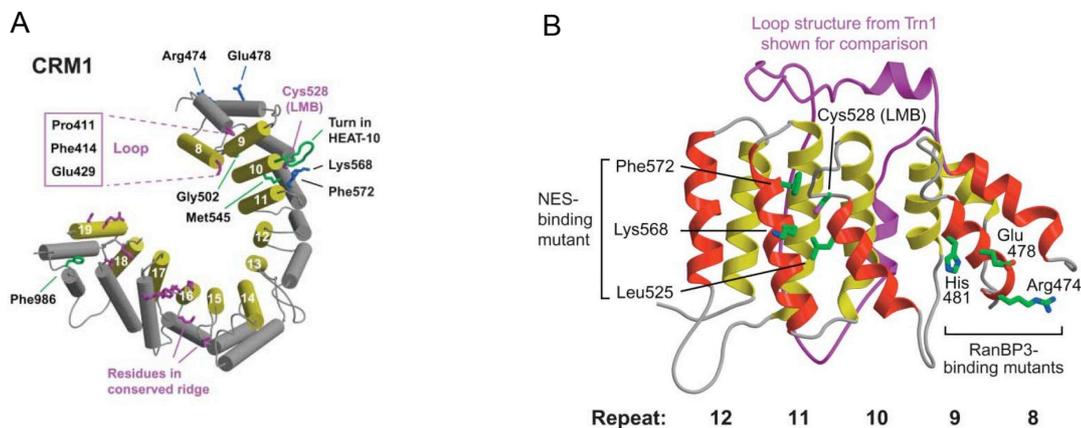


ABB. 1.2: VORHERGESAGTE STRUKTUR DER ZENTRALEN KONSERVIERTEN REGION IM HUMANEN XPO1/CRM1.

(A) Das Modell der Struktur von XPO1/CRM1 umfasst die HEAT-Motive acht bis 19. In grau und gelb dargestellt sind die A und B Helixstrukturen der HEAT-Motive. Die angegebenen AS-Reste werden im Text erwähnt. (B) Detaillierte Darstellung der zentralen konservierten Region mit der putativen NES-Bindestelle und der Bindestelle für Leptomycin B. In rot und gelb sind die A und B Helices eines HEAT-Motivs dargestellt. In violett ist eine Schleifenstruktur von Transportin 1 (TRN1) angegeben zur Kennzeichnung der putativen Ran-Bindeschleife. (nach PETOSA *et al.* 2004)

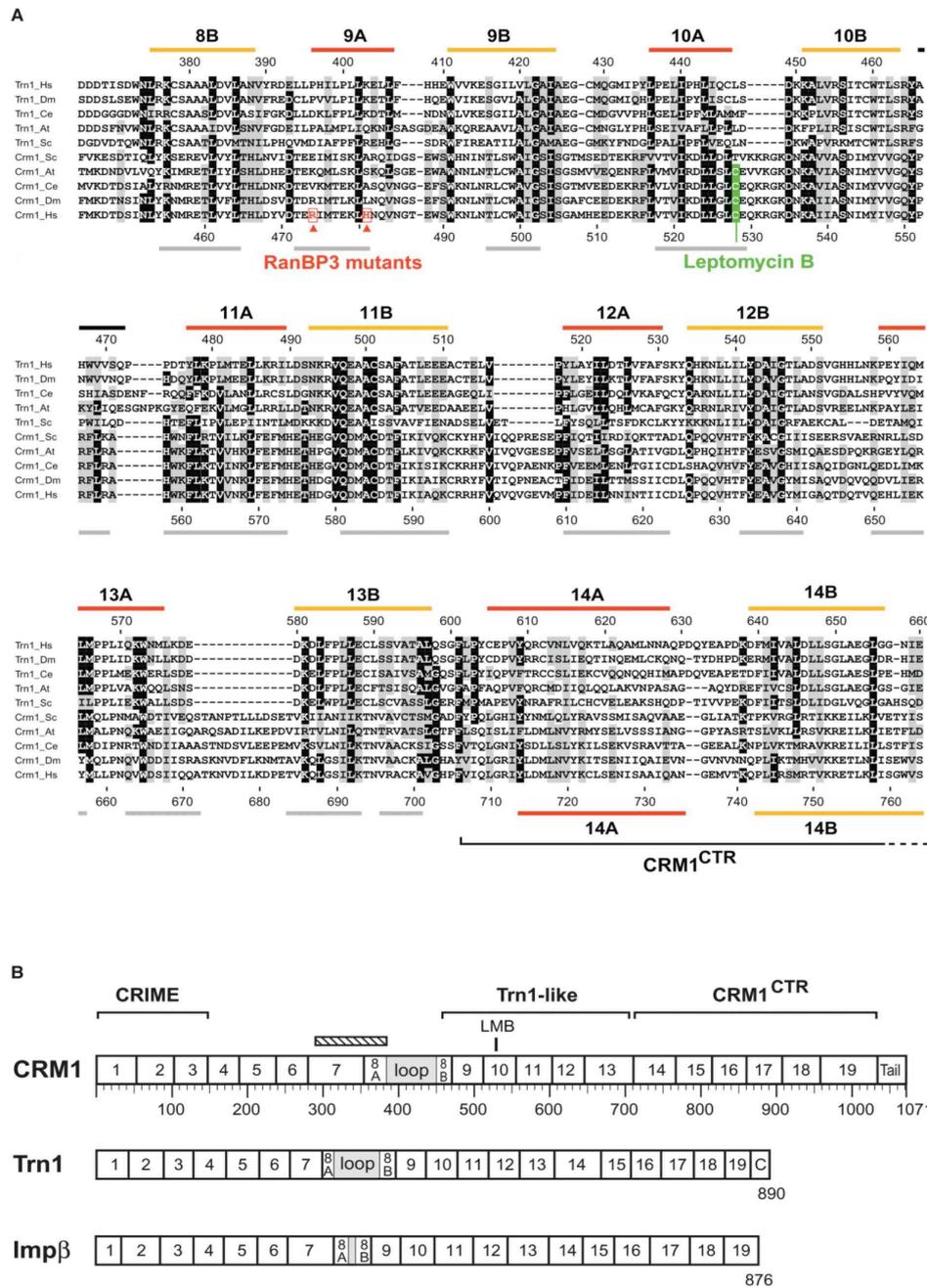


Abb. 1.3: HEAT-MOTIVE IN XPO1/CRM1.

(A) Sequenzalignment der mittleren Region von XPO1/CRM1 und Transportin 1 (TRN1). Identische oder konservierte AS-Reste sind durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Die gelben und roten Balken markieren die Helices A und B jeweils eines HEAT-Motivs (8B bis 14B). Die grauen Balken kennzeichnen vorhergesagte Helixstrukturen. Die Leptomycin B Bindestelle und RanGAP3 Bindestelle sind angegeben. (B) Vorhergesagte HEAT-Motive in XPO1/CRM1 auf Grund von Sequenzdaten von TRN1 und Importin β (Imp β). CRIME Domäne (CRM1, Importin β , etc.), bindet RanGTP. Trn1-like weist auf eine hohe Homologie von XPO/CRM1 auf Trn1 hin. CRM1^{CTR} ist der kristallographisch dargestellte Bereich (s. Abb. 1.2). Der gestreifte Kasten kennzeichnet den Bereich, dessen Struktur noch unbekannt ist. Hs, *Homo sapiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; At, *A. thaliana*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*. (nach PETOSA et al. 2004)

1.2.2 □ REGULATION DES KERNTTRANSPORTS DURCH RANGTP

Ran (*Ras-related nuclear protein*) ist eine Ras-verwandte, hoch konservierte GTPase, die löslich ist, kontinuierlich zwischen Nukleus und Zytoplasma wandert und in diversen zellulären Prozessen Aufgaben übernimmt. Dazu gehören unter anderem die Assemblierung der Kernhülle und des Spindelapparats während der Mitose sowie Funktionen im Kerntransport (BILBAO-CORTES *et al.* 2002; DASSO 2002; HETZER *et al.* 2002). In allen Kerntransportprozessen, die durch Mitglieder der Importin β Rezeptor Familie vermittelt werden, übernimmt Ran eine wichtige regulatorische Funktion (FORNEROD *et al.* 1997; GORLICH und KUTAY 1999; REXACH und BLOBEL 1995; ZEMP und KUTAY 2007). Wobei die Tatsache, dass Ran in zwei stabilen Konformationen auftritt, einerseits in GTP und zum anderen in GDP gebundener Form, im Zusammenhang mit dem Kerntransport von großer Bedeutung ist (BISCHOFF und PONSTINGL 1991b; MOORE und BLOBEL 1993).

Importin β -verwandte Transportrezeptoren binden Ran spezifisch und in Abhängigkeit vom jeweiligen Kompartiment. Die Bindung eines Cargosubstrates durch XPO1 im Nukleus oder durch den heterodimeren Komplex aus Importin α und Importin β im Zytoplasma und die anschließende Dissoziation der Transportkomplexe im jeweiligen Kompartiment findet in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten von RanGTP über die Kernhülle statt (GORLICH *et al.* 1996a; GORLICH *et al.* 1996b; IZAURRALDE *et al.* 1997). Der Gradient wird von den RanGTP Bindestellen in den Transportrezeptoren wahrgenommen. Im Nukleus liegt eine hohe Konzentration an RanGTP vor, was zur Bindung eines Cargosubstrats durch XPO1 führt. Diese hohe Konzentration bedingt aber auch, dass ein Importkomplex, bestehend aus Cargoprotein, Importin α und Importin β , im Nukleus dissoziiert. Der Exportkomplex aus XPO1, dem Substrat und RanGTP dissoziiert im Zytoplasma durch die Aktivität der regulatorischen Proteine Ran-bindendes Protein 1 (RanBP1) und das GTPase-aktivierende Protein 1 für Ran (RanGAP1), welche das durch Ran gebundene GTP hydrolysieren (BECKER *et al.* 1995; BISCHOFF und GORLICH 1997; BISCHOFF *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu ist der *Ran-specific guanine nucleotide-exchange factor* (RanGEF) im Nukleus lokalisiert und sorgt für eine hohe Konzentration an RanGTP (BISCHOFF und PONSTINGL 1991a).

Der Exportrezeptor von Importin α , CAS, bindet sein Substrat, ebenso wie XPO1, nur in Gegenwart von RanGTP. Für die Importine, wie Importin β und Transportin 1, gilt, dass die Substratbindung nur in Abwesenheit von RanGTP erfolgen kann. In Experimenten konnte nachgewiesen werden, wie wichtig der Einfluss des RanGTP Gradienten auf die Direktionalität des Kerntransports ist. Die Importrezeptoren gelangen ohne einen Komplex mit RanGTP gebildet zu haben in den Nukleus, aber verlassen ihn in einer RanGTP gebundenen Form. Mit jedem Exportprozess, der stattfindet, wird somit kontinuierlich

RanGTP aus dem Nukleus heraus transportiert. Um zu verhindern, dass die Konzentration an RanGTP zu gering wird, muss RanGDP in den Nukleus importiert werden, was durch den *nuclear transport factor 2* (NTF2) katalysiert wird (RIBBECK *et al.* 1998; ZHAO *et al.* 2006). NTF2 ist hoch konserviert, bindet spezifisch RanGDP und interagiert mit den FG-Motiven in den NPCs, wodurch der Kernimport vermittelt wird. Im Nukleus wird die Interaktion zwischen NTF2 und RanGDP vermutlich durch die Phosphorylierung zu RanGTP beeinflusst, da NTF2 keine Affinität zu RanGTP aufweist (RIBBECK *et al.* 1998). Weitere Mechanismen zur Regulation des Kerntransports und der damit verbundenen nukleozytoplasmatischen Partitionierung von wichtigen regulatorischen Proteinen werden im Abschnitt 4. Diskussion vorgestellt.

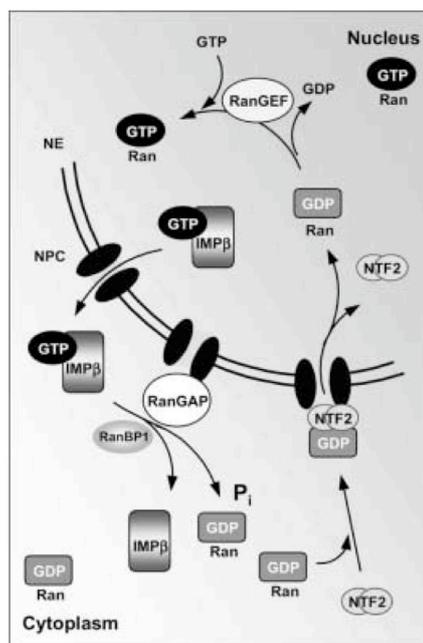


ABB. 1.4: RAN GTPASE ZYKLUS.

RanGTP komplexiert im Nukleus mit Transportrezeptoren der Importin β Familie und gelangt ins Zytoplasma, wo der Komplex durch die Aktivität der beiden Proteine RanBP1 und RanGAP dissoziiert, hervorgerufen durch die Hydrolyse von GTP am Ran. Der Kernimport von RanGDP wird katalysiert von NTF2. Im Nukleus wird RanGDP durch RanGEF zu RanGTP umgewandelt. NE, *nuclear envelope*; NPC, *nuclear pore complex*; RanBP1, *Ran-binding protein 1*; RanGAP, *Ran-specific GTPase activating protein*; Pi, anorganisches Phosphat; RanGEF, *Ran-specific guanine nucleotide exchange factor*. (nach MERKLE 2001)

1.2.3 □ WEITERE EXPORTREZEPTOREN IN PFLANZEN

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) enthält 17 Gene, die für Mitglieder der Importin β Kerntransportrezeptorfamilie kodieren (MERKLE 2001; MERKLE 2003). Die Familie der Importin β Transportrezeptoren umfasst sowohl Importine als auch Exportine. In *A. thaliana* existieren zwei Gene, die für XPO1 kodieren und eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (*XPO1A* und *XPO1B*). Zudem liegt eine hohe Sequenzähnlichkeit der beiden XPO1 Proteine aus *A. thaliana* zu dem Exportrezeptor CRM1/XPO1 aus Vertebraten und Hefen vor. Exportin 2 (CAS) ist der zweite Exportrezeptor, der in *A. thaliana* charakterisiert wurde und verantwortlich für den Kernexport von Importin α ist (HAASEN und MERKLE 2002). Das Ortholog in *A. thaliana* zum Exportrezeptor für tRNAs, Exportin t oder Xpo-t, wurde in einer Studie zur Analyse von Mutanten in verschiedenen Phasen der Entwicklung identifiziert und als *PAUSED* (*PSD*) bezeichnet (HUNTER *et al.* 2003). PSD/XPO-t aus *A. thaliana* weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zum Ortholog in Hefen und Vertebraten auf, interagiert mit der GTPase Ran und kann in Hefen eine Mutation im Gen *Los1*, welches für Xpo-t in Hefen kodiert, komplementieren (BOHNSACK *et al.* 2002; HUNTER *et al.* 2003). Des Weiteren wurde in *A. thaliana* ein Ortholog zu Exportin 5 charakterisiert und als *HASTY* (*HST*) bezeichnet (BOLLMAN *et al.* 2003). In Experimenten mit humanem Exportin 5 stellte sich heraus, dass es ein Exportrezeptor für doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA) ist. Dies konnte auch für HST gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine Interaktion mit Ran nachgewiesen sowie der Export von microRNA (miRNA) ins Zytoplasma mittels HST wurde gezeigt (BOLLMAN *et al.* 2003). Das Gen *At3g04490* in *A. thaliana* weist eine hohe Ähnlichkeit zum humanen Exportin 4 auf, welches als Exportrezeptor für den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF5A fungiert (LIPOWSKY *et al.* 2000).

TAB. 1.2: EXPORTINE IN SÄUGERN.

Zusammenfassung der in Säugern bekannten Exportine und deren Cargosubstrate sowie die Angabe der in *A. thaliana* bekannten Exportine mit gleichen Funktionen. (nach KUTAY und GUTTINGER 2005)

Exportine in Säugern	Cargosubstrat	Exportine in <i>A. thaliana</i>
CRM1/XPO1	Proteine mit einer NES Snurportin 1	XPO1A/XPO1B
CAS	Importin α	CAS
Exp-t/Xpo-t	tRNAs	PAUSED
Exp4	eIF5A	
Exp5	Prä-miRNA, tRNAs, minihelix RNAs, eEF1A, JAZ	HASTY
Exp6	Profilin-Actin	
Exp7	p50RhoGAP, 14-3-3 sigma	
Imp13	eIF1A	

1.3 REGULATION DER TRANSKRIPTION DURCH NUKLEOZYTOPLASMATISCHE PARTITIONIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Im Genom von *A. thaliana* kodieren etwa 5 % der Gene für Transkriptionsfaktoren. Die größte Gruppe hierbei bilden die MYB Transkriptionsfaktoren (ROMERO *et al.* 1998; STRACKE *et al.* 2001). Das erste *MYB* Gen, das Onkogen *v-Myb*, wurde im Myeloblastosis Virus beschrieben (KLEMPNAUER *et al.* 1982). In vielen Vertebraten existieren drei *v-Myb* verwandte Gene - *c-Myb*, *A-Myb* und *B-Myb* (WESTON 1998). Die Proteine, für die die genannten MYB Gene kodieren, sind involviert in die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung (JIN und MARTIN 1999; WESTON 1998). MYB Transkriptionsfaktoren in Tieren besitzen eine konservierte MYB DNA-Bindedomäne, die aus bis zu drei nicht perfekten *repeats* besteht, welche als R1, R2 und R3 bezeichnet werden. Während die MYB DNA-Bindedomäne innerhalb der verschiedenen MYB-Proteine hoch konserviert ist, unterscheiden sich die Proteine ansonsten sehr deutlich in ihrer Struktur, Funktion und Gewebelokalisierung (ROSINSKI und ATCHLEY 1998). Die Einteilung der *MYB* Gene in Pflanzen erfolgt auf Grund der Anzahl der MYB *repeats* (JIN und MARTIN 1999; ROSINSKI und ATCHLEY 1998). Es wird unterschieden zwischen MYB1R Faktoren mit nur einem *repeat*, R2R3 MYB Faktoren mit zwei MYB *repeats* und schließlich den MYB3R Transkriptionsfaktoren, also solchen mit drei *repeats*. Am häufigsten treten in Pflanzen die R2R3 MYB Proteine auf. Die strukturelle Analyse von c-MYB ergab, dass ein einzelnes Motiv

eine *helix-turn-helix* Struktur bildet, bestehend aus etwa 53 AS-Resten. In regelmäßigen Abständen voneinander befinden sich in jedem Motiv drei Tryptophanreste, die eine wichtige Rolle in der Faltung übernehmen und in allen MYB Proteinen konserviert sind. Darüber hinaus sind die Tryptophanreste an der Ausbildung eines MYB-DNA-Komplexes beteiligt (MARTIN und PAZ-ARES 1997). Im R3 Motiv in pflanzlichen MYB-Transkriptionsfaktoren ist der erste Tryptophanrest häufig durch eine andere aromatische oder hydrophobe Aminosäure ersetzt. Einige MYB Proteine, darunter auch solche aus Pflanzen, besitzen eine Aktivierungsdomäne und sind vermutlich in die transkriptionale Aktivierung involviert (PAZ-ARES *et al.* 1987). Die MYB Transkriptionsfaktoren binden spezifisch die MYB-Erkennungssequenzen TAACTG in Promotoren von Zielgenen, wodurch diese exprimiert oder reprimiert werden. Eine Bindung von AtMYB2 an die Erkennungssequenz im *Bz-1* Mais Promotor wurde nachgewiesen (URAO *et al.* 1993). PhMYB3 aus *Petunia hybrida* bindet an zwei verschiedene Erkennungssequenzen: MBSI (TAAC[C/G]GTT) und MBSII (TAACTAAC) (SOLANO *et al.* 1995).

Für einige der 125 R2R3 MYB Proteine in *A. thaliana* sind Daten über die Funktionen verfügbar. Es konnte gezeigt werden, dass R2R3 MYB Faktoren regulatorische Aufgaben im Phenylpropanoid Metabolismus übernehmen. Dazu gehören MYB75/PAP1 (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1*) und MYB90/PAP2 als Regulatoren der Anthocyanbiosynthese (BOREVITZ *et al.* 2000). Die Überexpression von *MYB75* und *MYB90* resultiert in der Akkumulation von Anthocyanen. MYB11, MYB12 und MYB111 sind involviert in die Akkumulation von Flavonolen in *A. thaliana* Keimlingen (STRACKE *et al.* 2007). Andere Funktionen der R2R3 MYB Proteine sind die Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Hormon- und Stressantwort (MARTIN und PAZ-ARES 1997; STRACKE *et al.* 2001). *MYB66/WEREWOLF* ist involviert in die Differenzierung von Epidermiszellen (LEE und SCHIEFELBEIN 1999; TOMINAGA *et al.* 2007).

Die Regulation der Aktivität eines Transkriptionsfaktors und der damit verbundenen Regulation der Transkription kann durch die nukleozytoplasmatische Partitionierung eines Transkriptionsfaktors innerhalb der pflanzlichen Zelle erreicht werden. Die Verteilung eines Transkriptionsfaktors zwischen Nukleus und Zytoplasma findet in Abhängigkeit von der Rate des Kernimports und/oder Kernexports statt (MERKLE 2001). Die nukleozytoplasmatische Partitionierung eines transkriptionaler Regulators dient als molekularer Schalter, der als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale, Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Zelldifferenzierung in Pflanzen nimmt (CARTWRIGHT und HELIN 2000; KOMEILI und O'SHEA 2000).

Das Tumorsuppressor Protein p53 hat eine einzigartige Methode entwickelt seine Lokalisierung zu regulieren. In ungestressten Zellen wandert p53 kontinuierlich zwischen

Nukleus und Zytoplasma. Unter Stressbedingungen ist es hauptsächlich im Nukleus lokalisiert und induziert die Transkription von Genen zur Stressantwort. Es konnte gezeigt werden, dass p53 ein Homotetramer ausbildet und als dieser auch die Transkription von Stressgenen effizienter aktivieren kann. Die für p53 charakterisierte NES befindet sich in der Innenseite des Tetramers (STOMMEL *et al.* 1999). Die Tetramerisierung von p53 reguliert die Aktivität des Proteins in zweierlei Hinsicht: zum einen beeinflusst der Tetramer die Transkriptionsaktivierung und zum anderen verhindert er den Kernexport von p53, da die NES maskiert ist und somit sicher gestellt wird, dass p53 im Nukleus verbleibt. Für den Transkriptionsfaktor NF-AT wurde ebenfalls eine derartige Maskierung der NES festgestellt (ZHU und MCKEON 2000). Die Lokalisierung von NF-AT wird reguliert in Abhängigkeit vom intrazellulären Calciumspiegel. Ist dieser gering, liegt NF-AT phosphoryliert vor und ist im Zytoplasma lokalisiert. Steigt der Calciumspiegel, wird NF-AT durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert, dadurch aktiviert und wandert als Folge in den Nukleus. Inwiefern die Lokalisierung Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung nimmt ist noch unklar.

Ein drittes Beispiel eines Transkriptionsfaktors, dessen Funktion durch nukleozytoplasmatische Partitionierung kontrolliert wird ist Pho4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Pho4 ist involviert in den Phosphatmetabolismus der Hefen (OSHIMA 1997). Unter Phosphatmangelbedingungen liegt Pho4 unphosphoryliert vor und ist im Nukleus lokalisiert, wo es Gene für den Phosphatmetabolismus exprimiert. In einer Phosphatreichen Umgebung liegt Pho4 phosphoryliert im Zytoplasma vor (KAFFMAN *et al.* 1994; O'NEILL *et al.* 1996). Pho4 wird durch Pse1 in den Nukleus importiert und Msn5 übernimmt den Export zurück ins Zytoplasma (KAFFMAN *et al.* 1998a; KAFFMAN *et al.* 1998b). Pse1 weist eine Bindeaffinität zu unphosphoryliertem Pho4 auf, wohingegen Msn5 ausschließlich mit der phosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors assoziiert (KAFFMAN *et al.* 1998a). So wird sichergestellt, dass phosphoryliertes Pho4 exportiert wird und im Zytoplasma nicht durch Pse1 gebunden werden kann und daraufhin wieder in den Nukleus importiert werden würde.

Die Aktivität eines Transkriptionsfaktors wird nicht ausschließlich durch Kernimport und Kernexport kontrolliert, stattdessen erfolgt die Regulation auf mehreren Ebenen. Dies ermöglicht eine präzisere und effizientere Expression von Genen als Antwort auf intra- oder interzelluläre Signale.

1.4 KERNEXPORT VON RNA DURCH RNA-BINDEnde PROTEINE

Da alle zytoplasmatischen RNAs aus dem Nukleus exportiert werden müssen, ist dieser Prozess eine wichtige zelluläre Funktion. Die meisten verfügbaren Daten zum RNA Export stammen aus Studien an *Xenopus laevis* Oozyten. Es konnte gezeigt werden, dass der Export von tRNAs, mRNAs und ribosomalen Untereinheiten Energie-abhängig und Rezeptor vermittelt ist (BATAILLE *et al.* 1990; MOY und SILVER 2002). In Hefen werden die verschiedenen Klassen der RNAs (tRNAs, rRNAs, UsnRNAs und mRNAs) als Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) aus dem Nukleus exportiert (JARMOLOWSKI *et al.* 1994; ZEMP und KUTAY 2007). Der Export ist auch in Hefen Rezeptor- und Signal- vermittelt, wobei die Signale in der RNA und/oder den RNA-bindenden Proteinen vorhanden sind und auch RanGTP ist involviert in den Transportprozess in Hefen (GADAL *et al.* 2001; HO und JOHNSON 1999; IZAURRALDE *et al.* 1997; JOHNSON *et al.* 2002; WATANABE *et al.* 1999). Der Kernexport von mRNA in Hefezellen erfordert die Anwesenheit von zahlreichen Faktoren, dazu gehören RNA-bindende Proteine, NPC oder NPC assoziierte Proteine. Als verantwortlicher Transportrezeptor für den mRNA Export in Hefen wurde Mex67p charakterisiert, das humane Homolog wird als TAP bezeichnet (GRUTER *et al.* 1998; KATAHIRA *et al.* 1999; SEGREF *et al.* 1997). Beide Faktoren wandern zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her, wobei sie zum einen den Poly(A)⁺ Bereich der mRNA binden und andererseits mit den FG Motiven der Nukleopore interagieren. Mex67p bildet ein Heterodimer zusammen mit Mtr2, welcher dann den Export von mRNA übernimmt. Mtr2 ist ein kleines NPC-assoziiertes Protein (SANTOS-ROSA *et al.* 1998). Ein solcher heterodimerer Komplex konnte auch für den mRNA Export in humanen Zellen gefunden werden. In diesem Fall komplexiert TAP mit p15, welches verwandt ist mit NTF2, dem Kernimportrezeptor von RanGDP (KATAHIRA *et al.* 1999). p15 und Mtr2 weisen keine Ähnlichkeiten in ihren Sequenzen auf. Eine Mutation von *mex67p* und *mtr2* kann durch die Koexpression von TAP und p15 komplementiert werden, was ein Hinweis darauf ist, dass die Funktion der Heterodimere ähnlich ist (KATAHIRA *et al.* 1999). In Untersuchungen an Hefe- und Säugerzellen konnte eine Akkumulation der mRNA im Nukleus nachgewiesen, wenn diese mit Leptomycin B, einem spezifischen Inhibitor von CRM1/XPO1, behandelt wurden. Darüber hinaus konnten zwei funktionale NES in Mex67p und eine Gle1p in Hefen beschrieben werden (MURPHY und WENTE 1996; SEGREF *et al.* 1997; YOON *et al.* 2000). Gle1p ist integriert in die filamentösen Strukturen der NPCs, die ins Zytoplasma hinein ragen. TAP besitzt ebenfalls zwei NES, deren Sequenz homolog ist zu Mex67p und deren Funktion konserviert ist (THAKURTA *et al.* 2004). Inwiefern jedoch XPO1 am Export von mRNA aus dem Nukleus beteiligt ist, ist noch weitgehend unklar. Es ist aber anzunehmen, dass der Exportrezeptor über Adapterproteine mit der mRNA interagieren kann, und somit deren Kernexport vermittelt.

In Hefen existieren verschiedene Mechanismen, die den Export von mRNA regulieren. Die Effizienz, mit der der Export erfolgt, ist verbunden mit der Phospholipase C-abhängigen Inositolphosphatkinase Signaltransduktion (YORK *et al.* 1999). Des Weiteren scheint die Methylierung von Arginin in den hnRNP Proteinen einen Einfluss auf den mRNA Export zu nehmen. Auch unter Stressbedingungen findet die gezielte Regulation des mRNA Exports statt. Die Hitzestress-induzierte Expression von Genen und die daraus resultierenden Transkripte werden effizienter exportiert als solche, die nicht essentiell sind für die Hitzestressantwort (KREBBER *et al.* 1999; SAAVEDRA *et al.* 1997; VAINBERG *et al.* 2000). Der Export von mRNA in Pflanzen ist noch weitgehend ungeklärt. Ein Homolog zu TAP/Mex67p existiert nicht in *A. thaliana*, womit der Export von mRNA in Pflanzen vermutlich durch einen anderen Mechanismus erfolgt.

Die Reifung und Assemblierung von Ribosomen findet hauptsächlich im Nukleolus und im Nukleus statt. In Vertebraten bestehen reife 40S und 60S Untereinheiten aus 18S, 28S, 5.8S und 5 rRNA sowie etwa 80 weiteren Proteinen. Der Export der 60S ribosomalen Untereinheiten in Hefen wird vermittelt durch XPO1, wobei NMD3 als Adapterprotein zwischen dem Exportrezeptor und der Untereinheit fungiert (HO und JOHNSON 1999; HO *et al.* 2000; JOHNSON *et al.* 2002; TROTTA *et al.* 2003). NMD3 ist ein konserviertes Protein, das in Eukaryoten und auch in Archea auftritt. Es ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, kann aber zwischen Nukleus und Zytoplasma wandern. Es gibt zahlreiche Experimente, die belegen, dass XPO1 und NMD3 in den Kernexport der 60S ribosomalen Untereinheit involviert sind. Zum einen besitzt NMD3 eine NES und durch die Verwendung von Leptomycin B akkumulierte die 60S ribosomale Untereinheit im Nukleus der Hefen (HO *et al.* 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Export der 60S und auch der 40S ribosomalen Untereinheit von RanGTP abhängig ist (JOHNSON *et al.* 2002; MOY und SILVER 2002). In anderen Studien wurde der Export der 60S Untereinheit in Hefezellen durch Fusion an GFP sichtbar gemacht (HURT *et al.* 1999). Hierbei wurde das ribosomale Protein L25, das mit der 60S Untereinheit assembliert, mit GFP fusioniert. Es stellte sich heraus, dass zahlreiche Nukleoporine in den Exportprozess involviert sind. Aber auch das Heterodimer Mex67p/Mrt2, welches als mRNA-Exportrezeptor bekannt ist, scheint am Export der 60S ribosomalen Untereinheit beteiligt zu sein. Ein Adapterprotein, das eine potentielle Verbindung zwischen der 40S Untereinheit und XPO1 herstellt, ist noch nicht bekannt, ebenso unklar ist, ob weitere Exportrezeptoren in den Export der kleinen ribosomalen Untereinheit involviert sind (GADAL *et al.* 2001; HO *et al.* 2000; MOY und SILVER 2002).

Es gibt Hinweise darauf, dass XPO1 als Rezeptor und andere Proteine in den Kernexport reifer Untereinheiten in Pflanzen involviert sind. In *A. thaliana* existiert ein Gen, das für

NMD3 kodiert. Eine Interaktion von *NMD3* mit *XPO1A* aus *A. thaliana* (T. Merkle, persönliche Kommunikation) konnte mittels Hefe-2 Hybrid System nachgewiesen werden.

Die Bindung von RNA Transkripten durch RNA-bindenden Proteine (RBPs) erfolgt bereits während der Transkription. Entweder binden sie schon in frühen Stadien an die RNA bis sie abgebaut wird oder während spezifischer Prozesse wie *Splicing*, Prozessierung, Transport und Lokalisierung (DREYFUSS *et al.* 2002). Einige RBPs agieren auch als Chaperone, indem sie einzelsträngige RNA in der Bildung sekundärer und tertiärer Strukturen unterstützen (LORSCH 2002). Die Interaktion zwischen den RBPs und der RNA wird durch spezifische Domänen vermittelt, dem *RNA recognition motif* (RRM) und dem *double-stranded RNA-binding motif* (dsRBM). Im Folgenden näher beschrieben wird jedoch nur das RRM. Das häufig auftretende RRM ist eine kleine Proteindomäne, bestehend aus 75 bis 85 AS-Resten, die eine typische $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ Topologie bilden, d.h. ein viersträngiges β -Blätterfaltblatt mit zwei α -Helices (MATTAJ 1993). Proteine, die eine RRM besitzen, binden prä-mRNA, mRNA, prä-ribosomale RNA (rRNA) und kleine nukleäre RNA (snRNA) und sind in Prozesse wie RNA Export und Stabilisierung von RNA involviert (DREYFUSS *et al.* 2002). Bisher gibt es zehn Modelle von RRM, die in Komplexen mit RNA vorliegen. Alle Modelle weisen einige gemeinsame Merkmale auf (tabellarisch zusammengefasst in STEFL *et al.* 2005). Hauptsächlich verantwortlich für die Interaktion mit der RNA ist das viersträngige β -Faltblatt, welches für gewöhnlich mit zwei oder drei Nukleotiden interagiert (HANDA *et al.* 1999). Weitere Elemente in der Struktur einer RRM, die die Bindung zur RNA herstellen, sind Schleifenstrukturen zwischen den β -Faltblättern und den α -Helices sowie N- und der C-terminale Extensionen der RRM. Variable Regionen innerhalb der RRM, die sich hauptsächlich in der Schleife und den terminalen Abschnitten befinden, sind für die Spezifität der RRM verantwortlich (STEFL *et al.* 2005). Deletionsstudien führten zu der Annahme, dass das β -Faltblatt für die allgemeine Bindung der Oberfläche der RNA zuständig ist (BURD und DREYFUSS 1994). Im nachfolgenden Abschnitt 1.3.1 werden im Besonderen zwei RBP Proteinfamilien vorgestellt, die RRM besitzen und zusätzlich als XPO1-interagierende Proteine isoliert wurden.

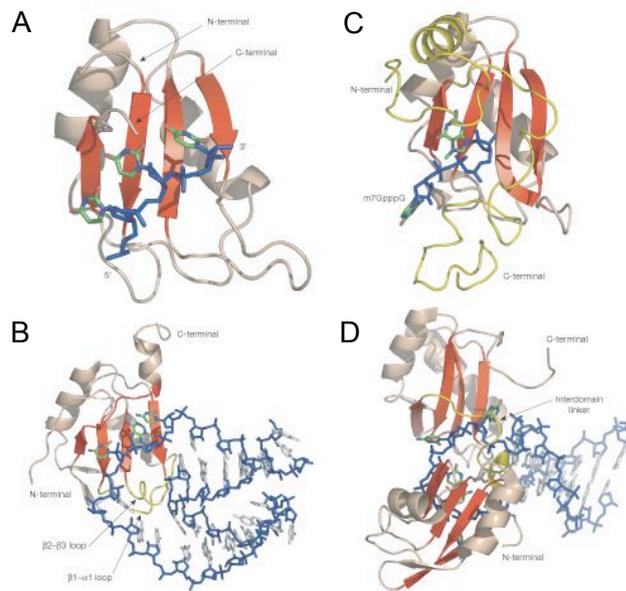


ABB. 1.6: ERKENNUNG VON RNA DURCH RRM.

(A) Das viersträngige β -Faltblatt (rot) der RRM1 erkennt drei Nukleotide. (B) RRM1 von U1A bindet die interne Schleife einer RNA. β -Faltblatt (rot) bindet drei Nukleotide. (C) RRM von CBP20 komplexiert mit m^7GpppG (7-methyl-G(5')ppp(5')). N- und C-terminale Extensionen (gelb) stellen ebenfalls einen Kontakt zwischen Protein und RNA her. (D) RRM 1 und 2 von Nucleolin binden RNA *stem-loop*. β -Faltblätter (rot) der RRM2 erkennen zwei Nukleotide. *Interdomain linker* (gelb) erkennt eine Haarnadelstruktur. (nach STEFL *et al.* 2005)

1.5 XPO1-INTERAGIERENDE PROTEINE (XIPs) IN *A. THALIANA*

Die nukleozytoplasmatische Partitionierung von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen übernimmt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Genexpression. In Hefen und Säugern gibt es zahlreiche Berichte über die Partitionierung von Proteinen, in die XPO1 involviert ist. Für *A. thaliana* sind bisher nur wenige Informationen verfügbar über potentielle Cargoproteine von XPO1-vermitteltem Kernexport. Ein *yeast-2 hybrid screen* sollte näheren Aufschluss darüber geben, welche Proteine und Proteinklassen durch XPO1 in Pflanzen exportiert werden (in Vorbereitung HAASEN *et al.* 2008). Die in dem *screen* isolierten Proteine wurden auf Grund konservierter Domänen und putativen Funktionen in die folgenden sechs Gruppen unterteilt: (1) Nukleoporine, (2) Proteine, die Aufgaben im Kernexportprozess übernehmen, (3) Proteine, die in den Kernexport von ribosomalen Untereinheiten involviert sind, (4) RNA-bindende Proteinen, (5) Transkriptionsfaktoren und (6) weitere regulatorische Proteine. Stellvertretend werden im Folgenden die Familie der GAMYB Transkriptionsfaktoren und RNA-bindende Proteine vorgestellt.

1.5.1 □ GAMYB TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

In Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde ein *MYB* Gen identifiziert, das in die Signaltransduktion von Gibberellin (GA) im Aleuron involviert ist und als *HvGAMYB* bezeichnet wird (GUBLER *et al.* 1995). Die Expression von *HvGAMYB* wird durch GA herauf reguliert und es bindet das TAACAAA Motiv in der Promotorregion des Gens, das für die α -Amylase kodiert. Das Motiv spielt eine wichtige Rolle in der durch GA regulierten Expression des α -Amylase Gens (GUBLER und JACOBSEN 1992; SKRIVER *et al.* 1991). *HvGAMYB* wird als positiver Regulator der Gibberellin induzierten Signaltransduktion im Aleuron betrachtet, aber auch außerhalb dieses Gewebes konnten Funktionen von *HvGAMYB* gezeigt werden. In den Antheren von Gerste wurde eine deutliche Expression von *HvGAMYB* nachgewiesen und transgene *HvGAMYB* überexprimierende Pflanzen entwickelten keine Pollen, was in einer Sterilität resultierte (MURRAY *et al.* 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden für das *GAMYB* Ortholog in Reis (*Oryza sativa*) beschrieben. *OsGAMYB* übernimmt wichtige Funktionen in der Entwicklung von Pollen und in *knockout* Mutanten ist die Entwicklung der Blüten beeinflusst. Der Defekt in *GAMYB* wirkt sich auf die Entwicklung diverser Blütenorganellen aus, dazu gehören u.a. Fruchtknoten, Schoten und besonders die Fruchtblätter (KANEKO *et al.* 2004). Auf Grund von Sequenzdaten wurden drei *GAMYB* Gene in *A. thaliana* identifiziert, *AtMYB33*, *AtMYB65* und *AtMYB101* (GOCAL *et al.* 1999; GUBLER *et al.* 1995; GUBLER *et al.* 1997). Funktionale Analysen der *GAMYBs* aus *A. thaliana* zeigten, dass alle drei an den Promotor des α -Amylase Gens binden und die Expression des Gens in Aleuronzellen induzieren konnten. Zusätzlich konnte die Bindung von *MYB33* an das GARE Motiv in *LEAFY (LFY)* Promotor nachgewiesen werden (GOCAL *et al.* 2001). *LFY* ist ein potentieller Faktor, der das Blühen in Dikotyledonen induziert, aber auch in monokotylem Reis beeinflusst er den Blühzeitpunkt (HE *et al.* 2000; WEIGEL und NILSSON 1995). Das Expressionsmuster von *MYB33* und *MYB65* ähnelt sich sehr stark, wohingegen die Expression von *MYB101* sich deutlich von der der anderen beiden *GAMYBs* unterscheidet. Während *MYB33* und *MYB65* in fast allen Geweben in ähnlichen Mengen exprimiert werden, wird *MYB101* nur in den Stamina und besonders in reifen Pollen exprimiert (Abb. 1.5).

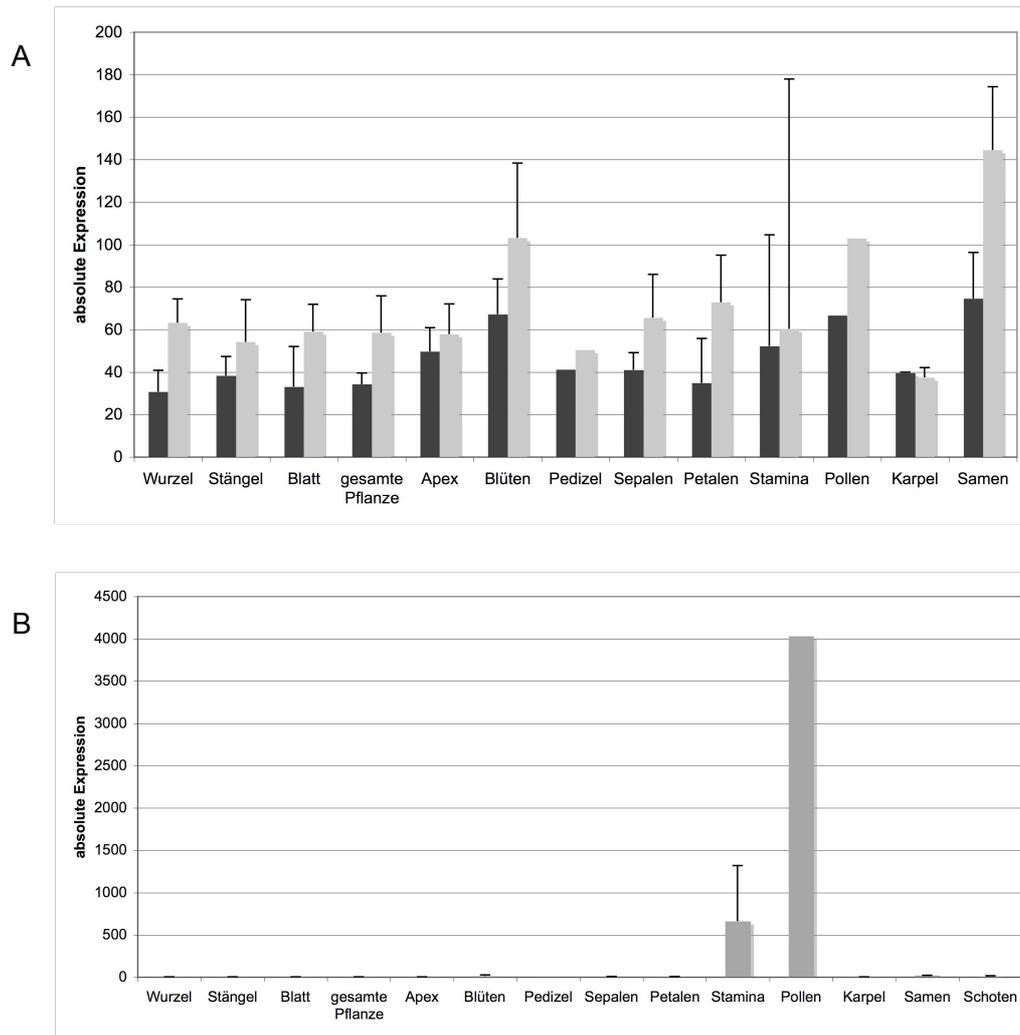


ABB. 1.5: EXPRESSION VON MYB33, MYB65 UND MYB101 IN A. THALIANA.

(A) Absolute Expression von MYB33 (dunkelgrau) und MYB65 (hellgrau) in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*. (B) Absolute Expression von MYB101 in den diversen Geweben von *A. thaliana*. (SCHMID *et al.* 2005)

1.5.2 □ POLY(A)-BINDEnde PROTEINE (PABP) UND CID-RNA-BINDEnde PROTEINE (CID-RBPs)

PABPs sind innerhalb der Eukaryoten hoch konservierte Proteine und essentiell für die Vitalität von *Saccharomyces cerevisiae* (SACHS *et al.* 1987), *Aspergillus nidulans* (MARHOUL und ADAMS 1996), *Caenorhabditis elegans* (CRITTENDEN *et al.* 2002) und *Drosophila melanogaster* (SIGRIST *et al.* 2000). Sie übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation der Translation und sie tragen zu Stabilisierung der mRNA bei. Weshalb PABPs von solch essentieller Bedeutung für das Überleben von diversen Organismen ist, bleibt abschließend zu klären. Die Charakterisierung einiger Mitglieder der PABP Familie in *A. thaliana* ergab, dass sie in verschiedenen Organen und Geweben in unterschiedlichem Maße exprimiert werden. PABPs in *A. thaliana* besitzen typischerweise vier RRM, die sich im N-terminalen Abschnitt der Proteine befinden und über die die Bindung zum Poly(A)-Bereich der mRNA vermittelt wird. Durch die Interaktion der PABPs mit der mRNA wird deren Deadenylierung verhindert. Die einzelnen RRM innerhalb eines Proteins unterscheiden sich sehr stark in ihrer Sequenz, wohingegen sie zu vergleichbaren RRM in anderen PABPs eine deutlich höhere Ähnlichkeit aufweisen. RRM übernehmen im Protein anscheinend unterschiedliche Funktionen.

In *Saccharomyces cerevisiae* (SACHS *et al.* 1987), *Schizosaccharomyces pombe* (THAKURTA *et al.* 2002) und *Drosophila melanogaster* (SIGRIST *et al.* 2000) gibt es nur ein einzelnes Gen, das für ein PABP kodiert. In *Caenorhabditis elegans* gibt es zwei Gene und im Menschen drei Gene, die für PABPs kodieren (MANGUS *et al.* 2003). In *A. thaliana* bilden insgesamt acht Gene die Familie der PABPs (BELOSTOTSKY 2003). Pab1p aus *Saccharomyces cerevisiae* ist sowohl im Nukleus als auch Zytoplasma lokalisiert und ist essentiell (SACHS *et al.* 1987). Das Pab1p Homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, spPABP, ist nicht essentiell notwendig für das Überleben der Zelle. Lokalisiert ist es im Zytoplasma, aber es kann in den Nukleus wandern und eine Rolle von spPABP im mRNA Export wird vermutet (THAKURTA *et al.* 2002). Das humane PAB1 ist involviert in Translation und RNA turnover. PAB2 ist beteiligt an der Polyadenylierung und humanes PAB3 ist Testis-spezifisch. Die in *A. thaliana* vorhandenen acht PABPs können auf Grund ihrer phylogenetischen Abstammung und ihrer Expression in vier Klassen unterteilt werden. Klasse I enthält PAB3 und PAB5, welche besonders in reproduktiven Geweben exprimiert werden. PAB5 wird hauptsächlich in Pollen und während der frühen embryonalen Entwicklung produziert. PAB3 und PAB5 dienen vermutlich als regulatorische Faktoren während der Gametogenese und der frühen Entwicklung (BELOSTOTSKY und MEAGHER 1996). Klasse II besteht aus PAB2, PAB4 und PAB8, welche sich durch eine hohe und ubiquitäre Expression auszeichnen (BELOSTOTSKY 2003; HILSON *et al.* 1993; PALANIVELU *et*

al. 2000b). Klasse III umfasst die PAB6 und PAB7, die nur schwach und eingeschränkt exprimiert werden. Klasse IV besteht nur aus PAB1, welches nur schwach in Wurzel exprimiert wird (BELOSTOTSKY 2003). PAB2, PAB3 und PAB5 aus *A. thaliana*, aber auch solche aus Weizen, können eine *pab1* Mutation in Hefen komplementieren (BELOSTOTSKY und MEAGHER 1996; CHEKANOVA *et al.* 2001; PALANIVELU *et al.* 2000a).

Die PABC Domäne in PABPs vermittelt Protein-Protein Interaktionen und ist hoch konserviert (KOZLOV *et al.* 2001). Es wurde gezeigt, dass die PABC Domäne mit zahlreichen Proteinen interagieren kann und Faktoren für den mRNA-RNP bindet. In Säugern existieren zwei PABP interagierende Proteine 1 und 2 (Paip1 und Paip2), die in ihrer Sequenz die PAM2 Domäne (*PABP-interacting motif 2*) besitzen, über welche die Interaktion mit den PABPs hergestellt wird (KHALEGHPOUR *et al.* 2001; ROY *et al.* 2002). Um weitere Informationen über die PABPs in *A. thaliana* zu erhalten, wurde ein *yeast 2-hybrid screen* mit der PABC Domäne von PAB2 durchgeführt (BRAVO *et al.* 2005). Als Interaktionspartner wurden zwei Proteine identifiziert, CID1 (At2g41430) und CID7 (At2g26280) (*CTC-interacting domain*). CID1 wird auch als ERD15 (*early response to dehydration*) bezeichnet, dessen Expression durch abiotischen Stress, wie Trockenheit und Lichtstress, induziert wird (DUNAEVA und ADAMSKA 2001). Beide Proteine, CID1 und CID7, besitzen eine PAM2 Domäne, wie sie schon für Paip1 und Paip2 beschrieben wurde. In *A. thaliana* existieren elf weitere CIDs, die für putative PABP-interagierende Proteine kodieren (BRAVO *et al.* 2005). CID8 bis CID13 kodieren für RNA-bindende Proteine (RBPs) und besitzen zwei RRM's sowie eine *bipartite* NLS. T-DNA Insertionslinien für die Mitglieder dieser Gruppe, außer für CID11, wurden analysiert, wobei keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp Col-0 beobachtet werden konnten (BRAVO *et al.* 2005).

1.6 ZIEL DIESER ARBEIT

XPO1 ist ein konservierter Exportrezeptor, der spezifisch das Kernexportsignal NES in verschiedenen Proteinklassen bindet. In Kooperation mit RanGTP vermittelt XPO1 den Export von Cargoproteinen aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Zu den potentiellen Cargosubstraten von XPO1 zählen nicht nur solche, die auf Grund ihrer molekularen Masse nur sehr langsam durch die Kernmembran diffundieren würden, auch deutlich kleinere Proteine werden mittels XPO1 aktiv exportiert. Der Export von Proteinen, die auch durch passive Diffusion die Membran schnell überwinden könnten, dient der Regulation der Funktion dieser Cargoproteine.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zum Kernexport und -import von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen. Dies umfasste unter anderem

die Analyse des Kernexportrezeptors Exportin1 (XPO1) in *A. thaliana*. XPO1 ist ein Ortholog zum in Hefen und humanen Zellen bekannten CRM1 und wurde in vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe aus *A. thaliana* isoliert und charakterisiert (HAASEN *et al.* 1999). Neben einer großen Anzahl an Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen, wurden auch Nukleoporine in einem *yeast 2-hybrid* (Y2H) *screen* identifiziert, der zur Isolierung von potentiellen Interaktionspartnern von XPO1 diene. Der *screen* wurde mit einer cDNA-Bibliothek durchgeführt, die aus *A. thaliana* inklusive Infloreszenzen hergestellt wurde. Im Besonderen wurden im Rahmen dieser Arbeit Transkriptionsfaktoren und RNA-bindende Proteine untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Kernexport- und Kernimportsignale in den verschiedenen Proteinen. Für die Signale NLS und NES sind bereits konservierte, klassische Proteinsequenzen bekannt, nach deren Vorbild die zu untersuchenden, pflanzlichen Proteine analysiert wurden. Mittels Deletions- und Mutationsanalysen sollten die putativen Signale in der Proteinsequenz identifiziert werden. Zu den zu untersuchenden Proteinen gehören die Transkriptionsfaktoren MYB101, HSF3 und das Zinkfingerprotein AtCTH. MYB101 wird auf Grund seiner Proteinsequenz zur Familie der GAMYB Transkriptionsfaktoren zugeordnet, die durch Gibberillin ausgelöst die Expression von Genen induzieren. Ein Zielgen für MYB101 ist noch unbekannt, daher sollte die Bindung an das GARE Motiv (*gibberillic acid response element*) im *LEAFY* Promotor nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte mittels Kreuzungsexperimenten von T-DNA Insertionslinien die Funktion von MYB101 analysiert werden. Die Überexpression von export-negativem *MYB101*, d.h. MYB101 besitzt keine funktionale NES, in *A. thaliana* sollte ebenfalls Informationen zur Funktion liefern.

Die NES in den RNA-bindenden Proteinen CID11 und PAB2 sollte ebenfalls charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch das Potential der beiden Proteine zur Bildung eines Heterodimers untersucht werden.

Im Genom von *A. thaliana* existieren zwei Gene, die für *XPO1* kodieren und als *XPO1A* und *XPO1B* bezeichnet werden. Die Analyse von T-DNA Insertionslinien im Bereich der Gene für *XPO1A* und *XPO1B* sollten Hinweise darauf liefern, ob Unterschiede in der Funktion der beiden Exportrezeptoren bestehen. Kreuzungsexperimente der T-DNA Insertionslinien sollten ebenfalls zur Analyse der Funktion von *XPO1A* und *XPO1B* dienen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Für alle verwendeten Chemikalien wurde der höchste Reinheitsgrad gewählt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien sowie Verbrauchsmaterialien von den Firmen Amersham Bioscience (Freiburg), Biorad (München), Biozym (Hameln), Difco (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Steinheim), GE Healthcare (München), Genomed (Löhne), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Starlab (Ahrensburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) verwendet. Alle Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert.

2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 □ NÄHRMEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON BAKTERIEN

LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium:	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefeextrakt 5 g NaCl mit H ₂ O _{deion} auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert
LB-Festmedium:	LB-Flüssigmedium mit 1,6 % Bacto Agar versetzt
YEP-Flüssigmedium:	10 g Bacto Pepton 10 g Bacto Hefeextrakt 5 g NaCl mit H ₂ O _{deion} auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert

Für die Selektionsmedien wurden die benötigten Antibiotika (Duchefa Biochemie, Niederlande) in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

TAB. 2.1: ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg / ml Medium
Tetrazyklin	10 µg / ml Medium
Chloramphenicol	25 µg / ml Medium
Kanamycin	50 µg / ml Medium
Gentamycin	40 µg / ml Medium
Rifampicin	100 µg / ml Medium

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren der Medien.

IPTG/X-Gal-Mix (pro Platte): 30 µl X-Gal
 40 µl IPTG
 30 µl LB-Medium

2.2.2 □ NÄHRMEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON HEFEN

YPD (500 ml): 10 g Bacto Pepton
 5 g Bacto Hefeextrakt
 470 ml H₂O_{deion}
 nach dem Autoklavieren wurden steril hinzugefügt:
 25 ml 40 % (w/v) Glukoselösung

SD U⁻ glc Flüssigmedium: 6,7 g/l *yeast nitrogen base*
 650 mg/l *dropout* HWU⁻
 nach dem Autoklavieren wurden steril hinzugefügt:
 25 ml 40 % Glukoselösung
 2,5 ml 200 x Histidinlösung
 5 ml 100 x Tryptophanlösung

SD U⁻ gal Flüssigmedium: 50 ml 20 % (w/v) Galaktoselösung

SD U⁻ glc Festmedium: SD-U⁻-Medium + 20 g/l Difco Agar (1,8 %)

<i>dropout</i> HWU ⁻ :	L-Isoleucin:	300 mg/L
	L-Valin:	1500 mg/L
	L-Adenin:	200 mg/L
	L-Arginin HCl:	200 mg/L
	L-Leucin:	1000 mg/L
	L-Lysin HCl:	300 mg/L
	L-Methionin:	200 mg/L
	L-Phenylalanin:	500 mg/L
	L-Threonin:	2000 mg/L
	L-Tyrosin:	300 mg/L

Die Komponenten für den Aminosäure *dropout* wurden eingewogen, durch Mörsern homogenisiert und bei RT gelagert. Von den Aminosäuren L-Histidin HCl Monohydrat (20 mg/L) und L-Tryptophan (20 mg/L) wurden 200 x bzw. 100 x konzentrierte Lösungen hergestellt.

2.2.3 ZELLSTÄMME

In Tab. 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgeführt. Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue diente zur Vermehrung von Plasmiden. Zur Identifizierung und Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-2-Hybrid-System diente der Hefe-Stamm EGY48. Die Transformation von *A. thaliana* wurde mittels *A. tumefaciens* GV3103 vorgenommen.

TAB. 2.2: LISTE DER VERWENDETEN STÄMME.

Stamm	Genetische Charakteristika	Herkunft
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsrR17, supE44, relA1, lac, [F ⁺ proAB, lacI ^q ZΔM15Tn10(tet) ^r]	BULLOCK et al. (1987)
EGY48 [p8op-lacZ] <i>S. cerevisiae</i>	MAT α , his3, trp1, ura1, LexA _{op(x6)} -LEU2, Reporterplasmid p8op-lacZ: lacZ unter der Kontrolle des lexA _{op(x8)} , URA3, Amp ^r	Clontech BD Biosciences, Belgien
<i>A. tumefaciens</i> GV3103	pMP90RK, Gm ^R , Rif ^R	Koncz und Schell (1986)

2.3 ANZUCHT VON PFLANZEN

Die Kultivierung von *A. thaliana* erfolgte entweder auf Erde oder unter sterilen Bedingungen auf ½ MS-Festmedium. Zum Stratifizieren wurden die auf Erde ausgebrachten Samen für drei Tage bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Es erfolgte die Aufzucht im Gewächshaus für etwa vier bis acht Wochen unter Kurztagbedingungen (acht Stunden Licht, 16 Stunden dunkel pro Tag) und anschließend unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, acht Stunden dunkel pro Tag). Die für die Anzucht auf ½ MS-Festmedium vorbereiteten Samen (Protokoll zum Sterilisieren der Samen 2.3.1) wurden ebenfalls für drei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, acht Stunden dunkel pro Tag) im Lichtraum aufgezogen, um nach etwa ein bis zwei Wochen analysiert zu werden.

2.3.1 □ OBERFLÄCHENSTERILISIERUNG VON SAMEN UND MEDIUM FÜR DIE ANZUCHT VON PFLANZEN

Für die Anzucht von *A. thaliana* auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Es wurden etwa 50 bis 100 μ l Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in 1 ml Waschlösung aufgenommen. Die Suspension bestehend aus Samen und Waschlösung wurde unter gelegentlichem Mischen für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Waschlösung verworfen und die Samen in 1 ml Ethanol gewaschen. Dieser Schritt erfolgte für fünf Minuten und der Ansatz wurde gelegentlich durch Invertieren gemischt. Das Waschen der Samen wurde mindestens einmal wiederholt. Die Samen wurden abschließend unter sterilen Bedingungen auf einem mit Ethanol getränkten Rundfilter ausgelegt und getrocknet. Die getrockneten Samen wurden unter sterilen Bedingungen auf $\frac{1}{2}$ MS-Festmedium ausgesät, stratifiziert und im Lichtraum (Langtag) angezogen.

Waschlösung:	70 % Ethanol 0,05 % Triton X-100
$\frac{1}{2}$ MS-Festmedium (400 ml):	0,5 x Murashige & Skoog-Medium mit Vitaminen 0,8 x Phytoagar (Merck)

2.3.2 □ KREUZEN VON *A. THALIANA*

Für das Kreuzen von *A. thaliana* wurden Pflanzen gewählt, die neben der Hauptinfloreszenz bereits einige Seiteninfloreszenzen ausgebildet hatten. Die schon geöffneten Blüten wurden entfernt, verbliebene noch geschlossene Blüten wurden mittels einer Pinzette geöffnet und alle Blütenteile bis auf das Gynoeceum wurden entfernt. Von der Pflanze, die als Pollendonator diente, wurde eine bereits geöffnete Blüte gewählt. Durch Zusammendrücken der Blüte mit einer Pinzette am unteren Ende, wurden die Staubblätter hervorgedrückt und der Pollen wurde auf das freigelegte Gynoeceum übertragen. Das präparierte und bestäubte Gynoeceum wurde eingetütet, damit es zu keiner Fremdbestäubung kommen konnte. Pro Pflanze wurden etwa neun Gynoeceen bestäubt. Nachwachsende Infloreszenzen wurden entfernt, sofern eine erneute Präparation und Bestäubung von Gynoeceen nicht notwendig war.

2.3.3 □ ENTFÄRZEN VON *A. THALIANA*

Zum Entfärben von Infloreszenzen mit Schoten und Blüten von *A. thaliana* wurden diese in einer optimalen Länge von der Pflanze getrennt, so dass die Infloreszenz in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 70 %igem Ethanol entfärbt werden konnte. Das Entfärben erfolgte für drei bis fünf Tage unter mäßigem Schütteln. Gegebenenfalls wurde die Ethanol Lösung ein- bis zweimal gewechselt. Aufbewahrt wurden die entfärbten Pflanzenteile in 70 %igem Ethanol versetzt mit 10 % Glycerol.

2.4 ARBEITEN MIT DNA

2.4.1 □ VEKTOREN

TAB. 2.3: LISTE DER VERWENDETEN PLASMIDE.

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Herkunft
pUC19	Amp ^r	Amersham, Biosciences, Freiburg
5'GFP	Amp ^r	mGFP4 (S65T), T. Merkle
3'GFP	Amp ^r	5'GFP (S65T), T. Merkle
pB42AD	Amp ^r	Clontech BD Biosciences, Belgien
pGilda	Amp ^r	Clontech BD Bioscience, Belgien
pGPTV-BAR	Kan ^r	(BECKER <i>et al.</i> 1992)
pUC19	Amp ^r	Amersham Biosciences, Freiburg
pUC-SPYCE	Amp ^r	(WALTER <i>et al.</i> 2004)
pUC-SPYNE	Amp ^r	(WALTER <i>et al.</i> 2004)
5'YFP	Amp ^r	EYFP-cDNA (Clontech) in pUC19-35S, T. Merkle
pKS Bluescript	Amp ^r	Stratagene

2.4.2 □ ISOLIERUNG VON cDNA AUS EINER cDNA-BIBLIOTHEK

Vollängen-cDNA Sequenzen wurden aus einer *A. thaliana* Col-0 *Matchmaker* cDNA-Bibliothek (Clontech) oder der *A. thaliana* Col-0 pB42AD cDNA-Bibliothek (D. Haasen, 2001) mittels PCR mit genspezifischen 5'- und 3'-Oligonukleotiden isoliert. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten entsprechende Restriktionschnittstellen zum anschließenden Subklonieren der isolierten DNA-Fragmente. Zur Herstellung der Bibliotheken wurde eine vollständige *A. thaliana* Pflanze mit Infloreszenzen verwendet. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden jeweils 1 bis 2 µg der jeweiligen cDNA-Bank eingesetzt.

Deletionskonstrukte wurden mittels genspezifischer Oligonukleotide und der Vollängen-cDNA als *template* durchgeführt. Die Sequenz aller hergestellten Klone wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Zum Subklonieren isolierter cDNA wurde in den meisten Fällen pB42AD (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) als Eingangsvektor gewählt. Dieser Vektor erhält in seiner *multiple cloning site* ausschließlich die beiden Restriktionsschnittstellen für EcoRI und XhoI. Somit wurden die meisten cDNA-Fragmente mittels dieser beiden Restriktionsschnittstellen kloniert.

In die isolierte cDNA-Sequenz wurde eine „stumme“ Mutation eingeführt, sofern diese eine interne EcoRI bzw. XhoI-Schnittstelle enthielt. Dazu wurde eine Base in der internen EcoRI bzw. XhoI-Schnittstelle ausgetauscht, ohne dass dabei die Aminosäuresequenz verändert wurde.

2.4.3 □ AUFREINIGUNG UND ELUTION VON DNA AUS EINEM PCR-ANSATZ BZW. AUS EINEM AGAROSEGEL

Amplifizierte DNA wurde aus 50 µl PCR-Ansatz mit Hilfe des *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (GE Healthcare, München) aufgereinigt.

Die in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht lokalisiert und mittels eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte ebenfalls mit dem *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 □ ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA IN EINEM AGAROSEGEL

Die Gelelektrophorese basiert auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert polyanionisch sind und in einem elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu wandern. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in einer Agarose-Gelmatrix.

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit den Abmessungen 10 x 10 x 1 cm in 1 x TAE-Laufpuffer in Anlehnung an (SAMBROOK und RUSSELL 2001). Für die Herstellung eines 1 %igen Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Unter Rühren kühlte das noch flüssige Gel bis auf ca. 50 bis 60 °C ab. Es folgte die Zugabe von 1 µl einer 1 %igen Homidiniumbromidlösung. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine Gelschiene gefüllt und ein Taschenformer

wurde eingesetzt. Das erkaltete und damit erstarrte Gel wurde in einer Laufkammer für Agarosegele mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die mit 5 x Probenpuffer versetzten Proben wurden in die entstandenen Taschen pipettiert. Die DNA-Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von fünf bis 15 Volt/cm. Als Vergleichs- und Kontrollstandard fungierte der *1 kb DNA Ladder* (Invitrogen).

Das Homidiniumbromid in der Gelmatrix interkaliert mit der DNA, so dass durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) die DNA-Fragmente durch orangefarbene Fluoreszenz sichtbar werden. Die Analyse erfolgte mit der Geldokumentationsanlage der Firma Intas.

50 x TAE-Puffer:	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit H ₂ O auf 1000 ml aufgefüllt
5 x Probenpuffer:	20 mM EDTA (pH 8,0) 50% (v/v) Glycerol 0,02% (w/v) Bromphenolblau 0,02% (w/v) Xylencyanol

2.4.5 □ RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA

Die spezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen erkennen. Durch die Spaltung entstehen entweder glatte oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden. Pro µg DNA wurden je 2 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Inkubationslänge und Temperatur der Reaktion wurden unter Beachtung der Herstellerangaben (NEB, Ipswich, MA, USA) gewählt.

Eine sequentielle Restriktion wurde durchgeführt, wenn ein DNA-Fragment mit zwei Enzymen präpariert werden musste, die unterschiedliche Optima hatten. In der Regel wurde der Restriktionsverdau mit dem Enzym begonnen, welches in einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration den Verdau katalysierte. Anschließend wurde das Volumen des Verdauansatzes entsprechend erhöht, um optimale Pufferbedingungen für das zweite Enzym zu schaffen. Durch Zugabe von 5 x Probenpuffer wurden die Verdaureaktionen gestoppt und elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Gegebenenfalls wurde die DNA aus dem Agarosegel herausgeschnitten und wie unter 2.4.3 beschrieben aufgereinigt.

2.4.6 □ DEPHOSPHORYLIERUNGSREAKTION

Zum Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten. Um eine anschließende Religation des gespaltenen Vektors zu verhindern, wurde dieser nach der Verdauung mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Dieses Enzym spaltet die Phosphatgruppen am 5'-Ende von doppelsträngiger DNA ab, wodurch die Bildung von Phosphodiesterbindungen und somit eine Rezirkularisierung des Vektors verhindert wird.

Die Menge an Phosphatase, die für eine Dephosphorylierung benötigt wurde, wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$x \text{ pmol [Vektorenden]} = (\mu\text{g [Vektor]} \times 2 \times 10^6) / (\text{bp [Vektor]} \times 660) = x \mu\text{l SAP}$$

Linearisierte Vektoren wurden direkt nach dem Verdau und einer zehn minütigen Inkubation bei 65 °C zur Denaturierung der Restriktionsenzyme mit der individuell berechneten Menge an *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP; Roche Diagnostics) behandelt. Die Reaktion erfolgte in Phosphatasepuffer (Roche Diagnostics) für 15 Minuten bei 37 °C. Zur Denaturierung der SAP wurde die Reaktion zehn Minuten bei 65 °C inkubiert, anschließend mit Probenpuffer versetzt und vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach einer gelelektrophoretischer Auftrennung wurde der gespaltene, dephosphorylierte Vektor mittels UV-Licht im Gel lokalisiert, herausgeschnitten und anschließend in 30-50 µl H₂O eluiert (s. 2.4.3).

2.4.7 □ HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

Zur effizienten Transformation von Plasmid-DNA mussten die verwendeten *E. coli*-Zellen (*E. coli*-Stamm XL1-Blue, Stratagene) zunächst kompetent gemacht werden. Es wurde eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Am darauffolgenden Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur versetzt. Die Bakteriensuspension wurde unter Schütteln mit 180 rpm bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 (nach etwa 3 Stunden) inkubiert, dann auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße verteilt, für 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 4100 g für sechs Minuten sedimentiert. Nach der Zentrifugation wurden das Bakteriensediment auf Eis mit je 2 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Mit TFB1 wurde das Volumen auf 40 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubation von mindestens fünf Minuten auf Eis, wurde bei 4 °C und 1500 g für sechs Minuten zentrifugiert und daraufhin das Sediment auf Eis in 4 ml TFB2 resuspendiert. Nach einer mindestens 15 minütigen Inkubation auf Eis

wurden die *E.coli*-Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFB1:	30 mM K-Acetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ x2H ₂ O 50 mM MnCl ₂ x4H ₂ O 15% Glycerol pH 5,8 (mit 0,2 N Essigsäure) sterilfiltriert
TFB 2:	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ x2H ₂ O 10 mM RbCl 15% Glycerol pH 6,5 (mit KOH) sterilfiltriert

2.4.8 □ HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

Um die Effizienz einer Transformation mit großen Vektoren (wie beispielsweise pGPTV) zu steigern, wurden diese mittels Elektrotransformation in *E. coli*-Zellen eingebracht. Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurde 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue angeimpft und unter Schütteln bei 180 rpm und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Vor der Ernte wurden die Zellen zunächst 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C für 15 Minuten und 4000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen wie zuvor zentrifugiert, mit 0,5 l eiskaltem H₂O gewaschen und vorsichtig in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 4000 g, 4 °C) wurden die Zellen in einem Endvolumen von 2 ml bis 3 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol aufgenommen, in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.9 □ LIGATION

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Die Präparierung des für die Ligation eingesetzten Vektors erfolgte mit den gleichen Restriktionsendonukleasen, mit denen auch das zu ligierende Fragment geschnitten wurde.

Vor der Ligation wurden die relativen Konzentrationen des Fragments und des Vektors auf einem Agarosegel abgeschätzt und je nach Intensität der Banden vom Vektor 0,5 µl - 3 µl und vom DNA-Fragment 0,5 µl - 7 µl verwendet (4- bis 5-fache der molaren Menge des Fragments gegenüber dem Vektor). Die Ligation fand entweder über Nacht bei 16°C oder eine Stunde bei RT statt. Für die Ligation wurde die T4 DNA-Ligase der Firma NEB (Ipswich, MA, USA) verwendet.

2.4.10 TRANSFORMATION CHEMOKOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN UND SELEKTION AUF AGARPLATTEN

Die Transformation beschreibt das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Wirtszellen, die dazu dienen die eingebrachte DNA zu vervielfältigen.

Es wurden 100 µl kompetente *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,1 bis 0,5 µg isolierter Plasmid-DNA vermischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90 sekündigem Erhitzen auf 42 °C wurden die Zellen erneut für einige Sekunden auf Eis aufbewahrt. Abschließend wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusätze zu den Zellen gegeben und diese dann für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um das Etablieren der Plasmid-DNA in der Wirtszelle sicher zu stellen. Die transformierten Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation zentrifugiert (3 Minuten bei 5000 rpm). Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen und die sedimentierten Zellen wurden im verbleibenden Überstand resuspendiert. Der vollständige Transformationsansatz wurde auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.11 TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN UND SELEKTION AUF AGARPLATTEN

Für die Elektrottransformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl Ligationsansatz und 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben und sofort

in einen Micropulser (Biorad) gestellt. Nach dem Puls wurden die Zellen zügig mit 1 ml LB-Medium versetzt, 45 Minuten bei 37°C geschüttelt, bei 4100 g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde bis auf 150 µl abgenommen. Das Sediment wurde im restlichen Medium resuspendiert und der vollständige Ansatz auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

2.4.12 ANZUCHT VON *E. COLI* IN FLÜSSIGMEDIEN

Ein aliquoter Anteil einer Glycerinkultur oder eine einzelne Kolonie wurden in Kulturröhrchen mit 2 ml LB-Flüssigmedium und entsprechenden Antibiotikazusätzen überimpft und bei 37 °C über Nacht unter aeroben Bedingungen angezogen.

2.4.13 PLASMID-DNA PRÄPARATION AUS *E. COLI* IM MINIMABSTAB

Diese Methode wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen verwendet. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde die Übernachtskultur bei 14000 rpm fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl Lösung I aufgenommen. Zu der Suspension wurden 200 µl Lösung II pipettiert und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Suspension fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden zur Neutralisierung 150 µl Lösung III zugegeben. Nach erneutem Invertieren wurde der Ansatz 15 Minuten bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 100 %igem Ethanol überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 14000 rpm, RT), wonach der Überstand verworfen und die gefällte Plasmid-DNA mit 1000 µl 70 %igem Ethanol gewaschen wurde. Im darauf folgenden Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 21000 g, 4 °C) wurde die Plasmid-DNA sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Sediment unter einem Abzug getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl 1 x TE aufgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Analyse der Plasmid-DNA wurde ein Restriktionverdau mit entsprechenden Enzymen vorgenommen. Für die Verdaureaktion wurden 3 µl eines *high copy* Plasmids und 5 µl eines *low copy* Plasmids eingesetzt. Dem Verdauansatz beigefügt wurde RNase A zum Abbau von RNA in der isolierten Plasmid-DNA.

Lösung I:	25 mM Tris pH 8.0 mit HCl einstellen 10 mM EDTA 50 mM Glukose
Lösung II:	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
Lösung III:	3 M Natriumacetat, pH 4,8 mit Essigsäure
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA

2.4.14 PLASMID-DNA PRÄPATION AUS *E. COLI* IM GROßMAßSTAB

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus einer 50 ml-Übernachtskultur mit dem *Jetstar-Midi-Säulen-Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Genomed, Löhne) isoliert. Die Ausbeute betrug etwa 200 µg - 400 µg DNA pro Präparation.

2.4.15 BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION IN EINER LÖSUNG

Die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung wurde bei $\lambda=260$ nm mit Hilfe eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) in speziellen *UVetten®* (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Aus der Formel:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ ng DNA}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

wurde die Konzentration der DNA-Lösung ermittelt.

2.4.16 OLIGONUCLEOTIDE

Oligonucleotide dienen zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR).

Die Länge von Oligonucleotiden sollte zwischen 17 und 28 Basenpaaren (bp) betragen. Es sollte ein ausgeglichener G/C- zu A/T-Gehalt vorliegen. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55 °C und 80 °C betragen und der Schmelzpunkt eines Oligonucleotidpaares sollte möglichst gleich sein. Eine vollständige Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide befindet sich im Anhang.

2.4.17 FÄLLUNG VON DNA

Die Fällung von DNA mittels Ammoniumacetat (NH_4Ac) diente als zusätzlicher Aufreinigungsschritt von Plasmid-DNA, die mittels alkalischer Lyse aus *E. coli* isoliert wurde. Diese DNA war in der Regel verunreinigt und eignete sich nicht zur Analyse mittels Sequenzierung.

Die Plasmid-DNA wurde nach der alkalischen Lyse (s. 2.4.13) in 30 μl TE aufgenommen. Dieser Ansatz wurde durch Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ auf 100 μl aufgefüllt und nach Zugabe von 100 μl einer 4 M NH_4Ac Lösung gut gemischt. Durch Zugabe von 100 % Ethanol p.a. und anschließender Zentrifugation (15 Minuten, 13000 rpm, 4 °C), wurde die DNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 200 μl 70 % Ethanol p.a. gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (s.o.). Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde das Sediment für zehn Minuten bei 37 °C in der *SpeedVac* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) vakuum getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 50 μl 10 mM Tris pH 8.0 resuspendiert und die Konzentration wurde ermittelt.

2.5 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die PCR dient unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide zur *in vitro*-Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'OH Ende, das dann entsprechend verlängert werden kann. Die Oligonukleotide binden an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt (*annealing*) und können dann von der Polymerase verlängert werden. Durch eine Temperaturerhöhung wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge denaturiert. Daraufhin können neue Oligonukleotide binden und der Prozess wiederholt sich. In der Regel besteht ein PCR-Zyklus aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Zunächst das Denaturieren der DNA in ihre Einzelstränge, als nächstes folgt bei optimaler Temperatur das *annealing* der Oligonukleotide und anschließend die Elongation bei 72 °C durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Ein PCR-Zyklus wird 30 bis 36 x wiederholt.

2.5.1 □ STANDARD-PCR

Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100 μl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand aus maximal 100 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol Primer, 250 μM dNTPs und 1 U Taq- (Takara Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bzw. Pwo- (Roche Diagnostics, Mannheim) DNA-Polymerase in Taq- bzw. Pwo-Puffer eingesetzt. Die

Pwo-Polymerase besitzt *proof-reading* Aktivität und wurde verwendet, wenn ein PCR-Produkt subkloniert werden sollte. Die PCR-Reaktion wurde im PCR *Flexcycler* der Firma Analytik Jena (Jena) bzw. im *Mastercycler* von Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

TAB. 2.4: PCR PROGRAMM FÜR STANDARD-PCR.

Schritt	Takara Taq-Polmerase			Pwo-Polymerase		
	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklen	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklen
Aktivierung	120	94		120	94	
Denaturierung	30	94		15	94	
<i>annealing</i>	30	55-65	30	30	55-65	30
Elongation	60	72		60	72	
Elongation	120	72		120	72	
Kühlen	∞	16		∞	16	

2.5.2 □ OVERLAP EXTENSION PCR

Die Methode der *overlap extension* PCR diente zur ortsspezifischen Mutagenese in einer cDNA und wurde angewandt, um die NES- bzw. NLS-Sequenz in den zu untersuchenden Proteinen zu mutieren. Die in der NES auftretenden hydrophoben Aminosäurereste Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Valin und Methionin wurden dabei durch die neutrale Aminosäure Alanin ersetzt, und die in einer NLS vorhandenen basischen Aminosäuren Lysin und Arginin wurden durch Asparagin ausgetauscht. Der Austausch der Aminosäuren wurde durch Verwendung von 5'-und 3'-Oligonukleotiden erreicht, die an der Position der Lokalisierungssignale hybridisierten, aber für Alanin bzw. Asparagin statt der eigentlichen hydrophoben oder basischen Aminosäuren kodierten. Mittels der *overlap extension* PCR wurde die Sequenz ${}_{117}\text{RMKRRQK}_{123}$ der NLS in MYB101 (At2g32460) zu der Sequenz ${}_{117}\text{RMNNNQK}_{123}$ verändert. Des Weiteren wurde die NES-Sequenz in folgenden Proteinen mutiert: MYB101 (At2g32460), PAB2 (At4g34110), CID11 (At1g32790), HSF3 (At5g16820) sowie CTH (At2g25900).

Die *overlap exention* PCR erfolgt in drei einzelnen PCRs. In einer ersten PCR-Runde (Abb. 2.1, 1. PCR und 2. PCR) wurde der von dem jeweiligen, zu mutierenden Lokalisierungssignal ausgehende N-terminale Teil und der C-terminale Teil der cDNA amplifiziert. Dazu wurden folgende Oligonukleotid-Kombinationen gewählt: jeweils ein flankierends Vektor- bzw. genspezifisches Oligonukleotid A oder B (Abb. 2.1, rote Pfeile) und ein Oligonukleotid C oder

D (Abb. 2.1, grüne Pfeile), welches die Mutation einfügte. Die beiden resultierenden PCR-Produkte aus den PCR 1 und 2 wurden in einer nächsten PCR-Reaktion, ohne vorherige Aufreinigung der amplifizierten DNA, in äquimolaren Mengen als DNA-*templates*, zusammen mit den Vektorprimern bzw. genspezifischen Oligonukleotiden (Abb. 2.1, A und B, rote Pfeile) für die *overlap extension* PCR eingesetzt (Abb. 2.1, 3. PCR). Die 3. PCR resultierte in der Amplifizierung eines DNA-Fragments, das die durch Oligonukleotide eingefügte Mutation enthielt.

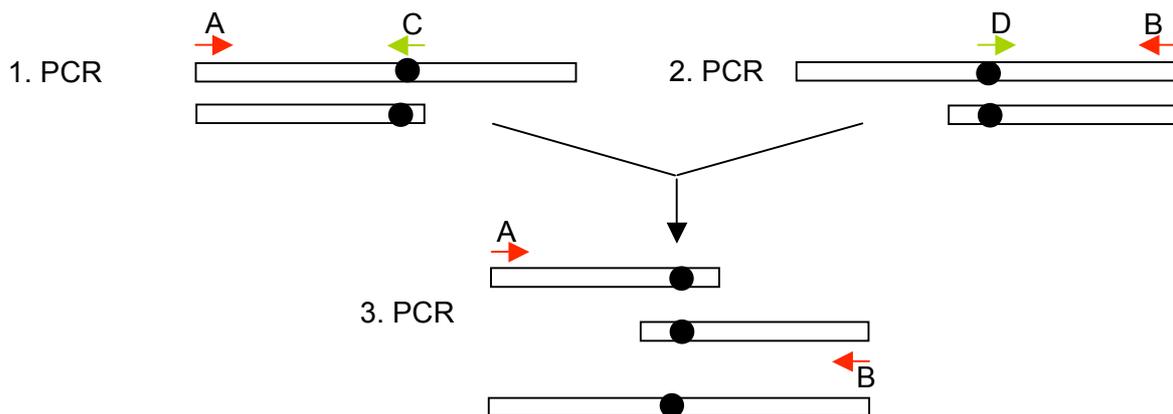


ABB. 2.1: OVERLAP EXTENSION PCR.

Die Oligonukleotide C und D (grüne Pfeile) dienen zur Insertion der Punktmutation im Bereich der putativen NES bzw. NLS. Die Oligonukleotide A und B (rote Pfeile) waren genspezifisch und dienen zur Amplifizierung des Volllängen Konstrukts. Der schwarze Punkt markiert die Stelle in der Sequenz, die mutiert wurde.

2.5.3 KOLONIE-PCR

Die Kolonie-PCR diente zur Überprüfung transformierter *E.coli*-Zellen. Dabei wurden diese daraufhin untersucht, ob die vorangegangene Transformation erfolgreich war und die Plasmid-DNA in *E. coli* etabliert werden konnte.

Von einer *E. coli* Kolonie wurde ein aliquoter Anteil für die PCR eingesetzt. Diese wurde mittels eines sterilen Zahnstochers in einen bereitgestellten PCR-Ansatz überführt. Der PCR-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl (10 x Reaktionspuffer, je 10 pmol eines *forward* bzw. eines *reverse* Oligonukleotids, 0,4 mM dNTP-Mix, Taq-Polymerase). Der erste Denaturierungsschritt erfolgte bei 94 °C für acht Minuten, um einen vollständigen Zellaufschluss der *E. coli*-Zellen zu garantieren. Folgendes PCR-Programm wurde für die Kolonie-PCR verwendet:

TAB. 2.5: PCR-PROGRAMM FÜR KOLONIE-PCR.

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklen
Aktivierung	480	94	
Denaturierung	20	94	
<i>annealing</i>	60	55-65	30
Elongation	90	72	
Elongation	180	72	
Kühlen	∞	16	

2.6 ARBEITEN MIT GENOMISCHER DNA

2.6.1 □ ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZLICHEM GEWEBE

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial von *A. thaliana* wurden 200 mg mit flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Das gemahlene Pflanzenmaterial wurde in 500 µl 2x CTAB-Puffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, um Proteine zu denaturieren. Anschließend wurde der Ansatz bei RT abgekühlt und mit 500 µl Chloroform versetzt. Die Extraktion fand bei mehrmaligem Invertieren statt, daraufhin folgte ein Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 14000 rpm). Nach erfolgter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 0,7 Vol. Isopropanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5.2 versetzt. Durch vorsichtiges Invertieren wurde der Ansatz gut vermischt und fünf Minuten bei RT inkubiert, wobei das Ausfallen der DNA erreicht wurde. Nach erneuter Zentrifugation (20 Minuten, 14000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, woraufhin der Überstand erneut verworfen wurde und das Sediment bei RT für etwa 15 Minuten getrocknet und anschließend in 30 µl TE (mit RNase, 40 µg/ml) aufgenommen wurde. Die Konzentration wurde durch Bestimmung der OD₂₆₀ und dem Vergleich mit einer Referenzprobe auf einem 1% Agarosegel ermittelt.

2x CTAB-Puffer:	2 % CTAB (w/v) 1,4 M NaCl 100 mM Tris, pH 8.0 20 mM EDTA, pH 8.0 1 % Polyvinylpyrrolidon
TE Puffer:	10 mM Tris, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0

2.6.2 □ EINFACHE ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZLICHEM GEWEBE (*SHORTY PREP*)

Dieses Protokoll zur schnellen Präparation von Gesamt-DNA aus kleinsten Mengen Pflanzenmaterial stammt von der *Knock Out Facility*, Wisconsin, USA (www.biotech.wisc.edu/A.thaliana).

Ausgangsmaterial war ein Blatt eines ca. zwei Wochen alten *A. thaliana*-Keimlings (unter Kurztagbedingungen gewachsen), der die Keimblätter und mindestens vier Folgeblätter besaß. Das Blatt wurde in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt und mittels des *TissueLyser* (Macherey & Nagel, Düren) fand der Zellaufschluss statt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit wurden 350 µl des Überstands abgenommen und mit 350 µl Isopropanol versetzt. Die Lösung wurde invertiert und erneut für zehn Minuten bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment getrocknet (bei RT für etwa 15 Minuten) und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert.

Extraktionspuffer:	0,2 M Tris-HCl (pH 9,0) 0,4 M LiCl 25 mM EDTA 1% (w/v) SDS
--------------------	---

TE Puffer:	10 mM Tris, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
------------	---

2.6.3 □ PCR ZUR ANALYSE VON *SHORTY PREP*-DNA

Dieses PCR-Protokoll zur Analyse von genomischer DNA, die durch die *Shorty Prep*-Methode isoliert wurde, stammt ebenfalls von der *Knock Out Facility*, Wisconsin, USA. Für diese PCR wurde die Takara rTaq-Polymerase (Takara Bio Inc.) verwendet.

In einem 20 µl PCR- Ansatz wurden 2 µl der *Shorty Prep*-DNA, mit 12 pmol pro Oligonukleotid, 250 µM rTaq-dNTP-Mix und 10x rTaq-Puffer versetzt. Zu Beginn des PCR-Programms erfolgte eine Denaturierung der DNA bei 94°C für 5Minuten („*hot start*“). Erst danach wurden bei 94°C 5 µl rTaq-Polymerase-Mix (0,125 µl rTaq-Polymerase, 0,5 µl 10x rTaq-Puffer, 4,375 µl H₂O) zugegeben. Während der Zugabe dieses Polymerase-Mix wurde die Temperatur des PCR-Blocks auf 94 °C gehalten und nach Beendigung der Zugabe wurde das PCR-Prgramm gestartet.

TAB. 2.6: PCR-PROGRAMM FÜR HOT START-PCR.

Schritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklen
<i>hot start</i>	300	94	
Pause			
Denaturierung	30	94	
<i>annealing</i>	30	55-65	36
Elongation	120	72	
Elongation	240	72	
Kühlen	∞	16	

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Agarosegel analysiert.

2.7 DNA-SEQUENZIERUNG

Die DNA-Sequenzanalyse nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruch-Methode diente zur Identifikation und Überprüfung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Die Analyse erfolgte an ABI Prism® 377, 3100 und 3730 Sequenzierautomaten und wurde durchgeführt von der *Sequencing Core Facility* an der Universität Bielefeld. Zum Einbau von markierten Nukleotiden mittels PCR wurde die *BigDye-terminator v3.1* Chemie verwendet.

2.8 ARBEITEN MIT RNA

2.8.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS PFLANZENMATERIAL MIT ANSCHLIEBENDER DNASE-BEHANDLUNG

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus 100 mg Blattmaterial erfolgte mittels TRI REAGENT® (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Blattmaterial wurde mit Silica Kügelchen (Roth) versetzt und mit Hilfe eines Ribolyser erfolgte der Zellaufschluss. Die isolierte Gesamt-RNA wurde zur Eliminierung von DNA mit DNaseI behandelt. Verwendet wurde dazu wiederum nach Angaben des Herstellers das *DNA-free™ Kit* der Firma Ambion (Austin, Texas, USA).

2.8.2 □ AUFTRENNUNG VON RNA IN AGAROSE-FORMALDEHYDGELEN

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehydgelen (RNA-Gele) erfolgte in einer mit H₂O₂-behandelten Gelkammer. In einem sterilen Kolben wurde 1 % Agarose mit 80 % (v/v) DEPC-H₂O aufgekocht und unter Rühren auf etwa 55°C abgekühlt. Es wurden 10 % (v/v) 10 x MEN-Puffer und 10 % (v/v) 37 %iges Formaldehyd zugegeben und in die RNase-freie Gelkammer (12,5 x 10 cm) mit Taschenformer gegossen. Die RNA-Proben (20 µg) wurden mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt, mit 20 µl Gelladepuffer sowie 10 ng/µl Homidiumbromid vermischt. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben für zehn Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für zwei bis vier Stunden bei 50-70 V in 1 x MEN-Puffer. Nach der Trennung der Proben wurde das Gel auf einem UV-Leuchttisch betrachtet, um die Regelmäßigkeit der RNA-Banden beurteilen zu können. Das Gel wurde mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert.

10 x MEN-Puffer:	200 mM MOPS
	50 mM NaAc x 3 H ₂ O
	10 mM EDTA pH 8.0 mit NaOH

Der pH-Wert wurde auf 6,8 NaOH eingestellt, mit 0,1 % DEPC (v/v) versetzt, zwei Stunden bei RT gerührt, autoklaviert und anschließend abgedunkelt bei 4°C gelagert.

Gelladepuffer:	15 % (v/v) 10x MEN-Puffer
	50 % (v/v) Formamid
	25 % (v/v) Formaldehyd (37 %)
	10 % (v/v) Bromphenolblau

2.8.3 □ REVERSE TRANSKRIPTION (RT)

0,4 µg DNA-freie RNA wurde in einem 10 µl Volumen entweder mit 20 pmol eines genspezifischen 3'-Primers oder mit einem OligodT-Primer versetzt. Die RNA wurde zunächst für zwei Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (*primer annealing*). Es folgte die Zugabe von 4 µl 5x *first-strand buffer*, 0,4 µl 0,1 M DTT, 4 µl 5 mM dNTP-Mix und 2 µl (400 U) Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen). Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend für sieben Minuten bei 72°C abgestoppt.

2.8.4 □ RT-PCR REAKTION

Die mittels der RT Reaktion synthetisierte cDNA wurde für eine nachfolgende PCR eingesetzt. Dazu wurden 0,4 bzw. 0,1 µg cDNA der RT-Reaktion ohne Aufreinigung verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mit je 50 pmol eines cDNA-spezifischen 5'-Primers sowie eines spezifischen 3'-Primers versetzt und es wurde eine PCR nach dem Standard-PCR Protokoll durchgeführt. Verwendet wurde eine Taq-Polymerase (NEB oder Takara Bio Inc.) mit dem dazugehörigen Puffer. Als Negativkontrolle diente isolierte RNA, die ohne RT-Reaktion für eine Standard-PCR als *template* verwendet wurde. Nach erfolgter Standard-PCR Reaktion wurde die amplifizierte DNA mittels gelelektrophoretischer Auftrennung analysiert.

2.9 HEFE TWO-HYBRID (Y2H) ANALYSE

Der *two-hybrid* Assay wird angewendet zur *in vivo*-Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in einem eukaryotischen System. Dieser Assay kann genutzt werden, um bekannte Interaktionen genauer zu untersuchen oder um neue Interaktionen zu identifizieren. Zusätzlich ist dieses System eine sensitive Methode, mit der auch schwache und transiente Interaktionen detektiert werden können. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsregulatoren aus physikalisch getrennten, funktionsunabhängigen Domänen bestehen. Solche transaktivierende Regulatoren besitzen häufig eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD), die an eine spezifische Promotorsequenz bindet, und eine Aktivierungsdomäne (AD), die den RNA Polymerase II Komplex an die DNA rekrutiert, um das Gen *downstream* der Promotorsequenz zu transkribieren. Beide Domänen werden benötigt, um die Transkription eines Gens zu aktivieren. Gelangen sie in der Promotorregion in räumliche Nähe zueinander, erfolgt die Transaktivierung.

Im Matchmaker LexA *Two-Hybrid* System (Clontech) dient das prokaryotische LexA-Protein als DNA-BD. Das LexA-Protein ist normalerweise ein Repressor von SOS Genen in *E. coli*. Die AD besteht aus dem B42-Peptid aus *E. coli*, welches auch eine Transkription in Hefe aktivieren kann. Beide Domänen sind in verschiedenen Klonierungsvektoren kodiert und bilden Fusionen mit Genen, die für Proteine kodieren, deren Interaktion untersucht werden soll. Die Aktivierungsdomäne B42 ist mit einem Protein fusioniert, das entweder bekannt ist oder aus einer cDNA-Bank stammt. Interagiert das *target*-Protein mit dem Protein welches an die AD fusioniert ist, kommt es zur Ausbildung eines Transkriptionsaktivators mit DNA-BD und AD, der an die LexA-Operatoren in der Promotorsequenz des Gens binden kann. Die Interaktion der Proteine wird phänotypisch durch die Aktivierung des Reportergens (in

diesem Fall das Gen für die β -Galactosidase) sichtbar. Das LexA-System kann auch genutzt werden, um eine cDNA-Bank nach Genen für Proteine zu durchsuchen, die mit einem bekannten *target* („bait“)-Protein interagieren.

2.9.1 □ DETEKTION VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN IM Y2H-SYSTEM

Der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] wurde mit den beiden Vektoren pGilda und pB42AD nach dem Protokoll von Clontech kotransformiert.

Der pGilda-Vektor enthielt das Gen, welches für das LexA-Protein kodiert, mit der DNA-BD und ein Gen für die Histidin-Biosynthese. XPO1 oder eines der MYB-Proteine waren als „bait“-Protein mit der DNA-BD fusioniert. Der pB42AD-Vektor enthielt die B42-AD und ein Gen für die Tryptophan-Biosynthese. Das zu untersuchende MYB-Protein („prey“-Protein) war mit der AD fusioniert. Alle MYB-cDNAs wurden jeweils EcoRI/XhoI in die beiden Hefektoren kloniert. Der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] enthielt den Vektor p8op-lacZ. Hier lagen acht LexA-Operatoren hintereinander, an die das LexA-Protein binden konnte. Zusätzlich enthielt das Plasmid ein Gen für die Uracil-Biosynthese, damit der Stamm auf U-Medium selektiert werden konnte.

Kam es zu einer Interaktion des „bait“-Proteins mit dem „prey“-Protein, also von XPO1 mit dem zu untersuchenden Protein, wurden DNA-BD und AD in räumliche Nähe gebracht. Dadurch konnte das Reporter-gen *lacZ*, das durch die LexA-Operatoren gesteuert wurde, abgelesen werden. Die Hefezellen exprimierten β -Galactosidase, deren Aktivität durch Blaufärbung der Hefekolonien sichtbar wurde und gemessen werden konnte.

Hefezellen, die die drei Vektoren enthielten, wurden mit einem HWU-Medium selektiert. Da die AD im pB42AD-Vektor und das LexA-Fusionsprotein im pGilda-Vektor unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors standen, war eine Induktion durch Galaktose notwendig. Es durfte sich dabei keine Glukose im Medium befinden, da diese die Galaktoseverwertung unterdrücken würde. Neben Galaktose konnte dem Medium Raffinose als weitere Kohlenstoffquelle zugesetzt werden, um den Hefezellen das Wachstum zu erleichtern.

2.9.2 □ HEFETRANSFORMATION

150 ml YPD-Medium wurden mit einer Übernachtskultur aus SD-U-Medium und dem Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] auf $OD_{600}=0,2-0,3$ angeimpft. Die Hefesuspension wurde im Inkubator bei 30 °C bis zur OD_{600} 0,5 bis 0,6 angezogen. Nach der Überführung in drei 50 ml Reaktionsgefäße und einer Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten bei RT wurde der

Überstand verworfen, die Sedimente in etwas H₂O resuspendiert, in einem Reaktionsgefäß vereinigt und abermals unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Des Weiteren wurde nach dem Protokoll von Clontech (Li-Acetat-Methode) vorgegangen.

Von allen Hefeklonen wurden Glycerol-Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden die drei Tage auf SD-HWU⁻-Platten gewachsenen transformierten Hefekolonien vollständig mit einer Impföse abgekratzt, in 300 µl bis 600 µl H₂O resuspendiert und das gleiche Volumen an Glycerol-Lösung hinzugegeben. Die Kulturen konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren bei -80°C gelagert werden.

10 x TE-Puffer:	0,1 M Tris (pH 7,5 mit HCl) 10 mM EDTA
10 x Li-Acetat:	1 M Li-Acetat pH 7,5 (mit Essigsäure)
PEG/Li-Acetat-Lösung (10 ml):	40% PEG (w/v) 1 x TE-Puffer 1 x Li-Acetat
SD-HWU ⁻ -Platten:	2,68 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> , ohne Aminosäuren 8 g Glukose 7,2 g Bactoagar 260 mg <i>dropout</i> HWU ⁻ mit H ₂ O _{deion} auf 400 ml aufgefüllt
Glycerol-Lösung:	65% (w/v) Glycerol 100 mM MgSO ₄ 25 mM Tris-HCl (pH 7,5)

2.9.3 □ INTERAKTIONSTEST AUF INDIKATORPLATTEN

Je 2 ml SD-HWU⁻-Medium wurden mit den kotransformierten Hefen aus den Glycerol-Dauerkulturen angeimpft und 1-2 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert. Dann wurden den Kulturen je 600 µl entnommen, bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert und das Sediment in 600 µl sterilem H₂O resuspendiert. Von jedem Ansatz wurden 5 µl auf Gal-HWU⁻-Platten aufpipettiert. Wurde direkt vor dem Interaktionstest eine Hefetransformation durchgeführt, wurden die Zellen von den SD-HWU⁻-Platten abgekratzt, jeweils in 300 µl bis 600 µl H₂O resuspendiert und davon direkt 5 µl auf die Gal-HWU⁻-Platten pipettiert. Die Platten enthielten das Substrat X-Gal, welches nach der Spaltung durch die β-Galaktosidase eine Blaufärbung aufweist. Die Platten wurden 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Wiesen die Hefen auf der Platte nach der Inkubation eine Blaufärbung auf, war das ein Nachweis für die Interaktion der untersuchten Proteine.

SD-HWU ⁻ -Medium:	3,35 <i>yeast nitrogen base</i> 10 g Glukose 325 mg <i>dropout</i> HWU ⁻ mit H ₂ O _{deion} auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert
20 x BU <i>salts</i> :	30 g NaH ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O 70 g Na ₂ HPO ₄ in 1000 ml H ₂ O _{deion} gelöst pH 7.0 eingestellt und autoklaviert
Gal-HWU ⁻ -Platten:	2,8 g <i>yeast nitrogen base</i> 7,2 g Bactoagar 260 mg <i>dropout</i> HWU ⁻ 325 ml H ₂ O autoklaviert, danach steril zugegeben: 40 ml 20% Galaktose (sterilfiltriert) 20 ml 20 x BU <i>salts</i> 0,64 ml 50 mg/ml X-Gal (Biomol, Hamburg)

2.9.4 □ QUANTIFIZIERUNG DER INTERAKTION ZWEIER PROTEINE MITTELS ONPG-ASSAY

Um die Interaktion zweier Proteine im Y2H-System zu quantifizieren, wurde als Substrat ONPG gewählt. Dieses wird wie X-Gal durch die β -Galaktosidase gespalten, zeigt bei Spaltung aber eine Gelbfärbung, die photometrisch quantifiziert werden kann.

Von jeder zu testenden Interaktion wurden drei voneinander unabhängige Kulturen vorbereitet. Jeweils 2 ml SD-HWU⁻-Medium wurden mit den Glycerol-Dauerkulturen angeimpft und für zwei Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Befanden sich die Hefezellen in der stationären Phase, wurden sie folgendermaßen mit Galaktose induziert: 0,5 ml jeder Kultur wurde in 5 ml Gal-Raffinose-HWU⁻-Medium überimpft und vier Stunden bei 30°C wiederum unter Schütteln inkubiert.

Das Wachstum wurde gestoppt, indem die Kulturen auf Eis gestellt wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 g für fünf bis zehn Minuten. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Hefesedimente in je 5 ml Z-Puffer resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nach Resuspension des Sediments in jeweils 0,5 ml Z-Puffer wurden je drei Aliquots zu 50 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Vom Rest der Kulturen wurden je zwei 1:50-Verdünnungen in Z-Puffer hergestellt, um die OD₆₀₀ zu messen.

Für den ONPG-Test wurden die 50 μ l-Aliquots dreimal bei 37°C für 1-2Minutenaufgetaut und wieder in Flüssigstickstoff eingefroren. Beim letzten Auftauen wurden 50 μ l Z-Puffer zugegeben. Zusätzlich zu den Kulturen wurden drei Nullkontrollen mit 100 μ l Z-Puffer vorbereitet. Dann wurden in jedes Eppendorfgefäß je 700 μ l Z-Puffer+BME gegeben. Nach Zugabe von 160 μ l ONPG-Lösung pro Ansatz wurden die Ansätze für genau eine Stunde bei

30°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten wurden die Ansätze 1:4 mit Z-Puffer verdünnt und die OD₄₀₅ von zwei Proben pro Verdünnung in einem *ELISA-Reader* bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde wie folgt ermittelt: β-Galaktosidase-Einheit = 1000*OD₄₀₅ / (t*V*OD₆₀₀). Dieser höchste gemessene Wert wurde als 1 definiert und alle anderen Ergebnisse darauf bezogen.

Gal-Raf-HWU-Medium:	3,35 g <i>yeast nitrogen base</i> 275 mg <i>dropout</i> HWU ⁻ 5 g Raffinose 445 ml H ₂ O autoklaviert, danach steril zugegeben: 50 ml 20% Galaktose (sterilfiltriert)
Z-Puffer:	60 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O pH 7,0 autoklaviert
Z-Puffer+BME:	0,27 ml β-Mercaptoethanol in 100 ml
ONPG-Lösung:	4 mg/ml ONPG in Z-Puffer
Na ₂ CO ₃ -Lösung:	1 M Na ₂ CO ₃ x H ₂ O

2.10 HEFE *TWO-HYBRID-SCREEN*

2.10.1 SEQUENZIELLE TRANSFORMATION UND SELEKTION POSITIVER KOLONIEN

Mit Hilfe eines Y2H-Screens ist es möglich, eine cDNA-Bank nach Genen für potentielle Interaktionspartner eines bestimmten Proteins zu durchsuchen. In diesem Fall wurde eine *A. thaliana* cDNA-Bank („*pray*“) ins heterologe Hefesystem eingebracht und auf Interaktion mit einem bekannten Protein („*bait*“) getestet. Die Transformation erfolgte sequenziell, um die Transformationseffizienz zu steigern. Sie wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (*Matchmaker LexA Two-Hybrid System*, Clontech). Zunächst wurde der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] mit *XPO1* in pGilda als „*bait*“ vortransformiert, auf SD-HU⁻-Platten selektiert und in einer zweiten Runde mit einer *A. thaliana* pB42AD cDNA-Bank (D. Haasen, 2001) transformiert. Die Selektion für beide Plasmide erfolgte auf SD-HWU⁻-Platten. Insgesamt wurden etwa 1,6 x 10⁶ Kolonien ausplattiert, der Screen war dabei

nicht sättigend. Die Kolonien wurden nach drei Tagen bei 30°C mit Hilfe eines *colony-lift filter assays* (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech) auf Indikatorplatten (Gal-HWU) transferiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Da eine Kolonie meist mehrere pB42AD-Klone enthielt, wurden am nächsten Tag alle positiven (blauen) Kolonien einzeln auf Indikatorplatten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Dabei wurde weiterhin auf beide Plasmide selektiert, aber gleichzeitig auch eine Segregation erlaubt, um die Hefeklone zu vereinzeln. Dieser Vorgang wurde noch mindestens einmal wiederholt, bis alle Kolonien eines Hefeklons positiv waren.

2.10.2 PLASMID-ISOLIERUNG AUS HEFEZELLEN („PLASMID-RESCUE“)

Positive Hefekolonien wurden auf SD-HWU-Platten ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurden alle Kolonien mit einer Impföse von der Platte gekratzt und in 400 µl H₂O resuspendiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Hefezellen in 200 µl *yeast lysis solution* lysiert. Daraufhin wurden 200 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g *glass-beads* zugegeben und 2Minutenkräftig gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5Minuten bei maximaler Geschwindigkeit folgte eine Chloroformextraktion, wobei 200 µl Chloroform zum Überstand hinzugefügt wurden, kräftig gemischt und abermals zentrifugiert wurde. Die Plasmid-Präzipitation erfolgte anschließend durch Zugabe von 20 µl 3 M NaAc und 550 µl 100% Ethanol zum Überstand. Nach Zentrifugation wie oben wurde die sedimentierte DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

yeast lysis solution:

- 2% Triton X-100
- 1% SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris (pH 8,0)
- 1 mM EDTA

glass-beads:

- mit Acid gewaschen
- 425-600 µm (Sigma)

2.10.3 TRANSFORMATION VON *E. COLI* MIT ISOLIERTEN HEFEPLASMIDEN

Die durch den *Plasmid-Rescue* gewonnene DNA aus Hefezellen war nicht sauber und konzentriert genug, um durch einen Restriktionsverdau analysiert werden zu können. Deshalb wurde eine Zwischentransformation in den *E. coli*-Stamm KC8 (*trp*⁻) durchgeführt. Dafür wurden 2 µl „*Plasmid-Rescue*“ DNA für eine Elektrotransformation (Kap. 2.4.11) verwendet, die transformierten Zellen allerdings auf Minimalmedium mit Ampicillin aber ohne Tryptophan ausgestrichen, wodurch spezifisch auf einen pB42AD-Klon selektiert wurde. Einzelne Kolonien wurden gepickt und eine Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (Kap. 2.4.13) durchgeführt. Diese DNA konnte nun durch einen Restriktionsverdau analysiert werden.

Minimalmedium: 7,2 g Bactoagar
 8 g Glukose
 220 mg dropout HWU⁻
 310 ml H₂O_{deion}
 autoklaviert, danach steril zugegeben:
 80 ml 5 x M9 *salts*
 400 µl 1 M Thiamin-HCl
 800 µl 1 M MgSO₄
 40 µl 1 M CaCl₂
 100 µg/ml Ampicillin
 2,5 ml 200 x Histidin (=10 mg)
 2,5 ml 200 x Uracil (=10 mg)

5 x M9 *salts*: 64 g Na₂HPO₄ x H₂O
 15 g KH₂PO₄
 2,5 g NaCl
 5 g NH₄Cl
 mit H₂O_{deion} auf 1000 ml aufgefüllt
 autoklaviert

2.11 TABAK BY-2 ZELLKULTUR

Die Kultivierung der heterotrophen Tabak BY-2 Zellkultur erfolgte nach Merkle *et al.* (1996).

2.11.1 PROTOPLASTIERUNG DER BY-2 ZELLKULTUR

Die Protoplastierung einer BY-2 Zellkultur erfolgte drei Tage nach Subkultivierung. Etwa 20 ml dieser Kultur wurden unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für fünf Minuten bei RT sedimentiert. Das Sediment wurde in 25 ml Waschlösung aufgenommen und nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) in 13 ml Verdaulösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Petrischale überführt, mit Parafilm verschlossen und bei 26°C im Dunkeln über Nacht inkubiert.

Verdaulösung: 1% Cellulase Onozuka RS (Serva)
 0,5% Macerozym Onozuka RS (Serva)
 0,5% BSA
 0,01% β -Mercaptoethanol
 50 mM CaCl₂
 10 mM Na-Acetat (pH 5,8)
 0,25 M Mannitol
 sterilfiltriert

Waschlösung: wie Verdaulösung, jedoch ohne Enzyme
 sterilfiltriert

2.11.2 TRANSFEKTION DER TABAK BY-2 PROTOPLASTEN

Einen Tag nach der Protoplastierung der BY-2 Tabakzellkultur wurden die Protoplasten vorsichtig von der Petrischale in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100 g für fünf Minuten bei RT sedimentiert. Für sämtliche Zentrifugationsschritte in diesem Protokoll wurde ein Schwenkrotor verwendet und die Bremswirkung der Zentrifuge wurde ausgeschaltet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen bis auf etwa vier ml, in denen die Protoplasten resuspendiert wurden. Es folgte eine schrittweise Zugabe von 25 ml Waschlösung mit anschließender Zentrifugation (Bedingungen s.o.). Das Sediment wurde wiederum in ca. vier ml des Überstandes resuspendiert und durch eine schrittweise Zugabe in zehn ml W5-Lösung aufgenommen (zunächst ein ml, dann zwei ml, drei ml und zum Schluss die restlichen vier ml). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in fünf ml W5-Lösung resuspendiert und anschließend bei 4 °C für 20 bis 30 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationsphase sedimentierten die Protoplasten, so dass der Überstand ohne Zentrifugationsschritt verworfen werden konnte. Durch Zugabe von zehn ml

MMM-Lösung in aliquoten Anteilen wurden die Protoplasten resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wie oben, gefolgt von der Abnahme des Überstands, wurden die Protoplasten abermals in zehn ml MMM-Lösung aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Von dem Überstand wurden sechs ml abgenommen und die Protoplasten wurden anschließend in den verbliebenen vier ml resuspendiert. Diese erforderlichen Waschschriffe dienten der Vorbereitung der Protoplasten für die Transfektion.

Für die Transfektionsansätze wurden in einem Plastikzentrifugenröhrchen (14 ml Greiner Röhrchen mit Drehverschluss) je 30 µg DNA pro Konstrukt vorgelegt, wobei das Volumen nicht 20 µl überschreiten durfte (bei einer Kotransfektion von *split* YFP Konstrukten wurden je 20 µg DNA pro Konstrukt eingesetzt). Zu der vorgelegten DNA wurden je 300 µl der Protoplasten-Suspension gegeben und durch vorsichtiges Drehen des Röhrchens wurden DNA und Protoplasten gut vermischt. Tropfenweisen erfolgte die Zugabe von 300 µl PEG, durch wiederholtes Drehen des Zentrifugenröhrchens wurde die Suspension gut vermischt und anschließend für zehn Minuten bei RT inkubiert. Durch schrittweise Zugabe von zehn ml W5-Lösung (ein ml, zwei ml, drei ml und abschließend die restlichen vier ml) wurde die Protoplasten-DNA-PEG Suspension resuspendiert. Nach einem wiederholten Zentrifugationsschritt wie oben, wurde der Überstand vollständig verworfen und das Protoplastensediment zunächst vorsichtig in 0,2 ml *MS+Sucrose* resuspendiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten wurden nochmals 0,5 ml *MS+Sucrose* zugegeben. Die Röhrchen wurden mit leicht geöffnetem Drehverschluss, damit eine O₂-Zufuhr sichergestellt war, in waagrechter Position über Nacht bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse der transfizierten, fluoreszierenden Protoplasten erfolgte am darauf folgenden Tag im konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

W5-Lösung: 154 mM NaCl
 125 mM CaCl₂
 5 mM KCl
 5 mM Glukose
 pH 5,8-6,0
 sterilfiltriert

MMM-Lösung: 15 mM MgCl₂
 0,1% (w/v) MES-KOH (pH 5,8)
 0,5 M Mannitol
 sterilfiltriert

PEG-Lösung: 40% (w/v) PEG 4000 (Duchefa)
 0,4 M Mannitol
 0,1 M Ca(NO₃)₂
 pH 8-9 (pH-Wert sinkt nach dem Autoklavieren auf einen
 physiologischen Wert)
 autoklaviert

MS+Sucrose: 0,4 M Saccharose
in MS Zellkulturmedium (Merkle *et al.*, 1996)
sterilfiltriert

2.11.3 LOKALISATION VON GFP-FUSIONSPROTEINEN

Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurden die transfizierten Protoplasten mit einem 63 x Ölimmersionsobjektiv und einem DM RBE TCS4D Mikroskop (Leica, Bensheim) untersucht, das mit einem Argon-Krypton-Laser (488 nm Anregung, Strahlenteiler bei 510 nm, Filter bei 515 nm) ausgestattet war.

2.12 BiFC (BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION)

Das Y2H-System liefert wertvolle Informationen über Protein-Protein Interaktionen in stabilen und transienten Komplexen (KERSTEN *et al.* 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Interaktionen im heterologen Hefesystem und nicht im homologen, pflanzlichen stattfinden. Eine weitere Methode von Hu *et al.* (2002) in tierischer Zellkultur wurde als BiFC veröffentlicht. In der Methode wird sich die Eigenschaft von YFP zunutze gemacht, dass es durch Zusammenbringen zweier nicht fluoreszierender YFP-Teilfragmente zu einer Rekonstitution der grün-gelben Fluoreszenz kommen kann. Dies wird erreicht, wenn zwei Proteine, die mit den YFP-Fragmenten fusioniert sind, miteinander interagieren. BiFC besitzt eine hohe Spezifität und die rekonstituierten Chromophorkomplexe weisen eine hohe Stabilität auf (BRACHA-DRORI *et al.* 2004). BiFC ist eine einfache, verlässliche und relativ schnelle Methode, die sich auch zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen im pflanzlichen Protoplastensystem eignet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass neben dem Nachweis der Dimerisierung auch eine subzelluläre Lokalisierung des Dimers möglich ist.

2.12.1 KONSTRUKTION DER *SPLIT-YFP*-VEKTOREN UND KLONIERUNG DER cDNAs

Der N-terminale Teil von YFP (YN) wurde mittels PCR zusammen mit dem MYC-*tag* aus dem pUC-SPYNE-Vektor amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/XbaI in den 5'GFP Vektor kloniert. Der Vektor 5'YN entstand, indem die cDNA von GFP durch die von YN ersetzt wurde. Der C-terminale Teilfragment von YFP (YC) wurde durch eine PCR mit dem HA-Epitop aus pUC-SPYCE gewonnen und in gleicher Weise wie YN in 5'GFP

kloniert. Die Expression der YFP-Teile steht jeweils unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Die Vektoren 5'YN und 5'YC ermöglichten die Generierung von Fusionsproteinen, die am N-Terminus entweder mit dem N- oder C-terminalen Teilfragment von YFP fusioniert waren. Die cDNAs der zu untersuchenden Proteine wurden EcoRI/XhoI in 5'YN und 5'YC kloniert. Die analysierten Protein-Protein Interaktionen wurden sowohl als YN- als auch als YC-Fusionen getestet.

Die YN- und YC-Konstrukte wurden transient in BY-2 Tabakprotoplasten kotransfiziert. Die Transfektion der Protoplasten erfolgte wie in Kap. 2.11.2 beschrieben und pro Konstrukt wurden 20 µg DNA eingesetzt.

2.12.2 ANALYSE DER BIFC-INTERAKTIONEN

Die BiFC-Interaktionen wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (Leica TCS SP2 AOTF DM-RE 7) mit einem 20 x bzw. 63 x Ölimmersionsobjektiv analysiert. Die Anregung erfolgte mit einem Argonlaser bei 514 nm, durch einen dichroitischen (488/514 nm) Strahlenteiler und die Detektion mit einem wellenlängen optimierten Photomultiplier im Bereich von 530-580 nm. Die Analyse der Bilder wurde mit der Leica Software Version 2.61 *Build 1537* durchgeführt.

2.13 EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)

Der EMSA findet Verwendung als Nachweisverfahren von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Das Prinzip eines EMSA beruht darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in einer elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als freie DNA. Die radioaktiv markierte DNA wird mit einer Proteinlösung inkubiert und auf einem nativen Agarose-/Polyacrylamidgel elektrophoretisch analysiert. Die stark negative Ladung des DNA-Fragments bewirkt im Normalfall außerdem, dass sich der DNA-Protein-Komplex als Polyanion verhält und dementsprechend zur Anode wandert. Dieses Verhalten kann durch die Nettoladung der Proteine modifiziert werden, die die stark negative Ladung der DNA meist zum Teil kompensieren. Da es sich beim EMSA um eine native Gelelektrophorese handelt, kann nicht unmittelbar auf die Größe der beteiligten Proteine geschlossen werden.

2.13.1 HERSTELLUNG DES RADIOAKTIV MARKIERTEN DNA-FRAGMENTS

Mit dem EMSA sollte die eine Bindung von MYB101 an das GARE-Motiv im Promotor von *LEAFY* (*LFY*) nachgewiesen werden. Mittels PCR und genspezifischer Oligonukleotide (J034 und J035) wurde ein 572 bp großes Fragment des *LFY* Promotors aus genomischer DNA von *A. thaliana* amplifiziert und über die Restriktionschnittstellen EcoRI und BamHI wurde das Promotorfragment in den Vektor pBluescript II KS kloniert. Für den EMSA wurde ein kürzeres *LFY* Fragment aus dem pBluescript II KS amplifiziert (mit den Oligonukleotiden T7 und J037, 290 bp), durch die Restriktionsendonukleasen XhoI und SacI verdaut und wie unter 2.4.3 beschrieben aufgereinigt.

Für die radioaktive Markierung des DNA-Fragments, wurden in einem *fill-in* Ansatz 500 ng DNA-Fragment, 10 x Klenow-Puffer, 3 µl 10 mM dCTP-dGTP-dTTP-Mix, 5 µl 10 mCi/ml [32 P]dATP und 5 U Klenow DNA-Polymerase (NEB) in einem Endvolumen von 50 µl eingesetzt. Nach einer Inkubation für zehn Minuten bei 37 °C wurden die freien Nukleotide durch eine G-25 *Spin Column* (Amersham Biosciences) abgetrennt und die Einbaurate radioaktiver dATP-Nukleotide mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen.

2.13.2 IN VITRO TRANSLATION DER PROTEINE

Die cDNAs von MYB33 und MYB101 wurden EcoRI/XhoI in den Y2H-Vektor pGADT7 kloniert. Die *in vitro* Translation erfolgte im *TnT Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega, Mannheim). Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 2 µg DNA und 0,05 mM Methionin eingesetzt wurden.

2.13.3 DNA-PROTEIN BINDUNGSASSAY

Damit der Bindungsassay für alle Ansätze unten den gleichen Bedingungen stattfand, wurde ein DNA-*Mastermix* hergestellt, der die radioaktiv markierte DNA enthielt. Die DNA-Menge wurde entsprechend 1 Mio cpm eingesetzt, 36 µl Bindungspuffer, 10 µl poly [dI/dC]-Lösung und 10 µl 15 mM Spermidin-Lösung zugegeben und mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Pro Ansatz (d.h. pro Gelspur) wurden 5 µl *Mastermix* eingesetzt, was je 50.000 cpm an markiertem DNA-Fragment entsprach. Der *Mastermix* wurde mit Proteinlösung (etwa 3 µl) direkt aus dem Translationsansatz versetzt, mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Proteinlösung wurde mit 4 µl Färbepuffer versetzt. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Bindungsansätze direkt auf das Gel geladen.

Bindungspuffer:	60 mM HEPES 25 mM Tris 0,3 M KCl 60% Glycerol 5 mM EDTA 5 mM DTT pH 7,9 (mit KOH)
Färbepuffer:	1% (w/v) Bromphenolblau 1% (w/v) Xylencyanol 50% (v/v) Glycerol 5 x TBE (Kap. 3.3.5)

2.13.4 GELPRÄPARATION UND GELLAUF

Das Agarose-/Polyacrylamidgel musste einen Tag vor dem Gellauf gegossen werden. Dazu wurden Agarose, H₂O und 10 x TBE in einen Kolben gegeben, gewogen und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die Suspension wurde auf etwa 60°C abgekühlt, abermals gewogen, das verdampfte H₂O ersetzt und die restlichen Komponenten hinzugefügt und gemischt. Das noch flüssige Gel wurde sofort luftblasenfrei in eine vorbereitete, mit Isopropanol gereinigte Gelkammer gegossen und der Kamm zum Formen der Geltaschen wurde eingesetzt. Das Gel musste mindestens 30 Minuten auspolymerisieren. Zur Lagerung wurde das Gel, ohne dass der Taschenformer entfernt wurde, in angefeuchtetes Zellstoffpapier und Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht bei 4°C gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Luftblasen am unteren Rand des Gels und in den Geltaschen entfernt. Nach einem Vorlauf von einer Stunde bei 100 V in 0,25 x TBE als Laufpuffer wurde das Gel mit den Bindungsansätzen beladen und der Gellauf bei 200 V (das entspricht 13 V/cm) durchgeführt. Als Laufkontrolle diente der Ansatz, der keine Proteinlösung sondern Färbepuffer enthält. Sobald die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde der Gellauf beendet (etwa nach 2 h).

Agarose-/Polyacrylamidgel:	0,41 g Agarose 1,5 ml 10 x TBE (Kap. 3.3.5) 58 ml H ₂ O 4,8 ml Rotiphorese Gel 40 (Roth) 150 µl 10% APS 75 µl TEMED
----------------------------	---

2.13.5 GELANALYSE

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Glasplatten vorsichtig auseinandergedrückt, wobei das Gel an einer der beiden Platten haften blieb. Das Gel wurde vollständig mit der Fixierlösung überschichtet und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Fixierung war beendet, wenn die Bromphanolblau-Bande eine gelbe Färbung annahm. Das Gel wurde daraufhin von der Glasplatte abgelöst und auf *Whatman*-Papier übertragen, luftblasenfrei mit Frischhaltefolie überzogen und in einem Gelrockner bei 70 °C für 30 Minuten getrocknet. Mittels eines Phosphoimagers wurde das Gel analysiert.

Fixierlösung: 10% Essigsäure
 20% Methanol

2.14 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* VERMITTELTE TRANSFORMATION VON *A. THALIANA*

2.14.1 HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*-ZELLEN

Für die Transformation von *A. thaliana* mussten zunächst chemokompetente Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*, Stamm GV3101, Rifampicin- und Gentamycin-resistent) hergestellt werden. Dafür wurden zwei ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Rifampicin und 40 µg/ml Gentamycin) mit *Agrobacterium tumefaciens* angeimpft und für zwei Tage unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Diese Vorkultur diente zum Animpfen der Hauptkultur von 50 ml LB-Flüssigmedium (mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen), welche bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 bei 28 °C unter schütteln angezogen wurde. Die Ernte der Zellen begann mit kurzer Abkühlung auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 2800 g und 4 °C für fünf bis zehn Minuten. Das Sediment wurde in einem ml eiskaltem 20 mM CaCl₂ resuspendiert. Aliquote Anteile der vorbereiteten Zellen von je 0,1 ml wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und konnten bei -80°C gelagert werden.

2.14.2 TRANSFORMATION VON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*-ZELLEN

Für die Transformation der Agrobakterien wurden 5 µg des binären Plasmids pGPTV-BAR verwendet. Die DNA wurde direkt zu den noch gefrorenen, kompetenten Bakterien gegeben und bei 37°C erfolgte ein Hitzeschock für fünf Minuten mit anschließender Inkubation auf Eis für wenige Minuten. Nach Zugabe von 1 ml LB-Flüssigmedium wurden die Zellen bei 28 °C

für vier Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 150 µl verworfen, die sedimentierten Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und vollständig auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin ausgebracht. Nach einer Inkubation für zwei bis drei Tage bei 28 °C konnten Kolonien zur Analyse mittels Kolonie-PCR entnommen werden. Sofern sich die Kolonien als positive, transformierte Zellen herausstellten, konnte eine Übernachtskultur (fünf ml LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen, für zwei bis drei Tage bei 28 °C schütteln) angeimpft werden, von der zum einen ein aliquoter Anteil für eine alkalische Lyse (s. 2.4.13) eingesetzt wurde und zum anderen eine Dauerkultur (825 µl Kultur versetzt mit 375 µl 80 % Glycerol) zur Aufbewahrung bei -80 °C hergestellt wurde. Die alkalische Lyse mit anschließender PCR diente zur Verifizierung der transformierten Zellen.

2.14.3 AGROBAKTERIEN-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON *A. THALIANA* (FLORAL DIP)

Für die Herstellung transgener Pflanzen wurde der Ökotyp Columbia Col-0 von *A. thaliana* verwendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde zunächst unter Kurztag-Bedingungen und nach vier Wochen unter Langtag-Bedingungen.

Sobald sich primäre Infloreszenzen gebildet hatte, wurden diese nahe der Rosette abgeschnitten, um den Blühzeitpunkt aller Pflanzen für die Transformation zu synchronisieren und um eine größere Anzahl von Blüten durch das vermehrte Wachstum sekundärer Infloreszenzen zu erhalten. Eine Woche nach dem Abschneiden der Blüten waren die neuen Infloreszenzen zwischen fünf cm und 15 cm lang und die Pflanzen konnten für die Transformation eingesetzt werden. Die verwendeten Pflanzen sollten möglichst viele Blüten besitzen und eventuell bereits gebildete Schoten wurden entfernt. Damit die Stomata am Tag der Transformation geöffnet waren, wurden die Pflanzen am Tag zuvor gut gegossen.

Etwa sechs Tage vor der Transformation wurde ein aliquoter Anteil der Glycerol-Dauerkultur in eine fünf ml Vorkultur (YEP-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin zur Selektion von pGPTV) angeimpft und für zwei bis drei Tage unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Die Vorkultur diente zwei bis drei Tag vor der Transformation zum Animpfen von 500 ml YEP-Flüssigmedium (mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin zur Selektion von pGPTV), welches ebenfalls für zwei bis drei Tage bei 28 °C unter schütteln inkubiert wurde. Am Tag der Transformation wurde die 500 ml Kultur mit 5 % Saccharose und 0,02 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)

versetzt und erneut zehn Minuten bei 28 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in ein Becherglas überführt und Wildtyp Col-0 Pflanzen (fünf pro Topf) wurde etwa zwei Minuten, mit den Blüten voran, in die Agrobakterien-Kultur getaucht. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Pflanzen in Frischhaltefolie eingepackt und über Nacht im Dunkeln bei RT waagrecht liegend aufbewahrt. Pro Konstrukt wurden sieben bis zehn Töpfe á fünf Pflanzen in die Agrobakteriensuspension getaucht. Am darauf folgenden Tag wurde die Folie, in die die Pflanzen verpackt waren, entfernt und die Pflanzen wurden bis zur Bildung und Reifung der Schoten unter Langtagbedingungen angezogen.

2.14.4 SELEKTION TRANSGENER *A. THALIANA* PFLANZEN

Pflanzen, die mit dem pGPTV-BAR Vektor transformiert waren, wurden mittels des *bar*-Gen selektioniert, welches eine Resistenz gegen BASTA hervorruft. BASTA ist ein Kontaktherbizid, das von der Pflanze über die Blätter aufgenommen wird und die Glutaminsynthetase blockiert. Das Enzym katalysiert normalerweise den Einbau von Ammoniak in Glutamat, wodurch Glutamin gebildet wird. Ist es inhibiert, reichert sich das Zellgift Ammoniak an und das Pflanzengewebe wird zerstört.

Drei Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene Keimlinge der T1-Generation der transformierten Pflanzen wurden, sobald neben den Kotyledonen drei bis vier Folgeblätter gebildet waren, dreimal im Abstand von einer Woche mit einer BASTA-Lösung besprüht. Die Transformationseffizienz war etwa 3 - 4%. Die transgenen Pflanzen wurden bis zur Samenreife zunächst unter Kurztag- und später unter Langtagbedingungen angezogen und die Samen geerntet.

BASTA-Lösung: 240 µg/ml BASTA (Hoechst Schering AgrEvo, Düsseldorf)
 0,005% Detergens (z.B. Silwet L-77)

2.15 T-DNA INSERTIONSLINIEN UND GENERIERTE ÜBEREXPRIMIERENDE LINIEN

In diesem Abschnitt befinden sich eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten T-DNA Insertionslinien sowie eine tabellarische Zusammenfassung der zur Analyse der T-DNA Insertionslinien eingesetzten Oligonukleotide.

Des Weiteren enthält dieser Abschnitt eine Liste der hergestellten überexprimierenden *A. thaliana* Linien, die mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformiert wurden.

TAB. 2.7: T-DNA INSERTIONSLINIEN.

Angegeben sind das Gen, die Bezeichnung der Linie und das Plasmid der verwendeten T-DNA Insertionslinien.

Gen	Linie	Plasmid
<i>MYB101</i>	Salk_061355	pROK2
<i>MYB101</i>	Salk_149918	pROK2
<i>MYB33</i>	Salk_065473	pROK2
<i>MYB65</i>	Salk_118611	pROK2
<i>MYB65</i>	Salk_063552	pROK2
<i>XPO1A</i>	GabiKat 151C08	pAC161
<i>XPO1B</i>	GabiKat 156D08	pAC161
<i>CID11</i>	Salk_061880	pROK2
<i>CID11</i>	GabiKat 279H08	pAC161

TAB. 2.8: OLIGONUKLEOTIDE ZUR GENOTYPISIERUNG DER T-DNA INSERTIONSLINIEN.

Angegeben sind die Kombinationen der verwendeten Oligonukleotide zur genetischen Charakterisierung der verschiedenen T-DNA Insertionslinien. Zusätzlich wurden Angaben gemacht zur *annealing* Temperatur und zur Größe der amplifizierten Fragmente.

xpo1a, GabiKat 151C08

	Oligo	T [°C]	bp
WT	X1A & X1A2	60	710
T-DNA	X1A & TgabiA	60	750

xpo1b, GabiKat 156D08

	Oligo	T [°C]	bp
WT	X1B & 1623	65	1361
T-DNA	X1B & TgabiB	65	900

myb101, Salk_061355

	Oligo	T [°C]	bp
WT	L047 & L048	55	1000
T-DNA	L048 & J504	55	500

myb101, Salk_149918

	Oligo	T [°C]	bp
WT	L049 & L050	55	1000
T-DNA	L050 & J504	55	500

myb65, Salk_118611

	Oligo	T [°C]	bp
WT	J056_LP & J057_RP	56	1000
T-DNA	J504_LB & J057_RP	56	500
right border	J507_RB & J056_LP		

myb65, Salk_063552

	Oligo	T [°C]	bp
WT	J054_LP & J055_RP	56	1000
T-DNA	J504_LB & J055_RP	56	630
right border	J507_RB & J054_LP		

myb33, Salk_065473

	Oligo	T [°C]	bp
WT	J058_LP & J059_RP	56	1019
T-DNA	J504_LB & J059_RP	56	630
right border	J507_RB & J058_LP		

TAB. 2.9: HERGESTELLTE ÜBEREXPRIMIERENDE LINIEN.

A. thaliana Col-0 wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Für die Transformation wurde der Vektor pGPTV-BAR verwendet. Die in den Vektor klonierten cDNAs stehen unter der Kontrolle des 35S-Promotors, was zu einer konstitutiven Expression der transformierten Konstrukte führte.

Konstrukt	Linienbezeichnung	Kommentar
MYB101 NESmut, BSmut	101-12	15 unabhängige Linien verfügbar
MYB101 BSmut	101 BSmut	4 unabhängig Linien verfügbar

2.16 BIOINFORMATISCHE METHODEN

Im Internet gibt es diverse Computerprogramme und Datenbanken, die Informationen zu Genen, Proteinen, Aminosäure- und Nucleotidsequenzen zur Verfügung stellen. Über die Datenbank der „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) können bekannte Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen erfragt werden. Des Weiteren wurde mit NCBI Literaturrecherche durchgeführt, wie auch mit den Internetseiten <http://scholar.google.de/>, <http://highwire.stanford.edu/> und <http://www.jbc.org/current.shtml>.

Mit BLAST (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) wurden unbekannte Sequenzen auf Nukleotid- oder Aminosäureebene mit bekannten Sequenzen verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Mit <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> konnten mehrere bekannte Aminosäure- oder Nucleotidsequenzen miteinander verglichen werden.

Die Internetseite http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html diene dazu, in Sequenzen auf Nukleotidebene Polyadenylierungssignale zu bestimmen.

Mit dem Programm „Primer3“ wurden Oligonucleotide erstellt (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Für die beim Salk Institut bestellten T-DNA-Insertionsliniern von *A. thaliana* konnte mittels der Internetseite des Instituts <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> die Insertionsstelle der T-DNA bestimmt werden sowie Oligonucleotide erstellt werden, die zur Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien diene.

Die Seite <http://www.arabidopsis.org/> biete viele Informationen und bioinformatische Programme, zu Analyse von *A. thaliana*.

Die Internetseite der Universität Köln <http://brenda.uni-koeln.de> enthält zahlreiche Informationen zu vielen verschiedenen Enzymen.

3. ERGEBNISSE

3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM EXPORTREZEPTOR XPO1

Importin β Transportrezeptoren sind in eine Vielzahl von Kerntransportmechanismen involviert. Zur Familie der Importin β Rezeptoren gehören die für den Kernimport zuständigen Importine, sowie die für den Kernexport verantwortlichen Exportine (GORLICH und KUTAY 1999; MATAJ und ENGLMEIER 1998; WEIS 1998). Zu den Exportfaktoren zählt auch Exportin1 (XPO1). In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) erkennt XPO1 das Leucin-reiche Kernexport Signal (NES, *nuclear export signal*) in Proteinen, die aus dem Zellkern heraus transportiert werden müssen (FORNEROD *et al.* 1997). In dem HIV-1 Rev Protein sowie in dem zellulären Protein Kinase A Inhibitor PKI konnte die NES zum ersten Mal beschrieben werden (FISCHER *et al.* 1995; WEN *et al.* 1995). XPO1 vermittelt, nachdem es ein Cargoprotein sowie RanGTP gebunden hat, die Bindung zu den Nukleoporinen und erleichtert somit den Kernexport seines Cargoproteins. Nach erfolgter Translokation ins Zytoplasma wird GTP am Ran hydrolysiert und der Exportkomplex aus XPO1 und Cargoprotein dissoziiert. Die Hydrolyse wird katalysiert durch das Ran-bindende Protein 1 (RanBP1) und das Ran-spezifische GTPase-aktivierende Protein (RanGAP). Die Dissoziation des Exportkomplexes führt zum Freilassen des Cargoprotein ins Zytoplasma (FORNEROD *et al.* 1997; KUTAY *et al.* 1997; REXACH und BLOBEL 1995).

3.1.1 □ ANALYSE VON T-DNA INSERTIONSLINIEN FÜR *xpo1a* UND *xpo1b*

In *A. thaliana* existieren zwei Gene, die für ein Exportin1 kodieren: *XPO1A* (At5g17020) und *XPO1B* (At3g03110). Zur genaueren Analyse der beiden Gene für *XPO1* wurden T-DNA Insertionslinien der GabiKat (GK) Population (ROSSO *et al.* 2003) untersucht. Für *XPO1A* wurde die Linie GK 151C08 verwendet und für *XPO1B* wurde die Linie GK 156D08 untersucht. Samen dieser Linien wurden auf Erde ausgebracht und auf Insertion der T-DNA untersucht. Zur genotypischen Analyse wurde aus Blattmaterial der zu untersuchenden Pflanzen zunächst genomische DNA isoliert. Genspezifische Oligonukleotide, welche die T-DNA flankierten, sollten, sofern eine Insertion der T-DNA in beiden Genen vorlag, kein Fragment amplifizieren. Die Kombination aus *left border* Oligonukleotid, welches an der *left border* der T-DNA lokalisiert war, und genspezifischem Oligonukleotid diente zum Nachweis der T-DNA Insertion.

Für alle untersuchten *knock out* Linien für *xpo1a* und *xpo1b* konnten homozygote Pflanzen isoliert werden (Abb. 3.1). Aus 100 mg Blattmaterial dieser T-DNA Insertionspflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert, die für eine RT-Reaktion mit anschließender PCR zum Nachweis von

Transkript eingesetzt wurde. Für die Linie GK 151C08 konnte kein Transkript für *XPO1A* nachgewiesen werden. In Col-0 Pflanzen war es hingegen nachweisbar (Abb. 3.2). Für *XPO1B* war es weder möglich Transkript in Col-0 cDNA noch in cDNA von Pflanzen der Linie GK 156D08 nachzuweisen.

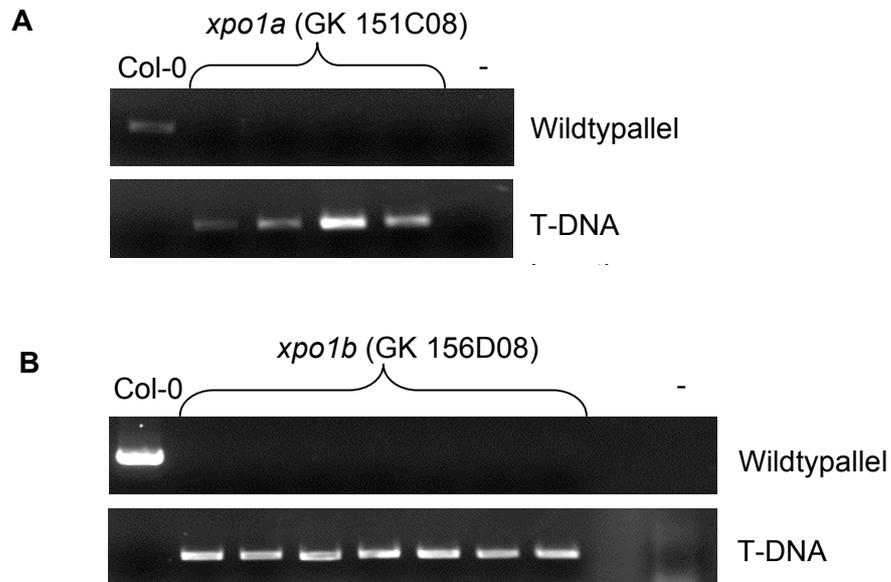


ABB. 3.1: ANALYSE DES GENOTYPS DER T-DNA INSERTIONSLINIEN FÜR *xpo1a* UND *xpo1b*.

Genomische DNA wurde isoliert und mittels genspezifischer bzw. T-DNA spezifischer Oligonukleotide auf Insertion der T-DNA in beiden Genen für *XPO1A* (A) und *XPO1B* (B) untersucht. Die Analyse der amplifizierten Fragmente erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Aufgetragen wurden je 10 μ l pro Ansatz.

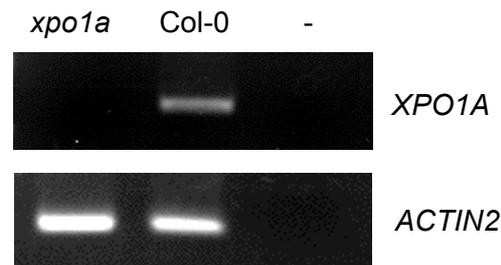


ABB. 3.2: NACHWEIS VON *XPO1A* TRANSKRIPT IN DER T-DNA LINIE GK 151C08.

Aus 100 mg Blattmaterial von Col-0 Pflanzen bzw. Pflanzen mit T-DNA Insertion im *XPO1A*-Gen wurde Gesamt-RNA isoliert, die mittels RT-Reaktion und einem OligodT Oligonukleotid zur Synthese von cDNA diente. Zum Nachweis von Transkript wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet. Als Kontrolle wurde *ACTIN2* aus der cDNA amplifiziert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1 % Agarosegel und pro Ansatz wurden 10 μ l aufgetragen.

Pflanzen mit Insertion der T-DNA in beiden Genen für *XPO1A* bzw. *XPO1B* wurden des weiteren für phänotypische Untersuchungen verwendet. Im Folgenden wird die Bezeichnung der Genotypen verwendet, d.h. Pflanzen mit T-DNA Insertion für *xpo1a* haben den Genotyp aaBB. Das kleine a steht in diesem Fall für eine Integration der T-DNA in beiden *XPO1A* Allelen. Ein großer Buchstabe deutet auf ein Wildtypallel hin. B verdeutlicht somit das Wildtypallel für *XPO1B*.

Die T-DNA Insertionslinie für *XPO1A* ergab keine phänotypischen Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp Col-0. Für Pflanzen mit T-DNA Insertion in beiden *XPO1B*-Genen (Abb. 3.3 C, Genotyp AAbb) wurden dagegen morphologische Unterschiede festgestellt. Bei Wildtyp Col-0 Pflanzen (Abb. 3.3 A, Genotyp AABB) und solchen Pflanzen, die nur in einem *XPO1B*-Gen eine T-DNA integriert hatte (Abb. 3.3 B, Genotyp AABb), betrug die Internodienlänge etwa 22 bis 25 mm. Eine Insertion der T-DNA in beiden *XPO1B*-Genen resultierte in einer Internodienlänge von etwa 13 bis 15 mm, wodurch diese Pflanzen buschiger wirkten als der Wildtyp Col-0.

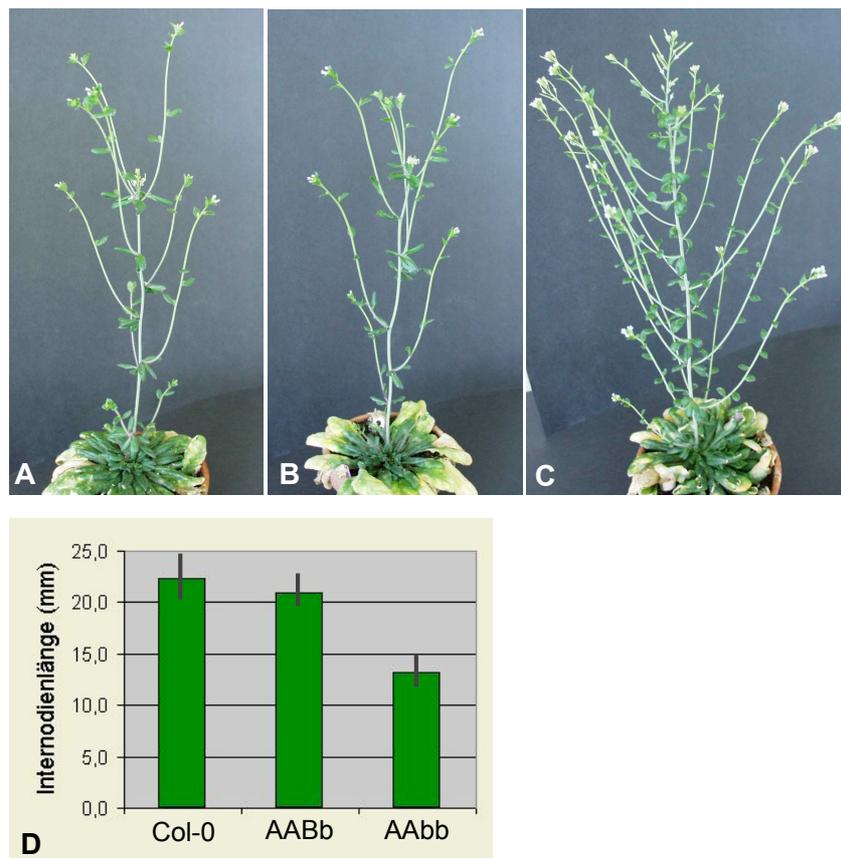


ABB.3.3: ANALYSE DES PHÄNOTYPS DER *xpo1b* T-DNA INSERTIONSLINIE GK 156D08.

Die Pflanzen wurden vollständig unter Kurztagbedingungen angezogen (A bis C). Repräsentative Aufnahmen zeigen: (A) Col-0, Genotyp AABB, (B) heterozygote *xpo1b* Pflanze, Genotyp AABb und (C) homozygote *xpo1b* Pflanze, Genotyp AAbb. Nach Ausbildung der Infloreszenz wurden die Abstände zwischen den Internodien bestimmt (D).

Da eine T-DNA Insertion in beiden *XPO1A*-Genen zu keinem auffälligen Phänotyp der Pflanzen führte, wurde diese Linie mit der T-DNA Insertionslinie für *XPO1B* gekreuzt. Das Ziel war die Isolierung von Pflanzen mit dem Genotyp aabb, d.h. eine doppelt homozygote Linie für *xpo1a xpo1b*. Es war jedoch nicht möglich Pflanzen mit diesem Genotyp zu identifizieren. Charakterisiert wurden nur solche Pflanzen, die heterozygot für *xpo1a* und *xpo1b* waren, also den Genotyp AaBb hatten, bzw. heterozygot für *xpo1a* und homozygot für *xpo1b* waren und somit den Genotyp Aabb hatten. Pflanzen mit dem Genotyp aaBb konnten ebenfalls nicht isoliert werden. Es stellte sich daher die Frage, ob ein Problem mit der Keimung potentieller homozygoter Pflanzen, also aabb Pflanzen, vorlag oder ob in der Entwicklung der Schoten und in der damit verbundenen Samenbildung Probleme auftraten.

Zur Untersuchung der Keimungsrate wurden Samen einer Selbstung von Pflanzen des Genotyps Aabb steril auf ½ MS Festmedium ausgesät. Auf insgesamt drei quadratischen Kultivierungsplatten wurden je 100 Samen im Abstand von einem cm zum nächsten Samen einzeln ausgebracht. Die Samen wurden für drei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend im Lichtraum unter Langtagbedingungen angezogen. Das Kreuzungsschema in Tab. 3.1 verdeutlicht, dass ¼ der Samen von geselbsteten Pflanzen mit dem Genotyp Aabb den Genotyp aabb haben sollten. Sollte eine Letalität von aabb-Pflanzen vorliegen, würden etwa ¼ der Samen nicht zur Keimung kommen. Es keimten jedoch alle 300 Samen.

TAB. 3.1: GENOTYPEN VON NACHKOMMEN NACH SELBSTUNG VON PFLANZEN DES GENOTYPS Aabb.

Die Gameten von Pflanzen mit dem Genotyp Aabb tragen die beiden möglichen Genotypen Ab und ab. Dargestellt sind die Genotypen der Nachkommen von Aabb-Pflanzen.

	Ab	ab
Ab	AAbb	Aabb
ab	Aabb	aabb

Es erfolgte eine phänotypische Analyse der Pflanzen mit den Genotypen AaBb bzw. Aabb. Dabei stellte sich heraus, dass Linien dieser Genotypen, Auffälligkeiten in der Entwicklung ihrer Schoten zeigten. Während die Schoten von Col-0 Pflanzen durchschnittlich 14 bis 16 mm lang waren, erreichten die Schoten von Pflanzen mit den Genotypen AaBb bzw. Aabb lediglich eine Gesamtlänge von durchschnittlich acht bis zehn mm. Die Schoten von Pflanzen mit T-DNA Insertion nur für *XPO1A* (aaBB) bzw. nur für *XPO1B* (AAbb) unterschieden sich nicht in ihrer Länge im Vergleich zu Col-0. (Abb. 3.4, A)

Zusätzlich wiesen Pflanzen der Genotypen AaBb bzw. Aabb eine verminderte Anzahl an Samen auf. Eine Wildtyp Col-0 Pflanze besaß durchschnittlich pro Schote 50 bis 60 Samen, im Gegensatz dazu enthielt eine Pflanze mit dem Genotype AaBb bzw. Aabb zehn bis 15 Samen pro Schote (Abb. 3.4, B). Die Anzahl der entwickelten Samen in den Schoten der *xpo1a xpo1b* Linien wurden verglichen mit der Anzahl der abortierten Samen (Abb. 3.4, C). In Linien des Genotyps AaBb waren etwa 20 bis 24 Samen abortiert bzw. 15 bis 20 abortierte Samen in Linien mit dem Genotyp Aabb. Alle Quantifizierungen wurden an Hand von entfärbten Schoten (mit 70 % Ethanol) vorgenommen.

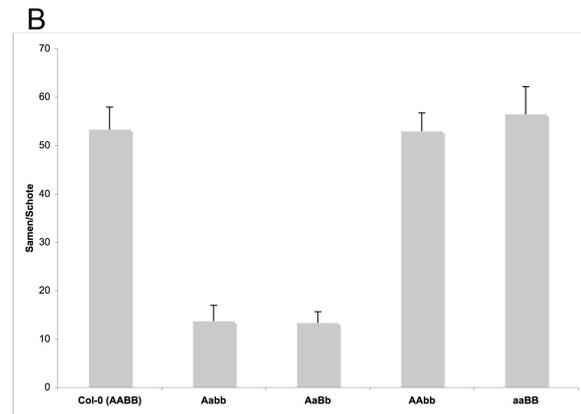
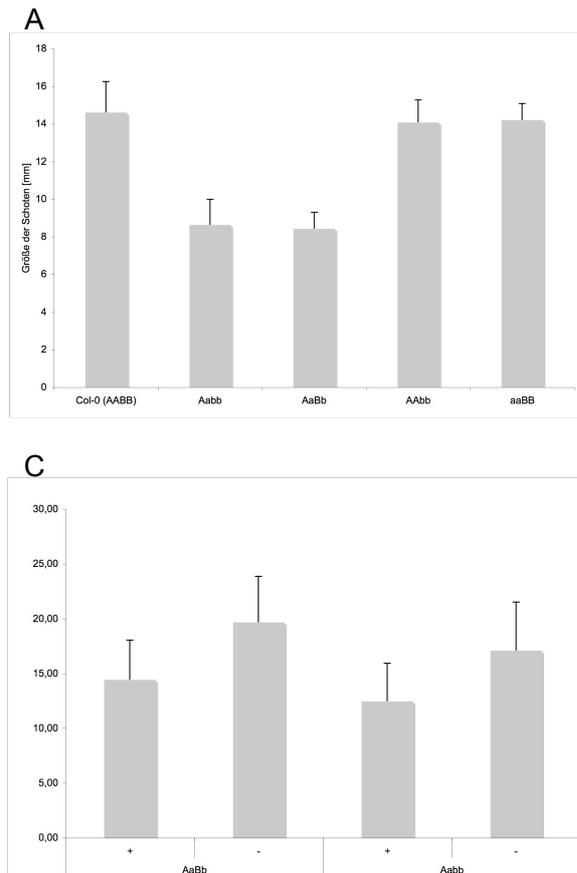


ABB. 3.4: ANALYSE DER SCHOTEN VON *xpo1a* *xpo1b* LINIEN.

Die Länge der Schoten (A) sowie die Anzahl der Samen pro Schote wurde bestimmt (B). Ermittelt wurden die Werte an Hand von Schoten von Wildtyp Col-0 (AABB), *xpo1a xpo1b* Linien (Aabb und AaBb), sowie den homozygoten Insertionslinien für *xpo1a* (Genotyp aaBB) und *xpo1b* (Genotyp AAbb). (C) Samen pro Schote (+) im Vergleich zu abortierten Samen (-) in *xpo1a xpo1b* Linien (Aabb und AaBb).

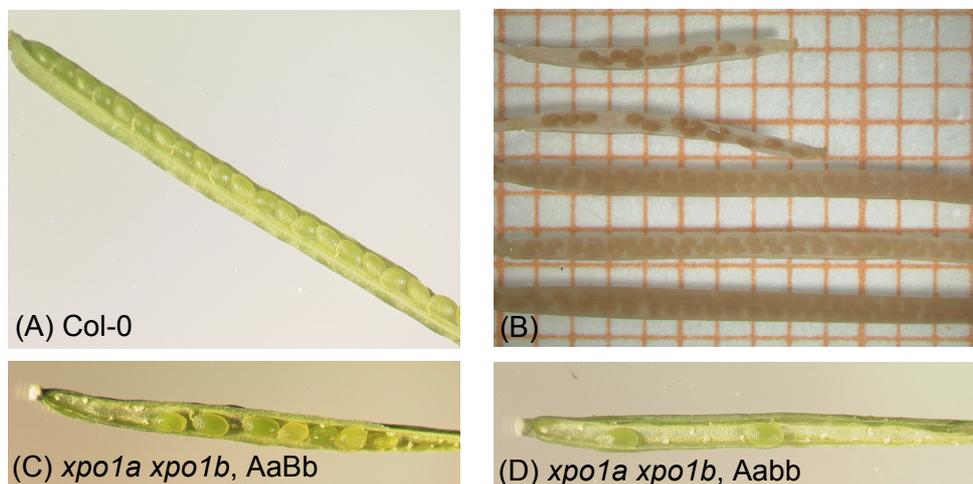


ABB. 3.5: KREUZUNGSMUTANTEN VON *xpo1a* UND *xpo1b* MIT DEN GENOTYPEN AaBb SOWIE Aabb ZEIGEN EINEN DEFENKT DER SAMENENTWICKLUNG IN DEN SCHOTEN.

Dargestellt sind Schoten von Pflanzen, die zunächst acht Wochen im Kurztag aufgezogen wurden, um nach erfolgtem Genotypisieren anschließend unter Langtagbedingungen Schoten bilden zu können. Schoten vom Wildtyp Col-0 (A) mit dem Genotyp AABB sowie von *xpo1a xpo1b* Doppelmutanten mit den Genotypen AaBb (C) und Aabb (D) sind abgebildet. (B) zeigt die mit 70 % EtOH entfärbten Schoten von Aabb, AaBb, AAbb, aaBB und AABB-Pflanzen (von oben nach unten).

Neben der Quantifizierung der Länge der Schoten sowie der Anzahl der Samen in *xpo1a xpo1b* (Genotyp AaBb und Aabb) Linien, wurden auch Aufnahmen der Schoten erstellt (Abb. 3.5). Dazu wurde die Schote am Stängelansatz vom Stängel getrennt und mit einem Skalpell wurde ein kleiner Keil in das Septum geschnitten. Die Schote wurde dann mit einer Pinzette fixiert und mit einer weiteren Pinzette wurde das Septum vollständig entfernt. Daraufhin war die eine Hälfte der Schote mit den am Replum aufgereihten Samen zu sehen. In Col-0 (Abb. 3.5, A) sind die Samen ohne Lücke dicht nebeneinander aufgereiht. Im Gegensatz dazu war ersichtlich, dass die *xpo1a xpo1b* Linien (Genotyp AaBb, Abb. 3.5, C und Genotyp Aabb, Abb. 3.5, D) in der kürzeren Schoten eine deutlich geringere Anzahl an entwickelten Samen aufwiesen. Die mit 70 % Ethanol entfärbten Schoten (Abb. 3.5, B) verdeutlichen zusätzlich auf dem Hintergrund von Millimeterpapier, den Unterschied in der Länge der Schoten und die verringerte Anzahl an Samen pro Schote.

Wildtyp Col-0, homozygote T-DNA Insertionslinien für *xpo1a* und *xpo1b* sowie *xpo1a xpo1b* Linien wurden für acht Wochen im Kurztag aufgezogen. In Abb. 3.6 ist zu erkennen, dass die T-DNA Insertionslinien deutlich kleinere Blätter aufwiesen im Vergleich zu Col-0.

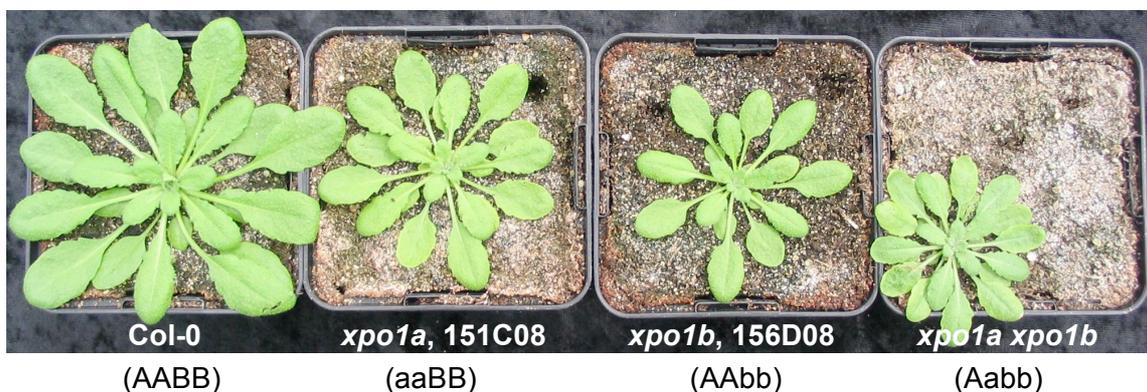


ABB. 3.6: PHÄNTYPISCHE ANALYSE VON *xpo1a*, *xpo1b* UND *xpo1a xpo1b* PFLANZEN.

Bezeichnenden Aufnahmen von Col-0, *xpo1a*, *xpo1b* sowie *xpo1a xpo1b* wurden von acht Wochen alten, im Kurztag aufgezogenen Pflanzen erstellt. Angegeben sind die Genotypen der Pflanzen und die Bezeichnung der verwendeten GK Linien.

3.2 ISOLIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN VON XPO1 MITTELS EINES HEFE TWO-HYBRID SCREENS

Zur Identifizierung und Isolierung neuer Interaktionspartner von XPO1 in *A. thaliana* wurde ein Hefe 2-hybrid (Y2H) Screen durchgeführt (Haasen et al. (2008), in Vorbereitung), in dem XPO1A als *bait* und eine zuvor hergestellte cDNA-Bibliothek (s. 2.4.2) aus *A. thaliana* als *prey* verwendet dienten. Der Screen führte zur Isolierung einer Vielzahl verschiedener Proteine, die eine spezifische Interaktion mit dem Kernexportrezeptor aufwiesen und operational als XPO1-interagierende Proteine (XIPs) bezeichnet werden. Die Sequenz der isolierten Interaktionspartner von XPO1 wurde analysiert und aufgrund von putativen Funktionen oder konservierten Domänen erfolgte die Einteilung der Interaktionspartner in sechs verschiedene Untergruppen: (1) Nukleoporine, (2) Proteine, die in nukleozytoplasmatische Partitionierung involviert sind, (3) Proteine, die für den Kernexport von ribosomalen Untereinheiten verantwortlich sind, (4) RNA-bindende Proteine, (5) Transkriptionsfaktoren sowie (6) weitere regulatorische Proteine.

Die im Screen isolierten cDNAs der XIPs waren in den seltensten Fällen Vollängen cDNA Klone. Für ausgewählte Proteine wurden genspezifische Oligonukleotide entworfen, mittels derer dann die Vollängen cDNAs aus der bereits für den Screen verwendeten cDNA-Bibliothek heraus amplifiziert wurde.

Die Aminosäuresequenz der ausgewählten Proteine wurde auf putative NES untersucht und durch genspezifische Oligonukleotide wurden Deletionen der jeweiligen cDNAs erstellt. Diese Deletionen sowie die Vollängen cDNAs der Proteine wurden im Y2H-System durch heterologe Koexpression mit XPO1 auf Interaktion untersucht.

Mittels der hergestellten Deletionen konnte die putative NES auf Aminosäureebene der zu untersuchenden Proteine genauer lokalisiert werden. Sofern eine Inhibition der Interaktion mit XPO1 im Y2H-System statt fand, erfolgte eine Punktmutation ausgewählter Aminosäuren in. Hierzu wurden spezifisch durch Oligonukleotide einzelne Basenaustausche eingefügt, die zu einem Austausch in den meisten Fällen von Leucin zu Alanin führten. Die Punktmutation wurde auf der Ebene der Vollängen cDNAs vorgenommen und diese in der putativen NES mutierten Klone erneut mit XPO1 in Hefen koexprimiert. Konnte die NES erfolgreich mutiert werden, trat keine Interaktion mit XPO1 im Y2H-System auf.

3.2.1 □ INTERAKTION VON MYB101 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES

Der *Screen* nach möglichen Interaktionspartnern für XPO1 ergab unter anderem, dass der MYB Transkriptionsfaktor MYB101 eine Interaktion mit dem Exportrezeptor eingehen konnte. Die Struktur von MYB101 ist dargestellt in Abb. 3.7. Eingezeichnet sind die verschiedenen bekannten Domänen, wie die R2R3-MYB-Bindedomäne, das identifizierte Kernimport Signal NLS sowie drei im Folgenden charakterisierte Kernexport NES.

Die Volllänge cDNA von MYB101 wurde aus der cDNA-Bibliothek (s. 2.4.2) isoliert. Zur Lokalisierung der NES in dem Transkriptionsfaktor musste die cDNA in den Hefe Vektor pB42AD kloniert werden, welcher in seiner *multiple cloning site* nur die Restriktionsschnittstellen für EcoRI sowie XhoI enthält. Die cDNA von MYB101 besitzt interne Schnittstellen für diese Restriktionsendonukleasen, daher wurde zunächst nur der N-terminale Teil der cDNA von MYB101 im Y2H-System mit XPO1 koexprimiert. Als Negativkontrollen wurden die Deletionen von MYB101 im pB42AD mit dem Leervektor pGilda im Hefestamm koexprimiert. Eine schwache Blaufärbung der Hefekolonien deutet daraufhin, dass in den Negativkontrollen eine Transaktivierung der β -Galaktosidase erfolgte. Die in MYB101 vorhandene NLS resultierte anscheinend in einer hohen Konzentration des Proteins im Zellkern der Hefen, was vermutlich die Transaktivierung der β -Galaktosidase in den Negativkontrollen hervorgerufen haben könnte. Nachdem eine Punktmutation der NLS vorgenommen worden war, trat keine Transaktivierung der β -Galaktosidase mehr auf. Alle weiteren untersuchten Deletionen und Punktmutationen von MYB101 wurden im Hintergrund der NLS Mutante des Transkriptionsfaktors vorgenommen.

Nachdem zahlreiche Deletionen des N-Terminus von MYB101 untersucht worden waren, wurde zunächst eine (NES1) von insgesamt drei putativen NES punktmuiert (Abb. 3.8). Nach Koexpression dieser Mutante mit XPO1 trat weiterhin eine Interaktion mit dem Exportrezeptor auf. Diese war jedoch schwächer, als die des Wildtyp-Proteins (Abb. 3.8, A und B). Darauf wurden auch die NES2 sowie die NES3 mutiert. Proteine, die jeweils nur eine mutierte NES enthielten, zeigten weiterhin eine Interaktion mit XPO1 (Abb. 3.8, C und D). Erst eine Mutante von MYB101, die in allen drei putativen Kernexportsignalen punktmuiert war, wies keine Interaktion mit XPO1 mehr auf (Abb. 3.8, E). Zur vollständigen Inhibition der Interaktion zwischen MYB101 und XPO1 wurden drei Aminosäurereste (AS-Reste) pro NES punktmuiert. Die jeweiligen Negativkontrollen, d.h. die Koexpression der untersuchten Mutante sowie des Leervektors pGilda, zeigten keine Transaktivierung der β -Galaktosidase (Abb. 3.8).

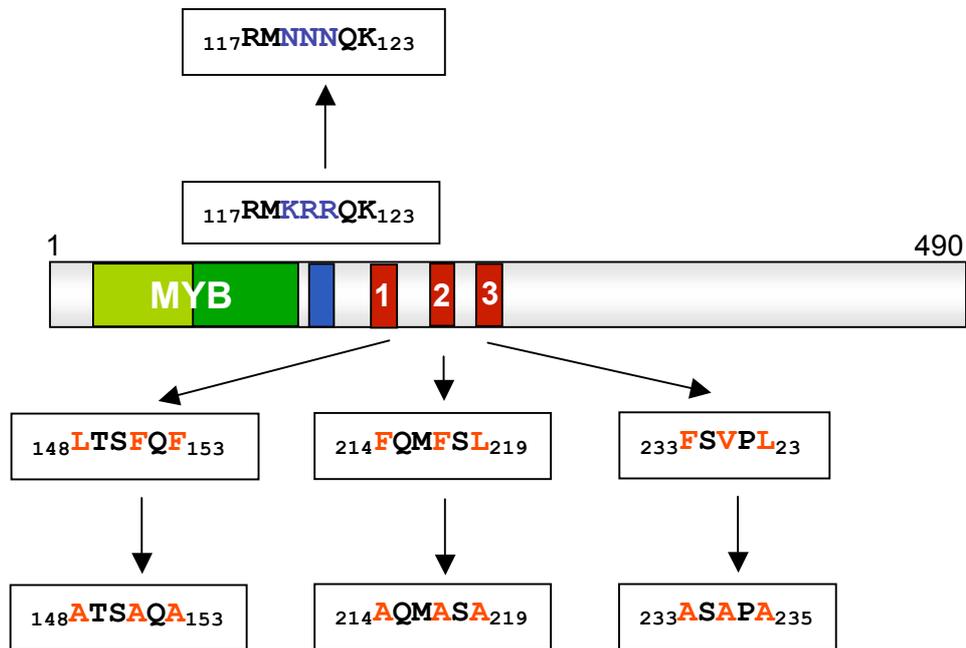


ABB. 3.7: PUNKTMUTATIONEN VON MYB101.

Dargestellt ist die Struktur von MYB101 (490 AS-Reste) mit den bekannten Domänen. Direkt angrenzend an die R2R3-MYB-Domäne (MYB, hell- und dunkelgrüner Kasten) befindet sich die NLS (blauer Kasten). Zur Punktmutation der NLS war es notwendig die AS-Reste Lysin bzw. Arginin gegen Asparagin auszutauschen (blaue Buchstaben). Im N-terminalen Abschnitt befinden sich des Weiteren die drei putativen, unabhängigen NES (rote Kästen, nummeriert von eins bis drei). Zur Herstellung der Export-negativen Mutante von MYB101, wurden pro NES jeweils drei hydrophobe AS-Reste gegen Alanin auszutauschen (rote Buchstaben).

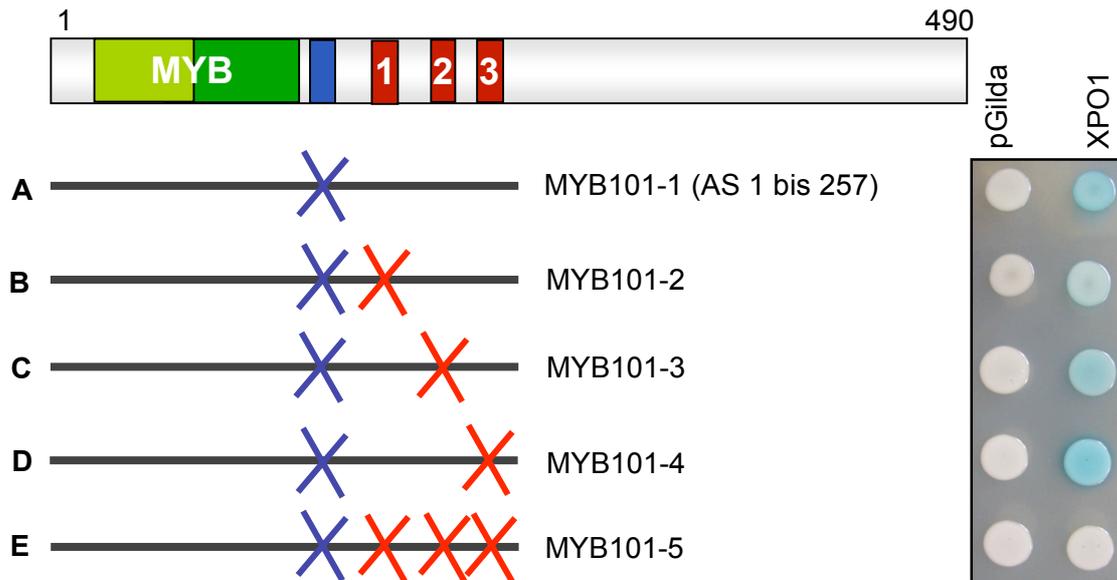


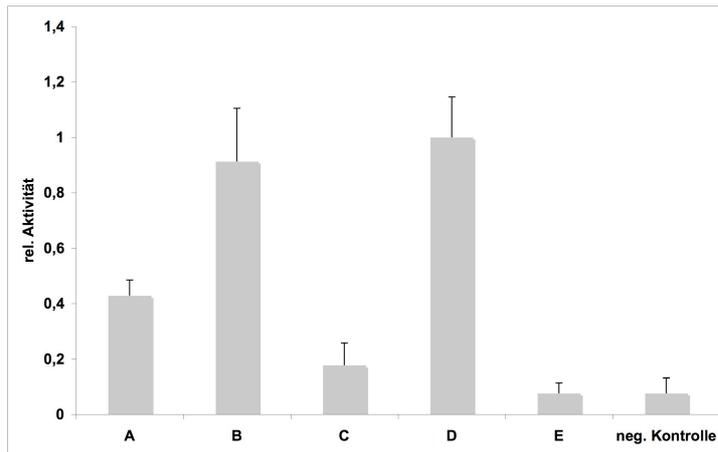
ABB. 3.8: ANALYSE VON DELETIONEN UND PUNKTMUTANTEN VON *MYB101* IM Y2H-SYSTEM.

Unterschiedliche cDNA-Fragmente von MYB101 wurden in den Vektor pB42AD kloniert und somit die kodierenden Peptide an die B42-Aktivierungsdomäne fusioniert. Die Konstrukte wurden mit XPO1, welches in den Vektor pGilda kloniert und damit an eine LexA DNA-Bindedomäne fusioniert war, im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] koexprimiert. Eine Interaktion der Fusionsproteine führte zu einer Transaktivierung des *lacZ*-Gens. Die Struktur von MYB101 mit den verschiedenen Domänen ist oben in der Abb. dargestellt. Die Analyse der Deletionen und Punktmutationen von MYB101 erfolgte vor dem Hintergrund der NLS-Mutante des Transkriptionsfaktors (blaues Kreuz weist auf Mutation in der NLS hin). Die Mutation in den NES1 bis 3 wird durch ein rotes Kreuz markiert.

3.2.2 □ QUANTITATIVE ANALYSE DER β -GALAKTOSIDASE AKTIVITÄT

Zur Quantifizierung der Interaktion von Wildtyp MYB101 und den NES-Mutanten des Transkriptionsfaktors mit XPO1 wurde ein ONPG-Assay durchgeführt. Die Interaktion mit dem höchsten gemessenen Werte wurde gleich eins gesetzt und die anderen Interaktionen dazu ins Verhältnis gesetzt.

Für die unter Abb. 3.8 abgebildeten Konstrukte A bis E von MYB101 wurde die Aktivität der β -Galaktosidase photometrisch ermittelt. Auch die Quantifizierung der Interaktionen zeigte, dass die Mutation aller drei putativen NES notwendig ist, um einen exportnegativen Transkriptionsfaktor MYB101 herzustellen (Abb. 3.9).



	pB42AD	pGilda
A	101-1	XPO1
B	101-2	XPO1
C	101-3	XPO1
D	101-4	XPO1
E	101-5	XPO1
neg. K.	x	-

ABB. 3.9: QUANTIFIZIERUNG DER INTERAKTIONSEXPERIMENTE IM Y2H-SYSTEM. RELATIVE β -GALAKTOSIDASEAKTIVITÄT ALS MAß FÜR DIE INTERAKTION DER MYB101-KONSTRUKTE MIT XPO1.

In der Tabelle dargestellt sind die Konstrukte, die in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ], zusammen mit XPO1 kotransformiert wurden und die bereits qualitativ analysiert wurden (Abb. 3.8). Die Negativkontrolle ist ein Durchschnittswert, ermittelt aus alle Negativkontrollen, die zu jedem Konstrukt gemessen wurden, d.h. die Koexpression von Konstrukt und leerem pGilda-Vektor. Pro Messung wurden der Mittelwert und der mittlere Fehler aus neun Messungen berechnet. Die Buchstaben im Balkendiagramm entsprechenden denen in der Tabelle und denen in Abb. 3.8. Der höchste gemessen Wert wurde gleich eins gesetzt und die anderen Werte wurden angepasst.

3.2.3 \square *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON MYB101 IN BY-2 PROTOPLASTEN

Zur weiteren Charakterisierung des MYB101 Transkriptionsfaktors wurden die Lokalisierung des Wildtyp Proteins, der importnegativen sowie der exportnegativen Mutante von MYB101 in BY-2 Protoplasten analysiert. Dazu wurden der N-Terminus (AS 1 bis 257) und die NLS-Mutante des N-Terminus am 5'Ende der cDNA mit GFP fusioniert (Abb. 3.10). Die Vollängen cDNA (Wildtyp-Protein und NES-Mutante) von MYB101 wurde am 3'Ende mit GFP fusioniert (Abb. 3.10). Die Unterschiede in der Orientierung der Fusionierung von GFP an die cDNA von MYB101 ergaben sich auf Grund der Restriktionsschnittstellen in den verwendeten Vektoren, 3'GFP und 5'GFP. MYB101 besitzt in seiner cDNA interne Restriktionsschnittstellen für EcoRI und XhoI, die sich nahe des 3'Endes der cDNA befinden. Daher wurde das 5'Ende von MYB101 mittels der Schnittstellen für EcoRI und XhoI in den 5'GFP Vektor kloniert werden. Zur Klonierung in den 3'-GFP Vektor mussten jedoch andere Restriktionsschnittstellen verwendet werden, da die beiden zuvor verwendeten Schnittstellen nicht in der *multiple cloning site* des Vektors vorkamen.

Die Darstellung der fluoreszierenden Protoplasten erfolgt in Falschfarben, da diese eine feinere Abstufung ermöglichen und somit auch schwächere Signal sichtbar sind, die bei einer

monochromen Darstellung der Fluoreszenz nicht möglich wären. Als Falschfarbeneinstellung wurde *glow over*, *glow under* gewählt. Diese Einstellung ermöglicht eine Darstellung der Signale im Bereich von schwarz für kein Signal über rot, gelb bis weiß. Starke Signale erscheinen in gelblichen-weißen Abstufungen, schwache Signale sind an rötlichen Abstufungen erkennbar.

Der N-terminale Teil von MYB101 (AS 1-257) wies eine deutliche Lokalisierung im Zellkern von BY-2 Protoplasten auf (Abb. 3.10, B 1). Die NLS Mutante dieser Deletion (AS 1-257) besitzt ein punktmutiertes Importsignal (K119N, R120N, R121N) und war daher vermehrt im Zytoplasma lokalisiert, da ein funktionales Signal für den Kernimport in diesem Protein fehlt. Weiterhin ist jedoch eine starke Lokalisierung im Zellkern erkennbar (Abb.3.10, B 2).

Das Wildtyp Vollängenprotein von MYB101 zeigte eine ähnliche Verteilung wie die NLS Mutante. Es war schwach im Zytoplasma lokalisiert und deutlich stärker im Zellkern (Abb. 3.10, B 3). Die NES Mutante von MYB101 ist in allen drei bereits charakterisierten Exportsignalen punktmutiert und war in BY-2 Protoplasten hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Abb. 3.10, B 4).

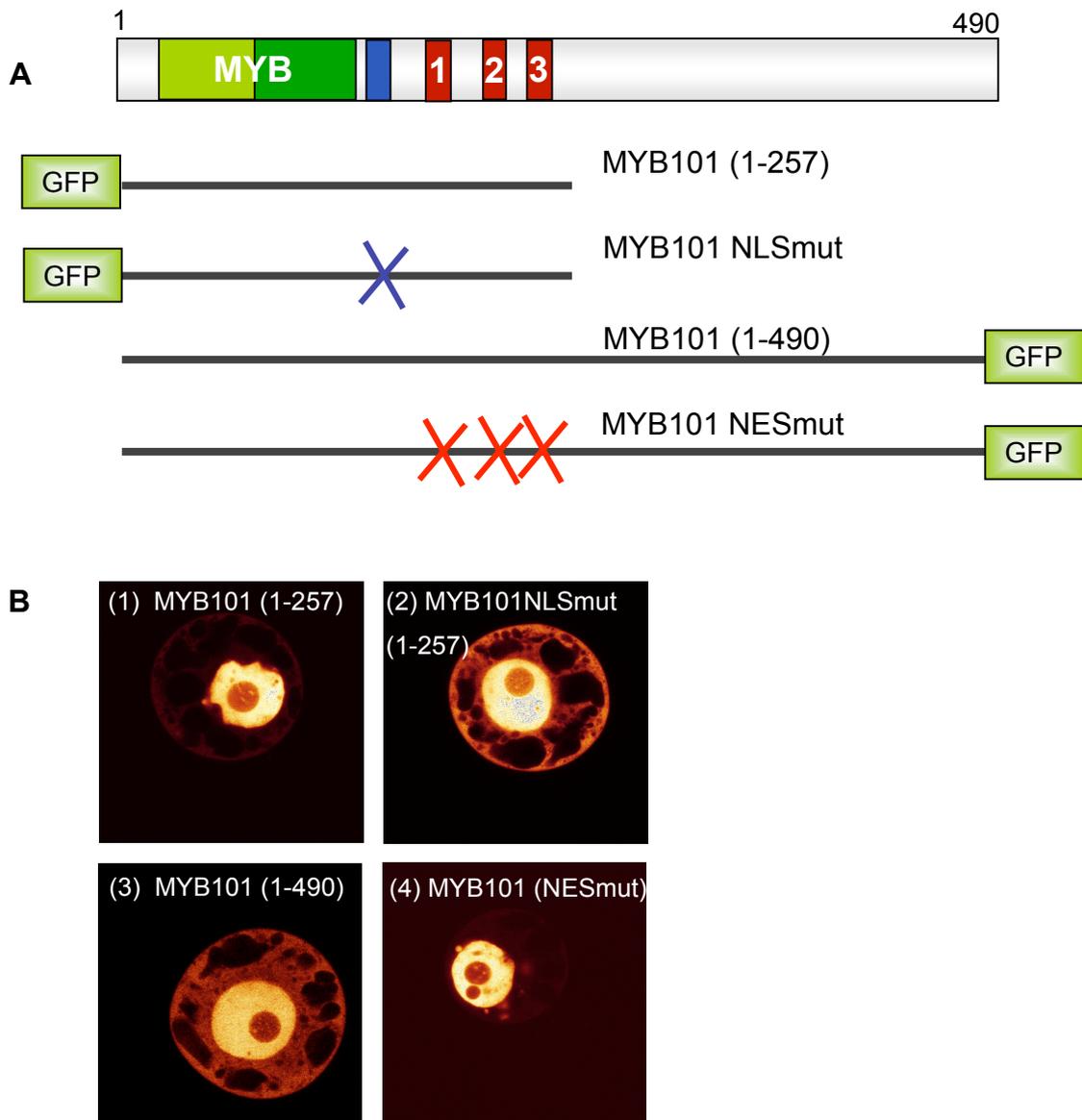


ABB. 3.10: *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON GFP-FUSIONSPROTEINEN IN BY-2 PROTOPLASTEN.

Protoplasten einer BY-2 Kultur wurden transient mit GFP-Fusionsproteinen transfiziert und die Lokalisierung der Fluoreszenz von GFP mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops detektiert. Dargestellt in (B) sind (1) MYB101 (1-257), (2) MYB101 NLSmut (1-257), (3) MYB101 (1-490), (4) MYB101 NESmut (1-490). Unter (A) sind die Struktur und ein Schema der transfizierten Konstrukte von MYB101 zu sehen.

3.2.4 □ ANALYSE DES KERNEXPORTS VON MYB101 IN PLANTA

Ein Gen an dessen Promotor der Transkriptionsfaktor MYB101 bindet ist bisher noch unbekannt. Lediglich die Zuordnung auf Grund der Sequenzhomologie zur Gruppe der so genannten GAMYBs ist möglich. In den nachfolgenden Abschnitten wird noch näher auf die Familie der GAMYBs eingegangen. In diesem Abschnitt steht zunächst die Analyse von MYB101 Fusionsproteinen *in planta* im Vordergrund, was zur Aufklärung möglicher Funktionen von MYB101 beitragen soll. Col-0 Pflanzen von *A. thaliana* wurden zunächst mit *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) vermittelter Transformation mit MYB101 YFP-Fusionskonstrukten transformiert. Untersucht wurde einerseits ein Konstrukt von MYB101, das eine Mutation in der miRNA-Bindestelle hatte (MYB101 miR-BSmut, Abb. 3.11, A, oranger Kasten). Andererseits wurde ein MYB101-Konstrukt transformiert, das neben der Mutation der drei unabhängigen Exportsignale (NES1 bis NES3) zusätzlich die mutierte miRNA-Bindestelle trug (MYB101 NESmut miR-BSmut). Beide Konstrukte wurden durch den 35S-Promotor reguliert. Die Mutation in der Bindestelle für die miRNA (miR-BS) sollte verhindern, dass die Expression des transformierten Konstrukts in der Pflanze auf diese Weise kontrolliert werden kann und somit sichergestellt werden konnte, dass es sich um tatsächlich *MYB101* überexprimierende Pflanzen handelte. Die miR-BS in MYB101 wurde bereits im Rahmen der Dissertation von Leonardo Alves Junior (2007) hergestellt. Die Sequenz der miRNA Bindestelle (Abb. 3.11, Kasten in orange) ist folgende:

```

          CTAGAGCTTCCTTCAAACCAAAGA
299      L E L P S N Q R      306
          CTAGAATTGCCAAGCAATCAAAGA

```

Die obere Sequenz entspricht der Wildtypsequenz der miRNA Bindestelle in MYB101. Die untere Sequenz ist die mutierte miRNA Bindestelle (ALVES-JUNIOR 2007). Die eingefügten Mutationen führten nicht zum Austausch von AS-Resten.

Als Selektionsmarker wurde ein Gen, das für *BAR* kodiert, zusammen mit den *MYB101*-Konstrukten in *A. thaliana* transformiert und somit konnte die T1-Generation mittels BASTA-Besprühung auf Transformanden selektioniert werden. Für das Konstrukt 35S_{pro}::MYB101 NESmut miR-BSmut konnten insgesamt 15 transformierte Linien isoliert werden. Für MYB101 miR-BSmut wurden vier überexprimierende Linien identifiziert. Verifiziert wurden diese Pflanzen zunächst mittels PCR. Hierbei wurde überprüft, ob eine stabile Transformation vorlag. Die Amplifizierung des transformierten Konstrukts erfolgte mittels genspezifischer 5'- und 3'-Oligonukleotide (Abb. 3.11). Alle 15 mit BASTA selektionierten Linien enthielten das Konstrukt 35S_{pro}::MYB101 NESmut, BSmut.

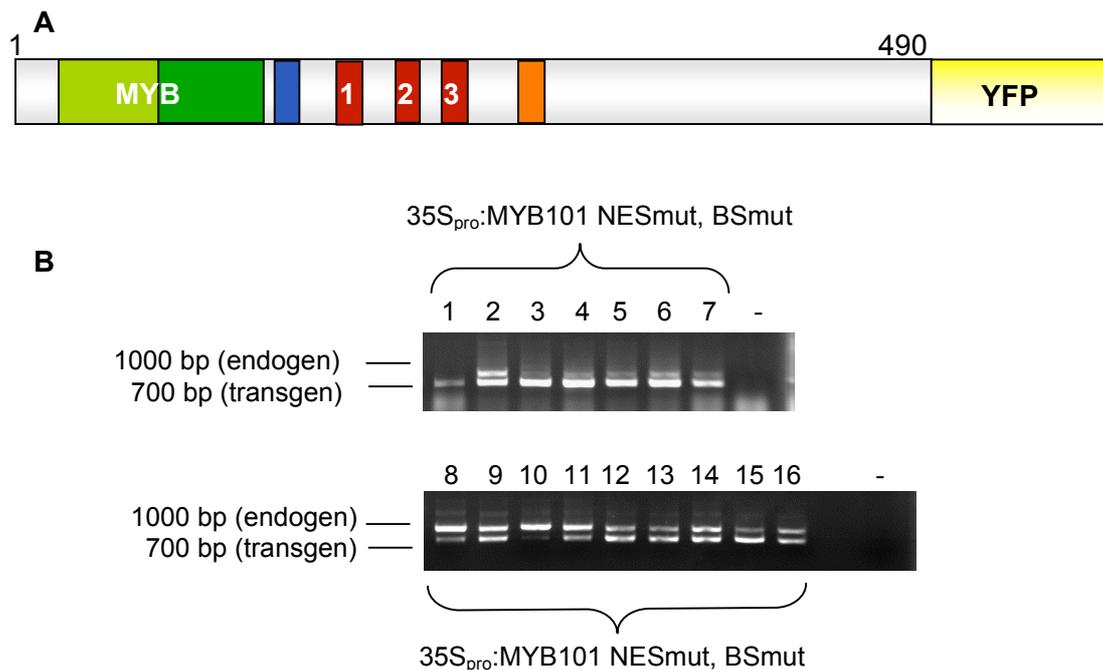


ABB. 3.11: NACHWEIS DER INSERTION VON 35S_{PRO}:MYB101NESMUT, BSMUT IN DAS GENOM VON *A. THALIANA*.

In der Abb. (A) ist die Struktur des Konstrukts abgebildet, dass in Col-0 transformiert wurde. Mutiert wurden die NES eins bis drei (Kästchen in rot) und die miRNA Bindestelle (Kasten in orange).

Die genomische DNA der mit BASTA selektierten Pflanzen wurde mittels PCR mit zwei genspezifischen Oligonukleotiden auf Integration der Konstrukts in das Genom von *A. thaliana* untersucht. Die amplifizierte DNA wurde auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Die 1000 bp Bande entspricht endogenem *MYB101*, die 700 bp große Bande entspricht transgenem *MYB101*.

Zum Nachweis von Transkript wurde RNA aus Blattmaterial *MYB101* NESmut, miRNA BSmut überexprimierender Pflanzen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Es ist bekannt, dass *MYB101*-Transkript in Blattmaterial von *A. thaliana* nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt (s. Abb. 1.5), was die schwache Bande in der Col-0 Kontrolle RT-PCR erklärt. Im Gegensatz dazu konnte in den *MYB101*-überexprimierenden Pflanzen eine deutlich höhere Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 3.12).

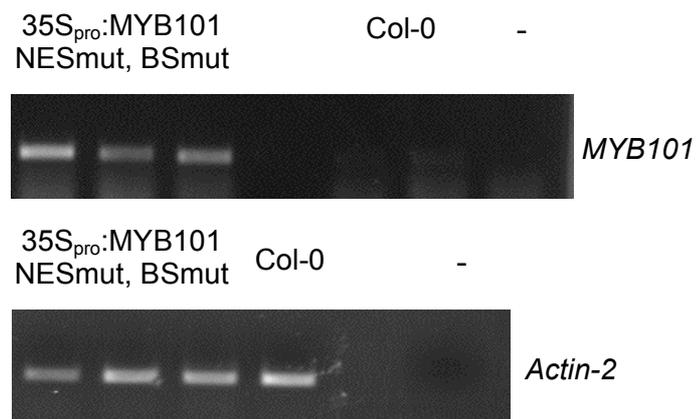


ABB. 3.12: EXPRESSIONSANALYSE DER *MYB101* NESMUT, BSMUT-ÜBEREXPRIMIERENDEN PFLANZEN.

Durch eine RT-PCR mit isolierter RNA aus *MYB101* NESmut, BSmut überexprimierenden Pflanzen konnte Transkript spezifisch nachgewiesen werden. Analysiert wurden zahlreiche Pflanzen. Stellvertretend ist das Ergebnis von drei Pflanzen abgebildet. In Col-0 wird *MYB101* nur sehr gering exprimiert. Als Positivkontrolle wurde *Actin-2* amplifiziert.

Das in *A. thaliana* transformierte Konstrukt von *MYB101* wurde zusätzlich am 3'Ende der cDNA mit YFP fusioniert. Diese Fusion ermöglicht eine Detektion des transkribierten und translatierten Konstrukts *in planta*.

Untersucht wurden die Wurzeln von sterilen, auf ½ MS-Medium angezogenen Keimlingen. Dieses Gewebe bietet sich für die Analyse der *in planta* Lokalisierung von *MYB101* an, da es aus nur wenigen Zellschichten besteht. Betrachtet wurden die Keimlinge im konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Für die *MYB101* NESmut, BSmut überexprimierenden Pflanzen konnte eine deutliche Lokalisierung im Zellkern der Zellen des Wurzelgewebes festgestellt werden (Abb 3.13, 1).

Die mit dem Konstrukt 35S_{pro}::*MYB101* miRNA BSmut transformierten Pflanzen wurden mittels Genotypisierung auf Insertion des Konstrukts in das Genom analysiert. Eine RT-PCR für diese Pflanzen konnte noch nicht durchgeführt werden. Die Expression und *in planta* Lokalisierung erfolgte wie für das Konstrukt 35S_{pro}::*MYB101* NESmut miRNA BSmut beschrieben in Keimlingen, die steril auf ½ MS-Festmedium angezogen wurden. Die miR BS-Mutante von *MYB101* ist im Wurzelgewebe ebenfalls im Nukleus lokalisiert, aber auch eine zytoplasmatische Lokalisierung wurde detektiert (Abb. 3.13, 2). Dies wird deutlich im Vergleich zur ausschließlichen Lokalisierung von 35S_{pro}::*MYB101* NESmut miRNA BSmut.

Als Kontrolle wurden Keimlinge von Col-0, auch auf ½ MS-Festmedium angezogen, im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

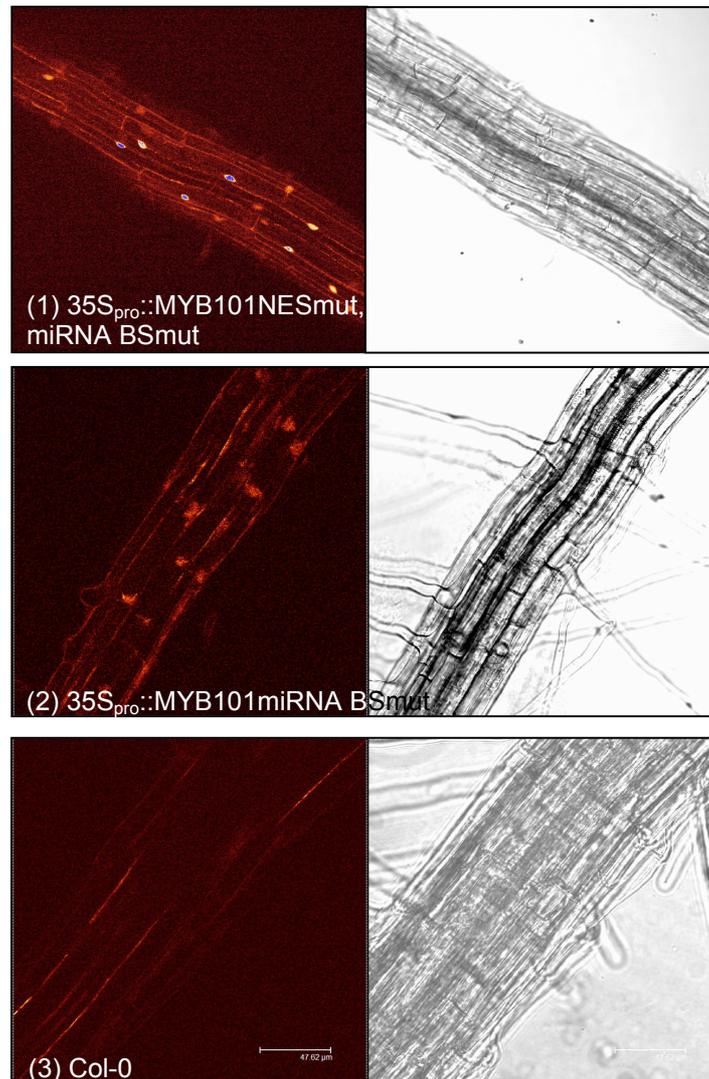


ABB. 3.13: ANALYSE DER *IN PLANTA* EXPRESSION VON *MYB101* NESMUT, MIRNA BSMUT ÜBEREXPRIMIERENDEN PFLANZEN.

Die Samen von (1) 35S_{pro}::MYB101NESmut, miRNA BSmut, (2) 35S_{pro}::MYB101 miRNA BSmut und (3) Col-0 wurden zehn Tage steril auf ½ MS-Festmedium im Lichtraum unter Langtagbedingungen aufgezogen. Die Expression von der beidern Konstrukte wurde mittels konfokalen Laserscanning Mikroskop detektiert. Dargestellt ist die Fluoreszenz in Wurzelgewebe (links) und eine entsprechende durchlichtmikroskopische Aufnahme (rechts).

3.2.5 □ INTERAKTION VON HSF3 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der ebenfalls mit XPO1 interagiert, ist HSF3 (At5g16820), der zur Familie der *heat stress transcription factors* (HSFs) gehört (PRANDL *et al.* 1998). HSFs sind essentielle Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Hitzestressantwort übernehmen (BANIWAL *et al.* 2004). Sie liegen in inaktiver, monomerischer Form im Zytoplasma vor und werden durch Stress aktiviert, indem sie oligomerisieren und in den Zellkern importiert werden. Für HSFA1 und HSFA2 aus Tomate, aber auch für viele andere HSFs, konnte eine bipartite NLS beschrieben werden, bestehend aus basischen Aminosäureresten (AS-Resten). Importin α als Adapterprotein und Importin β als Importrezeptor ermöglichen den Kernimport der HSFs, wo sie dann an Erkennungssequenzen (HSE, *heat shock promoter element*) in Promotoren von Genen binden und damit die Expression der *heat shock proteins* (HSPs) induzieren. Eine NES für HSFA2 aus Tomate konnte im C-Terminus des Proteins beschrieben werden (HEERKLOTZ *et al.* 2001). Die Überexpression von HSF3 in *A. thaliana* resultiert in einer konstitutiven Transkription und Translation von Hitzeschockproteinen, was zu einer erhöhten Resistenz der Pflanzen gegen Hitze führt, da es die Repression der Hitzeschockantwort ermöglicht. Die HSF3-überexprimierenden Pflanzen sind bei Temperaturen von 42 °C und 44 °C deutlich resistenter gegenüber Hitze als Wildtyp *A. thaliana* (PRANDL *et al.* 1998).

Zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung einer weiteren NES in einem pflanzlichen Protein, wurden Deletionen vom HSF3 im Y2H-System mit XPO1 koexprimiert, um die NES im Protein genauer lokalisieren zu können (nicht dargestellt). Im Folgenden abgebildet sind die Ergebnisse zur Interaktionsstudie im Y2H-System mit XPO1 für das Wildtyp Vollängenprotein sowie die NES-Mutante. HSF3 zeigte eine sehr starke Interaktion mit XPO1, die durch den Austausch von hydrophoben AS-Resten (L467A, M471A, L473A) vollständig inhibiert werden konnte (Abb. 3.14).

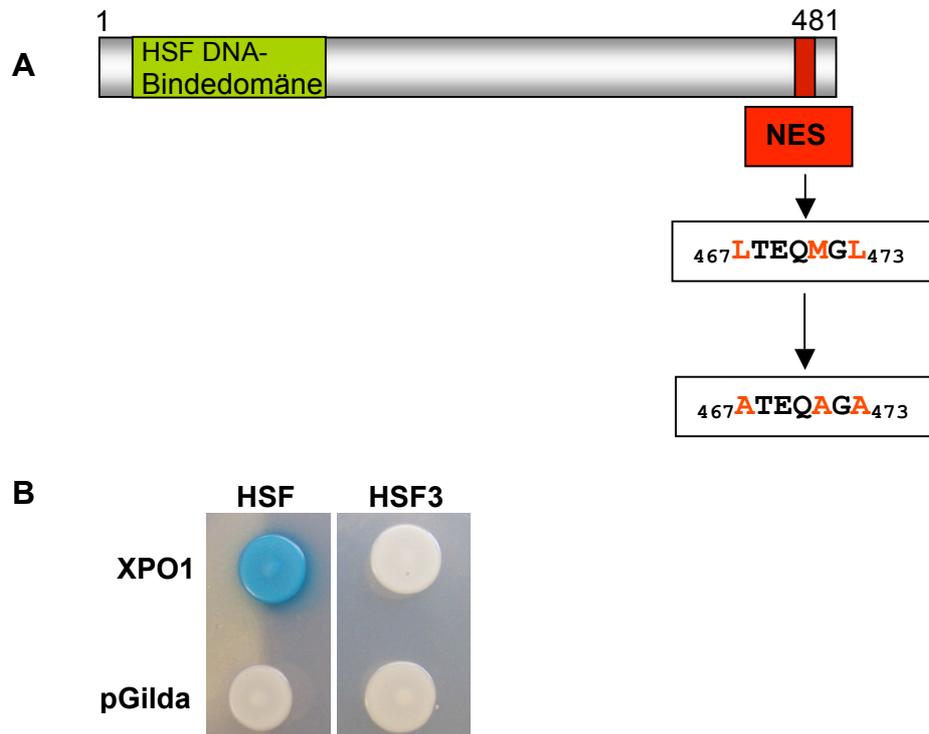


ABB. 3.14: CHARAKTERISIERUNG DER NES IN HSF3.

Die vereinfacht dargestellte Struktur von HSF3 (A) enthält die Aminosäuresequenz der charakterisierten NES und die vorgenommenen Punktmutationen zum erforderlichen Austausch der hydrophoben AS-Reste (rote Buchstaben) zu Alanin.

Die Vollängen cDNA von HSF3 sowie die NES Mutante des Transkriptionsfaktors wurden in pB42AD kloniert (B). Dieser Vektor ermöglichte die Fusion an die B42-Aktivierungsdomäne. XPO1 war in den Vektor pGilda kloniert und damit an die LexA-Bindedomäne fusioniert. Die Koexpression der zu untersuchenden Proteine erfolgte in dem Hefestamm EGY48[p8op-lacZ]. Die Interaktionen von HSF3 und XPO1 führten zur Transaktivierung der β -Galaktosidase, dessen Substrat X-Gal, im Medium enthalten war. Die Spaltung von X-Gal resultierte in einer Blaufärbung der Hefekolonie. Als Kontrolle diente die Koexpression von den zu untersuchenden Konstrukten mit dem Leervektor pGilda.

3.2.6 □ INTERAKTION VON AtCTH MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES

Neben den bereits dargestellten Ergebnissen zu den mit XPO1 interagierenden Transkriptionsfaktoren MYB101 und HSF3, konnte ein weiterer Transkriptionsfaktor isoliert werden, der ebenfalls eine Interaktion mit XPO1 aufwies. AtCTH (At2g25900) ist ein so genanntes Cys3His (C3H) Zinkfingerprotein und gehört zur Familie der CCCH Proteine. Im Gegensatz zu Tieren gibt es in Pflanzen nur wenige Daten zu funktionalen Charakteristika von CCCH Proteinen. In *A. thaliana* konnte HUA1 als RNA-bindendes Protein beschrieben werden, das vermutlich in einen regulatorischen Mechanismus während der Blütenentwicklung involviert ist (Li *et al.* 2001). Ein weiteres Beispiel für ein CCCH Protein aus *A. thaliana* ist AtCPS30, für das gezeigt werden konnte, dass es im Nukleus lokalisiert ist, RNA binden kann sowie an Calmodulin bindet. PEI1 aus *A. thaliana* ist ein embryo-spezifisches CCCH Zinkfingerprotein, das eine wichtige Rolle in der Embryogenese übernimmt.

Eine funktionale Charakterisierung von AtCTH hat im Rahmen dieser Arbeit nicht stattgefunden, vielmehr wurde die NES in diesem Protein beschrieben. Im Y2H-System wurden das Wildtyp Protein sowie diverse Deletionen von AtCTH zusammen mit XPO1 koexprimiert (nicht dargestellt). Die Herstellung der Deletionen diente zur genaueren Lokalisierung der NES im Protein, im Folgenden dargestellt sind nur die Ergebnisse des Wildtyp Proteins sowie der NES Mutante von AtCTH.

Die qualitative Analyse der Interaktion von AtCTH und XPO1 im Y2H-System ergab eine erkennbare Transaktivierung der β -Galaktosidase und verdeutlichte somit eine Interaktion des Transkriptionsfaktors mit XPO1. Durch Punktmutation auf Nukleotidebene und dem damit verbundenen Aminosäureaustausch, wurden hydrophobe Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Dies hatte zur Folge, dass AtCTH nicht mehr mit XPO1 interagieren konnte, sichtbar an der nicht vorhandenen Blaufärbung der Hefekolonie und somit ausbleibenden Transaktivierung der β -Galaktosidase (Abb. 3.15).

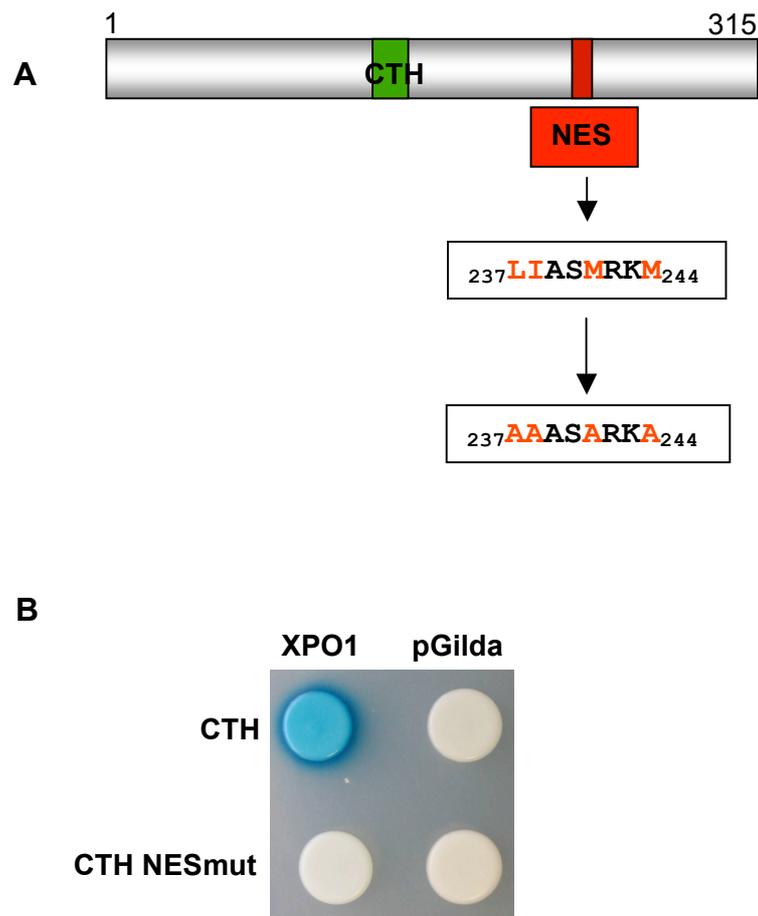


ABB. 3.15: ANALYSE DER NES MUTATION VON ATCTH IM Y2H-SYSTEM.

Die Struktur von AtCTH (A) wurde vereinfacht dargestellt und erhält das für dieses Protein charakteristische C3H- bzw. CTH-Motif sowie die NES. Zusätzlich wurden die Aminosäuresequenz der NES und der durch Punktmutation eingefügte Austausch bestimmter Aminosäuren angegeben.

Die Vollängen cDNA von AtCTH sowie die NES Mutante des Zinkfingerproteins wurden in pB42AD kloniert (B). Dieser Vektor ermöglichte die Fusion der cDNA an die B42-Aktivierungsdomäne. XPO1 war in den Vektor pGilda kloniert und damit an die LexA-Bindedomäne fusioniert. Die Koexpression der zu untersuchenden Proteine erfolgte in dem Hefestamm EGY48[p8op-lacZ]. Die Interaktionen von AtCTH und XPO1 führte zur Transaktivierung der β -Galaktosidase, dessen Substrat X-Gal, im Medium enthalten war. Die Spaltung von X-Gal führte zur Blaufärbung. Als Kontrolle diente die Koexpression von den zu untersuchenden Konstrukten mit dem Leervektor pGilda.

3.3 FUNKTIONELLE ANALYSE VON MYB101

Für den R2R3-MYB-Transkriptionsfaktor MYB101 konnten bereits drei unabhängige NES Motive sowie eine NLS beschrieben werden. Zusammen mit den R2R3-MYBs MYB33 und MYB65 gehört MYB101 zur Klasse der so genannten GAMYBs (GOCAL *et al.* 2001). Diese Bezeichnung leitet sich von dem zuvor in Gerste beschriebenen HvGAMYB ab, das als Transkriptionsaktivator durch Gibberellin (GA) induziert an das GA-Elemente im Promotor der α -Amylase bindet. Für die drei GAMYBs aus *A. thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass sie den α -Amylase Promotor in Aleurongewebe von Gerste induzieren können (GOCAL *et al.* 2001).

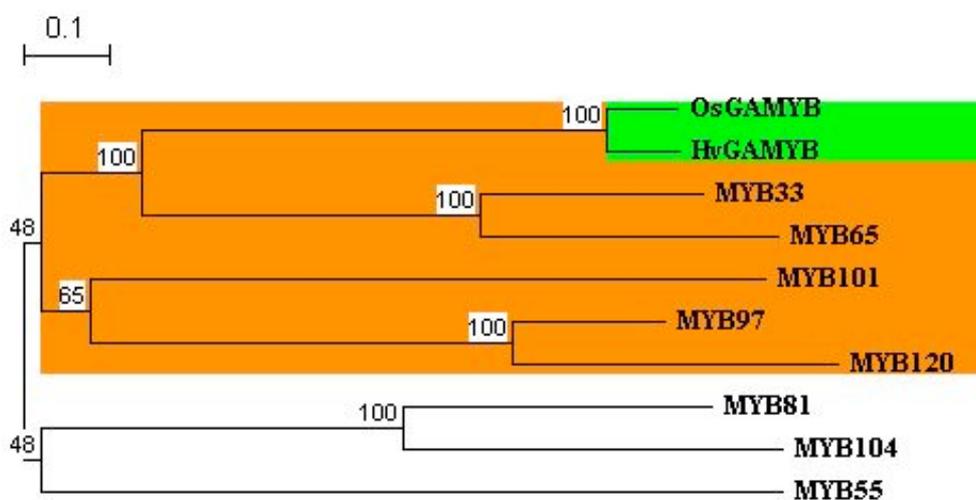


ABB. 3.16 PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER GAMYB TRANSKRIPTIOMFAKTOREN.

Zur Erstellung des Stammbaumes wurde der Algorithmus von CLUSTAL (THOMPSON *et al.* 1994) verwendet. Die phylogenetische Distanz wurde nach Tajima und Nei (1984) berechnet. Die *bootstrap* Werte wurden aus 100 Berechnungen ermittelt und die Topologie des Stammbaums ergab sich aus der *neighbor joining* Methode (SAITOU und NEI 1987). Der Sequenzvergleich wurde mit den Vollängenproteinen durchgeführt. Eine Untergruppe bilden die GAMYBs: MYB33, MYB65, MYB101, MYB97 und MYB120. Die Wurzelsequenz bilden OsGAMYB und HvGAMYB. Eine weitere *outgroup* bilden die R2R3-MYBs MYB81, MYB104 und MYB55.

Die Expression von MYB33 und MYB65 konnte in *A. thaliana* in gleichen Geweben detektiert werden. Homozygote T-DNA Insertionslinien für *myb33* und *myb65* zeigen keinen erkennbaren Phänotyp, wohingegen eine *myb33 myb65* Doppelmutante Sterilität zeigte (MILLAR und GUBLER 2005). Daher wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen beiden GAMYBs um zumindestens partiell redundante Gene handelt, die gemeinsame Funktionen in *A. thaliana* übernehmen, speziell in der Entwicklung der Antheren (MILLAR und GUBLER 2005). Das Expressionsmuster von *MYB101* unterscheidet sich deutlich von dem von

MYB33 und MYB65 (s. Abb 1.5, Einleitung). Lediglich in Blüten und Blütenorganen konnte *MYB101* Transkript nachgewiesen werden, was darauf schließen ließ, dass es in der Pflanze unterschiedliche Aufgaben übernimmt im Vergleich zu den anderen beiden GAMYBs.

Zur funktionellen Charakterisierung von MYB101 wurden bereits im Rahmen einer Dissertation am Lehrstuhl für Genomforschung zwei T-DNA Insertionslinien (*myb101-1* = Salk 061355 und *myb101-2* = Salk 149918) analysiert, die jedoch keinen Phänotyp aufwiesen (ALVES-JUNIOR 2007). Daher wurden homozygote T-DNA Insertionslinien für *myb101* mit homozygoten T-DNA Insertionslinien für die Gene *myb33* und *myb65* gekreuzt. Die zur Kreuzung mit *myb101-1* und *myb101-2* verwendeten T-DNA Linien wurden bereits auf Homozygotie sowie Expression der betreffenden Gene analysiert (ALVES-JUNIOR 2007). Zur Genotypisierung der verschiedenen T-DNA Linien für *myb33* und *myb65* wurden genspezifische Oligonukleotide für eine PCR eingesetzt, die die T-DNA flankierten, und dazu dienen sollten ein Wildtypallel nachzuweisen, sofern die T-DNA Insertion nicht homozygot war. Des Weiteren wurden T-DNA spezifische Oligonukleotide verwendet, die an die *left* oder *right border* der T-DNA binden konnten, und zusammen mit einem genspezifischen Oligonukleotid zum Nachweis der T-DNA im Gen dienten. Die Genotypisierung der Pflanzen für die verschiedenen T-DNA Linien wurde begonnen mit der Amplifizierung des Wildtypallels. Solche Pflanzen, die ein Wildtypallel aufwiesen, wurden aussortiert, alle anderen wurden auf T-DNA Insertion getestet.

Das dabei amplifizierte Fragment wurde anschließend sequenziert, um die Position der T-DNA im Gen zu verifizieren. In Tabelle 2.8 (Material und Methoden) sind die für die diversen T-DNA Insertionslinien verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst.

Für die Linie *myb65-2* konnten beide genspezifischen, die T-DNA flankierenden Oligonukleotide zusammen mit dem *left border* Oligonukleotide ein Fragment amplifizieren. Eine PCR mit dem *right border* und einem genspezifischen Oligonukleotid erbrachte kein Ergebnis. Die mit dem *left border* Oligonukleotid amplifizierten Fragmente, wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen verdeutlichen, dass eventuell eine multiple T-DNA Insertion für die Linie *myb65-2* vorliegt (Abb. 3.17). Für die Linien *myb33* und *myb65-1* konnten lediglich die Insertionsstellen für die *left border* amplifiziert und somit sequenziert werden (Abb. 3.17 und 3.18). Das Amplifizieren der *right border* erbrachte kein Resultat.

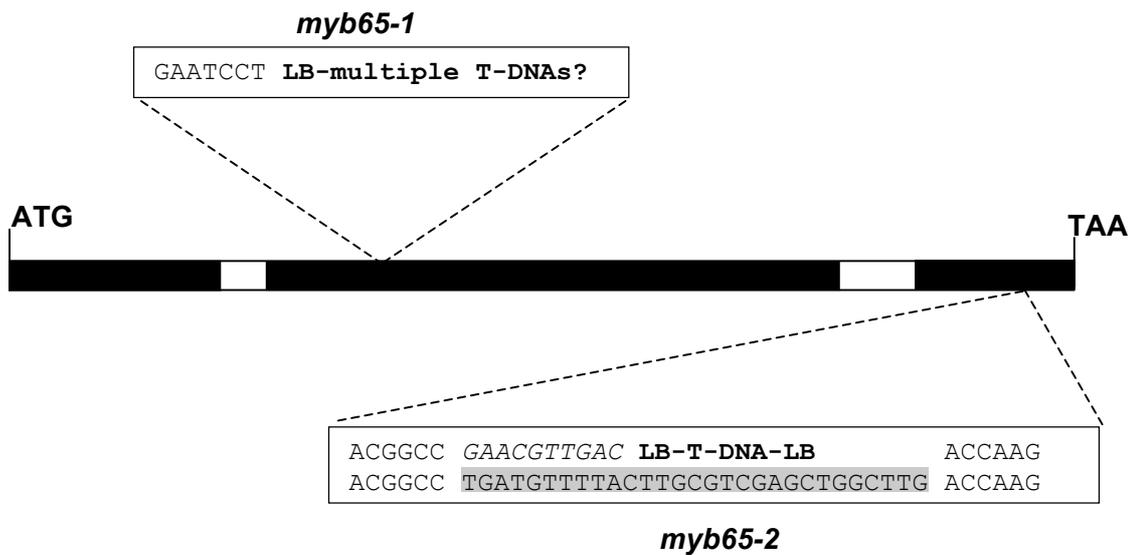


ABB. 3.17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER T-DNA INSERTIONEN FÜR MYB65.

Abgebildet ist die Struktur des Gens *MYB65*. Die schwarz dargestellten Boxen sind Exons, in weiß abgebildete Abschnitte sollen die Position der Introns im Gen verdeutlichen. Für jede T-DNA Insertionslinie für *MYB65* ist die genomische Sequenz der Insertionsstelle im Gen angegeben. Für *myb65-1* konnte nur die left border sequenziert werden. Für *myb65-2* sind die flankierenden genomischen Sequenzen (obere Zeile) an der Insertionsstelle angegeben. Kursiv bedeutet eine Insertion von Nukleotiden, die weder zur T-DNA noch zur Sequenz des Gens passen. In der unteren Zeile ist die Sequenz von MYB65 angegeben, grau unterlegt sind deletierte Nukleotide.

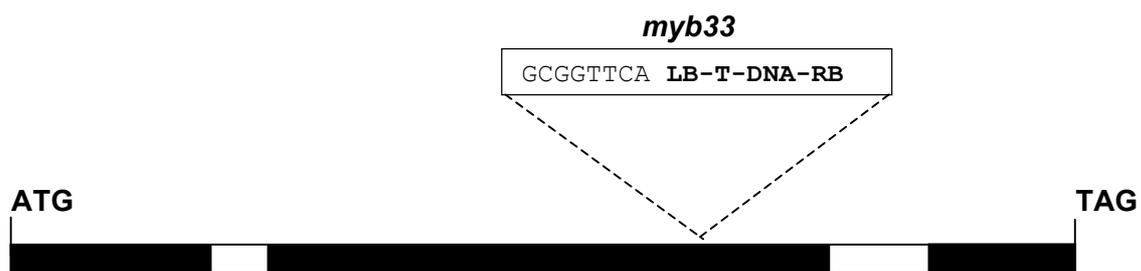


ABB. 3.18: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER T-DNA INSERTION FÜR MYB33.

Abgebildet ist die Struktur des Gens *MYB33*. Die schwarz dargestellten Boxen sind Exons, in weiß abgebildete Abschnitte verdeutlichen die Position der Introns im Gen. Die genomische Sequenz der T-DNA Insertionsstelle im Gen ist angegeben. Für *myb33* konnte nur die left border sequenziert werden.

Zum Nachweis, dass die T-DNA Insertionslinien *myb33*, *myb65-1* und *myb65-2* tatsächlich kein Transkript der jeweiligen Gene exprimieren, wurde Gesamt-RNA aus homozygoten Pflanzen der verschiedenen Linien isoliert und eine RT-Reaktion unter Verwendung eines Oligo-dT Oligonukleotids durchgeführt. Für die anschließenden PCR wurden die bereits zur Bestimmung des Genotyps verwendeten genspezifischen Oligonukleotide eingesetzt. Als Positivkontrolle diente cDNA aus Col-0 Pflanzen. Die Amplifizierung von *ACTIN2* diente als Referenz.

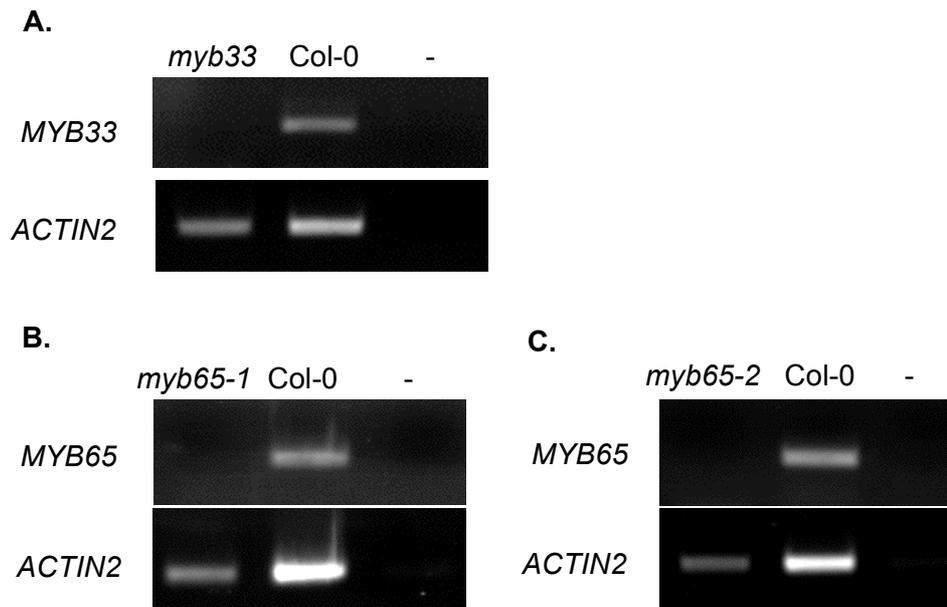


ABB. 3.19: EXPRESSIONANALYSE DER GAMYB T-DNA INSERTIONSLINIEN.

Eine RT-PCR mit RNA aus homozygoten T-DNA Insertionslinien für die GAMYB-Gene *MYB33* und *MYB65* sowie für Col-0 wurde vorgenommen. Für die Linien *myb33* (A), *myb65-1* (B) und *myb65-2* (C) wurden genspezifische Oligonukleotide in der PCR-Reaktion eingesetzt, die auch für die Amplifizierung der betreffenden Transkripte in der Col-0 Positivkontrolle verwendet wurden. Als weitere Kontrolle diente die Amplifizierung von *ACTIN2*.

Für alle drei untersuchten T-DNA Insertionslinien, *myb33*, *myb65-1* und *myb65-2*, wurde in homozygoten T-DNA Insertionspflanzen kein Transkript des jeweils untersuchten Gens nachgewiesen. In Col-0 cDNA konnte *MYB33* bzw. *MYB65* amplifiziert werden. Auch die Referenz, *ACTIN2*, konnte in allen untersuchten cDNAs nachgewiesen werden (Abb. 3.19, A bis C).

3.3.1 □ GENERIERUNG VON GAMYB DOPPELMUTANTEN PFLANZEN

Es wurde bereits veröffentlicht, dass die T-DNA Insertion in den Genen für *MYB33* und *MYB65* keinen Effekt auf den Phänotyp von *A. thaliana* hat (MILLAR und GUBLER 2005). In dieser Publikation wurden jedoch zum Teil andere Linien untersucht als die hier vorgestellten, weshalb die Untersuchungen zur Zygotie und Expressionsanalyse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Linien vorgenommen worden sind (s. Abschnitt 3.3). Homozygote Pflanzen der hier untersuchten T-DNA Insertionslinien für *MYB33* und *MYB65* wiesen ebenfalls keine Besonderheiten im Phänotyp auf. Weiterhin wurde in der Publikation von Millar & Gubler (2005) eine Doppelmutante aus den untersuchten T-DNA Insertionslinien für *MYB33* und *MYB65* hergestellt. Die daraus resultierenden für beide T-DNA Insertionen homozygoten Pflanzen zeigten keine Pollenproduktion und konnten somit keine Samen ausbilden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Linien für *MYB33* und *MYB65* wurden ebenfalls dazu verwendet Doppelmutanten herzustellen. Zusätzlich wurden Kreuzungsmutanten zwischen *myb33* und *myb101* sowie *myb65* und *myb101* generiert. Die bereits publizierten Ergebnisse zu der Kreuzung *myb33 myb65* (MILLAR und GUBLER 2005) konnten mit den hier untersuchten Linien reproduziert werden. Im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 3.20, A und B), der deutlich sichtbar Pollen produzierte, konnte für die erhaltenen Kreuzungsmutanten keine bzw. eine verminderte Produktion an Pollen festgestellt werden. Die deutlich erkennbaren Stamina der Kreuzung *myb33 myb65* bildeten stark reduzierte Pollenmengen (Abb. 3.20, C).

Neu in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der Kreuzungen *myb33 myb101* und *myb65 myb101* (Abb. 3.20, D und E). Auch diese Kreuzungen zeigten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 keine bis verminderte Ausbildung von Pollen und damit verbunden war eine sehr geringe Produktion von Samen.

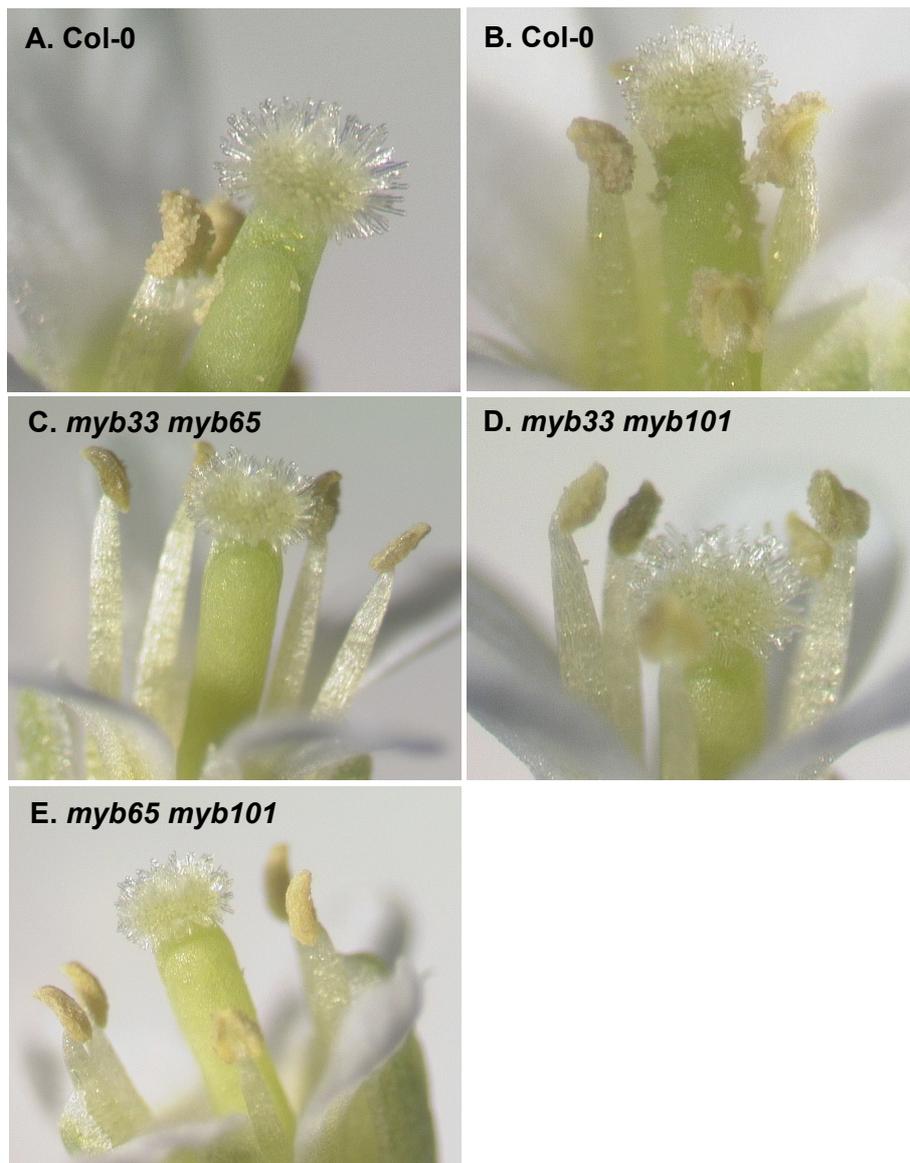


ABB. 3.20: VERMINDERTE POLLENPRODUKTION IN GAMYB DOPPELMUTANTEN.

Die Kreuzungsmutanten sowie Col-0 wurden zunächst für neun Wochen unter Kurztagbedingungen aufgezogen. Nach erfolgtem Genotypisieren zur Isolierung von homozygoten Doppelmutanten, wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen zum Blühen gebracht. Die Abb. wurde mittels eines Binokulars erstellt. Col-0 Blüten (A & B) sowie repräsentative Blüten von *myb33 myb65* (C), *myb33 myb101* (D) und *myb65 myb101* (E) sind dargestellt.

3.3.2 □ GENERIERUNG EINER GAMYB TRIPELMUTANTE

Die generierten Doppelmutanten *myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb65 myb101* wurden des Weiteren dazu verwendet Tripelmutanten, also *myb33 myb65 myb101* Pflanzen, herzustellen. Die T2-Samen der gekreuzten Tripelmutanten wurden ausgesät und die daraus hervorgegangenen Pflanzen anschließend geselbstet. Die dabei erhaltenen T3-Samen wurden erneut ausgesät und mittels Genotypisierung wurden aus insgesamt 141 Pflanzen nur zwei (Nr. 37 und Nr. 81) isoliert, die homozygote Insertionen in *MYB33*, *MYB65* und *MYB101* hatten. Diese Pflanzen wurden zunächst unter Kurztagbedingungen aufgezogen. Nach sieben Wochen im Kurztag zeigten die Tripelmutanten *myb33 myb65 myb101* ein deutlich verzögertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Der Durchmesser der Rosette der beiden Tripelmutanten *myb33 myb65 myb101* lag deutlich unter dem der Col-0 Pflanzen (Abb. 3.21, A). Nach acht Wochen wurden die Pflanzen für weitere Untersuchungen unter Langtagbedingungen angezogen. Auch dort zeigte sich ein verzögertes Wachstum der *myb33 myb65 myb101* Pflanzen (Abb. 3.21, B). Während der Col-0 Wildtyp bereits mehrere Infloreszenzen ausgebildet hatte, hatten die Tripelmutanten zum gleichen Zeitpunkt deutlich weniger Infloreszenzen entwickelt. In Abb. 3.21 ist zu erkennen, dass eine der beiden *myb33 myb65 myb101* Pflanzen (Abb. 3.21, B (2)) bereits sekundäre Infloreszenzen ausgebildet hatte, diese jedoch deutlich in ihrer Entwicklung verzögert waren als die des Wildtyps (Abb. 3.21, B (1)). Die andere *myb33 myb65 myb101* Tripelmutante (Abb. 3.21, B (3)) zeigte eine noch stärkere Verzögerung in ihrer Entwicklung im Vergleich zur Col-0 Pflanze. Diese Tripelmutante hatte zum gleichen Zeitpunkt lediglich die primäre Infloreszenz entwickelt. Das verzögerte Wachstum der Tripelmutanten geht aber auch aus der Abb. 3.22 (A) hervor. Die Infloreszenzen von *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten sind deutlich kleiner als die von Col-0 Pflanzen.

In der letzten Phase der Entwicklung, während die ersten Schoten bereits reiften, wurde die Anzahl der entwickelten Seiteninfloreszenz ermittelt. Diese betrug beim Wildtyp Col-0 22 und bei der *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten entwickelten sich lediglich zwölf Seiteninfloreszenzen.

Neben der verzögerten Entwicklung dieser Pflanzen, wurde des Weiteren ein neuer Phänotyp in den Blüten der *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten festgestellt. Im Gegensatz zu den Doppelmutanten *myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb65 myb101*, die keine oder verminderte Pollenmengen produzierten, deren Staubblätter im Hinblick auf die Größe jedoch normal entwickelt waren, hatten die *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten unterentwickelte Staubblätter, die keinen Pollen bildeten (Abb. 3.22).

In Col-0 Pflanzen sind unter normalen Bedingungen vier der insgesamt sechs Staubblätter deutlich größer als die übrigen zwei. Sie überragen den in der Mitte der Blüte befindlichen Stempel, während die anderen zwei, sich gegenüber liegenden Staubblättern deutlich kleiner sind (Abb. 3.22, B und C). Die große Anzahl der im Binokular untersuchten Blüten von *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten ließ darauf schließen, dass diese Pflanzen weiterhin sechs Staubblätter ausbilden konnten, welche jedoch deutlich kleiner waren als bei Col-0 Pflanzen (Abb. 3.22, D bis F). Die meisten Blüten von *myb33 myb65 myb101* Pflanzen produzierten Staubblätter, die deutlich kleiner als der Stempel waren. Einige der untersuchte Blüten der Tripelmutanten entwickelten vereinzelt Staubblätter, die den Stempel zwar überragten, diesen aber nicht befruchten konnten, da sie keinen Pollen produzierten (Abb. 3.22, D bis F).

Eine vollständig entwickelte Schote von Col-0 Pflanzen erreicht durchschnittlich eine Länge von etwa 15 mm und enthält ungefähr 55 bis 60 Samen (Abb. 3.22, G und H). Im Vergleich dazu bildeten *myb33 myb65 myb101* Pflanzen keine richtigen Schoten aus (Abb. 3.22, A, G und H). Nachdem Kronen- und Kelchblätter verblüht waren, blieb der unbefruchtete und unterentwickelte Stempel der *myb33 myb65 myb101* Pflanzen zurück (Abb. 3.22, A, G und H). Die Größe dieser unterentwickelten Schote betrug etwa 3 mm. Mit 70 %igem Ethanol entfärbte Schoten von Col-0 und *myb33 myb65 myb101* Pflanzen (Abb. 3.22, G und H) verdeutlichen zudem, dass die Tripelmutanten kein Samen entwickelte.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Stempels in Blüten von *myb33 myb65 myb101* Pflanzen, wurden diese mit Pollen von Col-0 Pflanzen befruchtet. Dabei stellte sich heraus, dass der Stempel und die Samenanlagen in den Blüten der Tripelmutanten intakt waren, da sich durch die Befruchtung mit Fremdpollen nicht nur eine vollständige Schote entwickelte, sondern auch Samen gebildet wurden (nicht dargestellt in einer Abb.).

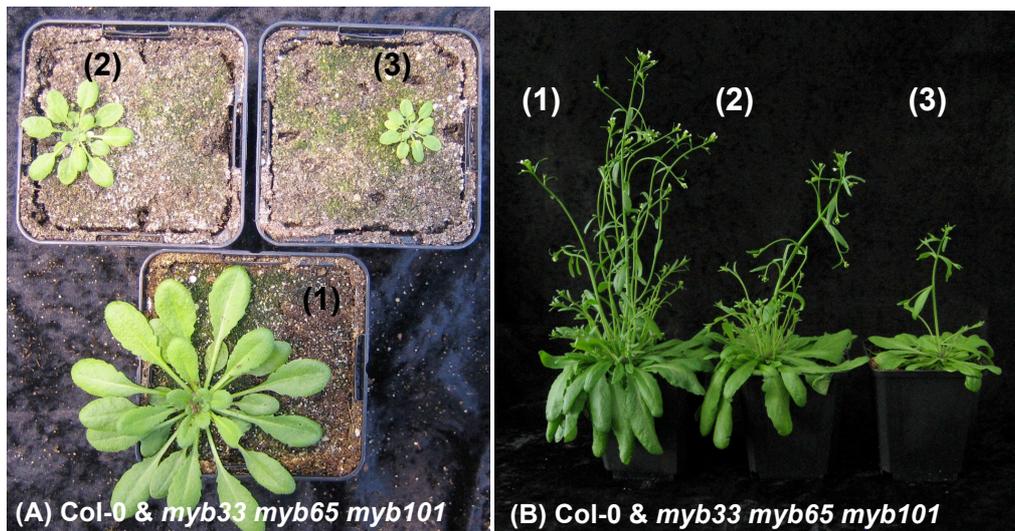


ABB. 3.21: ANALYSE DES PHÄNOTYPS VON *myb33 myb65 myb101* T-DNA INSERTIONSLINIEN

Die Pflanzen wurden zunächst acht Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und danach unter Langtagbedingungen zum Blühen gebracht. (A) zeigt eine repräsentative Aufnahme nach sieben Wochen im Kurztag, (1) Col-0, (2) *myb33 myb65 myb101* Pflanze Nr. 37 und (3) *myb33 myb65 myb101* Pflanze Nr. 81. (B) zeigt eine repräsentative Aufnahme nachdem die Pflanzen bereits zwei Wochen unter Langtagbedingungen angezogen worden waren. Die Nummerierung (1) bis (3) entspricht der von (A).

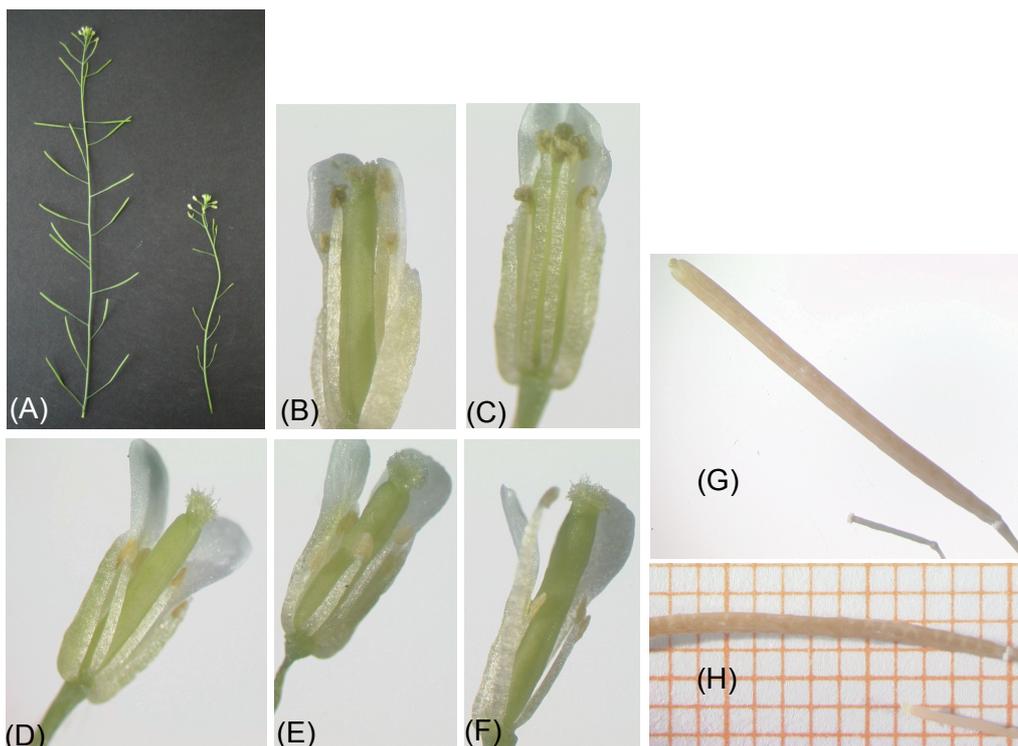


ABB. 3.22: ANALYSE DER SCHOTEN UND BLÜTEN VON *myb33 myb65 myb101* T-DNA INSERTIONSLINIEN.

Nach zunächst acht Wochen Kurztagbedingungen und anschließenden zwei Wochen unter Langtagbedingungen, konnten repräsentative Aufnahmen der Infloreszenzen mit Schoten (A) von Col-0 (links) und *myb33 myb65 myb101* (rechts) erstellt werden. Blüten von Col-0 (B und C) sowie der *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten (D bis F) sind dargestellt. Schoten von Col-0 und *myb33 myb65 myb101* Tripelmutanten (G und H) wurden mit 70 % Ethanol entfärbt. Als Größenmaßstab wurde Millimeterpapier verwendet (H). Zur verbesserten Ansicht des Inneren der Blüte wurden ein bis zwei Kron- und Kelchblätter entfernt.

3.3.3 \square *IN VITRO* TRANSLATION SOWIE EMSA ZUM NACHWEIS EINES POTENTIELLEN *target* GENS FÜR MYB101

Ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) sollte die Bindung von MYB101 an das *gibberillic acid response element* (GARE) Motiv im *LEAFY* (*LFY*) Promotor nachweisen. Gezeigt wurde dies schon für das MYB33 (GOCAL *et al.* 2001). *LFY* ist involviert die Bildung von Blütenmeristem aus Infloreszenzmeristem (WEIGEL *et al.* 1992). Zur Überprüfung des Bindevermögens wurden MYB33 und MYB101 mit Hilfe des *TnT Quick Coupled Translation/Transcription System* (Promega) *in vitro* transkribiert und translatierte. Aus genomischer DNA wurde durch genspezifische Oligonukleotide eine 70 bp großes Fragment aus dem *LFY* Promotor amplifiziert, welches das GARE Motiv umfasste. Die *in vitro* translatierten Proteine MYB33 und MYB101 wurden mit dem radioaktiv markierten *LFY* Promotorfragment inkubiert, anschließend elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt und gegen einen *phospho image screen* exponiert, um das Laufverhaltens der radioaktiv markierten DNA zu untersuchen.

Im Gel aufgetrennt wurden vier Inkubationsansätze, von denen zwei radioaktiv markierte DNA und Protein enthielten (Abb. 3.23, 2 und 4). Die verbleibenden zwei Inkubationsansätze enthielten lediglich markierte DNA und dienten als Kontrollen zum Laufverhalten des frei *LFY* Promotorfragments (Abb. 3.23, 1 und 3). MYB33 aber auch MYB101 führten zu einer Retardierung des DNA-Fragments im Gel, womit eine Bindung beider Proteine an das *LFY* Promotorfragment nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.23, 2 und 4).

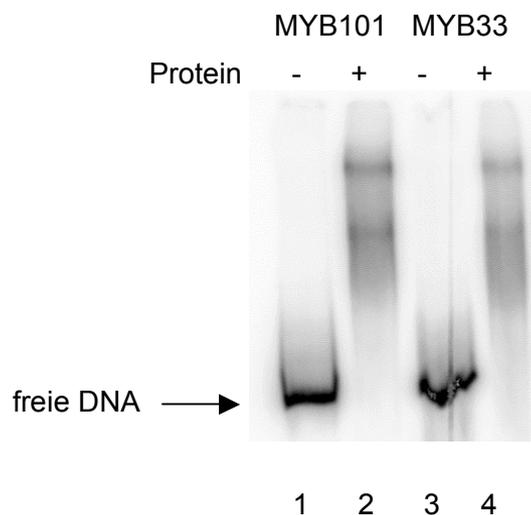


ABB. 3.23: EMSA MIT *IN VITRO* TRANSLATIERTEN MYB33 UND MYB101 PROTEINEN UND ANALYSE DER BINDUNG DAS GARE MOTIV DES *LFY* PROMOTORS.

(1) Bindungsreaktion mit GARE Motiv ohne MYB101 Translationsansatz, (2) mit MYB101 Translationsansatz, (3) Bindungsreaktion mit GARE Motiv ohne MYB33 Translationsansatz und (4) mit MYB33 Translationsansatz.

3.4 CHARAKTERISIERUNG DER NES IN RNA BINDENDEN PROTEINEN

Zur Familie der RNA-bindenden Proteine (RBP) gehören solche, die ein so genanntes RNA *recognition motif* (RRM) besitzen und im RNA-Metabolismus Funktionen beim *Splicing* und bei der Translation übernehmen oder zur Stabilität der RNA beitragen (MANGUS *et al.* 2003). Als XPO1 interagierende RBPs konnten CID11 und PAB2 isoliert werden. CID11 gehört zur Familie der CID-RBPs (CID, *CTC-interacting domain*), die typischerweise zwei RRM's im C-terminalen Bereich besitzen und mit der PABC/CTC-Domäne in Poly(A) bindenden Proteinen (PABP) interagieren (BRAVO *et al.* 2005). PAB2 ist ein Mitglied der PABPs, die vier RRM's besitzen (PALANIVELU *et al.* 2000b).

3.4.1 □ INTERAKTION VON CID11 MIT XPO1 UND IDENTIFIZIERUNG DER NES

Die nahezu vollständig im *Screen* isolierte cDNA von CID11 (AS 7 bis 358) wurde für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet und war somit Grundgerüst zur Herstellung von Deletions- und Mutationskonstrukten. Der fehlende Bereich am 5'-Ende der Sequenz wurde dennoch zur Überprüfung der Sequenz aus der gleichen cDNA-Bibliothek, die auch für den *Screen* genutzt wurde, amplifiziert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz stimmte mit der des 5'-Bereichs von CID11 überein, somit war sichergestellt, dass die cDNA-Bibliothek die bereits annotierte Sequenz von CID11 ebenfalls enthielt. Das Ursprungskonstrukt CID11-1 umfasste zudem die 3'-untranslatierte Region (3' UTR), die beim Klonieren der weiteren Konstrukte beibehalten wurde. Die Expression von CID11 im Y2H-System wurde am Stoppcodon des kodierenden Bereichs unterbrochen, so dass 3'UTR keinen Einfluss auf die Interaktionsstudien nehmen konnte.

Die Analyse der Deletions- und Mutationskonstrukte von CID11 erfolgte im Y2H-System (Abb. 3.24). Die Koexpression mit XPO1 in Hefe und die damit verbundene Transaktivierung der β -Galaktosidase, sofern eine Interaktion zwischen XPO1 und den zu untersuchenden Konstrukten vorlag, diente zur genaueren Lokalisierung der NES im Protein. Die Untersuchungen zu den Deletionskonstrukten (Abb. 3.24 umfasst nicht alle erstellten Konstrukte) ergab, dass sich die NES im N-terminalen Bereich von CID11 befinden musste. Als Kontrolle wurde der C-Terminus, CID11-5 (AS 131 bis 358), also ein Konstrukt dem die putative NES fehlte, ebenfalls auf Interaktion mit XPO1 getestet. Dieses Konstrukt wies jedoch keine Interaktion mit XPO1 auf, womit sichergestellt werden konnte, dass es keine weitere NES im Protein gab (Abb. 3.24).

Die NES-Mutante, CID11-NESmut, enthielt drei Aminosäureaustausche, wobei hydrophobe AS-Reste durch Alanin ersetzt wurden. Im Y2H-System konnte keine Interaktion zwischen CID11-NESmut und XPO1 detektiert werden, da keine Transaktivierung der β -Galaktosidase und die damit verbundene Spaltung des Substrats X-Gal stattfand (Abb. 3.24). Die Negativkontrolle zum jedem Konstrukt, d.h. die Koexpression von dem entsprechenden CID11-Konstrukt und dem Leervektor pGilda, erbrachte ebenfalls keine Transaktivierung der β -Galaktosidase.

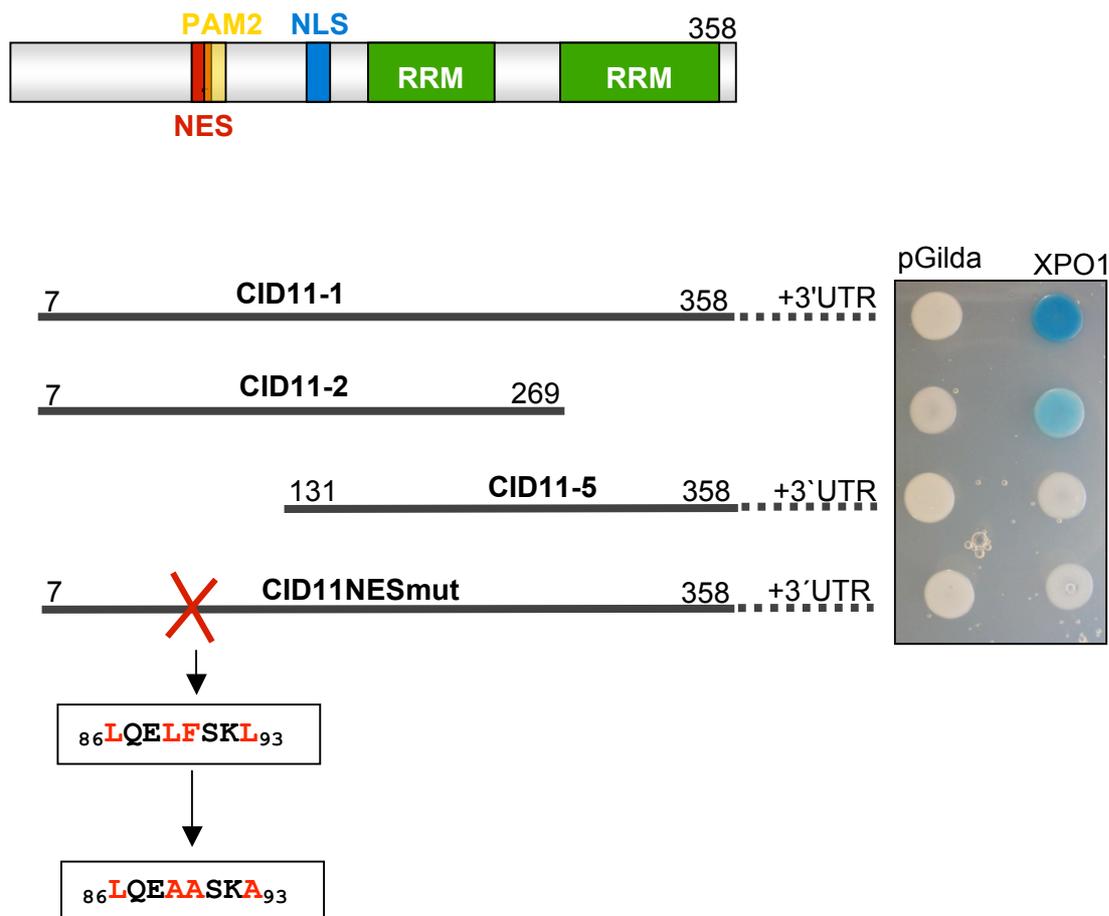


ABB. 3.24: ANALYSE DER DELETIONS- UND MUTATIONSKONSTRUKTE VON CID11 IM Y2H-SYSTEM

In der Abb. oben dargestellt ist die Struktur von CID11 mit den entsprechenden Domänen. Die Ziffern bezeichnen die AS-Reste, bei denen die Deletionskonstrukte beginnen bzw. enden. Angegeben ist weiterhin die Position der NES in der Aminosäuresequenz und der durch Punktmutation bestimmter Basen eingefügte Aminosäureaustausch zu Alanin (Buchstaben in rot). Die Deletionen und das Mutationskonstrukt von CID11 waren in den Vektor pB42AD kloniert. Die cDNA lag XPO1 in pGilda vor. Die Koexpression fand im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ]. Interaktionen der CID11-Konstrukte und XPO1 führte zur Transaktivierung der β -Galaktosidase, dessen Substrat X-Gal, im Medium enthalten war. Die Spaltung von X-Gal führte zur Blaufärbung. Als Kontrolle diente die Koexpression von den zu untersuchenden Konstrukten mit dem Leervektor pGilda. NES, *nuclear export signal*; NLS, *nuclear localisation signal*; RRM, *RNA recognition motif*; PAM2, Protein-Protein-Interaktionsdomäne.

3.4.2 □ LOKALISIERUNG VON CID11 GFP-FUSIONSPROTEIN IN BY-2 PROTOPLASTEN UND IDENTIFIZIERUNG DER NLS IN CID11

Zur Analyse der Kernimports und -exports von CID11 wurde die subzelluläre Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen in BY-2 Tabakprotoplasten mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops untersucht. Die bereits im Y2H-System analysierten Konstrukte wurden ebenfalls als GFP-Fusionen im Protoplastensystem getestet. Für die Expression in den BY-2 Protoplasten wurden die cDNAs in den p5`GFP-Vektor (s. Anhang) kloniert.

Die Lokalisierung von CID11 in BY-2 Tabakprotoplasten wurde für das Vollängen Wildtyp Protein, die zwei Deletionskonstrukte CID11-2 und CID11-5 (vgl. auch Abb. 3.24), die NES- sowie die NLS-Mutante von CID11 vorgenommen.

Das Wildtyp Protein CID11 war hauptsächlich im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert und nur ein schwaches Signal war im Nukleus detektierbar (Abb. 3.25, 1). Dies galt ebenfalls für die C-terminale Verkürzung, CID11-2 (Abb. 3.25, 2). Durch die Deletion wurde lediglich eine RRM entfernt, die offenbar keinen Einfluss auf die Lokalisierung des RNA-bindenden Proteins hatte, daher zeigte es die gleiche Verteilung im Protoplasten wie das Wildtyp Protein. Abb. 3.25 (3) stellte eine repräsentative Aufnahme von CID11-5, der N-terminalen Deletion, dar. Diesem Konstrukt fehlt die bereits charakterisierte NES, die NLS ist noch im Protein enthalten. Es kam zu einer Akkumulierung von CID11-5 im Nukleus, da durch das Fehlen der NES der Kernexport unterbunden war. Im Zytoplasma war ein schwaches Signal des fluoreszierenden CID11-5 detektierbar. Für die NES-Mutante von CID11 (Abb. 3.25, 4) konnte ebenfalls eine deutliche Verschiebung in den Nukleus festgestellt werden. Weiterhin eine war geringe Fluoreszenz in Zytoplasma detektierbar. Die NLS-Mutante von CID11 (Abb. 3.25, 5) wies eine deutliche Verschiebung der Lokalisierung in das Zytoplasma auf. Im Vergleich zum Wildtyp CID11 war für CID11-NLSmut (5) eine deutlich schwächere Lokalisierung im Nukleus sichtbar.

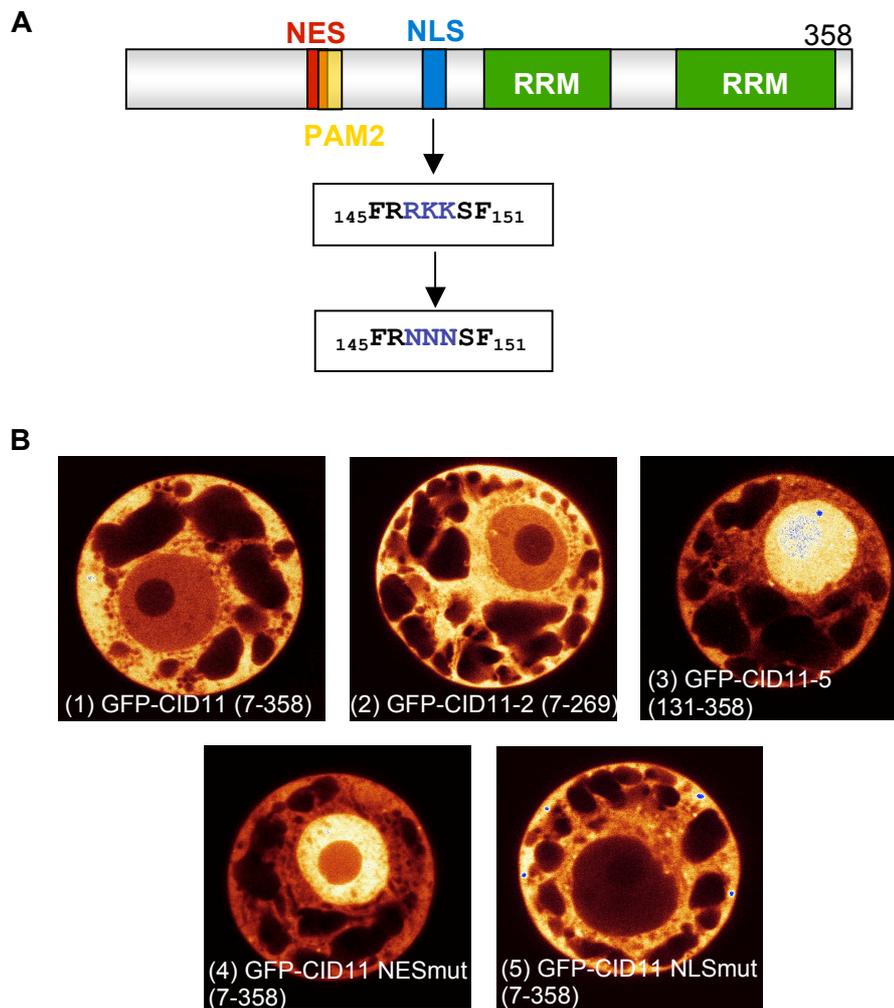


ABB. 3.25: *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON CID11 GFP-FUSIONSKONSTRUKTEN IN BY-2 PROTPLASTEN

In (A) ist die Struktur von CID11 mit den Lokalisierungssignalen und den RRM's wiedergegeben. Die Ziffern bezeichnen die Positionen der AS. Angegeben ist des Weiteren der AS-Austausch, der zur Mutation der NLS führte (oben die Wildtypsequenz, unter die mutierte NLS). (B) BY-2 Protoplasten wurden transient mit Konstrukten für GFP-Fusionproteine transfiziert und die Lokalisierung der Fluoreszenz im konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Repräsentative Aufnahmen zeigen: (A) GFP-CID11 (7-358); (2) GFP-CID11 (7-269); (3) GFP-CID11 (131-358); (4) GFP-CID11-NESmut (7-358); (5) GFP-CID11-NLSmut (7-358).

3.4.3 ANALYSE DER SEQUENZEN VON PROTEINEN DER CID-RBP-FAMILIE

Das isolierte CID11, dessen NES im Abschnitt oben, identifiziert und charakterisiert wurde, gehört zu einer Familie von Proteinen, deren Mitglieder zwei RRM's im C-terminalen Bereich besitzen. Diese Familie wird als CID RNA-bindende Proteine (CID-RBPs) bezeichnet und umfasst sechs Mitglieder, CID8 bis CID13. Neben der Homologie der beiden RRM's besitzen die verschiedenen CID-RBPs auch eine hohe Homologie im Bereich der bereits identifizierten NES (s. Abb. 3.27) und der NLS in CID11.

Die sechs CID-RBPs werden auf Grund ihrer Sequenz in drei Zweierpärchen eingeteilt (Abb. 3.26). CID11 weist eine hohe Ähnlichkeit zu CID12 auf, das auch als RBP37 annotiert ist. Dieses sowie je ein Vertreter der anderen beiden Pärchen wurden mittels genspezifischer Oligonukleotide aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert. CID12 sowie CID10 ließen sich aus der cDNA-Bibliothek amplifizieren. Die Analyse des Expressionsmusters von CID9 ergab, dass es in einer hohen Konzentration in den Staubblättern in *A. thaliana* exprimiert ist. Daher wurde Gesamt-RNA aus Blüten isoliert, eine RT-Reaktion zur Herstellung von cDNA durchgeführt und mittels genspezifischer Oligonukleotide war es möglich CID9 zu amplifizieren.

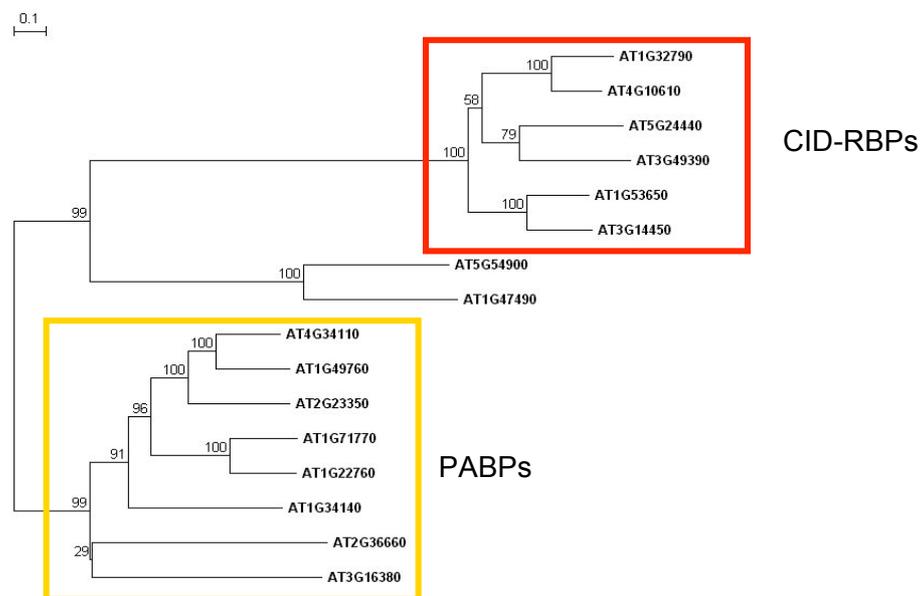


ABB. 3.26: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER CID-RBP UND DER PABP PROTEINFAMILIEN. Zur Erstellung des Stammbaumes wurde der Algorithmus von CLUSTAL W (THOMPSON *et al.* 1994) verwendet. Die phylogenetische Distanz wurde nach Tajima und Nei (1984) berechnet. Die *bootstrap* Werte wurden aus 100 Berechnungen ermittelt und die Topologie des Stammbaums ergab sich aus der *neighbor joining* Methode (SAITOU und NEI 1987). Der Sequenzvergleich wurde mit den Vollängenproteinen durchgeführt. Eine Untergruppe bilden die CID-RBPs: CID11 (At1g32790), CID12 (At4g10610), CID13 (At5g24440), CID10 (At3g49390), CID8 (At1g53650) und CID9 (At3g14450). Die *outgroup* bilden RBP45 (At5g54900) und RBP47 (At1g47490). Eine weitere Untergruppe bilden die PABPs: PAB2 (At4g34110), PAB8 (At1g49760), PAB4 (At2g23350), PAB5 (At1g71770), PAB3 (At1g22760), PAB1 (At1g34140), PAB7 (At2g36660) und PAB6 (At3g16380).

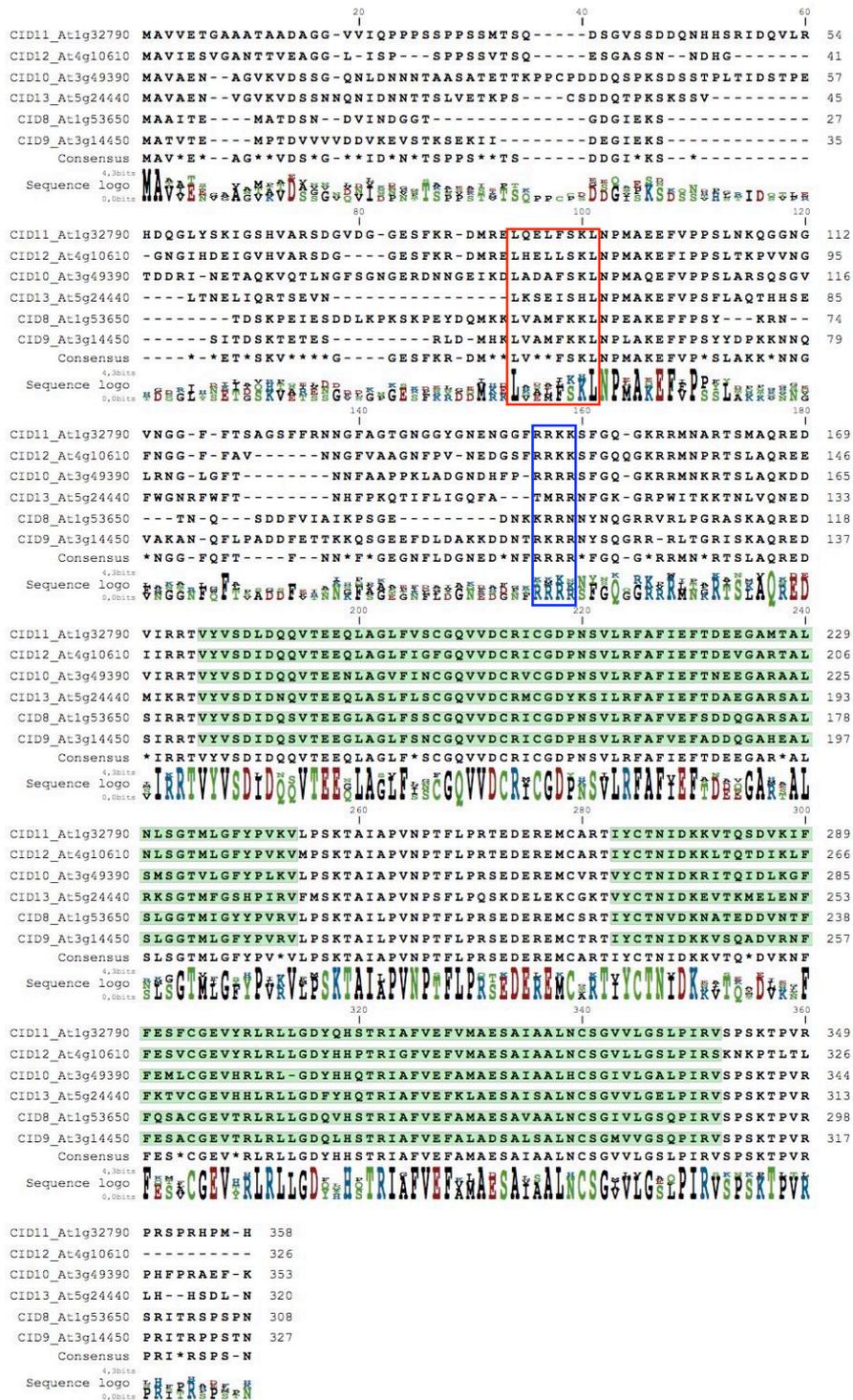


ABB. 3.27: ALIGNMENT DER PROTEINSEQUENZEN DER CID-RBPS

Das Alignment wurde erstellt mit der Software *CLC Protein Workbench 3*. Dem Alignment zu Grunde liegen die Proteinsequenzen der CID-RBPs CID8 bis CID13. Der rote Kasten umgibt die in CID11 identifizierte NES sowie die putativen NES der anderen CID-RBPs. Der blaue Kasten gibt die Region der NLS in CID11 sowie die putativen NLS der anderen CID-RBPs wieder. Grün unterlegt sind die beiden RRM in den Proteinen. Das Sequenz Logo kennzeichnet konservierte AS-Reste.

Die isolierten cDNAs der CID-RBPs wurden für weitere Untersuchungen in den Hefektor pB42AD und den p5`GFP Vektor kloniert. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus der Analyse in Y2H-System und der *in vivo* Lokalisierung in BY-2 Tabakprotoplasten präsentiert.

Das Alignment der Proteinsequenzen (Abb. 3.27) der CID-RBPs zeigt eine hohe Homologie innerhalb der Proteine im Bereich der bereits identifizierten NES in CID11 (Abb. 3.27, roter Kasten). Zusammengefasst ergibt sich folgende Sequenz: Lxxx(L/F/I)xxL. Auch im Bereich der zuvor beschriebene NLS in CID11 findet sich eine hohe Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen CID-RBPs. Dieser Bereich besteht hauptsächlich aus den AS-Resten Arginin und Lysin.

3.4.4 □ INTERAKTION VON AUSGEWÄHLTEN PROTEINEN DER CID-RBP FAMILIE MIT XPO1 UND *IN VIVO* LOKALISIERUNG IN BY-2 PROTOPLASTEN

Die aus der cDNA-Bibliothek amplifizierten CID10 und CID12 sowie das von cDNA aus Blüten isolierte CID9, wurden zur Analyse des Kernexports zunächst in den Vektor pB42AD kloniert. Es folgte die Koexpression der CID-RBPs mit XPO1 im Y2H-System. Als Kontrolle und zum Vergleich wurde das Experiment auch für CID11 erneut durchgeführt.

CID12, obwohl es eine hohe Ähnlichkeit mit CID11 hat, zeigte keine Interaktion mit XPO1 im Y2H-System (Abb. 3.28, A). CID9 wies eine schwächere Interaktion mit XPO1 als CID11 auf und CID10 dagegen spiegelte, quantifiziertbar auf Grund der Intensität der Blaufärbung der Hefekolonien, eine ähnlich starke Interaktion mit XPO1 wie CID11 wider (Abb. 3.28, A).

Für weitere Analysen wurden die Vollängen cDNAs der CID-RBPs außerdem in den p5`GFP Vektor kloniert, der zur *in vivo* Lokalisierung in BY-2 Protoplasten genutzt wurde. Die Expression der Konstrukt in den BY-2 Protoplasten erfolgte über Nacht und die Detektion am darauffolgenden Tag wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt.

Alle vier untersuchten CID-RBPs sind hauptsächlich im Zytoplasma der BY-2 Protoplasten lokalisiert und mehr oder weniger schwach im Nukleus der Protoplasten detektierbar (Abb. 3.28, B eins bis vier). Die Verwendung von LMB diente zur Inhibition des Kernexports via XPO1 (KUDO *et al.* 1999; YASHIRODA und YOSHIDA 2003). Die Wirkungsweise von LMB besteht darin, dass es spezifisch ein Cystein (in humanem CRM1 das Cystein 528) kovalent bindet, welches sich in der NES-bindenden Region von XPO1 befindet. LMB erzielt somit den Effekt, dass eine potentielle Cargoprotein von XPO1 nicht mehr aus dem Kern exportiert werden kann und folglich im Nukleus akkumuliert. Dies konnte für alle vier untersuchten CID-RBPs gezeigt werden. Es war eine deutliche Verschiebung der

Lokalisierung der CID-RBPs in den Nukleus erkennbar (Abb. 3.28, B, fünf bis acht) und somit ein Hinweis darauf, dass die verschiedenen CID-RBPs *targets* von XPO1 in pflanzlichen Zellen sind. Einzig das Ergebnis für CID12 stimmte nicht überein mit den gewonnenen Resultaten aus der zuvor durchgeführten Analyse im Y2H-System (Abb.3.28, A). Obwohl CID12 hier keine Interaktion mit XPO1 zeigte, wurde dennoch durch LMB ein deutlich Effekt hervorgerufen, was daraufhin weist, dass es dennoch ein potentiell *target* von XPO1 im pflanzlichen Organismus sein muss.

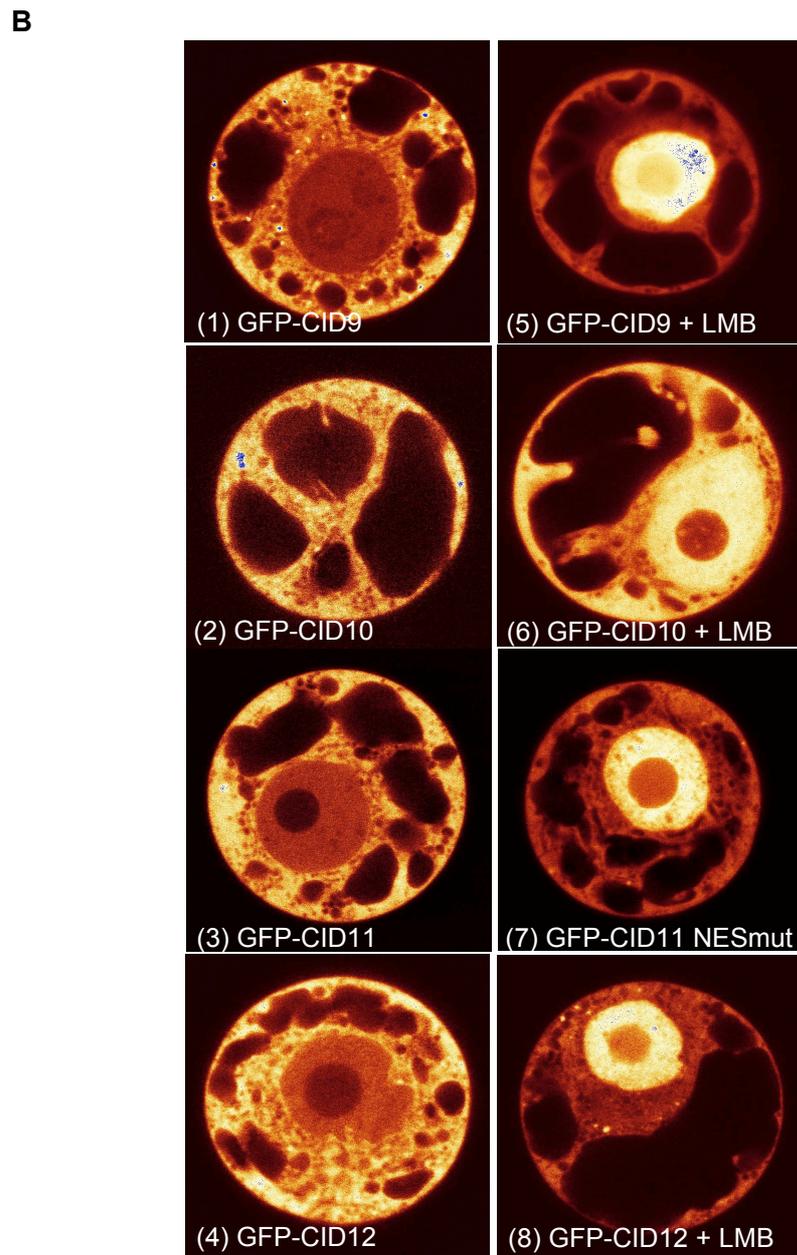
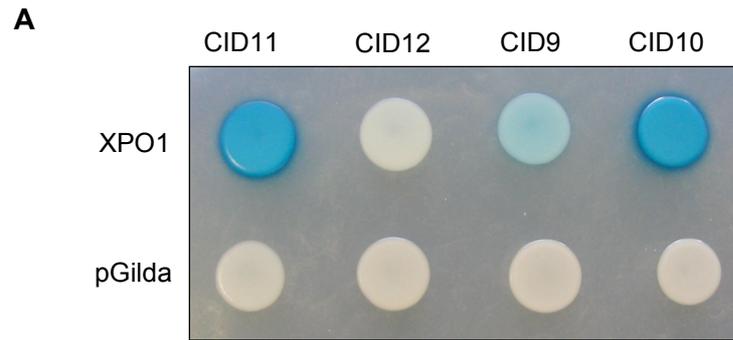


ABB. 3.28: ANALYSE DES KERNEXPORTS VON CID-RBPs IM Y2H-SYSTEM UND *IN VIVO* LOKALISIERUNG IN BY-2 TABAKPROTOPLASTEN.

In (A) das Ergebnis der Interaktionsstudie im Y2H-System dargestellt. Die cDNA der CID-RBPs waren in Vektor pB42AD kloniert. Es erfolgte die Koexpression mit XPO1, dessen cDNA im Vektor pGilda kloniert war, im Hefestamm EGY[p8op-lacZ]. Als Negativkontrolle wurden die CID-RBPs zusammen mit dem Leervektor pGilda in Hefen exprimiert. Eine Interaktion der Proteine führte zur Transaktivierung der β -Galaktosidase, dessen Substrat, X-Gal, im Medium enthalten war. Die Spaltung von X-Gal führte zur Blaufärbung. Zur *in vivo* Lokalisierung der CID-RBPs in BY-2 Tabakprotoplasten (B) wurden die cDNAs in die p5'GFP Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden transient transformiert und die Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert (B, 1 bis 4). Repräsentative Aufnahmen veranschaulichen: (1) GFP-CID9, (2) GFP-CID10, (3) GFP-CID11 und (4) GFP-CID12. 45 Minuten nach Zugabe von LMB wurden Aufnahmen von den Protoplasten vorgenommen: (5) GFP-CID9 + LMB, (6) GFP-CID10 + LMB, (7) GFP-CID11 + LMB und (8) GFP-CID12 + LMB.

3.4.5 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER NES IN PAB2 IM Y2H-SYSTEM

PAB2 gehört zur Familie der Poly(A)-bindenden Proteine (PABPs). Charakteristisch für diese Familie sind die im N-terminalen Abschnitt befindlichen vier RRM's sowie die PABC-Domäne, eine Protein-Protein Interaktionsdomäne, im C-Terminus (KENAN *et al.* 1991; KOZLOV *et al.* 2001). Wie im Falle von CID11 konnte auch für PAB2 im Y2H-Screen nicht die vollständige cDNA isoliert werden. Das Konstrukt PAB2-1 umfasste die AS-Reste 357 bis 629 und enthielt nur die Hälfte eines RRM's (s. auch Abb. 3.29). PAB2-1 wies eine deutliche Interaktion mit XPO1 im Y2H-System auf (Abb. 3.29). Die AS-Sequenz von PAB2 ließ darauf schließen, dass sich die putative NES möglicherweise direkt am Ende des Proteins befinden könnte, was zur Klonierung von zwei weiteren Deletionen von PAB2 führte. Die eine, PAB2-2 reichte von AS 357 bis 616 und PAB2-3 bestand aus AS 357 bis 535. Diese Konstrukte interagierten nicht mit XPO1 im Y2H-System (Abb. 3.29), was bedeutete, dass die NES im Bereich zwischen den AS-Resten 616 und 629 liegen musste. Eine Rev-NES verwandte Sequenz stellte der Bereich 623 bis 628 mit den AS-Resten LxxLxL dar. Zur Mutation der NES in PAB2 wurden die drei Lysine durch den Austausch einzelner Basen in der Nukleotidsequenz durch Alanin ersetzt. Die Mutation der NES im Konstrukt PAB2-4 (AS 357 bis 629) resultierte in einer vollständigen Hemmung der Interaktion mit XPO1 im Y2H-System (Abb. 3.29).

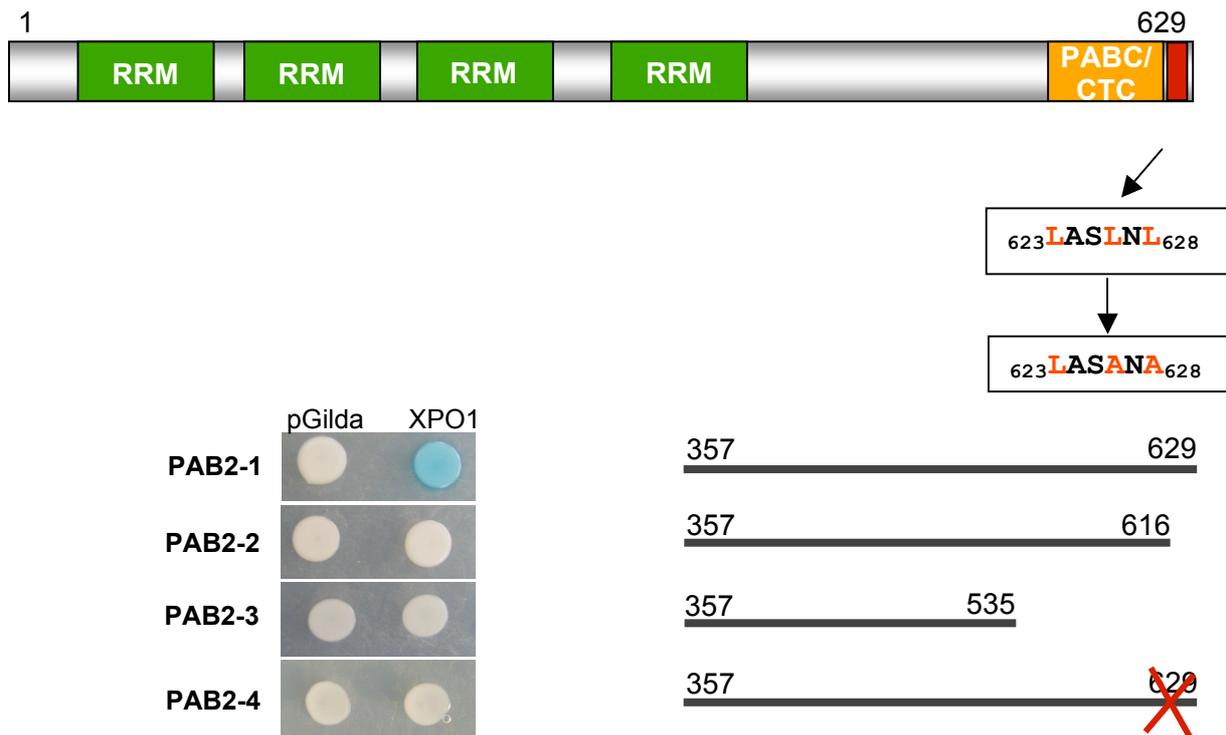


ABB. 3.29: ANALYSE VON DELETIONS- UND MUTATIONSKONSTRUKTEN VON PAB2 IM Y2H-SYSTEM.

Dargestellt ist die Struktur von PAB2 mit den bekannten Domänen. Die Ziffern bezeichnen die AS-Reste, bei denen die Deletionskonstrukte beginnen bzw. enden. Angegeben ist weiterhin die Position der NES in der Aminosäuresequenz und die durch Punktmutationen bestimmter Basen eingefügten Aminosäureaustausche zu Alanin (Buchstaben in rot). Die Deletionen und das Mutationskonstrukt von PAB2 waren in den Vektor pB42AD kloniert. Die cDNA von XPO1 war in pGilda kloniert. Die Koexpression fand im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] statt. Interaktionen der PAB2-Konstrukte und XPO1 führten zur Transaktivierung der β -Galaktosidase, dessen Substrat X-Gal, im Indikationsmedium enthalten war. Die Spaltung von X-Gal führte zur Blaufärbung. Als Kontrolle diente die Koexpression von den zu untersuchenden Konstrukten mit dem Leervektor pGilda. NES, *nuclear export signal*; RRM, *RNA recognition motif*, PABC, Protein-Protein Interaktionsdomäne.

3.4.6 \square *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON PAB2 IN BY-2 TABAKPROTOPLASTEN

Die subzelluläre Lokalisierung sowohl der bereits im Y2H-System getesteten Konstrukte von PAB2 als auch des Volllängenproteins und der Volllängen NES-Mutante von PAB2 erfolgte durch Transfektion von BY-2 Protoplasten.

Das Konstrukt PAB2-1 zeigte eine Gleichverteilung zwischen Nukleus und Zytoplasma (Abb. 3.30, 1). Die C-terminalen Deletionskonstrukte PAB2-2 und PAB2-3, die keine Interaktion mit XPO1 im Y2H-System vorwiesen, da ihnen das Kernexportsignal fehlte, zeigten im Protoplastensystem eine Verschiebung der Lokalisierung in den Nukleus der BY-2

Protoplasten (Abb. 3.30, 2 und 3). Eine schwache Fluoreszenz von PAB2-2 und PAB2-3 ist weiterhin im Zytoplasma messbar.

Zur genaueren Analyse der subzellulären Lokalisierung von PAB2 wurde die Vollängen cDNA in den p5'GFP Vektor kloniert und auch die NES-Mutante von PAB2 wurde vor dem Hintergrund es Vollängenproteins im Protoplastensystem untersucht. Im Gegensatz zum Konstrukt PAB2-1 (Abb. 3.30, 1), welches ursprünglich im Y2H-Screen isoliert wurde und dem die AS-Reste 1 bis 356 fehlen, ist das Vollängenprotein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 3.30, 4). Die Mutation der NES im Vollängenprotein führte zu einer Verschiebung von PAB2 in den Nukleus der Protoplasten. Ein deutliches Signal blieb weiterhin im Zytoplasma detektierbar (Abb. 3.30, 5).

Die Inkubation der mit Wildtyp PAB2 transfizierten Protoplasten mit LMB resultierte in einer deutlichen Verschiebung der Lokalisierung des Proteins in den Nukleus (Abb. 3.30, 6). Die Verwendung von LMB und der damit hervorgerufene Effekt auf die Lokalisierung von PAB2 belegte, dass der Kernexport des RNA-bindenden Proteins durch XPO1 vorgenommen wird und unterstützte somit die bereits aus dem Y2H-System gewonnenen Ergebnisse.

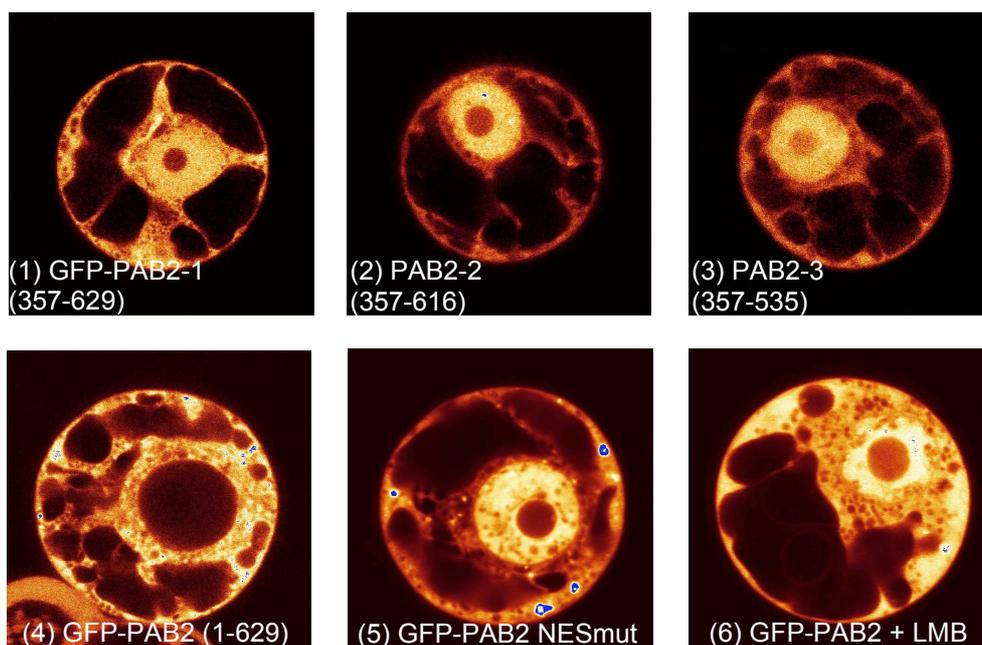


ABB. 3.30: *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON GFP-PAB2-FUSIONSPROTEINEN IN BY-2 PROTOPLASTEN.

Zur *in vivo* Lokalisierung der GFP-PAB2-Fusionsproteine wurden die cDNAs in die p5'GFP Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden transient transfiziert und die Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert. Repräsentative Aufnahmen veranschaulichen: (1) GFP-PAB2-1 (357-629), (2) GFP-PAB2-2 (357-616), (3) GFP-PAB2-3 (357-535), (4) GFP-PAB2 (1-629) und (5) GFP-PAB2 NESmut (1-629). (6) 45 Minuten nach Zugabe von LMB wurden Aufnahmen von den Protoplasten vorgenommen, die GFP-PAB2 (1-629) überexprimierten (vgl. Abb. 3.29).

3.4.7 □ DIMERISIERUNGSPOTENTIAL VON CID11 UND PAB2 IM BiFC-SYSTEM

Für die beiden Proteine CID1 und CID7 wurde berichtet, dass sie mit PAB2 interagieren und folglich Heterodimere ausbilden können (BRAVO *et al.* 2005). Getestet wurde die Dimerisierung der beiden RBPs von Bravo *et al.* (2005) jedoch nur im Y2H-System, also einem heterologen System. Die Koexpression im BiFC (BRACHA-DRORI *et al.* 2004; WALTER *et al.* 2004) in BY-2 Tabakprotoplasten ermöglichen einen Nachweis der Dimerisierung im pflanzlichen System. Zusätzlich kann eine genauere Lokalisierung des Heterodimers vorgenommen werden.

Eine Dimerisierung von CID11 und PAB2 konnte im Protoplasten-System nachgewiesen werden (Abb. 3.31, A). Das Heterodimer aus beiden RNA-bindenden Proteinen war ausschließlich im Zytoplasma der BY-2 Protoplasten lokalisiert. Weitere Untersuchungen im BiFC-System dienten zur Überprüfung der Bildung von CID11-Homodimeren und deren Lokalisierung. Es wurde festgestellt, dass grundsätzlich eine Homodimer Bildung von CID11 möglich ist, die im Zytoplasma der Protoplasten stattfindet (Abb. 3.31, B). Ist die NES in beiden CID11 Fusionsproteinen mutiert, führte dies zu einer Verschiebung der Lokalisierung des Homodimers. Da beiden Proteinen eine funktionale NES fehlte, akkumulierten sie im Nukleus und woraufhin eine Homodimerisierung von CID11 auch im Nukleus der Protoplasten detektiert werden konnte (Abb. 3.31, C).

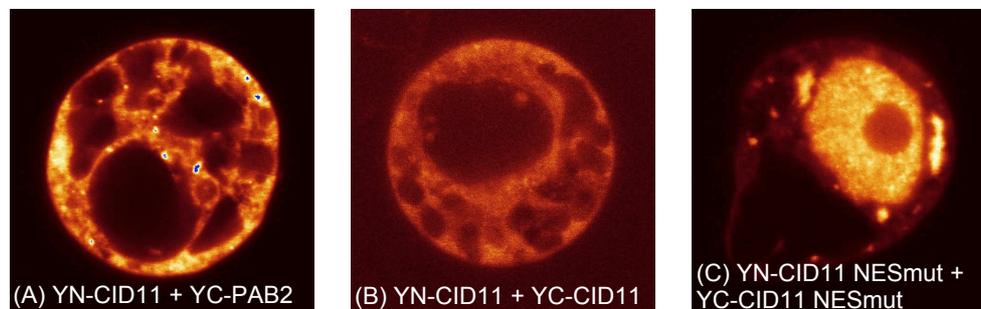


ABB. 3.31: *IN VIVO* LOKALISIERUNG VON KOEXPRIMIERTEN *SPLIT*-YFP-FUSIONSPROTEINEN IN BY-2 PROTOPLASTEN.

BY-2 Protoplasten wurden transient mit *Split*-YFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und die Lokalisierung der YFP-Fluoreszenz mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops detektiert. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen (A) YN-CID11 + YC-PAB2, (B) YN-CID11 + YC-CID11 und (C) YN-CID11 NESmut + YC-CID11 NESmut. YN, N-terminaler Teil des YFP ist an zu testendes Konstrukt fusioniert; YC, C-terminaler Teil des YFP ist an zu testendes Konstrukt fusioniert.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER BISHER CHARAKTERISIERTEN NES IN PFLANZLICHEN PROTEINEN

Der in früheren Studien durchgeführte Y2H-Screen, in dem XPO1 als *bait* verwendet wurde, resultierte in der Isolierung von zahlreichen verschiedenen Proteinen, die in Untergruppen eingeteilt werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vertreter aus den beiden Untergruppen Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteine ausgewählt und die NES sowie in einigen Fällen die NLS in diesen Proteinen identifiziert.

In Abb. 3.32 ist eine Zusammenfassung der charakterisierten NES im Vergleich zur bekannten REV-Typ NES (FISCHER *et al.* 1995). In regelmäßigen Abständen befinden sich hydrophobe Aminosäuren und in den meistens Fällen sind diese Leucin. Daneben können aber auch die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Valin, Phenylalanin oder Methionin anstelle von Leucin auftreten (Abb. 3.32). Zwischen den hydrophoben AS-Resten können sich andere, beliebige (x in Abb. 3.32) AS-Reste befinden. Die Anzahl dieser beliebigen AS-Reste ist von NES zu NES unterschiedlich und schwankt zwischen eins bis drei. MYB101 ist das einzige der hier untersuchten pflanzlichen Proteine, das drei unabhängig NES aufweist, die übrigen analysierten Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteine, besitzen nur ein Exportsignal.

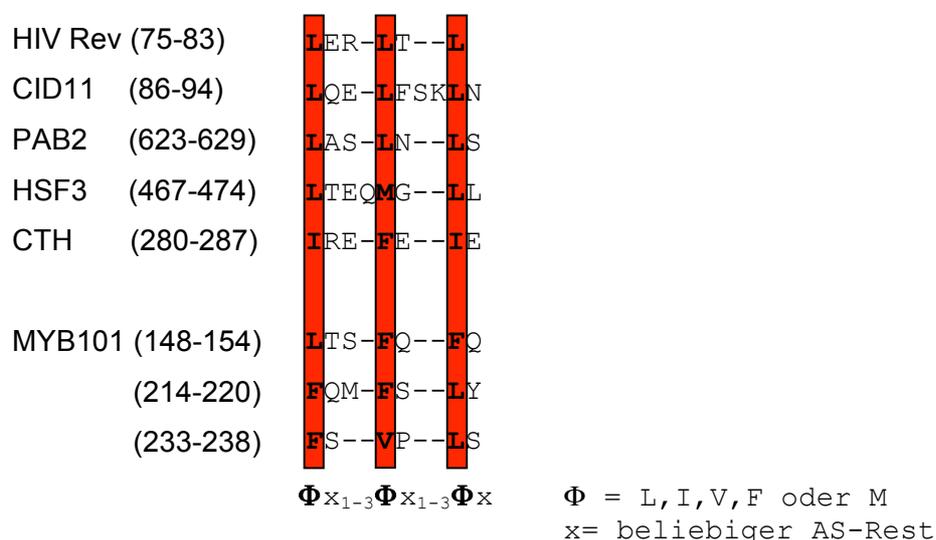


ABB. 3.32: ZUSAMMENFASSUNG DER IN IDENTIFIZIERTEN NES.

Die NES ist definiert als eine kurze Sequenz bestehend aus hydrophoben AS-Resten (Φ), wobei Leucin am häufigsten auftritt. Oben angegeben ist die Rev-Typ NES, nach deren Vorbild nach NES in pflanzlichen Proteinen gesucht wurde. Angegeben sind weiterhin die hier identifizierten NES.

4. DISKUSSION

Ein schneller und effizienter Transport von Proteinen und Komplexen durch die Kernhülle ist erforderlich zum Austausch von Informationen zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma in eukaryotischen Zellen. Bis zu einer molekulare Masse von 40 bis 60 kDa können Proteine oder Komplexe mehr oder weniger frei durch die in der Kernhülle befindlichen *nuclear pore complexes* (NPCs) diffundieren. Oberhalb dieser Ausschlussgröße können Proteine zwar weiterhin passive die Kernhülle überwinden, dieser Prozess findet aber deutlich langsamer statt als bei Proteinen mit einer geringeren molekularen Masse. Der aktive Transport von Molekülen über die NPCs ist ein selektiver Vorgang und wird beeinflusst durch spezifische Transportsignale. Den ersten Hinweis auf die Existenz solcher Transportsignale fanden Dingwall et al. (1982). Sie injizierten intaktes Nucleoplasmin in *Xenopus laevis* Eizellen, welches daraufhin rasch in den Nukleus wanderte. Das Entfernen des C-terminalen Bereichs von Nucleoplasmin unterband dessen Import in den Nukleus der Zellen. Die Kernimportsignale (NLS, *nuclear localisation signal*) des Nucleoplasmins und des SV40 *large-T* Antigen (KALDERON et al. 1984; LANFORD und BUTEL 1984) gelten als die Prototypen der klassischen NLS. Die NLS ebenso wie das Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) finden sich in vielen verschiedenen Proteinen wieder. Die Transportsignale in den für den Kernimport und Kernexport bestimmten Proteine werden in den Zellen von Rezeptoren erkannt. Die NLS wird von Importin α erkannt, welches die Funktion eines Adapters übernimmt zwischen dem Cargo und dem eigentlichen Importrezeptor Importin β . Proteine mit einer NES werden von dem Exportrezeptor Crm1/XPO1 gebunden. In *A. thaliana* wurde ein Ortholog zum in Hefen und höheren Organismen beschriebenen Kernexportrezeptor Crm1 charakterisiert, das Exportin 1 (HAASEN et al. 1999). Es existieren zwei Gene in *A. thaliana*, die für XPO1 kodierten, *XPO1A* und *XPO1B*. Im Gegensatz dazu ist für Hefe, Säuger und Menschen jeweils nur ein Gene bekannt, das für Crm1/XPO1 kodiert.

Um den Prozess des Kernexports von Proteinen im pflanzliche System besser verstehen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die nukleozytoplasmatische Partitionierung von Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen und die damit möglicherweise verbundenen regulatorischen Funktionen genauer untersucht. Diese beiden Klassen bilden zwei von insgesamt sechs Untergruppen, in denen XPO1-interagierende Proteine (XIPs) zusammengefasst worden sind (in Vorbereitung HAASEN et al. 2008). Weitere Untergruppen werden gebildet von Nukleoporinen, die am Aufbau von *nuclear pore complexes* (NPC) beteiligt sind und an die XPO1 während eines Translokationsvorganges bindet, sowie von Proteinen, die in den Kernexportprozess involviert sind. Eine andere Untergruppe besteht aus Adapterproteinen, die am Kernexport von ribosomalen Untereinheiten beteiligt sind. In

der sechsten Untergruppe sind regulatorische Proteinen zusammengefasst (in Vorbereitung HAASEN *et al.* 2008). Da es bisher wenige Veröffentlichungen zu NES in pflanzlichen Proteinen gibt, war ein Ziel dieser Arbeit, das Exportsignal für XPO1 in verschiedenen XIPs zu charakterisieren. Von den analysierten Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen wurden zur genaueren Lokalisierung der NES innerhalb der Proteinsequenz Deletions- und Mutationskonstrukte der klonierten cDNAs hergestellt, die dann im Y2H-System analysiert wurden. Die subzelluläre Lokalisierung dieser Proteine erfolgte als GFP-Fusionsproteine in BY-2 Tabakprotoplasten. Einer Beteiligung von XPO1 am Kernexport der zu untersuchenden Proteine wurde in BY-2 Protoplasten durch die Verwendung von Leptomycin B (LMB) nachgewiesen (KUDO *et al.* 1999).

4.1 □ XPO1-ABHÄNGIGER KERNEXPORTE REGULATORISCHER PROTEINE IN A. THALIANA

Die zwei in *A. thaliana* für XPO1 kodierenden Gene, *XPO1A* (At5g17020) und *XPO1B* (At3g03110), sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und sind vermutlich das Resultat einer Genduplikation. *XPO1A* besteht aus 29 Exons und *XPO1B* wird aus insgesamt 32 Exons zur mRNA zusammengesetzt. Die Proteinsequenzen der beiden Exportrezeptoren weisen eine 86 %ige Identität und eine 93 %ige Ähnlichkeit auf. Das Protein *XPO1A* umfasst 1075 AS-Reste und *XPO1B* besteht aus 1076 AS-Resten. Die Expression beider Gene, die für XPO1 kodieren, erfolgten in allen Geweben von *A. thaliana* (Abb. 4.1). Wobei *XPO1A* deutlich stärker exprimiert wird als *XPO1B*. Lediglich in reifen Pollen tritt eine höhere *XPO1B* Expression auf.

Die Isolierung von homozygoten T-DNA Insertionslinien für beide Gene und die anschließende phänotypische Analyse der Pflanzen erbrachte neue Erkenntnisse über mögliche unterschiedliche Funktionen der beiden Kopien von *XPO1* im Genom von *A. thaliana*. Für die *xpo1b knock out* Linie wurden kürzere Internodien festgestellt (Abb. 3.3). Die Internodienlänge beim Wildtyp Col-0 betrug etwa 23 mm und bei einer *xpo1b* Pflanze wurde eine Länge von ca. 13 mm gemessen. Das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen werden auf vielfältige Weise durch die Phytohormone Auxin und Gibberellin (GA) beeinflusst. Pflanzen, die Mutationen in der GA-Konzentration oder in der Wirkungsweise dieses Phytohormons aufweisen, haben einen kleinwüchsigen Phänotyp (*dwarf* oder *semi-dwarf*). Beispielsweise gibt es die *dwarf1* (*d1*) und die *GA-intensitive dwarf2* (*gid2*) Mutationen in Reis und die *sleepy1* (*sly1*) Mutante in *A. thaliana* (MITSUNAGA *et al.* 1994; SASAKI *et al.* 2003; STEBER *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu werden Pflanzen, die eine erhöhte GA-Konzentration haben, deutlich größer. Kürzere Internodien in *A. thaliana* wurden

auch beobachtet bei Linien, die *MYB33* überexprimierten, welches eine Mutation in seiner Bindestelle für die microRNA (miRNA) 159a besaß (MILLAR und GUBLER 2005). Die miRNA 159a reguliert *MYB33* post-transkriptional und beeinflusst somit die Konzentration von *MYB33*-Transkript. Durch die Mutation in der miRNA Bindestelle wird verhindert, dass *MYB33* in überexprimierenden Pflanzen negativ reguliert wird, was zu wirklichen überexprimierenden Linien führt. *MYB33* gehört zur Familie der GAMYBs in *A. thaliana* und ist ein positiver Regulator in der GA Signaltransduktion. Im Vergleich dazu resultierte eine *gamyb* Mutation in Reis ebenfalls in kürzeren Internodien (KANEKO *et al.* 2004).

Der Aufbau einer Pflanze wird durch das Sprossapikalmeristem (SAM, *shoot apical meristem*) beeinflusst, welches die Bildung von Blattprimordien, Internodien und Achselmeristem steuert. Die KNOX-Proteine spielen in *A. thaliana* eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des SAM. Zur Familie der KNOX-Proteine (*KNOTTED1-like homeobox*) gehören die Klasse I und Klasse II Proteine (BHARATHAN *et al.* 1999; KERSTETTER *et al.* 1994), wobei die Mitglieder der Klasse I für eine optimale Funktion des Meristems verantwortlich sind (REISER *et al.* 2000). Zu den KNOX Klasse I Proteine zählen STM (SHOOTMERISTEMLESS), KNAT1 (*knotted1-like Arabidopsis thaliana*), KNAT2 und KNAT6. STM ist involviert in die Bildung des SAM und des Infloreszenzmeristems durch Aufrechterhaltung von undifferenzierten Zellen (ENDRIZZI *et al.* 1996). Eine null-Mutante von STM resultiert in einem Keimling ohne SAM. Die KNOX Klasse II umfasst die Mitglieder KNAT3, KNAT4, KNAT5 und KNAT7, welche funktional noch nicht charakterisiert sind. Eine Interaktion von STM, KNAT2, KNAT6, KNAT1 und KNAT5 mit XPO1A und XPO1B im Y2H wurde im Rahmen einer Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genomforschung untersucht (SCHLEPPENBÄUMER 2006). Die analysierten KNOX-Proteine interagierten sowohl mit XPO1A als auch mit XPO1B, wobei eine deutlich stärkere Interaktion mit XPO1B beobachtet werden konnte.

Des Weiteren interagieren die KNOX Proteine mit den Mitgliedern der BEL1-like (BELL) Familie, die ebenfalls eine Homeodomäne besitzen (BELLAOUI *et al.* 2001). Zur Familie der BELL-Proteine gehören ATH1 (*ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN 1*), BEL1 sowie die BEL1-like Homeodomain Proteine BLH1 bis BLH10 (BECKER *et al.* 2002). Eines der am besten analysierten Proteine der BELL-Familie ist das BLH9, welches auch als VAAMANA, PENNYWISE oder REPLUMLESS bezeichnet wird, basierend auf den verschiedenen Phänotypen der BLH9 Mutante. Darüber hinaus besitzen BLH9 Mutanten zusätzlich kürzere Internodien und die KNOX-BELL Heterodimere übernehmen regulatorische Funktionen in Entwicklungsprozessen im Meristem (SMITH und HAKE 2003). Eine Interaktion von BLH9 mit XPO1A oder XPO1B konnte nicht nachgewiesen werden, wohl aber für BLH3, welches eine Rev-ähnliche NES besitzt (SCHREIBER 2001).

Neben BLH9 resultiert auch die Mutation in *BREVIPEDICELLUS* (*BP*) in kürzeren Internodien, was einen Einfluss von *BP* auf die Entwicklung der Internodien vermuten lässt (VENGLAT *et al.* 2002). Eine Doppelmutante von *blh9* und *bp* war deutlich kleiner als die Einzelmутanten und der Wildtyp Col-0. Die Internodienlänge von *blh9 bp* Mutanten betrug zwischen weniger als einem bis etwa 10 mm, während bei Col-0 die Internodienlänge 20 bis 26 mm war.

Die Länge der Internodien wird also durch viele Faktoren beeinflusst, die direkt oder indirekt mit XPO1 interagieren können. Eine Mutation in *xpo1b* kann somit Einfluss nehmen auf die Internodienlänge, indem ein Export der betreffenden Faktoren vermindert wird und dadurch andere Mechanismen über oder unter repräsentiert sind, je nachdem in welche regulatorischen Schritte der jeweilige Faktor involviert ist. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass XPO1A den Export von XPO1B Cargo übernehmen kann, da beide Exportrezeptoren in den gleichen Geweben exprimiert werden (Abb. 4.1), was jedoch nicht automatisch bedeutet, dass sie auch dort translatiert werden.

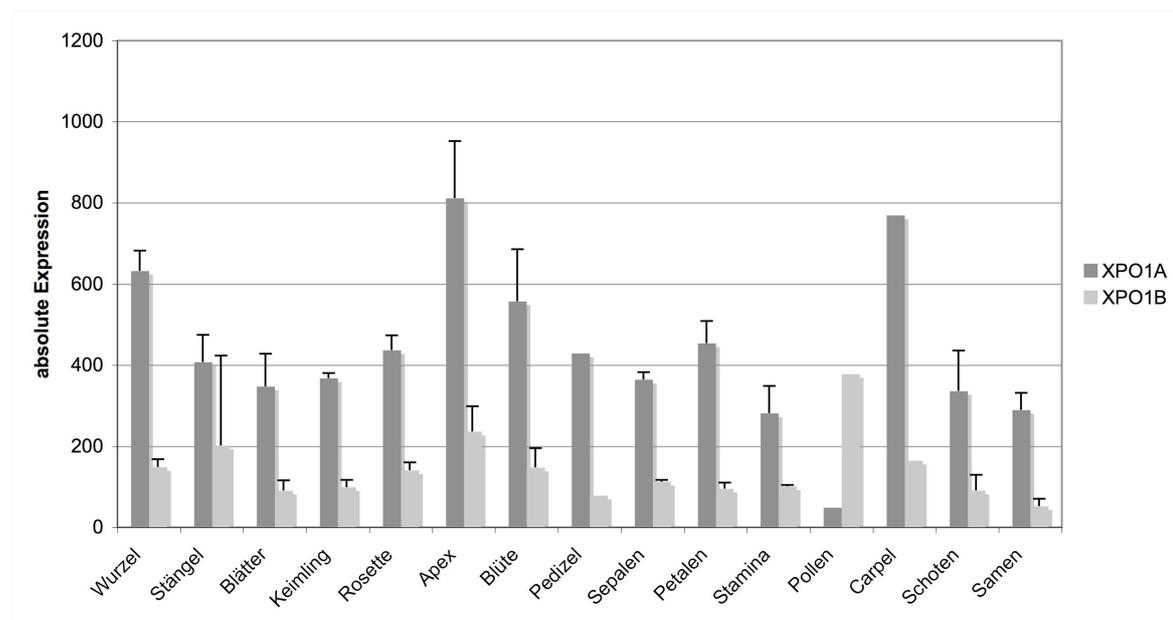


ABB. 4.1: EXPRESSIONSMUSTER FÜR XPO1A UND XPO1B.

Absolute Expression von XPO1A (dunkelgraue) und XPO1B (hellgraue) in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*. (SCHMID *et al.* 2005)

Die Kreuzung der beiden homozygoten *knock out* Linien für *xpo1a* und *xpo1b* sollte näheren Aufschluss darüber liefern, inwiefern die Funktion der beiden Genprodukte redundant ist und ob eine Mutation in *xpo1a*, die keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp Col-0 ergab, im Zusammenhang mit *xpo1b* einen auffälligen Phänotyp auslöst. Die Generierung von homozygoten Doppelmutanten mit dem formalisierten Genotyp *aabb* war nicht möglich. Ausschließlich Pflanzen mit den Genotypen *AaBb*, also heterozygote T-DNA Insertionen für *xpo1a* und *xpo1b*, oder *Aabb*, und damit nur für *xpo1b* homozygot, wurden gefunden. Die Untersuchungen zur Keimungsrate ergaben, dass alle Samen keimten, wobei sich Samen mit dem gewünschten Phänotyp *aabb* nicht unter den ausgesäten befunden haben müssen, da der Genotyp möglicherweise bereits in einem früheren Entwicklungsstadium letal ist. Es erfolgte daher die Untersuchung der Schoten und der damit verbundenen Samenentwicklung bei Kreuzungsmutanten mit den Genotypen *AaBb* und *Aabb*. Ausgehend von einer Letalität des haploiden Gametophyten, wäre nach Selbstung von Pflanzen des Genotyps *AaBb* der Genotyp *aabb* mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/16 zu erwarten (Tab. 4.1, A). Da aber auch solche Pflanzen mit dem Genotyp *aaBb*, also homozygote T-DNA Insertion für *xpo1a* und heterozygot für *xpo1b*, nicht isoliert werden konnten, sind mindestens drei von 16 Samen letal. Bei durchschnittlich 55 Samen pro Schote würde das bedeuten, dass ca. 10,3 Samen letal sind. Die Quantifizierung der Samen pro Schote ergab jedoch, dass nur zehn bis 15 Samen pro Schote in Pflanzen mit dem Genotypen *AaBb* gebildet wurden (Abb. 3.4). Es waren also durchschnittlich 40 Samen abortiert, was etwa 72 % entspricht. Es ist somit anzunehmen, dass möglicherweise eine Gametophytleletalität von *a* vorliegt. D.h., wenn bereits ein *XPO1A* Gen mutiert ist, würde dies zu einer Letalitätsrate von 75 % führen (Tab. 4.1, A, fettgedruckte Genotypen).

Die Selbstung von Pflanzen des Genotyps *Aabb* würde zur Letalität von ¼ der Samen führen, wenn nur der Genotyp *aabb* letal wäre (Tab. 4.2, B). Aber auch hier wurden nur etwa zehn bis 15 Samen pro Schote gebildet (Abb. 3.4), womit wiederum ca. 72 % der Samen abortiert waren. Diese Quantifizierung deutet ebenfalls daraufhin, dass eine Gametophytleletalität von *a* vorliegt kann (Tab. 4.1, B, fettgedruckte Genotypen).

TAB 4.1 : KREUZUNGSSCHEMA *xpo1a xpo1b* DOPPELMUTANTEN.

(A) Nach Selbstung von AaBb Doppelmutanten tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/16 der Genotyp aabb auf. (B) Die Selbstung von Aabb Doppelmutanten resultiert in mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/4 in aabb Doppelmutanten. Rot umkreist sind diejenigen Genotypen, wenn eine Sporophytletalität vorliegt. Fettgedruckt sind die Genotypen, wenn eine Gametophytletalität von a vorliegt.

A.	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	Aabb	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBa	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

B.	Ab	Ab	ab	ab
Ab	AAbb	AAbb	Aabb	Aabb
Ab	AAbb	AAbb	Aabb	Aabb
ab	Aabb	Aabb	aabb	aabb
ab	Aabb	Aabb	aabb	aabb

Warum der Genotyp aabb während der Entwicklung der Samen oder noch bevor es dazu komme, eventuell liegt auch schon ein Defekt in der Entwicklung der Samenanlagen vor, letal ist, kann viele Gründe haben. XPO1 ist kein hoch spezifischer Rezeptor, der nur eine bestimmte Proteinfamilie exportieren kann. XPO1 bindet eine Vielzahl von Proteinen, wie der Y2H *screen* nach potentiellen Interaktionspartnern gezeigt hat. Voraussetzung für die Interaktion mit XPO1 ist eine NES im zu exportierenden Protein. Einige der im *screen* isolierten Proteine wurden in voran gegangenen Arbeiten und auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Das breite Spektrum an Cargos, die XPO1 exportiert, können möglicherweise in an einem Schritt in der Entwicklung der Samenanlagen oder der Samen beteiligt sein.

Eine RT-PCR zu Nachweis von *XPO1B* Transkript in Wildtyp Col-0 war nicht möglich (Abschnitt 3.1.1), obwohl es in Rosettenblättern exprimiert wird (Abb. 4.1). Möglicherweise liegt eine zu geringe Konzentration an Transkript vor, welches einen Nachweis mittels RT-PCR unmöglich machte. Eine redundante Funktion von XPO1A und XPO1B kann nicht ausgeschlossen werden, da Kreuzungsmutanten des Genotyps Aabb isoliert werden konnten.

4.2 □ KERNEXPORT UND NES IN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Die transkriptionale Antwort auf intra- oder extrazelluläre Stimuli erfordert die Translokation von regulatorischen Faktoren in den Nukleus von pflanzlichen Zellen. Die nukleozytoplasmatische Partitionierung von Transkriptionsfaktoren stellt einen Prozess dar, der die Aktivierung und Inaktivierung der Transkription von wichtigen Genen reguliert. Die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren gehören unterschiedlichen Familien an. Der erforderliche Exportrezeptor XPO1 oder auch in Hefen und Säugern als Crm1 (*chromosome region maintenance 1*) bezeichnet, wurde ursprünglich in *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert, wo Mutationen im Gen, das für *Crm1* kodiert, zu deformierten Chromosomdomänen führte (ADACHI und YANAGIDA 1989). Der durch XPO1 vermittelte Exportmechanismus erfordert die Anwesenheit einer NES in Proteinen, die für den Kernexport vorgesehen sind. Die Proteinsequenz der NES weist auch in verschiedenen Organismen ein ähnliches Muster aus hydrophoben AS-Resten auf (Tab. 4.2). Die klassische NES wurde zum ersten Mal in dem Rev-Protein des HI-Virus (FISCHER *et al.* 1995) sowie dem Protein Kinase A Inhibitor, PKI, beschrieben (WEN *et al.* 1995). In Tab. 4.2 sind einige bekannte NES aus verschiedenen Organismen zusammengefasst. Aus den angegebenen NES ergibt sich folgende Konsensus-Sequenz: $\Phi_{x_{2-3}}\Phi_{x_{2-3}}\Phi x\Phi$ (BOGERD *et al.* 1996). Das Φ steht in diesem Fall für einen hydrophoben AS-Rest (L, I, V, F oder M) und das x ist stellvertretend für einen beliebigen AS-Rest.

TAB. 4.2: NES IN VIRALEN UND VERTEBRATEN PROTEINEN.

Zusammenfassung der NES Sequenzen in verschiedenen Proteinen. Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Dm, *Drosophila melanogaster*.

Protein (AS-Rest)	Sequenz	Referenz
Rev HIV (75-83)	LPP-LER-LTL	(Fischer et al. 1995)
PKI (37-46)	LALKLAG-LKI	(Wen et al. 1995)
Cyclin B1 (142-151)	LCQAFSD-VIL	(Yang et al. 1998)
MAPKK (32-42)	LQKKLEE-LEL	(Fukuda et al. 1997)
Hs Nmd3 (480-489)	LAEMLED-LHI	(Trotta et al. 2003)
Sc Nmd3 (493-502)	LLDELDE-MTL	(Ho et al. 2000)
Dm Nmd3	LEEMLED-MTL	(Trotta et al. 2003)
p53 (340-350)	MFRELNEALEL	(Stommel et al. 1999)
p73 (367-377)	LMK-LKESLEL	(Inoue et al. 2002)
NF-AT (312-321)	IVAAINA-LTT	(Klemm et al. 1997)
	$\Phi_{x_{2-3}}\Phi_{x_{2-3}}\Phi x\Phi$	

Die Proteinsequenzen der ausgewählten XPO1-interagierenden Proteine aus der Gruppe der Transkriptionsfaktoren wurden nach dem Vorbild der klassischen Rev-NES untersucht. In allen drei analysierten transkriptionalen Regulatoren, MYB101, HSF3 und AtCTH wurde eine NES bzw. in MYB101 wurden drei NES charakterisiert (Abb. 4.2, Abb. 3.7, 3.14, 3.15). Abgesehen von den hydrophoben AS-Resten unterscheiden sich die Sequenzen der NES in pflanzlichen Transkriptionsfaktoren in der Anzahl der AS-Reste, die sich zwischen den hydrophoben Resten befinden. Für virale und Vertebraten Proteine wurde berichtet, dass meistens negative geladene, polare oder kleine AS-Reste die NES umgeben (KUTAY und GUTTINGER 2005). Der Proteinkontext und die an das Exportsignal angrenzenden AS-Reste sind maßgeblich für die Aktivität einer NES. Die aus HIV Rev isolierte NES beispielsweise bindet deutlich schwächer an Crm1 als es der Fall im Vollängenkontext des Rev Proteins ist (PARASKEVA *et al.* 1999). Aber auch die flankierenden AS-Reste dürften zur NES Affinität beitragen. Die Bindungsaffinität zu Crm1/XPO1 unterscheidet sich innerhalb den verschiedenen NES, sie ist aber generell eher schwach (KUTAY und GUTTINGER 2005). Eine hohe Affinität zu Crm1/XPO1 zeigt Snurportin 1, das als Importadapter zwischen Importin β und U snRNPs fungiert. Snurportin 1 besitzt nicht die kurze Rev-Typ NES, sondern eine ganze Domäne, die die Interaktion mit Crm1/XPO1 vermittelt. Diese Domäne steht aus mehreren nicht perfekten NES. Die hohe Affinität zu Crm1/XPO1 reguliert die Bindung von Snurportin 1 zu den in den Nukleus importierten U snRNPs und verhindert ein erneutes binden von Snurportin 1 an sein Importssubstrat (PARASKEVA *et al.* 1999).

HIV Rev (75-83)	LER-LTL
HSF3 (467-474)	LTEQMGLL
CTH (280-287)	IRE-FEIE
MYB101 (148-154)	LTS-FQFQ
(214-220)	FQM-FSLY
(233-238)	FS--VPLS
	$\Phi_{x_1-3}\Phi_x\Phi_x$
	$\Phi = L, I, V, F \text{ oder } M$
	$x = \text{beliebiger AS-Rest}$

ABB. 4.2: NES IN PFLANZLICHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.

Die NES ist definiert als eine kurze Sequenz bestehend aus hydrophoben AS-Resten (Φ), wobei Leucin am häufigsten auftritt. Oben angegeben ist die Rev-Typ NES, nach deren Vorbild nach NES in pflanzlichen Proteinen gesucht wurde.

Eine weitere NES in einem pflanzlichen, transkriptionalen Regulator wurde in vorherigen, ebenfalls am Lehrstuhl für Genomforschung vorgenommenen Untersuchungen identifiziert. In dem MYBR1 Transkriptionsfaktor LCL1 wurde eine NES charakterisiert, die sich über einen Bereich von insgesamt 23 AS-Resten erstreckt (SCHMIED 2005). Zur vollständigen Hemmung der Interaktion von LCL1 und XPO1 im Y2H-System war die Mutation von elf hydrophoben AS-Resten notwendig. Die NES in LCL1 hat folgende Proteinsequenz: ${}_{247}\text{LxxMxxIxFxxVLLLxxxLxVxL}_{269}$. Mit x sind beliebige AS-Reste angegeben. Die angegebenen hydrophoben AS-Reste wurden durch Alanin ersetzen, um eine Interaktion mit XPO1 im Y2H-System vollständig zu unterbinden. Das Beispiel der NES in LCL1 verdeutlicht, dass die Sequenz des Exportsignals nicht immer der klassischen Rev-NES LxxLxL entsprechen muss, wie es auch schon für humanes Snurportin 1 beschrieben wurde (PARASKEVA *et al.* 1999).

Zur Mutation der NES in HSF3 und AtCTH wurden jeweils drei hydrophobe AS-Reste durch Alanin ersetzt. In MYB101 wurden dagegen insgesamt neun, also drei hydrophobe AS-Reste pro NES, durch Alanin ausgetauscht (Abb. 4.2). Die Mutation des Exportsignals in HSF3 und AtCTH bzw. der drei NES in MYB101 hatte zur Folge, dass XPO1 im Y2H-System nicht mehr mit den Proteinen interagieren konnte, detektierbar aufgrund der nicht vorhandenen Transaktivierung der β -Galaktosidase in den Hefezellen. In MYB101 mussten alle drei NES mutiert sein, um eine Interaktion mit XPO1 zu hemmen. Die Mutation nur einer einzelnen NES in MYB101 ließ weiterhin eine wenn auch schwächere Interaktion mit XPO1 im Y2H-System zu. Ebenso zeigte eine Mutante von MYB101, die in der NES2 und NES3 mutiert war, eine schwache aber dennoch detektierbare Interaktion mit XPO1 (Daten nicht gezeigt). Da jede einzelne der drei NES eine ähnliche Struktur wie die Rev-NES aufweist und die drei NES innerhalb der Proteinsequenz deutlich von einander getrennt sind, kann von drei unabhängigen NES gesprochen werden. Die LCL1 NES könnte dagegen als NES-Domäne mit zwei oder mehreren nicht perfekten, also nicht der Rev-NES entsprechenden, Exportsignalen bezeichnet werden.

Die Anwesenheit von zwei oder mehr NES in einem Protein bzw. Transkriptionsfaktor ist zwar ungewöhnlich, aber keine Seltenheit. Für den transkriptionalen Regulator Hs NF-AT wurden zwei Regionen beschrieben, die zwei autonome NES, NES1 und NES2, enthalten (ZHU und MCKEON 1999). Die Deletion der Region NES1 (AS-Rest 31-96) verringerte nur die Affinität von Crm1 zu NF-AT. Mutanten, denen die Region NES2 (AS-Rest 99-154) fehlte, konnte ebenfalls weiterhin Crm1 binden. Erst die Deletion beider Regionen, NES1 und NES2, verhinderte vollständig die Interaktion von NF-AT und Crm1, was bedeutet, dass beide NES für den Crm1-vermittelten Kernexport erforderlich sind.

Das humane FA Protein FANCA besitzt fünf NESs, NES1 bis NES5 (FERRER *et al.* 2005). Sie sind alle gleichmäßig im Protein verteilt, ihre Struktur ähnelt der Rev-NES und sie wurden durch den Austausch hydrophober AS-Reste durch Alanin charakterisiert. Die gleichzeitige Mutation von drei NES reduzierte zwar den Kernexport, verhinderte ihn aber nicht vollständig. Das *adenomatous polyposis coli* (APC) Protein, ein Tumor Suppressor in humanem Gewebe aber auch in Mäusen, Ratten und Fröschen vorhanden, enthält ebenfalls zwei NES (NEUFELD *et al.* 2000). Beide NES sind konserviert im APC Protein der verschiedenen Organismen und sind ebenfalls Rev-Typ NES. Die Funktionalität von beiden NES konnte nachgewiesen werden. Weshalb das APC Protein zwei NES besitzt wurde von Neufeld (2000) nicht diskutiert. Das Auftreten von mehreren NES oder einer NES-Domäne innerhalb eines Proteins kann Einfluss auf die Affinität zu Crm1/XPO1 haben (NEUFELD *et al.* 2000).

Die Verteilung von Hitze-Stress Faktoren (Hsfs) verändert sich dynamisch zwischen Nukleus und Zytoplasma und ist abhängig von der Balance zwischen Kernimport und Kernexport. Der Import in den Nukleus findet statt, wenn eine Antwort auf Hitze-Stress erforderlich ist (BANIWAL *et al.* 2004). Die Hsfs binden Promotoren von Genen, die für Hitze-Stress Proteinen (Hsps) kodieren. Der Kernexport der Hsfs resultiert in der Repression der Transkription der Hsps. Im Zytoplasma liegen die Hsfs in inaktiven Komplexen vor. Für zahlreiche Hsfs der Klasse A ist bekannt, dass sie eine NES im C-terminalen Bereich besitzen. HsfA2 aus Tomate besitzt folgende NES: ³⁴⁴LVDQLGFL*. Durch den Austausch der grau unterlegten Leucine zu Alanin sowie durch Deletion dieses Motivs, wurde die NES charakterisiert (HEERKLOTZ *et al.* 2001). Die NES im hier untersuchten HSF3 (Abb. 4.2, 3.14), oder auch als HSFA1b bezeichnet, befindet sich ebenfalls im C-terminalen Bereich des Proteins und entspricht wie die NES in HsfA2 der Rev-NES.

Zink-Finger Transkriptionsfaktoren der CCCH Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein so genanntes C3H-Zink-Finger Motiv besitzen, welches aus drei Cysteinresten und einem Histidinrest besteht. Im Gegensatz zu Tieren sind in Pflanzen nur wenige CCCH Protein funktional charakterisiert. Vermutet wird, dass die Zink-Finger Transkriptionsfaktoren hauptsächlich als RNA-bindende Proteine in der RNA Prozessierung fungieren. Die bisher in *A. thaliana* charakterisierten C3H-Zink-Finger Proteine, wie z. B. HUA1 (LI *et al.* 2001) oder *AtCPSF30* (DELANEY *et al.* 2006), wurden ebenfalls als RNA-bindende Proteine identifiziert. HUA1 scheint eine regulatorische Funktion in der Blütenbildung zu übernehmen und *AtCPSF30* ist im Nukleus lokalisiert und bindet Calmodulin.

Die Expression des Zink-Finger Transkriptionsfaktors AtCTH (At2g25900) ist vermutlich beschränkt auf die frühe und/oder mittlere Phase der Entwicklung der Stamina. Die

Expression konnte zunächst in jungen Stamina nachgewiesen werden und in späteren Entwicklungsstadien ist die Expression von AtCTH auf die Antheren begrenzt (ALVES-FERREIRA *et al.* 2007). Über die Funktion von AtCTH in diesen Geweben ist nichts bekannt. Von den wenigen in *A. thaliana* untersuchten Zink-Finger Proteinen wurde bisher weder etwas über nukleozytoplasmatische Partitionierung noch über Lokalisierungssignale berichtet. Die hier identifizierte NES in AtCTH entspricht einer Rev-typischen NES (Abb. 4.2, 3.15).

4.2.1 □ SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER NES- BZW. NLS MUTANTE VON MYB101

Die *in vivo* Lokalisierungen von Wildtyp MYB101 und der Export-negativen Mutante von MYB101 erfolgten als GFP-Fusionsproteine in BY-2 Tabakprotoplasten (Abb. 3.10). Während das Wildtyp MYB101 zum Teil im Zytoplasma und stark im Nukleus lokalisiert war, zeigte die NES-Mutante von MYB101 eine deutliche Verschiebung in den Nukleus der Protoplasten. Im Zytoplasma war jedoch weiterhin ein Signal von GFP-MYB101NESmut messbar. Erwartet worden wäre eine ausschließliche Lokalisierung der NES-Mutante im Nukleus der Tabakprotoplasten, wie es für LCL1 NESmut gezeigt werden konnte (SCHMIED 2005). Nachdem die NES-Mutante von LCL1 im Y2H-System keine Interaktion mehr mit XPO1 aufwies (Abb. 3.8), wurde dieses Konstrukt als GFP-Fusionsprotein in BY-2 Tabakprotoplasten analysiert und eine klare Lokalisierung im Nukleus detektiert. Es ist also anzunehmen, dass MYB101 möglicherweise durch Protein-Protein-Interaktionen im Zytoplasma lokalisiert bleibt. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein Y2H-Screen mit MYB101 durchgeführt. Notwendig dazu war zunächst die Analyse auf Selbstaktivierung von MYB101 im Y2H-System. Die cDNA von *MYB101* wurde in den Vektor pGilda kloniert und damit an die Bindedomäne (BD) fusioniert. Im Y2H-System zeigte das Vollängenprotein von MYB101 (AS 1 bis 490) eine deutliche Selbstaktivierung. Die Proteinsequenz wurde auf mögliche Aktivierungsdomänen analysiert, die sich durch saure AS-Reste auszeichnen. Die Proteinsequenz von MYB101 besaß zwei mögliche Aktivierungsdomänen im C-terminalen Bereich, die durch Herstellung von Deletionen in der cDNA entfernt wurden. Die C-terminalen Deletionen wiesen dennoch weiterhin die Fähigkeit zur Selbstaktivierung auf. Es folgten weitere Deletionen von denen nur ein Konstrukt, welches die beiden MYB-Domänen umfasste (AS 1 bis 143), keine Selbstaktivierung mehr zeigte. Der Y2H-Screen mit diesem Konstrukt ergab zahlreiche putative Interaktionspartner, die jedoch möglicherweise unspezifische Bindungen im Hefesystem waren (SCHRÖDER 2006).

Die in MYB101 identifizierte NLS besteht aus einem Abschnitt basischer AS-Reste, wie es für die NLS des T-Antigens des Simian-Virus 40 beschrieben wurde (KALDERON *et al.* 1984;

LANFORD und BUTEL 1984). Diese *monopartite* NLS befindet sich direkt im Anschluss an die MYB-Domäne. Für die subzelluläre Lokalisierung der NLS-Mutante von MYB101 (AS-Rest 1 bis 257, also nur der N-terminale Teil) wurde erwartet, dass sich der GFP-Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma der BY-2 Tabakprotoplasten befindet, da durch die Mutation der NLS das Lokalisierungssignal für den Nukleus fehlte. Tatsächlich war das GFP-Fusionsprotein MYB101NLSmut jedoch weiterhin deutlich stärker im Nukleus als im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert (Abb. 3.10). Es konnte lediglich eine Verschiebung der Lokalisierung in das Zytoplasma beobachtet werden. Für das Wildtyp MYB101 (AS-Rest 1 bis 257) wurde eine stärkere Lokalisierung im Kern und ein im Vergleich zur NLS-Mutante deutlich schwächeres Signal im Zytoplasma detektiert. Die subzelluläre Lokalisierung der NLS-Mutante des MYBR1 Transkriptionsfaktor LCL1 war dagegen ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt, während für das Wildtype Vollängenprotein LCL1 eine Gleichverteilung zwischen Nukleus und Zytoplasma vorlag (SCHMIED 2005). Wie schon für die NES-Mutante von MYB101 vermutet wurde, kann auch für die NLS-Mutante von MYB101 angenommen werden, dass Protein-Protein-Interaktionen Einfluss auf die Lokalisierung nehmen.

Proteine, die weder eine NES noch eine NLS besitzen, liegen in der Regel gleich verteilt vor, da sie auf Grund von Diffusion die NPCs passieren können und somit vom Nukleus ins Zytoplasma gelangen und umgekehrt. Große Proteine, die das Ausschlussvolumen von 40 bis 60 kDa übersteigen, haben im Prinzip auch die Fähigkeit durch die Kernporen zu diffundieren, wenn auch deutlich ineffizienter. So konnte für ein Reporterkonstrukt, das das Ausschlussvolumen überstieg, in Säugerzellen eine Gleichverteilung zwischen Nukleus und Zytoplasma beschrieben werden (KUDO *et al.* 1999). Die massive Überexpression des GFP-Reporterkonstrukts unterstützte vermutlich die beobachtete gleichmäßige Verteilung.

Die subzelluläre Lokalisierung von Wildtyp MYB101 und der NES-Mutante von MYB101 wurde auch *in planta* analysiert (Abschnitt 3.2.4). Dazu wurden Col-0 Pflanzen mit diesen beiden Konstrukten, welche zur Visualisierung an YFP fusioniert waren, stabil mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Die Expression von MYB101 wird post-transkriptional reguliert durch die microRNA 159a, welche eine fast perfekte Komplementarität zur microRNA Bindestelle (miR BS) in MYB101 aufweist (ACHARD *et al.* 2004; MILLAR und GUBLER 2005). Um eine Überexpression der beiden Konstrukte von MYB101 zu gewährleisten, wurde die miR BS mutiert. Dabei wurden nur einzelne Basen ausgetauscht, die jedoch nicht zum Austausch des kodierten AS-Rests führten. Im Vergleich zum Wildtyp MYB101 war die NES-Mutante deutlich stärker im Nukleus von *A. thaliana* Wurzelzellen lokalisiert. Die Mutation der NES1 bis 3 in MYB101 führte somit *in planta* zu einer Akkumulation im Nukleus der Zellen, was daraufhin deutet, dass der Kernexport via

XPO1 möglicherweise negativ beeinflusst war. Im Rahmen dieser Arbeit konnte noch keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden, die einen Effekt der NES Mutation in MYB101 auf die Entwicklung von *A. thaliana* aufzeigen.

4.3 □ KERNEXPORT VON RNA

Das Wachstum eukaryotischer Zellen hängt vom kontinuierlichen Austausch von Makromolekülen zwischen Nukleus und Zytoplasma ab, da die Kernhülle die RNA-Synthese und die Protein-Synthese separiert. Der Kernexport von mRNA durch die NPCs wird koordiniert durch zahlreiche Schritte und resultiert in der Bildung eines Export kompetenten Ribonukleoprotein Komplexes (mRNP). Studien in Hefen führten zur Isolierung mehrerer Faktoren, die an der Translokation des mRNP durch die NPCs und an dessen Freilassung ins Zytoplasma beteiligt sind. Verschiedene Klassen von RNAs, dazu gehören tRNAs, rRNAs UsnRNAs (*U-rich small nuclear*) und mRNAs, werden als RNPs durch Energie-abhängige, Rezeptor-vermittelte Prozesse exportiert (JARMOLOWSKI *et al.* 1994). Es ist bekannt, dass Crm1/XPO1 in den Export von UsnRNAs und 5S rRNA sowie den Export der 60S ribosomalen Untereinheit in Hefen involviert ist (GADAL *et al.* 2001; HO *et al.* 2000; OHNO *et al.* 2000).

Zur Stabilisierung und um die mRNA vor Degradierung zu schützen, wird sie noch im Zellkern von Proteinen gebunden, die zusammen mit der mRNA den mRNP Komplex bilden. Die gebundenen Proteine begleiten die mRNA in das Zytoplasma, wobei einige von ihnen auch am Exportprozess beteiligt sind. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es zwei Proteine, Gle1p (MURPHY und WENTE 1996) und Mex67p (SEGREF *et al.* 1997), die eine funktionale Leucin-reiche NES enthalten und am Kernexport von mRNA beteiligt sind. Dass Crm1/XPO1 in *Saccharomyces cerevisiae* für den Kernexport von mRNA erforderlich ist, wurde berichtet (STADE *et al.* 1997). TAP ist das humane Homolog zu Mex67p (GRUTER *et al.* 1998). In Pflanzen ist bislang kein Exportrezeptor für mRNA bekannt und ein Homolog zu Mex67p oder zum humanen TAP existiert nicht in *A. thaliana*. Es gibt aber zahlreiche Proteine in *A. thaliana*, die am Exportprozess der mRNA beteiligt sein könnten und die mit XPO1 interagieren. Um den Prozess des mRNA-Exports, aber auch des Exports ribosomaler Untereinheiten in Pflanzen besser verstehen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit der Kernexport von RNA-bindenden Proteine genauer untersucht.

4.3.1 □ KERNEXPORT UND NES IN RNA-BINDENDEN PROTEINEN

Eine Untergruppe der XPO1-interagierenden Proteine bilden die RNA bindenden Proteine (RBPs) (in Vorbereitung HAASEN *et al.* 2008). Aus dieser Gruppe wurden zunächst die NES in CID11 (*CTC-interacting domain*) charakterisiert. Die Proteinsequenz von CID11 wurde auf eine putative NES analysiert, wobei auch hier nach Sequenzmotiven gesucht wurde, die der Konsensussequenz der Rev-NES entsprechen. Durch Herstellung von Deletionen der CID11 cDNA wurde die Region der putativen NES eingeschränkt und durch Mutation von drei hydrophoben AS-Resten die NES anschließend erfolgreich identifiziert (Abb. 3.24). Die NES mit der Sequenz $L_{xxx}LF_{xxx}L$, wobei in der Mutante das Leucin in der Mitte und das am Ende sowie das Phenylalanin durch Alanin ersetzt wurden, zeigt eine ähnliche AS-Abfolge wie in der Rev-NES, nur der Abstand der AS-Reste unterscheidet sich. Der Austausch der hydrophoben Reste durch Alanin resultiert in der vollständigen Hemmung der Interaktion mit XPO1 im Y2H-System (Abb. 3.24).

Das GFP-Fusionsprotein von Wildtyp CID11 zeigt eine deutlich stärkere Lokalisierung im Zytoplasma als im Nukleus der BY-2 Tabakprotoplasten (Abb. 3.25). Die Mutation der NES führt zu einer Verschiebung der Lokalisierung in den Nukleus der Protoplasten. Das verbleibende, vergleichsweise schwache Signal der fluoreszierenden NES-Mutante von CID11 im Zytoplasma, kann durch Protein-Protein-Interaktionen bedingt sein, oder aber hervorgerufen worden sein durch die massive Überexpression des Proteins. CID11 kann dann durch Diffusion aus dem Nukleus in das Zytoplasma gelangen.

CID11 gehört zu einer Familie aus insgesamt sechs RBPs (BRAVO *et al.* 2005), CID8 bis CID13, die sich durch zwei *RNA recognition motifs* (RRMs) im C-terminalen Abschnitt des Proteins auszeichnen. Jeweils zwei der CID-RBPs bilden im phylogenetischen Stammbaum ein Pärchen (Abb. 3.26). CID11 und CID12 weisen eine hohe Identität auf, ebenso CID8 und CID9. CID10 und CID13 bilden das dritte Pärchen und haben eine etwas schwächere Identität zueinander im Vergleich zu den beiden anderen Paaren (Abb. 3.26 und 3.27). Im Bereich der in CID11 charakterisierten NES weisen die Sequenzen der anderen CID-RBPs ebenfalls hydrophobe AS-Reste auf. Die Konsensussequenz in diesem Bereich sieht folgendermaßen aus: $LV_{xxx}FSKL$ (Abb. 3.27). Zur Überprüfung der Fähigkeit dieser CID-RBPs mit XPO1 zu interagieren, wurden CID10 und CID12 aus einer cDNA-Bibliothek und CID9 von cDNA aus Blüten-RNA isoliert. Die Interaktion mit XPO1 wurde im Y2H-System getestet (Abb. 3.28, A). CID9 und CID10 interagierten mit XPO1. CID12 zeigte, obwohl es eine hohe Identität im Bereich der putativen NES mit CID11 aufweist, eine äußerst schwache Interaktion mit XPO1. Dieses Resultat widerspricht dem aus der *in vivo* Lokalisierung der CID-RBPs erhaltenen Ergebnis (Abb. 3.18, B). Hier konnte durch die Zugabe von LMB für

alle untersuchten CID-RBPs ein deutlicher Effekt erzielt werden, da es eine Verschiebung der Proteine in den Nukleus der Protoplasten nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass alle analysierten CID-RBPs potentielle *targets* von XPO1 im pflanzlichen System sind. LMB wurde ursprünglich als antifungales Antibiotikum aus *Streptomyces* isoliert (HAMAMOTO *et al.* 1983). Es stellte sich jedoch heraus, dass es ein spezifischer Inhibitor von XPO1-vermitteltem Kernexport ist. LMB bindet kovalent ein Cystein in der NES-bindenden Region von XPO1. *Saccharomyces cerevisiae* fehlt dieses Cystein beispielsweise, was sie resistent gegenüber LMB macht. Wird die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins durch LMB verändert, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Kernexport des Proteins XPO1-abhängig ist. LMB kann somit auch die Translation von mRNA beeinflussen, da der Kernexport von RNPs ebenfalls unterbunden wird. Watanabe *et al.* (1999) konnten die Inhibition des mRNA Exports in Säugerzellen und in Hefen nach Zugabe von LMB nachweisen. Detektiert wurde DIG-markierte mRNA. Ohne LMB lag der Export der mRNA bei 80 %, mit LMB betrug der Export weniger als 10 %. In Hefen existieren zwei Proteine, Gle1p (MURPHY und WENTE 1996) und Mex67p (SEGREF *et al.* 1997), die am Export von mRNA in Hefen beteiligt sind und beide eine NES besitzen. Crm1/XPO1 ist ebenfalls am Export von mRNA in Hefen und Säugerzellen beteiligt (WATANABE *et al.* 1999). Eine direkte Interaktion zwischen Gle1p und Mex67p mit XPO1 wurde bislang nicht gezeigt. In wie fern LMB den Export von mRNA in Pflanzen beeinflusst wurde bislang nicht untersucht.

Poly(A)-bindende Proteine (PABPs) besitzen typischerweise vier RRM, die zur Bindung des Poly(A)-Bereichs von mRNAs dienen, wodurch diese vor Degradierung geschützt werden. In *A. thaliana* existieren acht PABPs, PAB1 bis PAB8. Zur Identifizierung der NES in PAB2 wurden ebenfalls zunächst Deletionen im Y2H-System analysiert (Abb. 3.29), die auf Grund von Sequenzanalysen bezüglich möglicher NES Motive hergestellt wurden. Die NES konnte schließlich durch Mutationsanalyse charakterisiert werden, dazu hydrophobe AS-Reste durch Alanin ersetzt wurden, was zu einer Inhibition der Interaktion von PAB2 und XPO1 im Y2H-System führte. Die NES in PAB2 hat die Sequenz LxxLxL und ist somit ebenfalls verwandt mit der Rev-NES. Zur Herstellung der NES-Mutante wurden das mittlere und das letzte Leucin durch Alanin ausgetauscht.

In BY-2 Protoplasten ist das Wildtype PAB2 GFP-Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 3.30). Die Mutation der NES in PAB2 resultierte in einer Verschiebung der Lokalisierung des Fusionsproteins in den Nukleus der Protoplasten. Es konnte jedoch weiterhin eine Fluoreszenz der PAB2 NES-Mutante im Zytoplasma detektiert werden. Erwartet worden wäre eine vollständige Lokalisierung der NES-Mutante im Nukleus, da durch Mutation der NES eine Interaktion mit XPO1 ausgeschlossen werden kann und

folglich der Export von PAB2 mittels XPO1 gehemmt sein sollte. Aber wie auch schon für CID11 und MYB101 beschrieben, war die Lokalisierung der NES-Mutanten dieser beiden Proteine ebenfalls nicht nur auf den Nukleus der Protoplasten beschränkt. Die ausschließliche Lokalisierung einer NES-Mutante eines Proteins wurde für LCL1 dargestellt (SCHMIED 2005), dies konnte aber für keine im Rahmen dieser Arbeit untersuchte NES-Mutante gezeigt werden. Das synthetische Fusionsprotein GFP-NLS-CHS-NES, d.h. an die Chalconsynthase (CHS) waren eine NLS sowie eine NES fusioniert, bzw. die NES-Mutante dieses Proteins, zeigte ebenfalls eine ausschließliche Lokalisierung im Nukleus der BY-2 Protoplasten (HAASEN *et al.* 1999). Entweder sind, wie schon für MYB101 und CID11 vermutet, Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich dafür, dass die NES-Mutante von PAB2 eine schwache Lokalisierung im Zytoplasma aufweist, oder aber die massive Expression des Proteins führt zur Diffusion von PAB2 NESmut in das Zytoplasma. Es ist bereits bekannt, dass PABPs und CIDs miteinander interagieren können (BRAVO *et al.* 2005), das Potential der Dimerisierung von CID11 und PAB2 wird im nachfolgenden Abschnitt (4.3.3) diskutiert. Diese Dimerisierung aber auch die Bindung von RNA durch PABPs kann eine Lokalisierung im Zytoplasma hervorrufen.

4.3.2 □ KERNIMPORT UND NLS IN CID11

Die Analyse der Proteinsequenz führte zur Charakterisierung einer NLS (Abb. 3.24). Diese befindet sich im Bereich der AS-Reste $_{145}\text{FRRKKSF}_{151}$, besteht aus positiv geladenen AS-Resten (Arginin und Lysin) und entspricht somit dem Prototyp der NLS aus den SV40 T-Antigen (KALDERON *et al.* 1984; LANFORD und BUTEL 1984). Durch den Austausch von drei positiv geladenen AS-Resten (147 bis 149) zu Asparagin, wurde der Import von CID11 in den Nukleus der BY-2 Protoplasten vollständig unterbunden (Abb. 3.25). Der Import von CID11 wird also anscheinend durch die Importine Importin α und Importin β vermittelt. Importin α agiert in diesem Importprozess als Adapter zwischen der NLS im Cargoprotein und dem eigentlichen Importrezeptor Importin β . CID11 besitzt in seinem C-terminalen Bereich zwei RRM's (BRAVO *et al.* 2005), die RNA binden können. Die Bindung geschieht im Nukleus, wo auch die Synthese der RNAs stattfindet. Die Tatsache, dass CID11 eine NES besitzt und damit von XPO1 gebunden werden kann, führt zu der Annahme, dass es die Funktion eines Adapterproteins übernimmt. CID11 bindet möglicherweise zum einen RNA im Nukleus und auf der anderen Seite interagiert es mit XPO1, wodurch der Kernexport vermittelt wird. Im Zytoplasma dissoziiert der Komplex bestehend aus RBP, RNA und Exportrezeptor. Zur Bereitstellung von CID11 für weitere Exportprozesse von RNA aus dem

Nukleus, wird es dann, vermutlich hervorgerufen durch die NLS, durch Importin α und Importin β wieder in den Nukleus importiert.

4.3.3 □ DIMERISIERUNG VON CID11 UND PAB2

Im C-terminalen Bereich der PABPs befindet sich die konservierte PABC oder auch als CTC bezeichnete Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (MANGUS *et al.* 2003). Die PABC-Domäne interagiert mit zahlreichen Proteinen und rekrutiert Faktoren für den mRNA-RNP Komplex. Diese Faktoren sind beteiligt an der Translation und der Prozessierung von mRNA (SIDDIQUI *et al.* 2003). Ein Bereich von 64 bis 72 AS-Resten in der Domäne ist hoch konserviert (KOZLOV *et al.* 2001). In Säuger gibt es zwei Proteine, PABP-interagierendes Protein 1 (Paip1) und 2 (Paip2), die mit der PABC Domäne interagieren, vermittelt durch das PAM2 Motiv (PABP-interagierendes Motiv 2) (KHALEGHPOUR *et al.* 2001; ROY *et al.* 2002). Das PAM2 Motiv besteht aus 15 konservierten AS-Resten (Tab. 4.3).

Bravo *et al.* (2005) verwendeten die PABC Domäne von PAB2 aus *A. thaliana* in einem Y2H *screen*, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Von den acht in *A. thaliana* vorkommenden PABPs besitzen sechs die PABC Domäne. In Reis gibt es vier PABPs, die alle eine PABC Domäne enthalten (BRAVO *et al.* 2005). Der *screen* resultierte in der Isolierung von zwei Proteinen, die von der Gruppe als CID1 (At2g41430) und CID7 (At2G26280) (CTC-interagierende Domäne) postuliert wurden. Zusätzlich konnte für beide Proteine ein PAM2-verwandtes Motiv im N-terminalen Bereich beschrieben werden, wobei in CID1 zehn und in CID7 elf der bereits oben erwähnten 15 AS-Reste des PAM2 Motivs entweder konserviert oder identisch waren (Tab. 4.3). Insgesamt wurden in *A. thaliana* 13 CIDs gefunden, die alle ein PAM2 Motiv besitzen, aber von denen nur CID8 bis CID13 RBPs sind, da sie zwei RRM's enthalten (BRAVO *et al.* 2005). Die Analyse von T-DNA Insertionslinien für *CID8*, *CID9*, *CID10*, *CID12* und *CID13* ergab keinen erkennbaren Phänotyp. Die Untersuchung von T-DNA Insertionslinien für *PAB2* und *PAB5* führte zu dem Ergebnis, dass ein homozygoter Phänotyp angeblich letal sein soll (BRAVO *et al.* 2005).

Die Interaktion von PAB2 und CID11, für die in dieser Arbeit jeweils eine NES beschrieben wurden und deren subzelluläre Lokalisierung analysiert wurde, wurde von Bravo *et al.* (2005) nicht untersucht. Ergebnisse zur Analyse einer T-DNA Insertionslinie für *CID11* wurden ebenfalls von dieser Gruppe nicht vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher die Untersuchungen auf *in vivo* Interaktion von PAB2 und CID11 in BY-2 Tabakprotoplasten (Abb. 3.31). In der BiFC-Analyse wurde jeweils ein zu untersuchender Interaktionspartner entweder mit dem N-terminalen oder dem C-terminalen Teil von YFP fusioniert. Kommt es zu einer Dimerisierung der untersuchten Proteine, erfolgt die Rekonstituierung der beiden

Teilfragmente von YFP und eine grün-gelbe Fluoreszenz ist im konfokalen Laserscanning-Mikroskop detektierbar. Nur die räumliche Nähe der Proteine ermöglicht eine vollständige Rekonstituierung des YFPs. Die BiFC-Analyse liefert nicht nur wertvolle Informationen über das Dimerisierungspotential zweier Proteine, sondern auch über die *in vivo* Lokalisierung des Dimers. Da auch eine Lokalisierung von PAB2 und CID11 als GFP-Fusionsproteine vorgenommen wurde, kann die subzelluläre Verteilung der einzelnen Proteine mit der des Dimers verglichen werden (Abb 3.25, 3.30, 3.31).

Die Ausbildung eines Heterodimers von PAB2 und CID11 fand ausschließlich im Zytoplasma der Protoplasten statt (Abb. 3.31). Das GFP-Fusionsprotein von CID11 war zwar auch hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, aber auch im Nukleus war ein schwaches Signal messbar. PAB2 als GFP-Fusion war ausschließlich im Zytoplasma detektierbar. Zur Analyse des Heterodimers von PAB2 und CID11 wurden beide Proteine entweder mit dem N-terminalen oder den C-terminalen Abschnitt von YFP fusioniert, um ausschließen zu können, dass das jeweilige fusionierte Teilfragment einen Einfluss auf die Dimerisierung und die Lokalisierung des Dimers hat. Die Teilfragmente des YFPs waren jeweils an den N-Terminus der Proteine fusioniert. Welches Teilfragment, ob N- oder C-terminaler Abschnitt, an PAB2 und CID11 letztendlich fusioniert war, spielte keine Rolle, die Dimerbildung sowie die Lokalisierung des Dimers unterschieden sich nicht (KÖTHER 2007).

Die Heterodimerbildung und Lokalisierung des Dimers von CID11 und PAB2 wurde des Weiteren untersucht, wenn die NES in einem der beiden Proteine oder in beiden Proteinen gleichzeitig mutiert war. Zusammengefasst wurden folgende Konstrukte im BiFC untersucht: (1) YN-CID11-NESmut + YC-PAB2, (2) YN-CID11 + YC-PAB2-NESmut und (3) YN-CID11-NESmut + YC-PAB2-NESmut (KÖTHER 2007). YN und YC weisen auf das jeweils fusionierte Teilfragments von YFP hin. Für alle drei untersuchten Varianten wurde immer eine Lokalisierung des Heterodimers im Zytoplasma der BY-2 Protoplasten festgestellt. Für die Konstruktkombinationen (1) und (2), wenn jeweils eine NES mutiert, die andere aber weiterhin funktionsfähig war, wurde dieses Ergebnis erwartet, da der Heterodimer mittels einer einzigen funktionalen NES nach wie vor aus dem Nukleus exportiert werden konnte. Für die Kotransfektion (3) wäre jedoch erwartet worden, dass eine Dimerisierung nur noch im Nukleus möglich sein würde, da kein Export aufgrund der fehlenden NES nicht möglich gewesen wäre. Die Dimerisierung fand jedoch weiterhin ausschließlich im Zytoplasma statt. Die Dimerisierung verhindert vermutlich den Import der Proteine, außerdem überlappen die NES und das PAM2 Motiv in CID11.

Darüber hinaus wurde die Ausbildung eines Homodimers von CID11 untersucht (Abb. 3.31). Das Prinzip war dasselbe wie bereits oben beschrieben. Die Protoplasten wurden mit zwei Konstrukten kotransfiziert, wobei CID11 zum einen an den N-Terminus und zum anderen an

den C-Terminus von YFP fusioniert war. Es konnte die Bildung eines Homodimers festgestellt werden, der ausschließlich im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert war. Die im konfokalen Laserscanning Mikroskop detektierte Fluoreszenz des Homodimers war im Vergleich schwächer als die des Heterodimers aus PAB2 und CID11 (Abb. 3.31). Es kann eventuell bedeuten, dass das Potential ein Heterodimer zu bilden größer ist als ein CID11-Homodimer zu formen. Wie gut die Expression von fluoreszierenden Proteinen in BY-2 Protoplasten funktioniert, hängt auch immer von der Zellkultur ab. Die Bedingungen, unter denen die Zellkultur angezogen wird, sind immer konstant, aber dennoch kann es zu natürlichen Schwankungen kommen, die die Transfektionseffizienz beeinflussen. Um diese Schwankungen auszugleichen, werden zu untersuchende Proteine mehrfach transfiziert. Im Fall des Homodimers von CID11 war es nicht möglich ein stärkeres Signal zu detektieren, was möglicherweise ein Hinweis darauf sein kann, dass die Bildung eines Heterodimers von PAB2 und CID11 bevorzugt wird im Vergleich zur Formierung eines CID11-Homodimers. Zusätzlich wurden im BiFC-System die NES-Mutanten von CID11 analysiert (Abb. 3.31). Dazu wurden zwei Konstrukte von CID11, jeweils fusioniert entweder an den N- oder den C-terminalen Abschnitt von YFP, kotransfiziert. Beide Konstrukte besaßen eine mutierte NES. Wie zu erwarten war, war das Homodimer der beiden NES-Mutanten von CID11 ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Es ist also theoretisch möglich, dass CID11 ein Homodimer im Nukleus ausbilden kann, was jedoch durch die mutierte NES forciert wurde. Dadurch kam es einer massiven Lokalisierung des Proteins im Nukleus der Protoplasten, was die Homodimerbildung begünstigte.

Die Analyse von Deletionen von PAB2 und CID11 im BiFC-System wurde nicht durchgeführt, da davon angegangen werden kann, dass eine Interaktion zwischen der PABC Domäne in PAB2 und dem PAM2 Motiv im CID11 statt findet. Über welche Domäne CID11 Homodimere ausbildet müsste noch an Hand von Deletionskonstrukten analysiert werden.

Das PAM2 Motiv befindet in unmittelbarer Nähe zur NES. Die postulierte Sequenz des PAM2 Motivs teilt sich die AS-Reste $_{89}\text{LFSKLNPM}_{96}$ mit der charakterisierten NES. Die Bildung von Heterodimeren aus PAB2 und CID11 resultiert eventuell aus der Maskierung der NES in CID11 und eine Interaktion von CID11 und XPO1 wird möglicherweise dadurch verhindert.

TAB. 4.3 : SEQUENZ DES PAM2 MOTIVS IN VERSCHIEDENEN PROTEINEN

Dargestellt sind verschiedene PAM2 Motive aus diversen Proteinen. Konservierte AS-Reste sind grau unterlegt.

Protein (AS-Reste)	Sequenz	Referenz
Paip1 (123 bis 137)	VLMS----KLSVNAPEFYF	(ROY ET AL. 2002)
Paip2 (106 bis 120)	VVKS----NLNPNAKEFVP	(ROY ET AL. 2002)
CID1 (2 bis 20)	AMVSGRRSTLNPDAPLFIP	(BRAVO ET AL. 2005)
CID7 (17 bis 32)	IKPT----TLNPHAAEFVP	(BRAVO ET AL. 2005)
CID11 (88 bis 102)	ELFS----KLNPMAEFVP	diese Arbeit

In Abschnitt 4.3.1 wurde der Kernexport von CID11 und PAB2 diskutiert. Die export-negativen Proteine, d.h. die Proteine mit einer mutiert NES, akkumulierten deutlich im Nukleus der BY-2 Protoplasten. Dennoch war eine schwache Lokalisierung der NES-Mutanten im Zytoplasma detektierbar. Die Fähigkeit von CID11 und PAB2 einen Heterodimer zu bilden, bietet eine mögliche Erklärung, dass die Proteine nach wie vor im Zytoplasma lokalisiert waren. Eine Dimerisierung des exprimierten GFP-Fusionsproteins CID11 NESmut mit intrazellulärem PAB2 der Tabakprotoplasten würde im Zytoplasma stattfinden und die Lokalisierung der CID11 NES-Mutante in diesem Kompartiment erklären. Umgekehrt würde dies auch für das GFP-Fusionsprotein PAB2 NESmut gelten.

4.3.4 □ KERNEXPORT VON MRNA

Für PAB3 aus *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass es in Hefen in den Export von mRNA involviert ist. PAB3 wird in Hefen in den Nukleus transportiert und kann letale Mutationen in Hefestämmen komplementieren (CHEKANOVA und BELOSTOTSKY 2003). In Abb. 4.3 ist ein Modell dargestellt, wie der mRNA Export in *A. thaliana* möglicherweise stattfinden könnte. Bisher ist bekannt, dass PAB2 eine NES besitzt, mit XPO1 im Y2H interagiert und die *in vivo* Lokalisierung von PAB2 durch LMB beeinflusst werden kann. PAB2 könnte somit als Adapter zwischen mRNA und XPO1 fungieren. XPO1 vermittelt die Bindung an die Nukleoporene in den NPCs und ermöglicht einen schnellen und effektiven Export des mRNP Komplexes. Nicht auszuschließen ist, dass weitere Exportrezeptoren am Export beteiligt sind, die einen schnell Export des mRNP Komplexes begünstigen. In Hefen ist das Heterodimer Mex67p-Mtr2p in den Export von mRNA involviert (YAO *et al.* 2007), das humane Homolog zu diesem Dimer bilden TAP-p15 (GRUTER *et al.* 1998; YAO *et al.* 2007), ein Homolog zu Mex67 und TAP existiert nicht in *A. thaliana*. Inwiefern das Heterodimer aus PAB2 und CID11, das im

Zytoplasma lokalisiert ist, einen Einfluss auf den Exportprozess von mRNA nimmt, ist unklar. Eine Beteiligung von CID11 ist nicht auszuschließen, da es einerseits ein Cargo von XPO1 ist und zusätzlich zwei RRM's besitzt. Eine bestehende Bindung der PABPs an den Poly(A)-Bereich ist auch im Zytoplasma denkbar.

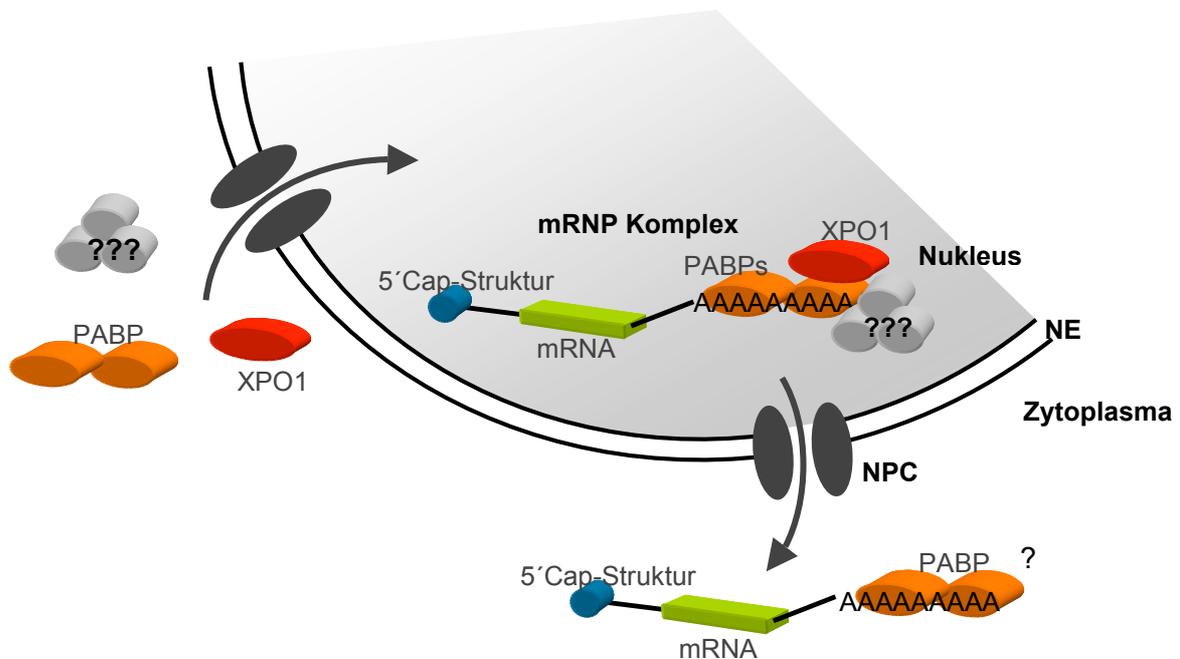


ABB. 4.3: MODELL FÜR DEN EXPORT VON MRNA IN *A. THALIANA*.

Der Export des reifen mRNP-Komplexes erfolgt durch die NPCs. XPO1 und eventuell weitere Exportrezeptoren vermitteln die Bindung an die Nukleoporene der NPC und ermöglichen so einen schnellen Export ins Zytoplasma. Nach der Translokation ist die mRNA bereit für die Translation im Zytoplasma. Die Exportrezeptoren, u.a. XPO1, und die PABPs werden wieder in den Nucleus importiert, um für weitere Exportprozesse zur Verfügung zu stehen. NE (*nuclear envelope*), Kernhülle; ???, unbekannte Exportrezeptoren.

4.3.5 □ KERNEXPORT RIBOSOMALER UNTEREINHEITEN

In Zusammenhang mit dem Export von mRNA und RNA-bindenden Proteinen sollte auch der Kernexport von ribosomalen Untereinheiten erwähnt werden. Die Synthese der ribosomalen Untereinheiten findet in einem subnuklearen Kompartiment statt, dem Nucleolus, wo in zahlreichen Schritten durch RNA-Prozessierung und Protein-Assemblierung die Untereinheiten hergestellt werden. In früheren Experimenten an *Xenopus* Eizellen stellte sich bereits heraus, dass der Kernexport der ribosomalen Untereinheiten energieabhängig und Rezeptor-vermittelt ist, ein Exportrezeptor konnte jedoch nicht identifiziert werden (BATAILLE *et al.* 1990). In nachfolgenden Studien wurde Crm1/XPO1 als verantwortlicher Rezeptor

ermittelt, der die 60S und die 40S Untereinheiten aus dem Nukleus ins Zytoplasma exportiert. Die Verwendung von LMB gab auch in diesen Studien ein wichtiger Hinweis darauf, dass der Crm1/XPO1 in den Exportprozess in Hefen involviert sein muss (GADAL *et al.* 2001; MOY und SILVER 2002). Als eine weitere erforderlich Komponente für den Export der ribosomalen Untereinheiten 60S und 40S wurde Ran-GTP gefunden, welche, wie bereits bekannt ist, die Interaktion eines Cargos mit XPO1 stabilisiert. Vor und während des Exports sind mehrere Schritte notwendig, damit die Untereinheiten aus dem Nukleolus entlassen werden und kompetent für den Exportkomplex sind. Die Faktoren, die den Nukleolus-Export begleiten müssen im Nukleus von den ribosomalen Untereinheiten getrennt werden, da sie sonst den Kernexport inhibieren würden (GADAL *et al.* 2002).

Den Durchbruch im Verständnis des Exports ribosomaler Untereinheiten brachte die Entdeckung eines Exportadapterproteins für die 60S ribosomale Untereinheit. Nmd3p wurde ursprünglich in einer Studie identifiziert, die sich mit *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) befasste (HE und JACOBSON 1995). Es ist aber unwahrscheinlich, dass Nmd3p tatsächlich eine Rolle in diesem Prozess spielt. Vergleichende Sequenzanalysen von mehreren NMD3 homologen Proteinen ergaben, dass eine N-terminale 40 kDa Domäne konserviert ist in den NMD3 Proteinen in Archaea und Eukaryoten. Eine zusätzliche C-terminale Domäne ist aber nur in eukaryotischen Proteinen vorhanden und besitzt eine NLS sowie eine NES (HEDGES *et al.* 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass LMB den Export von NMD3 hemmte und eine Nmd3p Mutante, der die NES fehlte, resultierte darin, dass die 60s Untereinheit im Nukleus lokalisiert blieb (HO *et al.* 2000). Nmd3p ist somit ein erforderlicher NES-Adapter zwischen XPO1 und der 60S ribosomalen Untereinheit. Eine gleichzeitige Mutation in *mex67*, dem mRNA Transportfaktor in Hefen, und *nmd3* ist letal (HO *et al.* 2000). Der Export der 40S Untereinheit wird wie bereits oben erwähnt ebenfalls durch XPO1 und Ran-GTP vermittelt. Ein Exportadapter, der die Interaktion zwischen der 40S Untereinheit und XPO1 vermittelt, oder ein ribosomales Protein, das eine NES bereit stellt, sind bislang jedoch noch unbekannt.

In Pflanzen existiert eine Ortholog zum in Hefen beschriebenen Exportadapter. NMD3 (At2g03820) aus *A. thaliana* wurde aus der cDNA Bibliothek (PD Dr. Thomas Merkle) amplifiziert. Es besteht aus 516 AS-Resten und zeigt eine hohe Sequenzidentität zu Nmd3p aus Hefen. In Tab. 4.2 sind die Sequenzen der NES von *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *Homo sapiens* angegeben, die sich jeweils im C-terminalen Abschnitt der Proteine befinden. Die Analyse des aus der cDNA Bibliothek isolierten NMD3 erfolgte zunächst im heterologen Y2H-System. Hier wurde eine schwache Interaktion von NMD3 und XPO1 nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt; T. Merkle, persönliche Kommunikation). Des Weiteren wurde NMD3 als GFP-Fusionsprotein in BY-2 Protoplasten untersucht. Das Wildtyp Vollängenprotein NMD3 ist deutlich stärker im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert und ein schwaches

Signal im Nukleus ist detektierbar (Ergebnis nicht gezeigt; T. Merkle, persönliche Kommunikation). Durch die Verwendung von LMB konnte eine Verschiebung der Lokalisierung von NMD3 in den Nukleus erzielt werden, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass NMD3 in Pflanzen mit XPO1 interagieren kann. Zur Charakterisierung der NES in NMD3 wurden Deletionen der cDNA, die an GFP fusioniert waren, analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass NMD3 aus *A. thaliana* ebenfalls eine NES nahe dem C-Terminus besitzt (T. Merkle, persönliche Kommunikation). Auch wenn nur eine schwache Interaktion mit XPO1 im Y2H-System nachgewiesen wurde, im homologen System, wurde durch LMB ein deutlicher Effekt hervorgerufen. Möglicherweise sind am Export der ribosomalen Untereinheiten in *A. thaliana* ebenfalls mehrere Exportadapter beteiligt, wie erst kürzlich für Hefen beschrieben wurde. Eine Rolle im Export der 60S ribosomalen Untereinheit in Hefen spielt u.a. ein Heterodimer aus Mex67 und Mtr2 (YAO *et al.* 2007). Der Komplex Mex67-Mtr2 ist eigentlich ein Kernexportrezeptor, der mRNA im Nukleus bindet und in das Zytoplasma in Hefen transloziert. Das Gegenstück zu diesem Komplex in höheren Eukaryoten bildet TAP-p15, wobei für diesen Komplex bisher nicht bekannt ist, ob er ebenfalls als Kernexportrezeptor von ribosomalen Untereinheiten fungiert. Arx1 ist in Hefen ein nukleozytoplasmatisch wanderndes Protein, das einen weiteren Exportrezeptor für ribosomale Untereinheiten darstellt (HUNG *et al.* 2008). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass auch in *A. thaliana* mehrere Kernexportrezeptoren am Transport der ribosomalen Untereinheiten beteiligt sind. Homologe Proteine zu Mex67 und Arx1 aus Hefen in *A. thaliana* wurden durch vergleichende Sequenzanalysen nicht identifiziert.

Unklar ist, weshalb Eukaryoten Adapterproteine für den Export ribosomaler Untereinheiten entwickelt haben. Es wird vermutet, dass Nmd3p dazu dient, die Stöchiometrie zwischen den Untereinheiten zu erhalten, da der Export der 60S Untereinheit langsamer abläuft als der der 40S Untereinheit (JOHNSON *et al.* 2002). In Zusammenhang mit dem Export von mRNA und RNA-bindenden Proteinen sollte auch der Kernexport von ribosomalen Untereinheiten erwähnt werden. Die Synthese der ribosomalen Untereinheiten findet in einem subnuklearen Kompartiment statt, dem Nukleolus, wo in zahlreichen Schritten durch RNA Prozessierung und Protein Assemblierung die prä-Untereinheiten hergestellt werden. In früheren Experimenten an *Xenopus* Eizellen stellte sich bereits heraus, dass der Kernexport der ribosomalen Untereinheiten energieabhängig und Rezeptor-vermittelt ist, ein Exportrezeptor konnte jedoch nicht identifiziert werden (BATAILLE *et al.* 1990). In nachfolgenden Studien wurde Crm1/XPO1 als verantwortlicher Rezeptor ermittelt, der die 60S und die 40S Untereinheiten aus dem Nukleus ins Zytoplasma exportiert. Die Verwendung von LMB gab auch in diesen Studien ein wichtiger Hinweis darauf, dass der Crm1/XPO1 in den Exportprozess in Hefen involviert sein muss (GADAL *et al.* 2001; MOY und SILVER 2002). Als eine weitere erforderliche Komponente für den Export der ribosomalen

Untereinheiten 60S und 40S wurde Ran-GTP gefunden, welche, wie bereits bekannt ist, die Interaktion eines Cargos mit XPO1 stabilisiert. Vor und während des Exports sind mehrere Schritte notwendig, damit die Untereinheiten aus dem Nukleolus entlassen werden und kompetent für den Exportkomplex sind. Der Import von Nmd3p zurück in den Nukleus, damit der Export der 60S Untereinheit gewährleistet bleibt, ist bislang ebenfalls unbeantwortet. Je größer ein Exportkomplex ist, desto langsamer erfolgt der Transport, weshalb vermutlich mehrere Exportrezeptoren am Transport der 60S ribosomalen Untereinheit in Hefen beteiligt sind. Durch die Anwesenheit mehrerer Rezeptoren, die eine Bindung zur den NPCs vermitteln, kann der Export von großen Komplexen möglicherweise schnell ablaufen.

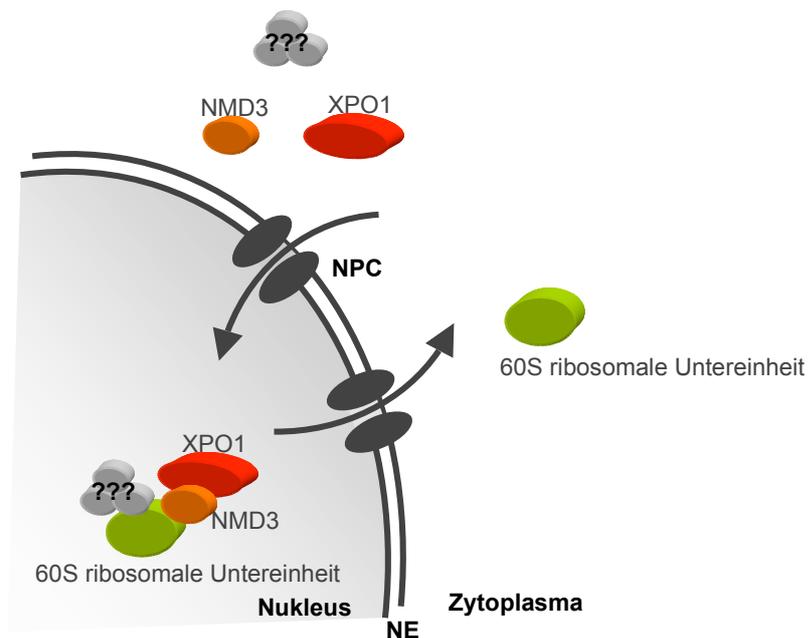


ABB. 4.4: MODELL ZUM EXPORT RIBOSOMALER UNTEREINHEITEN IN *A. THALIANA*.

NMD3 übernimmt die Funktion als Adapter zwischen XPO1 und der ribosomalen Untereinheit. XPO1 sowie möglicherweise weitere Exportrezeptoren vermitteln die Bindung an die Nucleoporine der NPCs und ermöglichen so den Export der ribosomalen Untereinheit. Im Anschluss an den Exportprozess werden XPO1, NMD3 und die anderen Exportrezeptoren zurück in den Nukleus importiert. NE (*nuclear envelope*), Kernhülle; ???, unbekannte Exportrezeptoren.

Ob XPO1 in *A. thaliana* in den Exportprozess der ribosomalen Untereinheiten involviert ist, bleibt abschließend zu klären. Eine Bindung von NMD3 an XPO1 wurde nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt) und durch LMB wurde die Lokalisierung des GFP-NMD3 Fusionsprotein in BY-2 Protoplasten beeinflusst und eine Verschiebung in den Nukleus wurde beobachtet (T. Merkle, persönliche Kommunikation). Ein Zusammenhang zwischen der Letalität von *xpo1a xpo1b* Doppelmutanten und dem XPO1-abhängigen Export der ribosomalen Untereinheiten in *A. thaliana* ist nicht auszuschließen.

4.3.6 □ ANALYSE EINER T-DNA INSERTIONSLINIE FÜR CID11

Die Analyse einer T-DNA Insertionslinie für *CID11* war nicht erfolgreich (Ergebnisse nicht gezeigt). Untersucht wurde eine T-DNA Insertionslinie vom Salk Institute (Salk_061880). Aus einer Reihe von Pflanzen der Salk Linie wurde genomische DNA isoliert. Es wurden verschiedene *left border* Oligonukleotide in Kombination mit *CID11* genspezifischen Oligonukleotiden getestet. Es war zunächst nicht möglich eine T-DNA im Gen zu lokalisieren. Die T-DNA des Salk Instituts umfasst zur Selektion transformierter Pflanzen ein Kanamycin Resistenzgen. Mittels Kanamycin-spezifischer Oligonukleotide wurde eine T- Insertion im Genom nachgewiesen. Für zwei aus insgesamt 30 Pflanzen der Salk Linie, die eine T-DNA Insertion im Genom besaßen, wurde schließlich doch mit einem DNA genspezifischen Oligonukleotid und einem *left border* Oligonukleotid, also ein Oligonukleotid, das sich im Bereich der *left border* T-DNA anlagerte, ein Fragment amplifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Fragment wurde sequenziert, die erhaltene Sequenz konnte jedoch nicht als *CID11*-Sequenz verifiziert werden, obwohl die veröffentlichte FST (*flanking sequence tag*) mit der mit der Sequenz von *CID11* übereinstimmte. Die Analyse einer T-DNA Linie für *CID11* aus der GabiKat Population ist noch nicht abgeschlossen (GK 279H03).

4.4 □ FUNKTIONALE ANALYSE VON MYB101

Für MYB101 ist bisher bekannt, dass es zur Familie der GAMYB Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* gehört. Der Name GAMYB leitet sich ab von dem in Gerste beschriebenen MYB-Transkriptionsfaktor, *HvGAMYB*, der im Aleurongewebe in die Gibberellin (GA) Signaltransduktion involviert ist (GUBLER *et al.* 1995). Die Expression von *HvGAMYB* wird durch Gibberellin induziert und es bindet dann an das TAACAAA Motiv im Promotor des Gens, das für die α -Amylase in Gerste kodiert, wodurch dessen Expression hervorgerufen wird (GUBLER und JACOBSEN 1992; SKRIVER *et al.* 1991). Das Motiv wird als *gibberellic acid response element* (GARE) bezeichnet und die Mutation dieses konservierten Motivs im Promotor der α -Amylase verhindert die GA Induktion der Expression des Gens. *HvGAMYB* scheint somit ein positiver Regulator in der GA Signaltransduktion im Aleurongewebe von Gerste zu sein. In Reis wurde für das Homolog, *OsGAMYB*, eine Rolle in der Entwicklung von Pollen beschrieben, dessen *knock out* Mutanten einen Defekt in der Entwicklung der Blüten aufweisen. Dieser Defekt nimmt einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Blütenorgane, wie Lemma, Palea, Fruchtknoten. Besonders beeinflusst wird die Entwicklung der Fruchtblätter (KANEKO *et al.* 2004). Auch in Gerste wurde eine hohe Expression von

HvGAMYB in den Antheren nachgewiesen und die Überexpression von *HvGAMYB* resultierte in sterilen Fruchtblättern, da sie keine Pollen mehr bildeten (MURRAY *et al.* 2003).

Vergleichende Sequenzanalysen der *GAMYB* Gene aus Gerste und Reis führten zur Identifizierung von *MYB33*, *MYB65* und *MYB101* als homologe Proteine in *A. thaliana* (GOCAL *et al.* 1999; GUBLER *et al.* 1995; GUBLER *et al.* 1997). Des Weiteren konnte auch *MYB97* und *MYB120* der Gruppe der *GAMYB*-ähnlichen Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden (STRACKE *et al.* 2001). *MYB33*, *MYB65* und *MYB101* können den Promotor des α -Amylase Gens im Aleurongewebe von Gerste induzieren (GOCAL *et al.* 2001).

Die Expression der *GAMYBs*, *MYB33*, *MYB65* und *MYB101*, wird post-transkriptional durch die *miRNA159* reguliert (JONES-RHOADES und BARTEL 2004; RHOADES *et al.* 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass die *miRNA159* die Expression von *MYB101* beeinflusst (SCHWAB *et al.* 2005). Das Expressionsmuster von *MYB101* unterscheidet sich deutlich von dem der anderen beiden *GAMYBs*. Während *MYB33* und *MYB65* in allen Geweben fast gleich stark exprimiert werden (Abb. 1.5), ist *MYB101* deutlich schwächer exprimiert in Wurzel- und Blattgewebe, außer in der Blüte und den Blütenorganen (GOCAL *et al.* 2001). Hier zeigt sich besonders in reifen Pollen und Fruchtblättern eine deutlich höhere Expression von *MYB101* im Gegensatz zu *MYB33* und *MYB65* (Abb. 1.5). *In vivo* Promotor-GUS Analysen von *MYB101* zeigten eine Promotoraktivität in den Kotyledonen von 13 Tage alten Keimlingen, juvenilen Blättern, der Wurzelspitze sowie der Blüte. Innerhalb der Blüte war eine *MYB101* Promotoraktivität sichtbar in Kelch- und Kronenblättern sowie Pollen (ALVES-JUNIOR 2007). Daten zur Expression von *MYB101* sind auch im *AtGenExpress* (SCHMID *et al.* 2005) verfügbar, der eine deutliche Expression in Pollen zeigt (Abb. 1.5). Der *MYB101* Promotor ist teilweise in Geweben aktiv, in denen kein Transkript nachgewiesen wurde, was die Bedeutung der regulatorischen Rolle der *miRNA159* unterstreicht (ALVES-JUNIOR 2007).

Im Rahmen der Dissertation von Leonardo Alves Junior am Lehrstuhl für Genomforschung (2007) wurden des Weiteren zwei T-DNA Insertionslinien für *myb101* analysiert. Für beide *knock out* Linien wurde kein *MYB101* Transkript mehr nachgewiesen, dennoch zeigten beide Linien keine signifikanten, morphologischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (ALVES-JUNIOR 2007). Alves (2007) untersuchte daraufhin *MYB101* überexprimierende Linien, wobei eine Linie das Konstrukt $35S_{pro}::MYB101$ enthielt und eine weitere das $35S_{pro}::MYB101mutBS$ überexprimierte. Die Linie, die Wildtyp *MYB101* überexprimierte, zeigte nur geringe morphologische Abweichungen zum Wildtyp Col-0, da das Konstrukt ebenso wie das endogene *MYB101* post-transkriptional von der *miRNA 159* reguliert wird. Pflanzen, die *MYB101* mit einer mutierten *miRNA* Bindestelle überexprimierten, wiesen unter Langtagbedingungen einen abweichenden Phänotyp auf. Sie entwickelten etwa kleinere Blätter als der Wildtyp Col-0.

4.4.1 □ GARE MOTIV DES LFY-PROMOTOR ALS MÖGLICHE BINDESTELLE VON MYB101

Potentielle *target* Gene der GAMYBs in *A. thaliana* sind bisher jedoch weitgehend unbekannt. Der Promotor von *LEAFY* (*LFY*, At5g61850) besitzt ein MYB-Bindemotiv, das so genannte *gibberellic acid response element* (GARE), welches durch GA induziert für die Promotoraktivität von *LFY* erforderlich ist (BLAZQUEZ und WEIGEL 2000). Das Motiv umfasst 8 Basenpaare, CAACTGTC, und befindet sich im *LFY* Promotor in der Position -249 bis -242. Die Sequenz stimmt mit der Konsensusbindestelle für MYB-Transkriptionsfaktoren in Tieren und pflanzlichen R2R3 MYB Faktoren überein (URAO *et al.* 1993). Die Promotoren von *LFY* aus *A. thaliana* und Pappel (*accession number* U93196) weisen nur eine geringe Ähnlichkeit auf, aber das GARE Motiv in beiden Promotoren ist konserviert (BLAZQUEZ und WEIGEL 2000). Mit Hilfe dieses Programms *Patmatch* (www.arabidopsis.org) kann nach Motiven/Sequenzen im Genom von *A. thaliana* gesucht werden, die weniger als 20 Nukleotide umfassen. Die von Blazquez und Weigel (2000) beschriebene Sequenz des GARE Motivs wurde in diesem Programm verwendet, um nach weiteren Genen zu suchen, die 1000 Basenpaare *upstream* des 5'UTR ein GARE Motiv besitzen. Insgesamt wurde das Motiv 253 in 33282 verfügbaren Sequenzen gefunden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Gocal *et al.* (2001) könnten eine *in vitro* Bindung von MYB33 an das GARE Motiv im *LFY* Promotor nachweisen, folglich scheint MYB33 ein Regulator von *LFY* zu sein und GA nimmt möglicherweise mittels GAMYB Transkriptionsfaktoren Einfluss auf den Blühvorgang in *A. thaliana*. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung von MYB101 an das GARE Motiv des *LFY* Promotors mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Die heterologe Expression von *MYB101* in *E. coli* blieb erfolglos (Ergebnisse nicht gezeigt), daher wurde die *in vitro* Translation von *MYB101* und *MYB33* mittels des *TnT Quick Coupled Translation/Transcription System*® (Promega) vorgenommen. Ein 70 Basenpaar großes Promotorfragment des *LFY* Promotors, welches das bereits identifizierte GARE Motiv enthielt (BLAZQUEZ und WEIGEL 2000), wurde aus genomischer DNA amplifiziert. Die Etablierung eines nicht-radioaktiven EMSA, bei dem das DNA-Fragment durch Biotin-markierte Oligonukleotide biotinyliert wurde und die Detektion der biotinylierten DNA erfolgen sollte, schlug fehl (SCHRÖDER 2006). Daher wurde der bereits etablierte EMSA mit radioaktiv-markierter DNA durchgeführt (SCHMIED 2005). Das MYB33 an das GARE Motiv binden kann, wurde bereits gezeigt (GOCAL *et al.* 2001), somit diente das *in vitro* translatierte MYB33 in der in dieser Arbeit durchgeführten EMSA-Analyse als Positivkontrolle (Abb. 3.23). Eine Bindung von MYB101 an das GARE-Motiv des *LFY* Promotors konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.23), wobei dies nicht heißen muss, dass MYB101 zwangsläufig ein Regulator von *LFY* in *A. thaliana* ist. Es bedeutet aber, dass

MYB101 *in vitro* an das GARE Motiv binden kann und potentielle *target* Gene, deren Expression durch MYB101 reguliert werden, möglicherweise ein solches Motiv enthalten.

4.4.2 □ MYB101 ÜBERNIMMT FUNKTIONEN IN DER ENTWICKLUNG DER FRUCHTBLÄTTER UND DER BILDUNG VON REIFEN POLLEN

Die funktionale Analyse der beiden GAMYBs MYB33 und MYB65 verdeutlichte, dass beide Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Entwicklung der Antheren übernehmen (MILLAR und GUBLER 2005). Die T-DNA Insertion in jeweils nur einem der beiden Gene führte zu keinem morphologischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp Col-0, erst die Doppelmutante *myb33 myb65* wies eine Sterilität auf, sie produzierten keinen Pollen. Daraus wurde geschlossen, dass die Funktion von MYB33 und MYB65, die zudem eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, redundant ist (MILLAR und GUBLER 2005). In diesem Zusammenhang wurde nicht die Rolle von MYB101 untersucht, für das in der hier vorliegenden Arbeit eine NLS sowie drei unabhängige NES beschrieben wurden. Der Kernexport von MYB101 mittels XPO1 in *A. thaliana* kann auf die Regulation der Funktion dieses Transkriptionsfaktors Einfluss nehmen. Eine Bindung von MYB101 an das GARE Motiv des *LFY* Promotors konnte gezeigt werden (Abb. 3.23), wobei unklar ist ob MYB101 *in planta* ebenfalls an diesen Promotor bindet. Zur Analyse der Funktion von MYB101 wurden T-DNA Insertionslinien für *myb33*, *myb65* und *myb101* zu verschiedenen Doppelmutanten gekreuzt. Generiert wurden *myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb65 myb101* Mutanten (Abb. 3.20). Für die Gene *MYB65* und *MYB101* waren jeweils zwei T-DNA Insertionslinien vom Salk Institut verfügbar (Abb. 3.17). Die in dieser Arbeit hergestellten Doppelmutanten aus den drei GAMYBs entwickelten Fruchtblätter, die sich in ihrer Größe nicht von denen des Wildtyps Col-0 unterschieden und produzierten deutlich reduzierte Mengen an Pollen (Abb. 3.20). Von Millar und Gubler (2005) wurde berichtet, dass die Doppelmutante *myb33 myb65* keinen Pollen und somit auch keine Samen produzierten, außerdem waren die Fruchtblätter in ihrer Größe deutlich unterentwickelt und überragten nicht den Fruchtknoten. Diese Doppelmutantenpflanzen wurden jedoch unter kontinuierlichen Lichtbedingungen aufgezogen ($\sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Lichtintensität und 21°C Temperatur). Die hier hergestellten GAMYB Doppelmutanten wurden zunächst für acht Wochen im Kurztag aufgezogen und anschließend weiter unter Langtagkonditionen wachsen gelassen, was ebenfalls zu größtenteils sterilen Pflanzen führte (Abb. 3.20). Es wurde also gezeigt, dass auch MYB101 in die Bildung der Antheren und damit verbundenen Pollenentwicklung involviert ist (Abb. 3.20).

Da geringe Mengen an Pollen von den Doppelmutanten *myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb65 myb101* gebildet wurde, war es möglich diese Kreuzungen zur Herstellung einer GAMYB Tripelmutante zu verwenden. Aus 141 potentiellen Tripelmutantenpflanzen (T3 Generation) wurden zwei isoliert, die homozygote T-DNA Insertionen für alle drei GAMYBs aufwiesen. Für diese beiden verbliebenen Pflanzen wurde beobachtet, dass sie im Kurztag deutlich kleinere und auch weniger Rosettenblätter bildeten als der Wildtyp Col-0 (Abb. 3.21). Später unter Langtagbedingungen bildeten die adulten GAMYB Tripelmutanten ebenfalls deutlich weniger Seiteninfloreszenzen als der Wildtyp aus (Abb. 3.21). Die Fruchtblätter der Tripelmutanten waren in ihrer Größe stark unterentwickelt und sie waren vollständig steril (Abb. 3.22). Die entfärbten Schoten der beiden Tripelmutanten enthielten keine Samen (Abb. 3.22). Zur Kontrolle, dass theoretisch die Entwicklung einer Schote möglich ist, wurden Blüten der Tripelmutante mit Pollen von Wildtyp Col-0 bestäubt. Die Entwicklung einer Schoten sowie reifen Samen konnte nachgewiesen werden, was bedeutet, dass der homozygote *knock out* der drei GAMYBs keine Auswirkung auf die Entwicklung des Fruchtknotens hatte (Ergebnis nicht gezeigt). Der Einfluss der GAMYBs auf die Bildung der Antheren ist nicht unwahrscheinlich, da für Gibberellin (GA) bekannt ist, dass es Funktionen in der Samenkeimung, bei der Regulation des Blühzeitpunkts und in der Entwicklung von Blüten, Früchten und Samen haben kann. Darüber hinaus können GAs auch Einfluss auf die Entwicklung von Stängel und Blättern nehmen (PHARIS und KING 1985). GA spielt in zahlreichen Langtagpflanzen eine wichtige Rolle in der Induktion des Blühvorgangs. Die Konzentration von GA₁ und GA₄ in Blätter und Spross von *Lolium temulentum* nimmt unter Langtagbedingungen zu und die Expression von *LtGAMYB* wird positiv reguliert (GOCAL *et al.* 1999). Die Regulation des Wachstums und der Entwicklung von Pflanzen durch GA kann erklären, weshalb die GAMYB Tripelmutanten außer dem Defekt in der Entwicklung der Fruchtblätter auch deutlich weniger Blätter und Seiteninfloreszenzen ausbildeten als Wildtyp Col-0 Pflanzen. In *A. thaliana* werden in keimenden Samen durch GA₄ 230 Gene herauf und 127 herunter reguliert (OGAWA *et al.* 2003). Die durch GA-regulierten Gene lassen sich in verschiedene zelluläre und metabolische Prozesse unterteilen: Zellelongation und Zellteilung, GA Biosynthese, Ethylen Biosynthese und Antwort, Auxin Transport und Transkriptionsfaktoren. Zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehören u.a. SCL3 (At1g50420), MYB66/WER (At5g14750), *zinc finger1* (At2g27730) und *zinc finger2* (At2g28200). GAMYBs wurden in der Studie von Ogawa *et al.* (2003) nicht isoliert.

Anhand der generierten Doppelmutanten *myb33 myb101* und *myb65 myb101* sowie der Tripelmutante *myb33 myb65 myb101* (Abb. 3.20, 3.21 und 3.22), konnte gezeigt werden, dass auch MYB101 Einfluss auf die Entwicklung der Antheren und Bildung von Pollen nimmt. Weiterhin scheinen die GAMYBs in *A. thaliana* induziert durch GA Einfluss auf die

Entwicklung und das Wachstum von Blättern zu nehmen. Für die Doppelmutanten (*myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb65 myb101*) wurden kleinere sowie eine reduzierte Anzahl an Rosettenblätter festgestellt. Zusätzlich entwickelten die Doppelmutanten eine deutlich geringere Anzahl an Seiteninfloreszenzen. Es ist zu bedenken, dass die Doppelmutanten immerhin noch ein drittes funktionales GAMYB enthielten, das die Funktionen der mutierten GAMYBs übernommen haben könnte, somit wären die drei GAMYBs offensichtlich funktional redundant. *MYB101* zeigt im Vergleich zu den anderen beiden GAMYBs ein anderes Expressionsmuster (Abb. 1.5). In wie fern sich dieses in der *myb33 myb65* Doppelmutante verändert wurde noch nicht geklärt. Ebenso unklar ist das Expressionsmuster von *MYB33* und *MYB65* in den Doppelmutanten, in denen jeweils nur eines der beiden funktional ist.

4.5 □ PARTITIONIERUNG ALS REGULATION DER FUNKTION VON PROTEINEN

Die nukleozytoplasmatische Partitionierung kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Diese Ebenen werden gebildet von dem Cargo selber, den Transportrezeptoren und den NPCs. Die Regulationsebene, die das Cargo bildet, kann wiederum unterteilt werden in verschiedene Mechanismen, die ihrerseits die Partitionierung beeinflussen können. Dazu zählen post-transkriptionale und post-translationale Modifikationen sowie inter- und intramolekulare Interaktionen, die die Partitionierung der Cargos kontrollieren. Zu den post-transkriptionalen Modifikationen gehören z.B. die Bildung eines mRNP Komplexes, zum Export von mRNA oder die Reifung ribosomaler Untereinheiten im Nukleus. Erst die vollständige Bildung eines Komplexes leitet den Kernexport von mRNA und ribosomalen Untereinheiten ein. Auch der Export von tRNAs durch Exportin-t erfolgt erst nachdem eine Synthese im Nukleus abgeschlossen ist. Als post-translationale Modifikationen gelten Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Poly(ADP-ribosyl)ierung. Die Bildung von inter- und intramolekularen Interaktionen kann zur Maskierung von Import- und Exportsignalen führen. Die Bindung eines Transportrezeptors wird dadurch verhindert und das Wandern eines Proteins zwischen Nukleus und Zytoplasma wird somit unterbunden.

Auf der Ebene der Transportrezeptoren kann die Expression der betreffenden Rezeptoren über die Partitionierung von Proteinen entscheiden. Aber auch die Interaktion mit den Nukleoporinen und das Konkurrieren verschiedener Transportrezeptoren um die begrenzte Anzahl der Bindestellen an den Nukleoporinen limitieren die Partitionierung. Zusätzlich bevorzugen diverse Transportrezeptoren bestimmte FG Domänen in den NPCs (TERRY und WENTE 2007).

Den Einfluss, den die NPCs auf die Partitionierung nehmen, wird reguliert durch die Zusammensetzung der Nukleoporine in den NPCs. In *Saccharomyces cerevisiae* ändert sich die Struktur der NPCs in Abhängigkeit vom Zellzyklus und passt sich so spezifischen Transportvorgängen an (LUSK *et al.* 2007; MAKHNEVYCH *et al.* 2003). Zusätzlich zur Änderung in der Zusammensetzung, variiert auch der Durchmesser der NPCs, der etwa 10 nm beträgt (FRIED und KUTAY 2003). Transportiert werden Cargos mit einer Größe von ein bis drei MDa, was ungefähr einem Durchmesser von 25 nm entspricht (z.B. ribosomale Untereinheiten).

Ein Transkriptionsfaktor beispielsweise reguliert die Expression eines Gens solange er im Nukleus verbleibt. Durch inter- oder intrazelluläre Signale kann er dann aus dem Nukleus exportiert werden, womit die Expression des Zielgens unterbrochen wäre (Abb. 1.5). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten überexprimierenden Linien für *MYB101* erlauben die *in vivo* Lokalisierung des Transkriptionsfaktors, da er an YFP fusioniert ist. Die Visualisierung des Wanderns von MYB101 soll mittels der überexprimierenden Linien noch untersucht werden sowie. Für den Transkriptionsfaktor *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (BZR1) aus *A. thaliana* wurden ein Kernexport in Abhängigkeit von seiner Phosphorylierung nachgewiesen (RYU *et al.* 2007).

Den Einfluss von intermolekularen Interaktionen auf die Partitionierung wurde anhand der Dimerisierung von PAB2 und CID11 dargestellt (Abb. 3.31). Eine Dimerbildung findet nur im Zytoplasma statt. Eine CID11 Homodimer ist ebenfalls ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 3.31). Welchen Einfluss die Dimerisierung auf die Funktion der RNA-bindenden Proteine PAB2 und CID11 hat, ist noch unbekannt. Die nukleozytoplasmatische Partitionierung von Proteinen kann also auf verschiedenen Ebenen stattfinden und in Abhängigkeit von dem entsprechenden Cargo werden diverse zelluläre Vorgänge beeinflusst.

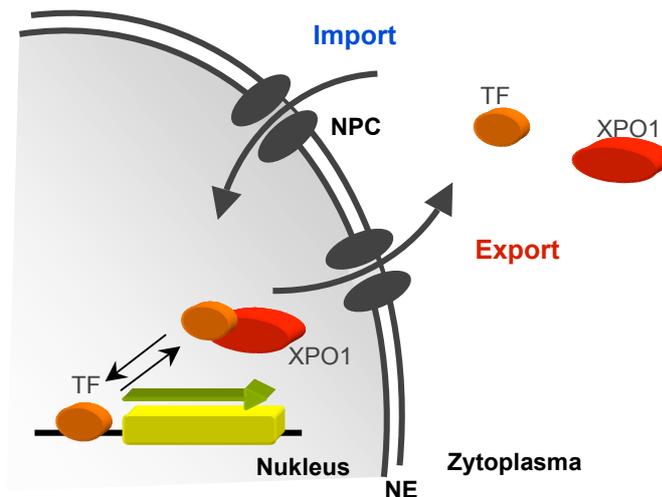


ABB. 4.5: NUKLEOZYTOPLASMATISCHE PARTITIONIERUNG EINES TRANSKRIPTIONSFAKTORS.

Dargestellt ist der nukleozytoplasmatische Transport eines Transkriptionsfaktors, dessen Funktion und damit die Genexpression durch den Kernimport und Kernexport reguliert werden. NPC, *nuclear pore complex*; NE, *nuclear envelope*.

4.6 □ AUSBLICK

Im Hinblick auf die Letalität einer *xpo1a xpo1b* Doppel T-DNA Insertion bleibt abschließend zu klären, weshalb genau und zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Letalität auftritt. Durch das Anfärben von Pollen kann die Entwicklung der Pollen in den Staubblättern nachvollzogen werden. Zusätzlich kann die Bildung des Pollenschlauchs im Fruchtknoten dargestellt werden. Es ist anzunehmen, dass bereits in einem frühen Stadium der Samenentwicklung Defekte auftreten, die zu einer Abortion der Samen führen. Eine normale Entwicklung der Staubblätter und die Bildung von Pollen wurden in *xpo1a xpo1b* Mutanten beobachtet. Im Gegensatz dazu bildet die *myb33 myb65 myb101* Tripelmutante keinen Pollen, während die verschiedenen Doppelmutanten *myb33 myb65*, *myb33 myb101* und *myb33 myb101* eine stark reduzierte Produktion von Pollen zeigen. Eine Lebensfärbung von Pollen erscheint sinnvoll in diesen Mutanten. Für *MYB101* ist bekannt, dass es hauptsächlich in Pollen und Staubblättern exprimiert wird. Durch quantitative *real-time* PCR-Analysen könnte die Expression von *MYB101* in *myb33 myb65* Pflanzen in verschiedenen Geweben untersucht werden. Aber auch die Expression von *MYB33* und *MYB65* in den Mutanten, in denen nur jeweils eines der beiden GAMYBs funktional ist, könnte genauer analysiert werden.

Die Bindung von *MYB101* an das GARE Motiv des *LEAFY* Promotor konnte gezeigt werden. Mittels des bioinformatischen Programms *Patmatch* (www.arabidopsis.org) wurden

zahlreiche Gene identifiziert, die in ihren Promotorregionen die Sequenz des GARE Motivs besitzen. Die Analyse der Promotoren könnte zur Identifizierung weiterer potentieller Zielgene für MYB101 führen.

Die Überexpressionslinien für *MYB101* exprimieren dieses Protein an YFP-Fusion. Durch die Verwendung von zum Beispiel Gibberellin könnte getestet werden, ob sich die *in vivo* Lokalisierung von MYB101 verändert und ein Wandern von MYB101 zwischen Nukleus und Zytoplasma beobachtet werden kann. Das Wandern von Proteinen *in vivo* darzustellen ist bislang noch nicht erfolgt. Eine andere Möglichkeit zur Visualisierung von wandernden Proteinen stellt die Verwendung von paGFP dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden im Genom von *A. thaliana* existierenden Genen *XPO1A* und *XPO1B* untersucht. Die Expression beider Gene ist in allen Geweben von *A. thaliana* detektierbar (*AtGenExpress*). Die Analyse einer T-DNA Insertionslinie für *XPO1A* erbrachte keinen morphologischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Für *xpo1b* T-DNA Insertionslinien wurden kürzere Internodien festgestellt im Vergleich zum Wildtyp, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass Proteine und andere Faktoren, die in die Entwicklung und das Wachstum von *A. thaliana* involviert sind, potentielle Cargosubstrate von *XPO1B* sind. Die Generierung von *xpo1a xpo1b* Doppelmutanten (Genotyp *aabb*) blieb erfolglos. Lediglich die Herstellung von heterozygoten T-DNA Insertionspflanzen (Genotyp *AaBb*) und solchen die heterozygot für *xpo1a* und homozygot für *xpo1b* (Genotyp *Aabb*) war möglich. Pflanzen, die einen der beiden Genotypen besaßen, wiesen einen starken Defekt in der Entwicklung der Samen auf. Während Wildtyp Col-0 Pflanzen durchschnittlich 55 bis 60 Samen pro Schote produzierten, entwickelten Pflanzen mit den Genotypen *AaBb* bzw. *Aabb* nur etwa zehn bis 15 Samen pro Schote aus. Einhergehend mit der Entwicklung einer deutlich reduzierten Anzahl an Samen waren die Schoten dieser Pflanzen mit acht bis zehn mm zusätzlich deutlich kleiner als solche des Wildtyps Col-0, die etwa 14 bis 16 mm lang waren. Eine homozygote T-DNA Insertion in beiden Genen *xpo1a* und *xpo1b* ist für die Pflanzen anscheinend gametophytisch letal.

Der Kernexport ribosomaler Untereinheiten, aber auch der von mRNA in *A. thaliana* ist noch weitgehend unklar. Eine Interaktion von *XPO1A* mit dem NMD3, einem potenziellen Adapter zwischen *XPO1* und der 60S ribosomalen Untereinheit, wurde nachgewiesen. Ein Rezeptor für den mRNA Kernexport, wie er z.B. in Hefen existiert, wurde noch nicht beschrieben.

Als *XPO1*-interagierende Proteine wurden die Transkriptionsfaktoren MYB101, HSF3 und das Zinkfingerprotein AtCTH identifiziert. Das Kernexportsignal NES, ein meist Leucinreiches Motiv, wurde in diesen transkriptionalen Regulatoren durch Deletions- und Mutationsanalyse charakterisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten NES dienen einer weiteren Arbeit am Lehrstuhl für Genomforschung als Grundlage zur Etablierung eines bioinformatischen Programms zur Identifizierung von NES in pflanzlichen Proteinen.

MYB101 gehört zur Familie der so genannten GAMYB Transkriptionfaktoren, die durch Gibberellin gesteuert, die Expression von Zielgenen induzieren können. Ein Zielgen und die damit verbundene genaue Funktion von MYB101 sind noch unbekannt. Eine Bindung von MYB101 an das GARE Motive (*gibberellic acid response element*) im *LEAFY* Promotor wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Zur Familie der GAMYBs gehören auch MYB33 und MYB65. Die Generierung von *myb33 myb101*, *myb65 myb101* und *myb33 myb65 myb101* T-DNA Insertionslinien verdeutlichte eine Funktion von MYB101 in

der Entwicklung der Staubblätter und Pollen in *A. thaliana*. Diese Gewebe sind hauptsächlich die Orte, an denen die Expression von MYB101 in Microarray-Experimenten nachgewiesen wurde.

RNA-bindende Proteine zählen ebenfalls zu den XPO1-interagierenden Proteinen. Für die hier untersuchten RNA-bindenden Proteine, CID11 und PAB2, wurde jeweils eine NES charakterisiert und eine XPO1-abhängige *in vivo* Lokalisierung in BY-2 Tabakprotoplasten wurde mittels Leptomycin B (LMB) nachgewiesen. Die RNA-bindenden Proteine CID9, CID10 und CID12 verändern ebenfalls ihre *in vivo* Lokalisierung unter dem Einfluss von LMB. Die Aufgabe von XPO1 beim Kernexport von RNA in *A. thaliana* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt.

6. LITERATUR

- ACHARD, P., A. HERR, D. C. BAULCOMBE and N. P. HARBERD, 2004 Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**: 3357-3365.
- ADACHI, Y., and M. YANAGIDA, 1989 Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* **108**: 1195-1207.
- ALBER, F., S. DOKUDOVSKAYA, L. M. VEENHOFF, W. ZHANG, J. KIPPER *et al.*, 2007 The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**: 695-701.
- ALVES-FERREIRA, M., F. WELLMER, A. BANHARA, V. KUMAR, J. L. RIECHMANN *et al.*, 2007 Global expression profiling applied to the analysis of *Arabidopsis* stamen development. *Plant Physiol* **145**: 747-762.
- ALVES-JUNIOR, L., 2007 Prediction, validation and functional analysis of miRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universität Bielefeld., pp. in *Lehrstuhl für Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- ANDRADE, M. A., and P. BORK, 1995 HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**: 115-116.
- ANDRADE, M. A., C. PETOSA, S. I. O'DONOGHUE, C. W. MULLER and P. BORK, 2001 Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* **309**: 1-18.
- BANIWAL, S. K., K. BHARTI, K. Y. CHAN, M. FAUTH, A. GANGULI *et al.*, 2004 Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci* **29**: 471-487.
- BATAILLE, N., T. HELSER and H. M. FRIED, 1990 Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J Cell Biol* **111**: 1571-1582.
- BECKER, A., M. BEY, T. R. BURGLIN, H. SAEDLER and G. THEISSEN, 2002 Ancestry and diversity of BEL1-like homeobox genes revealed by gymnosperm (*Gnetum gnemon*) homologs. *Dev Genes Evol* **212**: 452-457.
- BECKER, D., E. KEMPER, J. SCHELL and R. MASTERSON, 1992 New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* **20**: 1195-1197.
- BECKER, J., F. MELCHIOR, V. GERKE, F. R. BISCHOFF, H. PONSTINGL *et al.*, 1995 RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**: 11860-11865.
- BELLAOUI, M., M. S. PIDKOWICH, A. SAMACH, K. KUSHALAPPA, S. E. KOHALMI *et al.*, 2001 The *Arabidopsis* BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* **13**: 2455-2470.
- BELOSTOTSKY, D. A., 2003 Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* **163**: 311-319.
- BELOSTOTSKY, D. A., and R. B. MEAGHER, 1996 A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly(A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast. *Plant Cell* **8**: 1261-1275.
- BHARATHAN, G., B. J. JANSSEN, E. A. KELLOGG and N. SINHA, 1999 Phylogenetic relationships and evolution of the KNOTTED class of plant homeodomain proteins. *Mol Biol Evol* **16**: 553-563.
- BILBAO-CORTES, D., M. HETZER, G. LANGST, P. B. BECKER and I. W. MATTAJ, 2002 Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms. *Curr Biol* **12**: 1151-1156.
- BISCHOFF, F. R., and D. GORLICH, 1997 RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett* **419**: 249-254.

- BISCHOFF, F. R., C. KLEBE, J. KRETSCHMER, A. WITTINGHOFER and H. PONSTINGL, 1994 RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2587-2591.
- BISCHOFF, F. R., and H. PONSTINGL, 1991a Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**: 80-82.
- BISCHOFF, F. R., and H. PONSTINGL, 1991b Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10830-10834.
- BLAZQUEZ, M. A., and D. WEIGEL, 2000 Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* **404**: 889-892.
- BOGERD, H. P., R. A. FRIDELL, R. E. BENSON, J. HUA and B. R. CULLEN, 1996 Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* **16**: 4207-4214.
- BOHNSACK, M. T., K. REGENER, B. SCHWAPPACH, R. SAFFRICH, E. PARASKEVA *et al.*, 2002 Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *Embo J* **21**: 6205-6215.
- BOLLMAN, K. M., M. J. AUKERMAN, M. Y. PARK, C. HUNTER, T. Z. BERARDINI *et al.*, 2003 HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**: 1493-1504.
- BOREVITZ, J. O., Y. XIA, J. BLOUNT, R. A. DIXON and C. LAMB, 2000 Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**: 2383-2394.
- BRACHA-DRORI, K., K. SHICHRUR, A. KATZ, M. OLIVA, R. ANGELOVICI *et al.*, 2004 Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**: 419-427.
- BRAVO, J., L. AGUILAR-HENONIN, G. OLMEDO and P. GUZMAN, 2005 Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of Arabidopsis thaliana Poly(A)-binding proteins. *Mol Genet Genomics* **272**: 651-665.
- BURD, C. G., and G. DREYFUSS, 1994 Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- CARTWRIGHT, P., and K. HELIN, 2000 Nucleocytoplasmic shuttling of transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1193-1206.
- CHEKANOVA, J. A., and D. A. BELOSTOTSKY, 2003 Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *Rna* **9**: 1476-1490.
- CHEKANOVA, J. A., R. J. SHAW and D. A. BELOSTOTSKY, 2001 Analysis of an essential requirement for the poly(A) binding protein function using cross-species complementation. *Curr Biol* **11**: 1207-1214.
- CORDES, V. C., S. REIDENBACH and W. W. FRANKE, 1995 High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of Xenopus oocytes. *Eur J Cell Biol* **68**: 240-255.
- CRITTENDEN, S. L., D. S. BERNSTEIN, J. L. BACHORIK, B. E. THOMPSON, M. GALLEGOS *et al.*, 2002 A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **417**: 660-663.
- DASSO, M., 2002 The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* **12**: R502-508.
- DELANEY, K. J., R. XU, J. ZHANG, Q. Q. LI, K. Y. YUN *et al.*, 2006 Calmodulin interacts with and regulates the RNA-binding activity of an Arabidopsis polyadenylation factor subunit. *Plant Physiol* **140**: 1507-1521.
- DINGWALL, C., S. V. SHARNICK and R. A. LASKEY, 1982 A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* **30**: 449-458.
- DREYFUSS, G., V. N. KIM and N. KATAOKA, 2002 Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 195-205.
- DUNAEVA, M., and I. ADAMSKA, 2001 Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of Arabidopsis thaliana using RNA differential display. *Eur J Biochem* **268**: 5521-5529.

- ENDRIZZI, K., B. MOUSSIAN, A. HAECKER, J. Z. LEVIN and T. LAUX, 1996 The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**: 967-979.
- FERRER, M., J. A. RODRIGUEZ, E. A. SPIERINGS, J. P. DE WINTER, G. GIACCONE *et al.*, 2005 Identification of multiple nuclear export sequences in Fanconi anemia group A protein that contribute to CRM1-dependent nuclear export. *Hum Mol Genet* **14**: 1271-1281.
- FISCHER, U., J. HUBER, W. C. BOELEN, I. W. MATTAJ and R. LUHRMANN, 1995 The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483.
- FORNEROD, M., M. OHNO, M. YOSHIDA and I. W. MATTAJ, 1997 CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**: 1051-1060.
- FRIED, H., and U. KUTAY, 2003 Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1659-1688.
- FUKUDA, M., I. GOTOH, M. ADACHI, Y. GOTOH and E. NISHIDA, 1997 A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* **272**: 32642-32648.
- GADAL, O., D. STRAUSS, J. KESSL, B. TRUMPOWER, D. TOLLERVEY *et al.*, 2001 Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* **21**: 3405-3415.
- GADAL, O., D. STRAUSS, E. PETFALSKI, P. E. GLEIZES, N. GAS *et al.*, 2002 Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol* **157**: 941-951.
- GOCAL, G. F., A. T. POOLE, F. GUBLER, R. J. WATTS, C. BLUNDELL *et al.*, 1999 Long-day up-regulation of a GAMYB gene during *Lolium temulentum* inflorescence formation. *Plant Physiol* **119**: 1271-1278.
- GOCAL, G. F., C. C. SHELDON, F. GUBLER, T. MORITZ, D. J. BAGNALL *et al.*, 2001 GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 1682-1693.
- GORLICH, D., R. KRAFT, S. KOSTKA, F. VOGEL, E. HARTMANN *et al.*, 1996a Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell* **87**: 21-32.
- GORLICH, D., and U. KUTAY, 1999 Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-660.
- GORLICH, D., N. PANTE, U. KUTAY, U. AEBI and F. R. BISCHOFF, 1996b Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* **15**: 5584-5594.
- GRUTER, P., C. TABERNERO, C. VON KOBBE, C. SCHMITT, C. SAAVEDRA *et al.*, 1998 TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* **1**: 649-659.
- GUBLER, F., and J. V. JACOBSEN, 1992 Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pl alpha-amylase gene. *Plant Cell* **4**: 1435-1441.
- GUBLER, F., R. KALLA, J. K. ROBERTS and J. V. JACOBSEN, 1995 Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**: 1879-1891.
- GUBLER, F., R. J. WATTS, R. KALLA, P. MATTHEWS, M. KEYS *et al.*, 1997 Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GAMyb. *Plant Cell Physiol* **38**: 362-365.
- HAASEN, D., C. KOHLER, G. NEUHAUS and T. MERKLE, 1999 Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **20**: 695-705.
- HAASEN, D., and T. MERKLE, 2002 Characterization of an Arabidopsis thaliana Homologue of the Nuclear Export Receptor CAS by its Interaction with Importin α . *Plant Biology* **4**: 432-439.

- HAASEN, D., J. STARMANN, K. I. KÖTHER, C. RUBIANO, K. SCHMIED *et al.*, 2008 Nuclear export of proteins as a tool for regulation: Characterisation of Exportin 1-dependent pathways and different classes of proteins containing nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*, pp.
- HAMAMOTO, T., S. GUNJI, H. TSUJI and T. BEPPU, 1983 Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **36**: 639-645.
- HANDA, N., O. NUREKI, K. KURIMOTO, I. KIM, H. SAKAMOTO *et al.*, 1999 Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature* **398**: 579-585.
- HE, F., and A. JACOBSON, 1995 Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. *Genes Dev* **9**: 437-454.
- HE, Z., Q. ZHU, T. DABI, D. LI, D. WEIGEL *et al.*, 2000 Transformation of rice with the *Arabidopsis* floral regulator LEAFY causes early heading. *Transgenic Res* **9**: 223-227.
- HEDGES, J., Y. I. CHEN, M. WEST, C. BUSSIÈRE and A. W. JOHNSON, 2006 Mapping the functional domains of yeast NMD3, the nuclear export adapter for the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* **281**: 36579-36587.
- HEERKLOTZ, D., P. DORING, F. BONZELIUS, S. WINKELHAUS and L. NOVER, 2001 The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol Cell Biol* **21**: 1759-1768.
- HETZER, M., O. J. GRUSS and I. W. MATTAJ, 2002 The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nat Cell Biol* **4**: E177-184.
- HILSON, P., K. L. CARROLL and P. H. MASSON, 1993 Molecular characterization of PAB2, a member of the multigene family coding for poly(A)-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**: 525-533.
- HO, J. H., and A. W. JOHNSON, 1999 NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 2389-2399.
- HO, J. H., G. KALLSTROM and A. W. JOHNSON, 2000 Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* **151**: 1057-1066.
- HU, C. D., Y. CHINENOV and T. K. KERPPOLA, 2002 Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789-798.
- HUNG, N. J., K. Y. LO, S. S. PATEL, K. HELMKE and A. W. JOHNSON, 2008 Arx1 Is a Nuclear Export Receptor for the 60S Ribosomal Subunit in Yeast. *Mol Biol Cell* **19**: 735-744.
- HUNTER, C. A., M. J. AUKERMAN, H. SUN, M. FOKINA and R. S. POETHIG, 2003 PAUSED encodes the *Arabidopsis* exportin-t ortholog. *Plant Physiol* **132**: 2135-2143.
- HURT, E., S. HANNUS, B. SCHMELZL, D. LAU, D. TOLLERVEY *et al.*, 1999 A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* **144**: 389-401.
- INOUE, T., J. STUART, R. LENO and C. G. MAKI, 2002 Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73. *J Biol Chem* **277**: 15053-15060.
- IZAURRALDE, E., U. KUTAY, C. VON KOBBE, I. W. MATTAJ and D. GORLICH, 1997 The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**: 6535-6547.
- JARMOLOWSKI, A., W. C. BOELEN, E. IZAURRALDE and I. W. MATTAJ, 1994 Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* **124**: 627-635.
- JIN, H., and C. MARTIN, 1999 Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* **41**: 577-585.
- JOHNSON, A. W., E. LUND and J. DAHLBERG, 2002 Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* **27**: 580-585.

- JONES-RHOADES, M. W., and D. P. BARTEL, 2004 Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**: 787-799.
- KAFFMAN, A., I. HERSKOWITZ, R. TJIAN and E. K. O'SHEA, 1994 Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263**: 1153-1156.
- KAFFMAN, A., N. M. RANK, E. M. O'NEILL, L. S. HUANG and E. K. O'SHEA, 1998a The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**: 482-486.
- KAFFMAN, A., N. M. RANK and E. K. O'SHEA, 1998b Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev* **12**: 2673-2683.
- KALDERON, D., W. D. RICHARDSON, A. F. MARKHAM and A. E. SMITH, 1984 Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33-38.
- KANEKO, M., Y. INUKAI, M. UEGUCHI-TANAKA, H. ITOH, T. IZAWA *et al.*, 2004 Loss-of-function mutations of the rice GAMYB gene impair alpha-amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell* **16**: 33-44.
- KATAHIRA, J., K. STRASSER, A. PODTELEJNIKOV, M. MANN, J. U. JUNG *et al.*, 1999 The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* **18**: 2593-2609.
- KENAN, D. J., C. C. QUERY and J. D. KEENE, 1991 RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* **16**: 214-220.
- KERSTEN, B., L. BURKLE, E. J. KUHN, P. GIAVALISCO, Z. KONTHUR *et al.*, 2002 Large-scale plant proteomics. *Plant Mol Biol* **48**: 133-141.
- KERSTETTER, R., E. VOLLBRECHT, B. LOWE, B. VEIT, J. YAMAGUCHI *et al.*, 1994 Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell* **6**: 1877-1887.
- KHALEGHPOUR, K., A. KAHVEJIAN, G. DE CRESCENZO, G. ROY, Y. V. SVITKIN *et al.*, 2001 Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 5200-5213.
- KLEMM, J. D., C. R. BEALS and G. R. CRABTREE, 1997 Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol* **7**: 638-644.
- KLEMPNAUER, K. H., T. J. GONDA and J. M. BISHOP, 1982 Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**: 453-463.
- KOMEILI, A., and E. K. O'SHEA, 2000 Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 355-360.
- KÖTHER, K. I., 2007 Charakterisierung der Kernimport und Kernexport regulierenden Signale RNA-bindender Proteine in *Arabidopsis thaliana*, pp. in *Lehrstuhl für Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- KOZLOV, G., J. F. TREMPER, K. KHALEGHPOUR, A. KAHVEJIAN, I. EKIEL *et al.*, 2001 Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4409-4413.
- KREBBER, H., T. TAURA, M. S. LEE and P. A. SILVER, 1999 Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes Dev* **13**: 1994-2004.
- KUDO, N., N. MATSUMORI, H. TAOKA, D. FUJIWARA, E. P. SCHREINER *et al.*, 1999 Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9112-9117.
- KUTAY, U., F. R. BISCHOFF, S. KOSTKA, R. KRAFT and D. GORLICH, 1997 Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-1071.
- KUTAY, U., and S. GUTTINGER, 2005 Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* **15**: 121-124.

- LA COUR, T., L. KIEMER, A. MOLGAARD, R. GUPTA, K. SKRIVER *et al.*, 2004 Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**: 527-536.
- LANFORD, R. E., and J. S. BUTEL, 1984 Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**: 801-813.
- LEE, M. M., and J. SCHIEFELBEIN, 1999 WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**: 473-483.
- LI, J., D. JIA and X. CHEN, 2001 HUA1, a regulator of stamen and carpel identities in Arabidopsis, codes for a nuclear RNA binding protein. *Plant Cell* **13**: 2269-2281.
- LIPOWSKY, G., F. R. BISCHOFF, P. SCHWARZMAIER, R. KRAFT, S. KOSTKA *et al.*, 2000 Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J* **19**: 4362-4371.
- LORSCH, J. R., 2002 RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* **109**: 797-800.
- LUSK, C. P., D. D. WALLER, T. MAKHNEVYCH, A. DIENEMANN, M. WHITEWAY *et al.*, 2007 Nup53p is a target of two mitotic kinases, Cdk1p and Hrr25p. *Traffic* **8**: 647-660.
- MACARA, I. G., 2001 Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 570-594, table of contents.
- MAKHNEVYCH, T., C. P. LUSK, A. M. ANDERSON, J. D. AITCHISON and R. W. WOZNIAK, 2003 Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex. *Cell* **115**: 813-823.
- MANGUS, D. A., M. C. EVANS and A. JACOBSON, 2003 Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* **4**: 223.
- MARHOUL, J. F., and T. H. ADAMS, 1996 Aspergillus fabM encodes an essential product that is related to poly(A)-binding proteins and activates development when overexpressed. *Genetics* **144**: 1463-1470.
- MARTIN, C., and J. PAZ-ARES, 1997 MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**: 67-73.
- MATTAJ, I. W., 1993 RNA recognition: a family matter? *Cell* **73**: 837-840.
- MATTAJ, I. W., and L. ENGLMEIER, 1998 Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**: 265-306.
- MERKLE, T., 2001 Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* **213**: 499-517.
- MERKLE, T., 2003 Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr Genet* **44**: 231-260.
- MILLAR, A. A., and F. GUBLER, 2005 The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **17**: 705-721.
- MITSUNAGA, S., T. TASHIRO and J. YAMAGUCHI, 1994 Identification and characterization of gibberellin-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor. Appl. Genet.* **87**.
- MOORE, M. S., and G. BLOBEL, 1993 The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663.
- MOY, T. I., and P. A. SILVER, 2002 Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci* **115**: 2985-2995.
- MURPHY, R., and S. R. WENTE, 1996 An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. *Nature* **383**: 357-360.
- MURRAY, F., R. KALLA, J. JACOBSEN and F. GUBLER, 2003 A role for HvGAMYB in anther development. *Plant J* **33**: 481-491.
- NEUFELD, K. L., D. A. NIX, H. BOGERD, Y. KANG, M. C. BECKERLE *et al.*, 2000 Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12085-12090.
- O'NEILL, E. M., A. KAFFMAN, E. R. JOLLY and E. K. O'SHEA, 1996 Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**: 209-212.

- OGAWA, M., A. HANADA, Y. YAMAUCHI, A. KUWAHARA, Y. KAMIYA *et al.*, 2003 Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604.
- OHNO, M., A. SEGREF, A. BACHI, M. WILM and I. W. MATTAJ, 2000 PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**: 187-198.
- OSHIMA, Y., 1997 The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **72**: 323-334.
- PALANIVELU, R., D. A. BELOSTOTSKY and R. B. MEAGHER, 2000a Arabidopsis thaliana poly (A) binding protein 2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *Plant J* **22**: 187-198.
- PALANIVELU, R., D. A. BELOSTOTSKY and R. B. MEAGHER, 2000b Conserved expression of Arabidopsis thaliana poly (A) binding protein 2 (PAB2) in distinct vegetative and reproductive tissues. *Plant J* **22**: 199-210.
- PANTE, N., and M. KANN, 2002 Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**: 425-434.
- PARASKEVA, E., E. IZARRALDE, F. R. BISCHOFF, J. HUBER, U. KUTAY *et al.*, 1999 CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* **145**: 255-264.
- PAZ-ARES, J., D. GHOSAL, U. WIENAND, P. A. PETERSON and H. SAEDLER, 1987 The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J* **6**: 3553-3558.
- PETOSA, C., G. SCHOEHN, P. ASKJAER, U. BAUER, M. MOULIN *et al.*, 2004 Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell* **16**: 761-775.
- PHARIS, R. P., and R. W. KING, 1985 Gibberellins and Reproductive Development in Seed Plants. *Annu Rev of Plant Physiol* **36**: 51.
- POLLARD, V. W., W. M. MICHAEL, S. NAKIELNY, M. C. SIOMI, F. WANG *et al.*, 1996 A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**: 985-994.
- PRANDL, R., K. HINDERHOFER, G. EGGERS-SCHUMACHER and F. SCHOFFL, 1998 HSF3, a new heat shock factor from Arabidopsis thaliana, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **258**: 269-278.
- REISER, L., P. SANCHEZ-BARACALDO and S. HAKE, 2000 Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol Biol* **42**: 151-166.
- REXACH, M., and G. BLOBEL, 1995 Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**: 683-692.
- RHOADES, M. W., B. J. REINHART, L. P. LIM, C. B. BURGE, B. BARTEL *et al.*, 2002 Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**: 513-520.
- RIBBECK, K., and D. GORLICH, 2002 The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* **21**: 2664-2671.
- RIBBECK, K., G. LIPOWSKY, H. M. KENT, M. STEWART and D. GORLICH, 1998 NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* **17**: 6587-6598.
- ROMERO, I., A. FUERTES, M. J. BENITO, J. M. MALPICA, A. LEYVA *et al.*, 1998 More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **14**: 273-284.
- ROSINSKI, J. A., and W. R. ATCHLEY, 1998 Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol* **46**: 74-83.
- ROSSO, M. G., Y. LI, N. STRIZHOV, B. REISS, K. DEKKER *et al.*, 2003 An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**: 247-259.
- ROUT, M. P., J. D. AITCHISON, A. SUPRAPTO, K. HJERTAAS, Y. ZHAO *et al.*, 2000 The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**: 635-651.

- ROUT, M. P., and G. BLOBEL, 1993 Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**: 771-783.
- ROUT, M. P., and S. R. WENTE, 1994 Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol* **4**: 357-365.
- ROY, G., G. DE CRESCENZO, K. KHALEGHPOUR, A. KAHVEJIAN, M. O'CONNOR-MCCOURT *et al.*, 2002 Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol* **22**: 3769-3782.
- RYU, H., K. KIM, H. CHO, J. PARK, S. CHOE *et al.*, 2007 Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **19**: 2749-2762.
- SAAVEDRA, C. A., C. M. HAMMELL, C. V. HEATH and C. N. COLE, 1997 Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev* **11**: 2845-2856.
- SACHS, A. B., R. W. DAVIS and R. D. KORNBERG, 1987 A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol* **7**: 3268-3276.
- SAITOU, N., and M. NEI, 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- SAMBROOK, J., and D. RUSSELL, 2001 *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- SANTOS-ROSA, H., H. MORENO, G. SIMOS, A. SEGREF, B. FAHRENKROG *et al.*, 1998 Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* **18**: 6826-6838.
- SASAKI, A., H. ITOH, K. GOMI, M. UEGUCHI-TANAKA, K. ISHIYAMA *et al.*, 2003 Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**: 1896-1898.
- SCHLEPPENBÄUMER, J., 2006 Funktionale Charakterisierung der NES ind KNOX-Proteinen aus Arabidopsis thaliana, pp. in *Lehrstuhl fr Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- SCHMID, M., T. S. DAVISON, S. R. HENZ, U. J. PAPE, M. DEMAR *et al.*, 2005 A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* **37**: 501-506.
- SCHMIED, K., 2005 Funktionale Charakterisierung einer kleinen Familie von Arabidopsis MYB1R-Transkriptionsfaktoren: LHY/CCA1-like (LCL) Proteine als potentielle Koregulatoren des zentralen Oszillators pp. in *Lehrstuhl für Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- SCHREIBER, L., 2001 Regulation der nukleo-zytoplasmatischen Partitionierung der KNOX- und BELL-Proteine in Arabidopsis thaliana durch Kernexport und Dimerisierung, pp. in *Lehrstuhl für Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- SCHRÖDER, J., 2006 Analyse potentieller Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors MYB101 aus Arabidopsis thaliana, pp. in *Lehrstuhl für Genomforschung*. Universität Bielefeld, Bielefeld.
- SCHWAB, R., J. F. PALATNIK, M. RIESTER, C. SCHOMMER, M. SCHMID *et al.*, 2005 Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8**: 517-527.
- SEGREF, A., K. SHARMA, V. DOYE, A. HELLWIG, J. HUBER *et al.*, 1997 Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *EMBO J* **16**: 3256-3271.
- SIDDIQUI, N., G. KOZLOV, I. D'ORSO, J. F. TREMPER and K. GEHRING, 2003 Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in Trypanosoma cruzi: a vegetal PABC domain. *Protein Sci* **12**: 1925-1933.
- SIGRIST, S. J., P. R. THIEL, D. F. REIFF, P. E. LACHANCE, P. LASKO *et al.*, 2000 Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* **405**: 1062-1065.
- SIOMI, H., and G. DREYFUSS, 1995 A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**: 551-560.

- SKRIVER, K., F. L. OLSEN, J. C. ROGERS and J. MUNDY, 1991 cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7266-7270.
- SMITH, H. M., and S. HAKE, 2003 The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the Arabidopsis inflorescence. *Plant Cell* **15**: 1717-1727.
- SOLANO, R., C. NIETO, J. AVILA, L. CANAS, I. DIAZ *et al.*, 1995 Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J* **14**: 1773-1784.
- STADE, K., C. S. FORD, C. GUTHRIE and K. WEIS, 1997 Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**: 1041-1050.
- STEBER, C. M., S. E. COONEY and P. MCCOURT, 1998 Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of ABI1-1 in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 509-521.
- STEFL, R., L. SKRISOVSKA and F. H. ALLAIN, 2005 RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **6**: 33-38.
- STOMMEL, J. M., N. D. MARCHENKO, G. S. JIMENEZ, U. M. MOLL, T. J. HOPE *et al.*, 1999 A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* **18**: 1660-1672.
- STRACKE, R., H. ISHIHARA, G. HUEP, A. BARSCH, F. MEHRTENS *et al.*, 2007 Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J* **50**: 660-677.
- STRACKE, R., M. WERBER and B. WEISSHAAR, 2001 The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447-456.
- TAJIMA, F., and M. NEI, 1984 Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* **1**: 269-285.
- TERRY, L. J., and S. R. WENTE, 2007 Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **178**: 1121-1132.
- THAKURTA, A. G., G. GOPAL, J. H. YOON, T. SAHA and R. DHAR, 2004 Conserved nuclear export sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67 and human TAP function in mRNA export by direct nuclear pore interactions. *J Biol Chem* **279**: 17434-17442.
- THAKURTA, A. G., J. HO YOON and R. DHAR, 2002 *Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. *Yeast* **19**: 803-810.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS and T. J. GIBSON, 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- TOMINAGA, R., M. IWATA, K. OKADA and T. WADA, 2007 Functional analysis of the epidermal-specific MYB genes CAPRICE and WEREWOLF in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2264-2277.
- TROTTA, C. R., E. LUND, L. KAHAN, A. W. JOHNSON and J. E. DAHLBERG, 2003 Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J* **22**: 2841-2851.
- URAO, T., K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, S. URAO and K. SHINOZAKI, 1993 An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529-1539.
- VAINBERG, I. E., K. DOWER and M. ROSBASH, 2000 Nuclear export of heat shock and non-heat-shock mRNA occurs via similar pathways. *Mol Cell Biol* **20**: 3996-4005.
- VASU, S. K., and D. J. FORBES, 2001 Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 363-375.
- VENGLAT, S. P., T. DUMONCEAUX, K. ROZWADOWSKI, L. PARNELL, V. BABIC *et al.*, 2002 The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4730-4735.

- VETTER, I. R., A. ARNDT, U. KUTAY, D. GORLICH and A. WITTINGHOFER, 1999 Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**: 635-646.
- WALTER, M., C. CHABAN, K. SCHUTZE, O. BATISTIC, K. WECKERMANN *et al.*, 2004 Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**: 428-438.
- WATANABE, M., M. FUKUDA, M. YOSHIDA, M. YANAGIDA and E. NISHIDA, 1999 Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes Cells* **4**: 291-297.
- WEIGEL, D., J. ALVAREZ, D. R. SMYTH, M. F. YANOFSKY and E. M. MEYEROWITZ, 1992 LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**: 843-859.
- WEIGEL, D., and O. NILSSON, 1995 A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**: 495-500.
- WEIGHARDT, F., G. BIAMONTI and S. RIVA, 1995 Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J Cell Sci* **108 (Pt 2)**: 545-555.
- WEIS, K., 1998 Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci* **23**: 185-189.
- WEN, W., J. L. MEINKOTH, R. Y. TSIEN and S. S. TAYLOR, 1995 Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473.
- WESTON, K., 1998 Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 76-81.
- YANG, J., E. S. BARDES, J. D. MOORE, J. BRENNAN, M. A. POWERS *et al.*, 1998 Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**: 2131-2143.
- YAO, W., D. ROSER, A. KOHLER, B. BRADATSCH, J. BASSLER *et al.*, 2007 Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell* **26**: 51-62.
- YASHIRODA, Y., and M. YOSHIDA, 2003 Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. *Curr Med Chem* **10**: 741-748.
- YOON, J. H., D. C. LOVE, A. GUHATHAKURTA, J. A. HANOVER and R. DHAR, 2000 Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol Cell Biol* **20**: 8767-8782.
- YORK, J. D., A. R. ODOM, R. MURPHY, E. B. IVES and S. R. WENTE, 1999 A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* **285**: 96-100.
- ZEMP, I., and U. KUTAY, 2007 Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* **581**: 2783-2793.
- ZHAO, Q., S. LEUNG, A. H. CORBETT and I. MEIER, 2006 Identification and characterization of the Arabidopsis orthologs of nuclear transport factor 2, the nuclear import factor of ran. *Plant Physiol* **140**: 869-878.
- ZHU, J., and F. MCKEON, 1999 NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* **398**: 256-260.
- ZHU, J., and F. MCKEON, 2000 Nucleocytoplasmic shuttling and the control of NF-AT signaling. *Cell Mol Life Sci* **57**: 411-420.
- ZIEMIENOWICZ, A., D. HAASEN, D. STAIGER and T. MERKLE, 2003 Arabidopsis transportin1 is the nuclear import receptor for the circadian clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7. *Plant Mol Biol* **53**: 201-212.

7. PUBLIKATIONEN

Haasen, D., Starmann, J., Köther, K.I., Rubiano, C., Schmied, K., and Merkle, T. (2008). Nuclear export of proteins as a tool for regulation: Characterisation of Exportin 1-dependent pathways and different classes of proteins containing nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. Manuskript

Starmann, J. and Merkle, T. (2008). Characterization of the CRM1/Xpo1 nuclear export pathway in plants by identifying different classes of interacting proteins in *Arabidopsis thaliana*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2008), Tampere, Finland. Poster P14-037.

Holtgreffe, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C., and Scheibe, R. (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant* **133**, 211-228.

8. ANHANG

OLIGONUKLEOTIDLISTE:

ID	Name	Sequenz
J001	MYB75-51	ATCGAATTCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGCT
J002	MYB75-52	ATGGAATTCCCCATTCTCTACAACACCGGCACTA
J003	MYB75-31	GAGCTCGAGCTAATCAAATTTACAGTCTCTCCATC
J004	MYB75-32	GAGCTCGAGCTATGCCGGTGTGTAGGAATGGGCGT
J005	MYB101-511	TTGGTGCCTCTGCTCCTGCGTCTCATCATCCTCGTCTAACGAGGT
J006	MYB101-312	TGAGGACGCAGGAGCAGAGGCACCAAAGTGGTTATTGTCATTCTCAAGGCT
J007	MYB90-51	ACTGAATTCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTTGAGG
J008	MYB90-31	GAGCTCGAGCTAATCAAGTTCAACAGTCTCTCCATCA
J009	MYB113-51	ACTGAATTCATGGGCGAATCACCCAAAGGGTTGAGA
J010	MYB113-31	GAGCTCGAGCTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAAACCGAGCCCAAATTTGC
J011	MYB114-51	ATCGAATTCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTTG
J012	MYB114-31	GAGCTCGAGCTAATCAAAGATCACAGTCTCTCCATC
J013	MYB75-53	ATGAACAACAACGACATTACGCCATTCTACAACACCGGCA
J014	MYB75-33	GAGCTCGAGCTATCCATCAATCAAATTATTTACTAGTTGGTC
J015	MYB75-34	GGGCGTAATGTCGTTGTTGTTTCATCTTTATCTTACAACACGGTTC
J016	MYB75-35	GAGCTCGAGCTAGGTGTCCCCCTTTTCTGTTGTCGT
J017	MYB75-36	GAGCTCGAGCTACTCTTGGCTTTCTCTAGGAATTTCTC
J018	MYB101-512	GATGCAACTTCCGCTCAGGCCAAAACCAAGATCTTGATCATAACCACCAA
J019	MYB101-313	TTGGGCCTGAGCGGAAGTTGCATCAAACCTCAAACCTCATCATCAATATCAATCCCTTG
J020	MYB75-54	CAACAAAGATAACAACAACGACCAACTAGTGAATAATTTGATTGATGGAG
J021	MYB75-37	GTTGGTCGTTGTTGTTATCTTTGTTGTATATGATACTATTTGTCACAAAC
J022	MYB101-513	GAGCTCGAGGAGAACTCGGACACAAGAAATACCA
J023	MYB101-514	ACGAGGATGAAGAGAAGACAAAGAGCTGGTTTGCCTTTATACCCTC
J024	MYB101-314	ACCAGCTCTTTGTCTTCTCTTCATCCTCGTGTCCAATAGTTCTTGATCTC
J025	MYB101-315	TGTGTCCGAGTTCTCGGAGATGTACTCAAGGATGTGGTTGGGA
J026	MYB101-515	CTTGAGTACATCTCCGAGAACTCGGACACAAGAAATACCAATAAGA
J027	MYB101-316	GAGGGTACCACAGATGCTAGGCATGTTGCTCCA
J028	XPO1B-51	GGGATGCTGCAACGGTACCGC
J029	XPO1B-31	CCTTAAATCTGCCAACATCG
J030	XPO1A-51	CCGTTCCCTTACCCGTATCCGG
J031	XPO1A-31	GTTATTCTTAAATCCAGACGGG
J032	5'pB42	CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG
J033	3'pB42	ACCAAACCTCTGGCGAAGAAGTCC
J034	LFY-51	ACTGAATTCCCGTTTGATCGTGTCTCATGGTAC

J035	LFY-31	TGCTTGAACCAATGCTCTCTGTGGG
J036	MYB101-517	GAGCTCGAGATGGATGGTGGTGGAGAGACGA
J037	LFY-52	CTCGAGCTCGTCGATGAAAGAAAAAGTTTACTTG
J038	LFY-32	GAGGGTACCAAGAAGATATGTGTCTTGCTGGG
J039	MYB101-54	ATGGATGCTCAAATGGCCTCTGCTTACAACAATAGCCTTGAGAATGACAATAACCAG
J040	MYB101-36	GTTGTAAGCAGAGGCCATTTGAGCATCCATCGAAGAATCGGGGATCGGGT
J041	LFY-33	AAGAAGATATGTGTCTTGCTGGG
J042	MYB101-318	GAGCCATGGCTAACAGATGCTAGGCATGTTGCTCC
J043	MYB33-51	GAGGGATCCAGATGAGTTACACGAGCACTGACAGTG
J044	MYB33-31	GAGCTCGAGTTAGGGTAGTTCTGTCAATTTGACAGAC
J045	MYB33-52	GAGCTCGAGATGAGTTACACGAGCACTGACAGTG
J046	MYB101-319	GAGCCATGGCTAAGGGTTTGCTCCCAATGATG
J047	5'pGildaseq	CGTCAGCAGAGCTTCACCATT
J048	MYB101-518	ATCGGATCCATGGATGGTGGTGGAGAGACGAC
J049	MYB101-520	AGAGAACGTCCCCATTCCAT
J050	XPO1A-52	GCGAATACACCATTAAGCTACTGAG
J051	XPO1A-32	ATAGAGATCTTTGTTATCTTGAGCG
J052	XPO1B-52	TGTCAAGTGAGCAACTGAAGC
J053	XPO1B-32	AGGTATCGGTCAAGACAGCA
J054	MYB65-51	GTTTTAATCCTCTTGGGGCAC
J055	MYB65-31	TCATGAGGCCAAGATCAAAAC
J056	MYB65-52	GGGGTGATGACATCAACAAAC
J057	MYB65-32	AGATGGGAAATAAATGGGCAC
J058	MYB33-53	CTGACAGATTCTGAACGGCTC
J059	MYB33-32	CCAAACTTGACAGCTTCTCAG
J060	N851163 LP	GCTTCCAGAAGCAACATATCG
J061	N851163 RP	GGCCAAATTTGAAGAAAGGAG
J062	SALK_078639 LP	ATCAAGGCAGGGAAACAAAAC
J063	SALK_078639 RP	TCCATCACGTGAATTCATGTC
J064	SALK_083373 LP	TGTTCAACGGGTAATGCATTC
J065	SALK_083373 RP	TTGCATTTCAATTTTATAATAATCTTTCC
J066	p745_Wisc_TDNA	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
J067	Wisc_TDNA_RB	AACGTGCTGACTGGGAAAAC
J068	XPO1A-53	GGTCGCAGCTCTTAATTTTCG
J069	XPO1A-33	CCCATTCCTCCCCACTTAAT
J070	XPO1B-53	TTGAGGACGAAAATGGGAAC
J071	MYB65-33	TTACAGCGACCAAACAGGAGGCA
J072	LFY-34	AAAAATGACCACTCGAGCAACT
J073	LFY-53	GAAAGAAAAAGTTTACTTGTTAAGTCCCAACTGTCAATTC
J074	LFY-35	GATATGTGTCTTGCTGGGAAATTGACAGTTGGGACTTAACAAGTC

J075	LFY-54	GAAAGAAAAGTTTGGACTTGTTAAGTCCACTGATTCAATTC
J076	LFY-36	GATATGTGTCTTGTCTGGGAAATTGAATCAGTGGACTTAACAAGTC
J077	HSF-54	AACAGTTCGCTTCTGTCTGAAGCCCCAGCGATTGCAGATACAGACGA
J078	HSF-35	TGGGGCTTCAGCAGAAGCGAACTGTTCCAGAATGGATC
J079	X118-53	AGGGCAAGAGAGGCTGAGGCCGAAGAAGCTCCGGCGATGGAATTTG
J080	X118-34	TTCTTCGGCCTCAGCCTCTCTTGCCCTCGGCCACGTTGCCGCTGAAT
J081	X118-35	GAGCTCGAGCTAAGATCGACCCGCCACGTC
J082	X118-36	ATCGAATTCCTAAGATCGACCCGCCACGTC
J083	X118-54	CTGGAATTCGCTACTTCTCCGACTTCGATTCTTG
J084	X118-55	CTGGAATTCGTTAGGTTACCTTTTTTCGTCGTCTC
J085	X79-53	CAGGAGGCTGCCTCTAAGGCTAATCCTATGGCTGAAGAGTTTGTTCCTCC
J086	X79-34	AGGATTAGCCTTAGAGGCAGCCTCCTGAAGCTCTCTCATATC
J087	X118-56	GCTGTGCGTCGGCGAGGAAAGCGCAATTGAACGGAGGTGGTTGTTCG
J088	X118-37	CGCTTTCCTCGCCGACGCAGCAGCTTCACCGGTACTCGGAGAAAGCGG
J089	SALK_061880 LP	TTACACTGGAGAAATGACGGC
J090	SALK_061880 RP	ACCGTTTTCGTTACCGTATCC
J091	CID12- 51	ATCGAATTCATGGCGGTCAATTGAGAGCGTC
J092	CID12- 31	GAGCTCGAGTAGCTACGGTTAATGCATTTGATGTCTG
J093	CID10- 51	ATCGAATTCATGGCTGTTGCTGAGAATGCTGGTGTCT
J094	CID10- 31	GAGCTCGAGTCACTTGAACCTCAGCGCGGGGAAAATG
J095	CID9- 51	ACTGAATTCACTGAGATGCCACTGATGTTGTTG
J096	CID9- 31	GAGCTCGAGCTAGTTTGTGCTGATGGTGGTTCGAGT
J097	HSF-55	GCTACTGAACAAGCGGGAGCGCTTTCCTCAGAAGCACAGAGG
J098	HSF-36	CGTCCCCTGTTTTCAGTAGCATACTTCATTTGTTGTTTACCGGTCCACTCG
J099	X98-51	ATCGAATTCATGGCGCAGGTTCAACTTCAGGGT
J100	X98-33	GAGCTCGAGTTAAGAGCGGTTTCGCGGAAGCGAGCTGCTCGGTTGCACCAC
J101	GK_279H03_LP	GTCAACGAAGACGGTAGCTTTCGT
J102	GK_279H03_RP	ACCATGACAAACTCCACGAAG
J103	Salk_026293_RP	TAATAAAAATGTTGCCAGCGC
J104	PHAX-51	ATCGAATTCATGGAGGGAGAAGAGAGTTTGTGGATGCT
J105	PHAX-31	GAGCTCGAGTTAAGCAGAAGGATGATGTGCTAGTG
J106	PAB5-32	CTTGTC AATAGCAGCCTGAGCGGT
J107	Gle1-33	AGCAATCTCAGCGACCAAACCTCTCGA

OLIGONUKLEOTIDE FÜR MYB101:

Oligo ID	Name	Sequenz
	MYB101-51	ATCGAATTCATGGATGGTGGTGGAGAGACGA
	MYB101-52	ATCGAATTCGCTGGTTTGCCTTTATACCCTCATG
	MYB101-53	CAAGCCTTGTCCTCCGAGGCGGACTCTTC
	MYB101-54	ATGGATGCTCAAATGGCCTCTGCTTACAACAATAGCCTTGAGAATGACAATAACCAG
	MYB101-55	ACGAGGATGAACAATAACCAAAGAGCTGGTTTGCCTTTATACCCTC
	MYB101-56	ATCGGATCCAACAATGGATGGTGGTGGAGAGACGA
	MYB101-57	CCTAGAATTGCCAAGCAATCAAAGACCGACCCATTTCGTTTCAG
	MYB101-58	ATCGGATCCAACAATGGCTGGTTTGCCTTTATACCCTCATG
	MYB101-59	TCCACCCGGGTATGGATGGTGGTGGAGAGACGA
	MYB101-510	ATCGAATTCGAGAACTCGGACACAAGAAATACCAATAAG
J005	MYB101-511	TTGGTGCCTCTGCTCCTGCGTCTCATCATCCTCGTCTAACGAGGT
J018	MYB101-512	GATGCAACTTCCGCTCAGGCCAAAACCAAGATCTTGATCATAACCACCAA
J022	MYB101-513	GAGCTCGAGGAGAAGCTCGGACACAAGAAATACCA
J023	MYB101-514	ACGAGGATGAAGAGAAGACAAAGAGCTGGTTTGCCTTTATACCCTC
J026	MYB101-515	CTTGAGTACATCTCCGAGAAGCTCGGACACAAGAAATACCAATAAGA
L090	MYB101-515L	
	MYB101-516	
J036	MYB101-517	GAGCTCGAGATGGATGGTGGTGGAGAGACGA
J048	MYB101-518	ATCGGATCCATGGATGGTGGTGGAGAGACGAC
	MYB101-519	
J049	MYB101-520	AGAGAACGTCCCCATTCCAT
	MYB101-31	GAGCTCGAGCTAGGAGATGTACTCAAGGATGTGGT
	MYB101-32	GAGCTCGAGCTACTCATCATCAATATCAATCCCTTG
	MYB101-33	GAGCTCGAGCTACGAAGAATCGGGGATCGGGTTTAG
	MYB101-34	GCCTCGGGACAAGGCTTGAGACTCC
	MYB101-35	GAGCTCGAGCTAACAGATGCTAGGCATGTTGCTC
	MYB101-36	GTTGTAAGCAGAGGCCATTTGAGCATCCATCGAAGAATCGGGGATCGGGT
	MYB101-37	ACCAGCTCTTTGGTTATTGTTTCATCCTCGTGTTCGAATAGTTCTTGATCTC
	MYB101-38	GAGCTCGAGCTAACCAAAGCTGGTTATTGTCATTCTCAAGGCT
	MYB101-39	GCTACCCGGGACAGATGCTAGGCATGTTGCTCCA
	MYB101-310	GGTCTTTGATTGCTTGGCAATTCTAGGACGCTATTGTCTAGTCCT
	MYB101-311	CTCGAGCTCCTAACAGATGCTAGGCATGTTGCTC
J006	MYB101-312	TGAGGACGCAGGAGCAGAGGCACCAAAGTGGTTATTGTCATTCTCAAGGCT
J019	MYB101-313	TTGGGCTGAGCGGAAGTTGCATCAAAGTCAAAGTCAATATCAATCCCTTG
J024	MYB101-314	ACCAGCTCTTTGTCTTCTTTCATCCTCGTGTTCGAATAGTTCTTGATCTC

J025	MYB101-315	TGTGTCCGAGTTCTCGGAGATGTA
J027	MYB101-316	GAGGGTACCACAGATGCTAGGCATGTTGCTCCA
	MYB101-317	(LEO, NCOI)
J042	MYB101-318	GAGCCATGGCTAACAGATGCTAGGCATGTTGCTCC
J046	MYB101-319	GAGCCATGGCTAAGGGTTTGCTCCCAATGATG
	MYB101-320	

WEITERE OLIGONUKLEOTIDE:

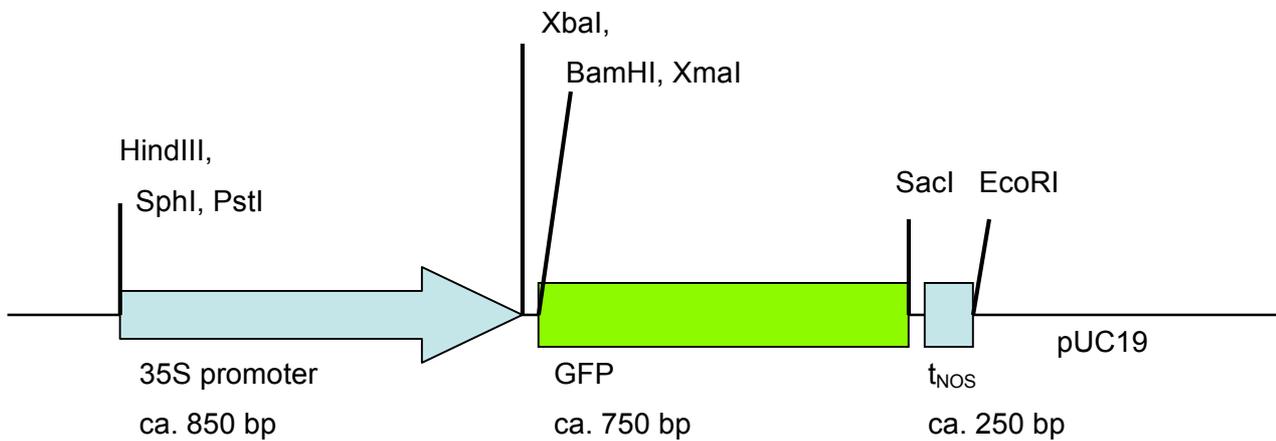
ID	Name	Sequenz	Kommentar
J504	Salk_LB	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG	Salk T-DNA <i>left border</i>
J507	Salk_RB	CTCCGCTCATGATCAGATTGTCGTTTCCCG	Salk T-DNA <i>right border</i>
L047	LP_Salk_061355	CATCTCCGGCCAAATCTAAAG	<i>MYB101</i> , genspezif.
L048	RP_Salk_061355	TTGAAGGAAGCTCTAGGACGC	<i>MYB101</i> , genspezif
L049	LP_Salk_149918	GGATCTACACTGGACGAAGGC	<i>MYB101</i> , genspezif
L050	RP_Salk_149918	CCGATTCTTCGATGGATT TTC	<i>MYB101</i> , genspezif
	X1A	GACTCGAATATGAAACTGCAGAGA	<i>XPO1A</i> , genspezif.
	X1A2	CTCACTATTCAATGTCTGACCGAGGTACCT	<i>XPO1A</i> , genspezif.
	TgabiA	GGGAATGGCGAAATCAAGGCATCG	GabiKat , <i>left border</i>
	X1B	GGGTCCATGGTAGTAGAACAGGTA	<i>XPO1B</i> , genspezif.
	1623	TATTGGAATTCATTAGTGTGGAGTTG	<i>XPO1B</i> , genspezif.
	TgabiB	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	GabiKat , <i>left border</i>

VEKTORKARTEN:

Origin: Thomas Merkle

3'GFP vector for transient transfections, contains mGFP4(S65T)

(pUC19-3'GFP, also for some reason called mAV5)



frame cloning site SmaI/XmaI: ... **.CCC.GGG**.AGT.AAA. ...
(no stop in cDNA!)
SmaI/XmaI

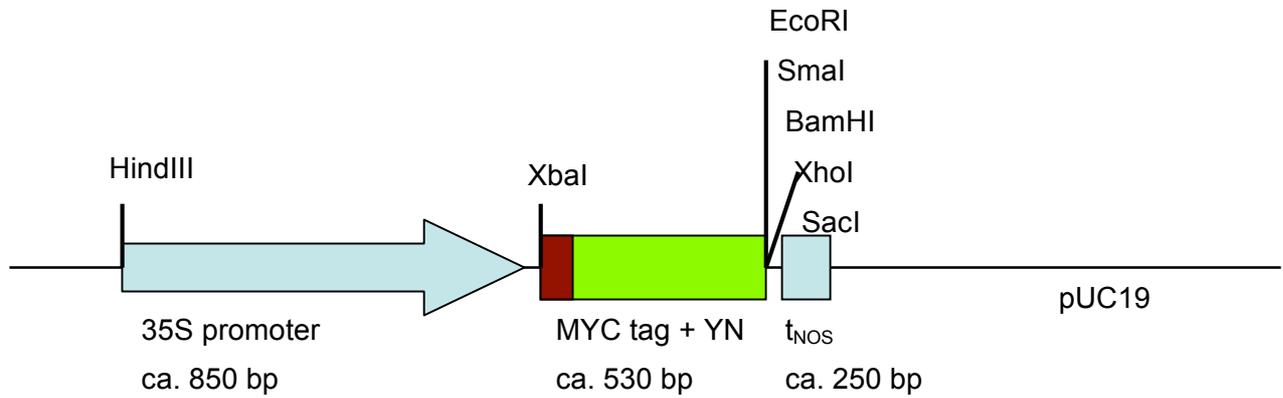
Kozak sequence in front of ATG for optimal translation,
using BamHI as 5'cloning site (in this example)
A GAG **GAT CCA ACA** ATG. ... (specific sequence of your cDNA)
BamHI Kozak

using XbaI as 5'cloning site (in this example)
G ACT **CTA GAA ACA** ATG. ... (specific sequence of your cDNA)
XbaI Kozak

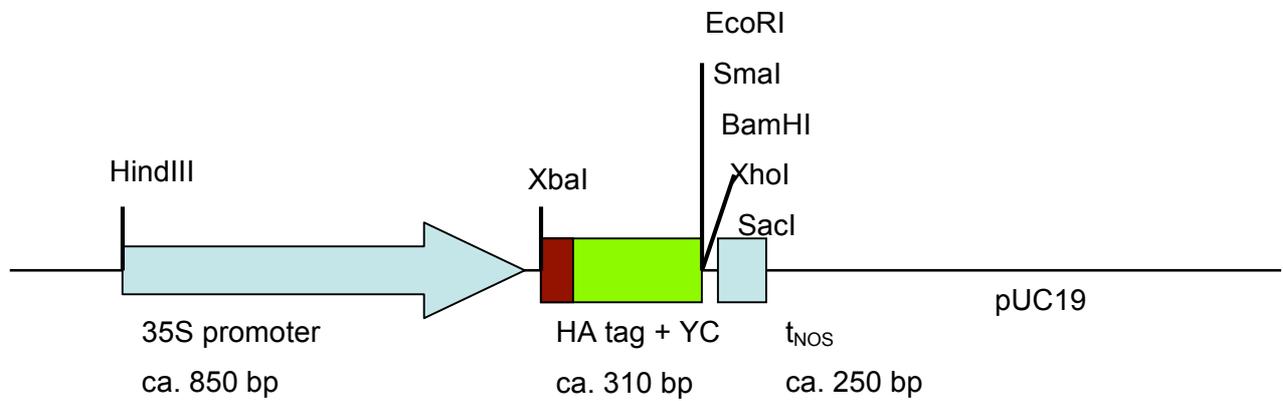
Origin: Thomas Merkle

BiFC (split YFP) vectors for N-terminal fusions of YN and YC

p5'YN2



p5'YC2



9. ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bHLH	basische Helix-Schleifen-Helix
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cm	Chloramphenicol
Col	Columbia Ökotyp
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glukose
GUS	β -Glukuronidase
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(-2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LMB	Leptomycin B
M	Molar
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA	microRNA
mM	Millimolar
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
M _w	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ CO ₃	Natriumdihydrogencarbonat
NaHCO ₃	Natriumascorbat
NaOH	Natriumhydroxid
NES	Kernexportsignal, <i>nuclear export signal</i>
NLS	Kernimportsignal, <i>nuclear localisation signal</i>
nos	Nopalinsynthase
nt	Nukleotide
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	reverse Transkriptase Reaktion
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TBE	Tris- <i>buffered</i> EDTA
TBS	Tris- <i>buffered saline</i>
TBST	Tris- <i>buffered saline</i> Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris EDTA Puffer
TEMED	N'-Tetramethylethylendiamid
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit = μmol Substratumsatz pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
Y2H	Hefe (<i>yeast</i>) <i>two-hybrid</i>
YC	C-terminales Teilfragment von YFP
YFP	gelb (<i>yellow</i>) fluoreszierendes Protein
YN	N-terminales Teilfragment von YFP
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YT	<i>yeast tryptone</i>

Aminosäurecode:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Try	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Basen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGKEIT DER ERBRACHTEN WISSENSCHAFTLICHEN LEISTUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die benutzten Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben und die direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind in jedem Einzelfall gekennzeichnet.

Des Weiteren versichere ich, die vorliegende Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt zu haben.

Die Bestimmungen der Promotionsverordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn PD Dr. Thomas Merkle (Lehrstuhl für Genomforschung, Fakultät für Biologie an der Universität Bielefeld) betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede mögliche die obigen Angaben betreffenden Veränderungen dem Dekanat mitzuteilen.

Osnabrück, im Juli 2008

LEBENS LAUF**PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Julia Starmann
 Geburtsdatum: 29. September 1979
 Geburtsort: Georgsmarienhütte
 Anschrift: Heger Str. 24, 49074 Osnabrück

AKADEMISCHE AUSBILDUNG**PROMOTION**

07/2008 Abgabe der Dissertation

Titel der Dissertation:

***Nukleozytoplasmatische Partitionierung von
 Transkriptionsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen in
 Arabidopsis thaliana***

Die Arbeit wurde betreut und begutachtet von PD Dr. Thomas Merkle.

05/2005 Beginn der Promotion an der Universität Bielefeld am von Herrn Prof. Dr. Bernd Weisshaar geleiteten Lehrstuhl für Genomforschung

WISSENSCHAFTLICHE WEITERBILDUNG

01 - 04/2005 Wissenschaftliche Tätigkeit an der *University of Illinois at Urbana-Champaign, Department of Plant Biology, Institute for Genomic Biology, USA*

DIPLOM BIOLOGIE

12/2004 Abschluss des Studiums am 15.12.2004 im Studiengang Diplom Biologie an der Universität Osnabrück mit der Gesamtnote: gut (1,6)
 Hauptfächer: Biochemie, Mikrobiologie und Pflanzenphysiologie

Titel der Diplomarbeit:

***Redoxregulation der NAD-abhängigen Isoformen der
 Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus pflanzlichen
 und tierischen Geweben***

Die Diplomarbeit wurde durchgeführt in der von Frau Prof. Dr. R. Scheibe geleiteten Abteilung Pflanzenphysiologie an der Universität Osnabrück

10/1999 Beginn des Studiums im Studiengang Diplom Biologie an der Universität Osnabrück

SCHULISCHE AUSBILDUNG

07/1992 – 06/1999 Gymnasium Oesede in Georgsmarienhütte, Abitur am 20.06.1999

08/1986 – 07/1992 Grundschule Michaelisgrundschule und Orientierungsstufe Overbergschule in Georgsmarienhütte