

**Funktionale Charakterisierung einer kleinen
Familie von *Arabidopsis* MYB1R-
Transkriptionsfaktoren:
LHY/CCA1-like (LCL) Proteine als potentielle
Koregulatoren des zentralen Oszillators**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von
Katja C. Schmied
aus Heidelberg

Bielefeld, im Juli 2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2001 bis März 2004 am Lehrstuhl für Zellbiologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg begonnen und von April 2004 bis Juli 2005 am Lehrstuhl für Genomforschung an der Universität Bielefeld fortgesetzt und beendet.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen in Freiburg und Bielefeld für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. G. Neuhaus am Lehrstuhl für Zellbiologie in Freiburg sowie Prof. Dr. B. Weißhaar am Lehrstuhl für Genomforschung in Bielefeld für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, die in dieser Arbeit dargestellten Experimente in ihren Laboratorien durchzuführen.

Dem Betreuer dieser Arbeit, PD Dr. Thomas Merkle, für die Bereitstellung des spannenden Themas, für die ununterbrochene Unterstützung, das große Interesse an meiner Arbeit, die Verbesserungsvorschläge beim Korrigieren und die wertvollen Anregungen, die mich immer wieder auf neue Pfade der Erkenntnis geführt haben.

Prof. Dr. K.-J. Dietz für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Dorothea Haasen, die mich in das „Export-Business“ eingeführt hat und die mir am Anfang bei jeder neuen Methode mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für deine große Hilfsbereitschaft und deine immerwährende Begeisterung!

Miriam Dewald und Petra Hohenberger, ohne die der Laboralltag manchmal ganz schön öde gewesen wäre und die mich mit ihren Aufmunterungen immer wieder zurück auf die Erde geholt haben. Ich werde die Zeit mit euch nie vergessen! Vielen Dank auch für die vielen Verbesserungsvorschläge beim Schreiben dieser Arbeit.

Ralf Palmisano für die Unterstützung am konfokalen Laserscan-Mikroskops (zu jeder Tages- und Nachtzeit) und das Korrekturlesen.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei: Martin Barz, Kerstin Brachhold, Ute Bürstenbinder, Sonja Fleig, Gabor Igloi, Melanie Kuhlmann, Sandra Niemeier, Klara Ronai, Martin Sagasser, Elfi Schiefermayr, Judith Schleppenbäumer, Lena Schreiber, Matthias Schultze, Volker Speth, Timo Staffel und Julia Starmann.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Thomas, der oft meine arbeitsbedingten guten und schlechten Launen zu spüren bekam und mich manchmal am Wochenende mit dem Labor teilen musste; an meinen ehemaligen Mitbewohner Patrick für die vielen leckeren Abendessen und entspannten Videoabende; an meinen Bruder Andreas (der Trucker), der mir beim Umzug in den Norden eine unersetzliche Hilfe war und natürlich an meine Mutter, deren Beistand und Unterstützung ich mir glücklicherweise immer gewiss sein durfte.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kerntransport	1
1.1.1	Rezeptorvermittelter nucleocytoplasmatischer Transport	1
1.1.2	Kernimport	3
1.1.3	Kernexport	4
1.1.4	Regulation der nucleocytoplasmatischen Partitionierung.....	5
1.1.5	Transkriptionsregulatoren	7
1.1.6	Die Lichtsignaltransduktion als Beispiel einer Regulation durch nucleocytoplasmatische Partitionierung	9
1.2	MYB Faktoren	10
1.2.1	Struktur und Funktion der MYB-Domäne	10
1.2.2	MYB-Proteine in Tieren.....	12
1.2.3	MYB-Proteine in Pflanzen	13
1.2.3.1	Einteilung pflanzlicher MYB-Proteine in drei Klassen.....	13
1.2.3.2	Evolution und verwandtschaftliche Beziehung der MYB-Proteine	17
1.3	Circadiane Rhythmik in <i>A. thaliana</i>	19
1.3.1	Molekulare Zusammensetzung der circadianen Uhr	21
1.3.1.1	Der <i>Input</i> Signalweg	21
1.3.1.2	Der circadiane Oszillator	24
1.3.1.3	Der <i>Output</i> Signalweg	28
1.3.2	Zusätzliche Regulationsebenen des zentralen Oszillators	29
1.4	Zielsetzung	31
2	MATERIAL	32
2.1	Chemikalien und Lösungen	32
2.2	Medien	32
2.2.1	Medien für die Anzucht von Bakterien.....	32
2.2.2	Medien für die Anzucht von Hefen	33
2.2.3	Medien für die Anzucht von Pflanzen.....	33
2.3	Bakterien- und Hefestämme	34
2.4	Plasmid-Vektoren	34

3	METHODEN	35
3.1	DNA-Präparation	35
3.1.1	Aufreinigung und Elution von DNA	35
3.1.2	Auftrennung von DNA	35
3.1.3	Restriktionsverdau von DNA	36
3.1.4	Dephosphorylierungsreaktion	36
3.1.5	Behandlung mit T4 DNA-Polymerase	37
3.1.6	Ligation	37
3.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.1.7.1	Chemotransformation	38
3.1.7.2	Elektrotransformation	39
3.1.8	Plasmid-Isolierung	40
3.1.8.1	Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (<i>Miniprep</i>)	40
3.1.8.2	Plasmid-DNA Präparation im Großmaßstab (<i>Midiprep</i>)	41
3.1.9	Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung	41
3.1.10	Polymerasekettenreaktion	41
3.1.10.1	Standardansatz	41
3.1.10.2	<i>Overlapping extension</i> PCR	42
3.1.11	Isolation von cDNA-Klonen	42
3.2	Analyse von DNA	44
3.2.1	Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe	44
3.2.2	Einfache DNA-Isolierung (<i>Shorty Prep</i>)	45
3.2.3	PCR zur Analyse von <i>Shorty Prep</i> -DNA	45
3.3	Analyse von RNA	46
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus wenig Blattmaterial	46
3.3.2	Auftrennung von RNA	46
3.3.3	<i>Northern blot</i>	47
3.3.4	Radioaktive Hybridisierung und Markierung der Sonde	47
3.3.5	RNA <i>Dot Blot</i> Analyse	48
3.3.6	RT-PCR-Analyse	49
3.3.6.1	RNA-Isolation mit <i>RNeasy-Kit</i> für RT-PCR	49
3.3.6.2	Reverse Transkription (RT)	50
3.3.6.3	RT-PCR Reaktion	50
3.4	Hefe <i>Two-Hybrid</i>-Analyse	50
3.4.1	Detektion von Protein-Interaktionen im Y2H-System	51
3.4.2	Hefetransformation	52
3.4.3	Interaktionstest auf Indikatorplatten	53
3.4.4	Quantifizierung der Interaktion zweier Proteine mittels ONPG-Assay	54
3.4.5	Hefe <i>Three-Hybrid</i> Analyse	55
3.4.6	Hefe <i>Two-Hybrid</i> -Screen	57
3.4.6.1	Sequenzielle Transformation und Selektion positiver Kolonien	57
3.4.6.2	Plasmidisolierung aus Hefezellen („ <i>Plasmid-Rescue</i> “)	57
3.4.6.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit isolierten Hefepiasmiden	58
3.4.6.4	Retransformation in Hefe	59

3.5	Hefe <i>One-Hybrid</i> Analyse	59
3.5.1	Herstellung des <i>target</i> -Reporterkonstrukts.....	60
3.5.2	Integration des <i>target</i> -Reporterkonstrukts in das Hefegenom.....	60
3.5.3	Analyse des Reporter-Hefestamms auf Hintergrundexpression	60
3.5.4	Hefe <i>One-Hybrid Assay</i>	61
3.6	EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)	61
3.6.1	Herstellung des radioaktiv markierten DNA-Fragments	62
3.6.2	<i>In vitro</i> Translation der Proteine	62
3.6.3	DNA-Protein Bindungsassay.....	63
3.6.4	Gelpräparation und Gellauf	63
3.6.5	Gelanalyse	64
3.6.6	DNA-Kompetitionsanalysen	64
3.6.7	Protein-Kompetitionsanalysen	65
3.7	Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen	66
3.7.1	Tabak BY-2 Zellkultur.....	66
3.7.2	Protoplastierung der BY-2 Zellkultur	66
3.7.3	Transfektion der Tabak BY-2 Protoplasten	66
3.7.4	Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen	68
3.8	BiFC (<i>bimolecular fluorescence complementation</i>)	68
3.8.1	Konstruktion der Split-YFP-Vektoren und Klonierung der cDNAs	69
3.8.2	Analyse der BiFC-Interaktionen	69
3.9	Anzucht von <i>A. thaliana</i>	70
3.9.1	Anzucht auf Erde	70
3.9.2	Sterile Anzucht von <i>A. thaliana</i>	70
3.10	Transformation von <i>A. thaliana</i>	71
3.10.1	Transformation von Agrobakterien.....	71
3.10.2	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i>	72
3.10.3	Selektion transgener <i>A. thaliana</i> Pflanzen	73
3.11	Promotor-GUS Analysen	73
3.11.1	Herstellen der Promotor-GUS Pflanzen	73
3.11.2	Histochemischer Nachweis von GUS in Pflanzen.....	74
3.11.3	Herstellen von Gewebeschnitten	74
3.12	<i>In planta</i> Analyse des LCL1 Exports	76
3.12.1	Herstellung der YFP-Fusionsproteine	76
3.12.2	Expressionsanalyse der EYFP-LCL1- bzw. -LCL1(NESmut)-Pflanzen..	76
3.12.3	LMB-vermittelte Hemmung des Exports von LCL1	77
3.13	Analyse der LCL1 T-DNA Insertionslinien	77
3.14	RNA <i>interference</i> (RNAi)	78
3.14.1	Herstellen des RNAi-Konstrukts.....	79
3.14.2	Herstellen und Analyse transgener RNAi-Pflanzen.....	79

3.15	Überexpression von LHY MYB-Proteinen <i>in planta</i>	80
3.15.1	Überexpression von LCL1 und LCL1(NESmut)	80
3.15.2	Überexpression der MYB-Domäne von LCL1	81
3.15.3	Überexpression von LHY	81
4	ERGEBNISSE	83
4.1	Analyse des nucleocytoplasmatischen Transports von LCL1	83
4.1.1	Interaktion von LCL1 mit XPO1 und Identifizierung der NES	83
4.1.2	Quantitative Analyse der β -Galaktosidase Aktivität.....	87
4.1.3	Lokalisation von GFP-LCL1 Proteinen und Identifizierung der NLS.....	88
4.1.4	Analyse des Kernexports von LCL1 <i>in planta</i>	90
4.1.4.1	Expressionsanalyse der YFP-LCL1/LCL1(NESmut)-Pflanzen	90
4.1.4.2	LMB-Experiment.....	92
4.2	Sequenzvergleich der LHY MYB Familie	93
4.3	Bindung der LHY MYB Proteinfamilie an das <i>evening element</i>	97
4.3.1	Hefe <i>One-Hybrid</i> Analyse	97
4.3.2	EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)	98
4.4	Dimerisierungspotential der LHY MYB Familie	103
4.4.1	Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von LCL1.....	103
4.4.2	Dimerisierung von LCL2-LCL5 und EPR1 und Interaktion mit XPO1...	105
4.4.3	Dimerisierungspotential von LHY und CCA1 im Y2H-System.....	109
4.4.4	BiFC (<i>bimolecular fluorescence complementation</i>)	111
4.4.5	Identifizierung neuer Interaktionspartner von LCL1	114
4.4.6	Dimerisierungspotential von LIP26.....	115
4.4.7	Hefe <i>Three-Hybrid</i> Assay mit CCA1, LCL1 und XPO1.....	116
4.5	Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen	118
4.5.1	GFP-LCL-Fusionsproteine	118
4.5.2	GFP-Fusionen mit den <i>Clock</i> -Proteinen.....	119
4.6	Expression von LCL1	120
4.6.1	Circadiane Expression von LCL1	120
4.6.2	Lokalisation der <i>LCL1</i> -Promotoraktivität in <i>A. thaliana</i>	122
4.7	Analyse transgener <i>A. thaliana</i> Pflanzen	124
4.7.1	LCL1 T-DNA Insertionslinien.....	124
4.7.2	LCL-RNAi Pflanzen	129
4.7.3	LHY MYB-überexprimierende Pflanzen	132
4.7.3.1	LCL1- und LCL1(NESmut)-überexprimierende Pflanzen.....	132
4.7.3.2	Überexpression der MYB-Domäne von LCL1 in <i>A. thaliana</i>	134
4.7.3.3	LHY-überexprimierende Pflanzen.....	134

5	DISKUSSION	137
5.1	Charakterisierung der Proteindomänen	137
5.1.1	Die LHY MYB <i>family</i> Domäne	137
5.1.1.1	Bindung an das <i>evening element</i>	138
5.1.1.2	Charakterisierung der NLS von LCL1	139
5.1.2	Die LCL-Domäne	140
5.1.2.1	Charakterisierung der NES von LCL1	141
5.1.2.2	Nucleocytoplasmatische <i>Shuttle</i> -Proteine	143
5.2	Protein-Dimerisierungspotential	145
5.2.1	Interaktionen der LCL-Proteine	145
5.2.2	Interaktionen der <i>Clock</i> -Proteine	147
5.2.3	Neue Interaktionspartner von LCL1	147
5.2.4	Charakterisierung der Proteindimerisierungsdomäne	148
5.2.5	Zellokalisation der Monomere und Dimere	149
5.3	Expression und <i>in planta</i> Lokalisation von LCL1	152
5.3.1	Circadiane Expression	152
5.3.2	Lokalisation der <i>LCL1</i> -Promotoraktivität in <i>A. thaliana</i>	153
5.4	Experimente zur Analyse der Funktion von LCL1	154
5.4.1	LCL1 T-DNA Insertionslinien	154
5.4.2	LCL-RNAi Pflanzen	154
5.4.3	LCL1- und LCL1(NESmut)-überexprimierende Pflanzen	155
5.4.4	Überexpression der LCL1 MYB-Domäne	156
5.4.5	LHY-überexprimierende Pflanzen	157
5.5	Die mögliche Rolle von LCL1 im zentralen Oszillator	158
5.6	Perspektiven	162
6	ZUSAMMENFASSUNG	163
7	LITERATUR	165
8	ANHANG	175
8.1	Oligonukleotide	175
8.2	Abkürzungsverzeichnis	178
8.3	Publikationen	180

1 Einleitung

1.1 Kerntransport

1.1.1 Rezeptorvermittelter nucleocytoplasmatischer Transport

Eukaryotische Zellen besitzen, im Gegensatz zu den Prokaryoten, einen Zellkern, der durch die Kernhülle vom Cytoplasma getrennt ist. Durch diese Kompartimentierung kommt es zur räumlichen Trennung zweier fundamentaler zellulärer Vorgänge. Die Kernhülle trennt die im Zellkern ablaufende Transkription von der Translation, die ausschließlich im Cytoplasma stattfindet (Kleinig/Meier, 1999; Seite 166).

In der Kernhülle befinden sich eine große Anzahl von Kernporenkomplexen (NPCs, *nuclear pore complexes*), an denen die Translokation von Makromolekülen zwischen den beiden Kompartimenten erfolgt. Der nucleocytoplasmatische Transport dient der Translokation einer Vielzahl von Substraten. Kernlokalisierte Proteine wie zum Beispiel Histone oder Transkriptionsfaktoren werden vom Cytoplasma in den Kern transportiert. RNAs hingegen, die im Zellkern synthetisiert werden, gelangen über die NPCs ins Cytoplasma.

Die Kernhülle besteht aus zwei Membranen, der äußeren und der inneren Kernmembran, die durch einen perinukleären Raum getrennt sind (Rose *et al.*, 2004). Die NPCs durchspannen die Kernhülle, an den Rändern der Poren gehen äußere und innere Kernmembran ineinander über. Die Zahl an NPCs pro Zelle scheint von der Aktivität des Zellkerns abzuhängen. In einer Hefezelle findet man knapp 200 NPCs, in einer reifen *Xenopus* Oocyte können bis zu 5×10^7 NPCs auftreten (Görlich und Kutay, 1999). NPCs besitzen eine achtfache Rotationssymmetrie, sie sind etwa 125 MDa groß und bestehen aus mindestens 50 verschiedenen Proteinen, den Nucleoporinen. Diese haben nicht nur strukturelle Funktion, sie dienen auch als Andockstellen für Kerntransportfaktoren, mit denen sie direkt interagieren können.

Der innere Durchmesser einer Kernpore beträgt 50-70 nm. Sowohl cyto- als auch karyoplasmatisch wird die Pore von einem Annulus gebildet, der aus acht

globulären Untereinheiten besteht. Vom cytoplasmatischen Annulus reichen Filamente ins Cytoplasma hinein, am karyoplasmatischen Annulus ist eine korbformige Struktur befestigt. Vom Kernporenrand aus ragen acht Speichen in das Zentrum des NPCs hinein, wo sich das sogenannte Zentralgranulum befindet, welches eine Rolle beim Transport von Makromolekülen durch die Kernpore spielt. NPCs sind dynamische Strukturen, sie können sich in der Kernhülle lateral mehr oder weniger frei bewegen.

Kleine Moleküle können durch das Lumen der Kernporen frei hindurch diffundieren, bei größeren Partikeln ist die Diffusion stark eingeschränkt. Das Ausschlussvolumen für die Diffusion von Makromolekülen beträgt in der Regel 60 kDa (Haasen *et al.*, 1999), wobei eine langsame Diffusion durch die Kernporen auch bei höherem Molekulargewicht stattfinden kann.

Makromoleküle werden meist aktiv durch die NPCs transportiert, sodass sogar sehr große Strukturen, wie z.B. ribosomale Untereinheiten, die eine Molekularmasse von bis zu $2,8 \times 10^6$ Da besitzen, durch die Kernporen gelangen können.

Aber auch Makromoleküle, die kleiner als 60 kDa sind, wie beispielsweise die Histone, werden oft aktiv transportiert, um eine schnelle Regulation des Imports zu ermöglichen (Görlich und Kutay, 1999). Außerdem ist nur so eine Akkumulation von Proteinen gegen Konzentrationsgradienten zu erreichen.

Der Kerntransport von Makromolekülen verläuft rezeptorvermittelt. Die daran beteiligten Rezeptoren können mit den Nucleoporinen interagieren und pendeln fortlaufend zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her. Diese Rezeptoren gehören überwiegend zur Importin β -Familie, sind 90-130 kDa groß und besitzen eine RanGTP-Bindestelle. Sie können sehr spezifisch verschiedene Klassen von Makromolekülen binden und vermitteln etwa 10^3 Translokationsereignisse pro Sekunde und Kernpore (Ribbeck und Görlich, 2001).

Der Kerntransport von Proteinen im tierischen System ist schon lange bekannt. Aus Untersuchungen an Tieren kennt man die Rezeptoren, die für den Kernimport und -export zuständig sind. Der aktive Importvorgang bei Pflanzen wurde erst später beschrieben. Als Haasen *et al.* (1999) den Kernexport an Pflanzen

charakterisierten, wurde deutlich, dass die aktiven Kerntransportvorgänge im tierischen wie im pflanzlichen System hochkonserviert sind.

1.1.2 Kernimport

Proteine, die in den Kern transportiert werden sollen, besitzen ein Kernlokalisierungssignal (NLS; *nuclear localisation signal*). Die erste NLS wurde beim großen T-Antigen des Simian-Virus 40 charakterisiert und besteht aus einem kurzen Abschnitt basischer Aminosäureresten, meist Lysine. Dieses Signal, welches auch *monopartite* NLS genannt wird, ist notwendig und hinreichend, ein Protein in den Kern zu dirigieren, sodass es dort akkumulieren kann. Eine Variante dieser NLS ist die *bipartite* NLS, die aus zwei kurzen Abschnitten basischer Aminosäureresten besteht, die durch etwa zehn Aminosäurereste voneinander getrennt sind.

Der erste Schritt beim Import eines karyophilen Proteins besteht in der spezifischen Bindung des cytoplasmatischen NLS-Rezeptors Importin α an dessen NLS (Abb. 1A). Importin α dient als Adaptorprotein zwischen dem karyophilen Protein und dem Importrezeptor Importin β . Importin β interagiert direkt mit dem NPC und ermöglicht das Andocken des Importkomplexes an dessen cytoplasmatische Seite. Nach der Translokation durch die Kernpore dissoziiert der Importkomplex im Kern durch die Bindung von RanGTP an Importin β . Importin α und RanGTP konkurrieren um überlappende Bindestellen im Importin β -Rezeptor. Da die Konzentration von RanGTP im Zellkern hoch ist, führt dies letztendlich zur Dissoziation von Importin α und Importin β . Das karyophile Protein wird in das Nucleoplasma entlassen und Importin β wird im Komplex mit RanGTP zurück ins Cytoplasma transportiert. Die Hydrolyse von GTP an Ran im Cytoplasma bewirkt, dass Ran von Importin β abdissoziiert. Der Importrezeptor ist nun bereit für einen neuen Importzyklus. Importin α wird ebenfalls ins Cytoplasma zurücktransportiert. Dieser Transport erfolgt mit Hilfe des Exportrezeptors CAS (*cellular apoptosis susceptibility protein*), der ebenfalls zur Importin β -Familie gehört.

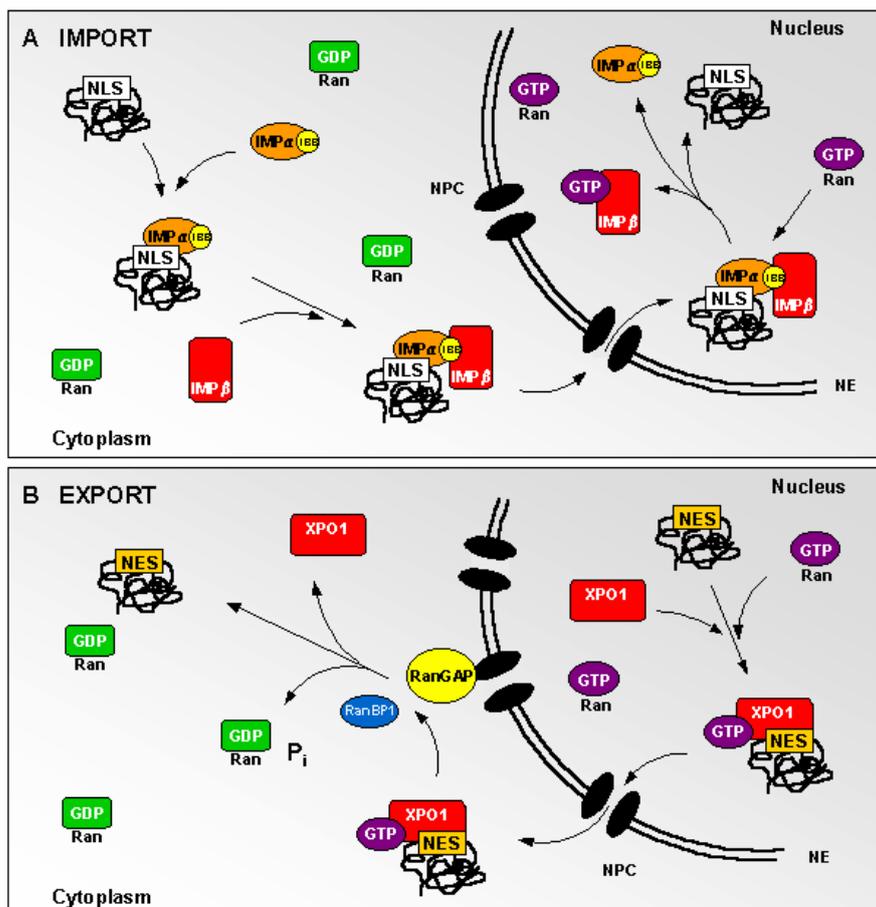


Abb. 1: Vergleich von Kernexport und Kernimport.

(A) Importin α (IMP α) bindet im Cytoplasma an die NLS eines karyophilen Proteins. Der Importrezeptor Importin β (IMP β) bindet in Abwesenheit von RanGTP an den dimären Komplex. Der Importkomplex dockt mit Hilfe von Importin β an den NPC an und wird in den Zellkern transloziert, wo er durch die Bindung von RanGTP an Importin β dissoziiert.

(B) Im Nucleoplasma bindet XPO1 die NES und RanGTP kooperativ. Nach Translokation des trimären Komplexes durch die Kernpore ins Cytoplasma, führt das koordinierte Zusammenspiel von RanBP1 und RanGAP dazu, dass GTP an Ran hydrolysiert wird. Der Exportkomplex dissoziiert und das Substratprotein wird frei.

IBB Importin β -Bindedomäne, *NE* Kernhülle (*nuclear envelope*), *NPC* Kernporenkomplex, *RanBP1* Ran-Bindeprotein 1, *RanGAP* Ran-spezifisches GTPase-Aktivierungsprotein, *P_i* anorganisches Phosphat (nach Merkle, 2001).

1.1.3 Kernexport

Die kurze Peptidsequenz, welche ein Protein befähigt, aus dem Kern transportiert zu werden, wird NES (*nuclear export signal*) genannt. Dieses Exportsignal wurde zuerst am HIV-Protein Rev entdeckt. Es besteht aus mehreren in bestimmten Abständen zueinander stehenden Leucinresten oder anderen langkettigen, hydrophoben Aminosäureresten. Der Rezeptor, der spezifisch diese Leucin-reiche

NES erkennt, wird Exportin1 (XPO1; oder CRM1) genannt und gehört ebenfalls zur Importin β -Familie. Im Gegensatz zu den Importinen binden Exportine aber ihre Substrate kooperativ mit RanGTP.

XPO1 hat die Fähigkeit, direkt an Proteine, die eine NES besitzen, zu binden (Abb. 1B). Der Exportkomplex, bestehend aus XPO1, dem Substratprotein und RanGTP dockt an die nucleoplasmatische Seite des NPCs an. Nach der Translokation wird durch das Zusammenspiel zweier cytosolischer Proteine, RanBP1 (*Ran-binding protein 1*) und RanGAP (*Ran GTPase-activating protein*) GTP an Ran hydrolysiert, was dazu führt, dass der gesamte Komplex dissoziiert. Das Substratprotein wird ins Cytoplasma entlassen. XPO1 gelangt, aufgrund seiner Fähigkeit an Nucleoporene zu binden, zurück in den Zellkern, um für einen neuen Exportzyklus zur Verfügung zu stehen. RanGDP wird mit Hilfe von NTF2 (*nuclear transport factor 2*) zurück in den Kern transportiert. Im Nucleoplasma wandelt das Chromatin-assoziierte Protein RanGEF (*Ran guanine nucleotide exchange factor*) RanGDP in RanGTP um, sodass der RanGTP-Gradient aufrechterhalten wird.

Dieser Exportvorgang ist am besten charakterisiert. Zusätzlich zu XPO1 gibt es noch eine Reihe anderer Exportrezeptoren, die den regulierten Export von Substraten vermitteln, wie z.B. der Exportvorgang von Importin α , bei dem der Exportrezeptor CAS eine Rolle spielt. Auf diesen soll hier allerdings nicht näher eingegangen werden.

1.1.4 Regulation der nucleocytoplasmatischen Partitionierung

Durch die Möglichkeit zur nucleocytoplasmatischen Partitionierung ergeben sich neue Möglichkeiten, die Transkription zu regulieren. Nicht nur die Aktivität eines Transkriptionsfaktors ist entscheidend, auch die Tatsache, dass dieser im entsprechenden Moment zur Verfügung steht und Zugang zum Genom hat, ist von Bedeutung. Die Verteilung eines Transkriptionsfaktors zwischen Kern und Cytoplasma ist abhängig von der Rate seines Kernimports und/oder Kernexports (T. Merkle, 2004). Die Regulation der Aktivität eines Transkriptionsfaktors und die Regulation seiner nucleocytoplasmatischen Partitionierung werden häufig kombiniert, um die Transkription zu kontrollieren. Hat ein Protein einmal einen

Kerntransportrezeptor gebunden, wird es sehr schnell durch den NPC transportiert. Die Regulation der nucleocytoplasmatischen Partitionierung findet demzufolge schon bei der Substraterkennung durch den Transportrezeptor statt. Prinzipiell kann eine Rezeptor-Substraterkennung durch mehrere Mechanismen kontrolliert werden (Kaffman and O'Shea, 1999). Proteinmodifikationen im Bereich oder in der Nähe des Transportsignals können die Interaktion eines Substrats mit dem Kerntransportrezeptor positiv oder negativ beeinflussen. Maskierung oder Abschirmung eines Transportsignals durch Konformationsänderung des Proteins oder Interaktion mit einem zweiten Protein können die Bindung an den Transportrezeptor verhindern oder ermöglichen. Schließlich kann die Interaktion eines Proteins mit einer festen Struktur in der Zelle und seine regulierte Freigabe die Substraterkennung des Rezeptors kontrollieren. Nicht nur der Transkriptionsfaktor selbst kann durch nucleocytoplasmatischen Transport reguliert werden, auch Proteine, die dessen Aktivität modulieren, können einem regulierten Transport unterworfen sein und in Antwort auf einen Stimulus in den Kern hinein- oder aus dem Kern herausgeschleust werden.

Leucin-reiche NES wurden in vielen regulatorischen Proteinen identifiziert, z.B. in Cyclin B1, I κ B α , RanBP1 und RanGAP1 (Hagting *et al.*, 1998; Zabel und Baeuerle, 1990; Feng, *et al.* 1999; Richards *et al.*, 1996). Ihre NES ist essentiell für die Funktionalität des jeweiligen Proteins. Das regulatorische Potential von Kernimport und -export wird anhand des folgenden Beispiels verdeutlicht:

NF- κ B ist ein Säuger-spezifischer Transkriptionsfaktor, der regulierend in die Apoptose eingreift und auch eine Rolle bei der Immunantwort spielt. In nicht stimulierten Zellen liegt NF- κ B als Heterodimer im Cytoplasma gebunden an seinen Inhibitor I κ B α vor. I κ B α maskiert durch die Bindung an NF- κ B dessen NLS, sodass NF- κ B nicht in den Kern gelangen kann (Beg *et al.*, 1992; Ganchi *et al.*, 1992). Auf einen Stimulus hin phosphoryliert eine Kinase I κ B α , was zu einer schnellen Degradation des Inhibitors führt, und die NLS von NF- κ B wird frei (Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995). NF- κ B gelangt in den Zellkern und kann seine Zielgene aktivieren, unter anderem auch das Gen für I κ B α , womit es seine eigene Aktivität reguliert (Sun *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1994; Chiao *et al.*, 1994). Neusynthetisiertes I κ B α gelangt in den Zellkern, bindet

inhibierend an NF- κ B und vermittelt dessen Export, wo es in aktiver Form wiederum als NF- κ B/I κ B α -Komplexe vorliegt (Zabel und Baeuerle, 1990; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995; 1997). I κ B α pendelt fortlaufend zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her. Indem es den Import von NF- κ B blockiert und dessen Export fördert, kann I κ B α die cytoplasmatische Lokalisation von NF- κ B kontrollieren. Zusätzlich verhindert es die Bindung von NF- κ B an die DNA im Zellkern.

Die Regulatoren RanBP1 und RanGAP1 besitzen ebenfalls eine NES. Sie halten zusammen mit dem kernlokalisierten RanGEF (*Ran guanine nucleotide exchange factor*) durch ihre ausschließlich cytosolische Lokalisation den RanGTP-Gradienten zwischen Cytoplasma (niedrige RanGTP-Konzentration) und Kern (hohe RanGTP-Konzentration) aufrecht. Aufgrund dieses Gradienten ist die Richtung des Kerntransports festgelegt. Dies wurde durch eine experimentell erzeugte Umkehrung der RanGTP-Konzentration in den beiden Kompartimenten gezeigt, die die Transportvorgänge in umgekehrter Richtung ablaufen ließ (Nachury und Weis, 1999).

1.1.5 Transkriptionsregulatoren

Mit zu den häufigsten Genen im *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Genom gehören Gene für Transkriptionsfaktoren (Kleinig/Maier, 1999; Seite 199), wo sie etwa 5% aller Gene ausmachen (Riechmann und Ratcliffe, 2000). MYB (myeloblastosis)-Transkriptionsfaktoren stellen hierbei eine der größten Familien unter den Transkriptionsfaktoren dar (Romero *et al.*, 1998). Transkriptionsfaktoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die generellen und die promotorspezifischen Transkriptionsfaktoren. Die generellen Transkriptionsfaktoren binden an Core-Promotor-Elemente und interagieren mit der RNA-Polymerase. Zu den Core-Promotor-Elementen gehören die TATA-Box und das Initiationselement, die in nahezu jedem eukaryotischen Promotor in ähnlicher Sequenz und Entfernung vom Transkriptionsstart vorhanden sind. Die TATA-Box liegt 24-36 bp vor dem Transkriptionsstart und ist eine AT-reiche Sequenz der Art TATAT/AA. Initiationselemente bestehen aus einem A in Position +1 und meist einem C direkt davor in Position -1.

Promotorspezifische Transkriptionsfaktoren können mit den generellen Transkriptionsfaktoren interagieren. Sie sind genspezifisch und zu ihnen zählt die Gruppe der MYB-Faktoren.

Klassische Transkriptionsfaktoren haben mindestens zwei trennbare Domänen, die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne. Die DNA-Bindedomäne interagiert spezifisch mit der DNA-Doppelhelix, die Aktivierungsdomäne vermittelt den Kontakt zu anderen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase. Die Aktivierungsdomäne kann auch durch eine Repressordomäne ersetzt sein, wie es z.B. bei MYB4 der Fall ist (Hemm *et al.*, 2001). MYB4 gehört zu einer Gruppe von R2R3-MYB-Faktoren, die eine Rolle bei der transkriptionellen Repression spielen. Man vermutet, dass die Balance zwischen MYB-Aktivatoren und -Repressoren an Zielpromotoren eine zusätzliche Flexibilität transkriptioneller Kontrolle ermöglicht (Jin *et al.*, 2000).

Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren werden beispielsweise durch das Leucin-Zipper-Motiv ermöglicht. Diese helikale Domäne ist charakterisiert durch Leucinreste an jeder siebten Position, und anderen hydrophoben Aminosäuren, die zwischen den Leucinresten an jeder vierten Position lokalisiert sind. Dadurch ergibt sich eine amphipatische α -Helix, die nach Art eines Reißverschlusses mit einem parallel ausgerichteten Leucin-Zipper eines anderen Proteins ein Homo- bzw. Heterodimer ausbilden kann.

Transkriptionsfaktoren sind auch anhand ihrer DNA-Bindedomänen einteilbar. Ein Beispiel hierfür ist der Zinkfinger. Er besteht aus einem Abschnitt von etwa 30 Aminosäureresten, die eine Struktur aus einem antiparallelen zweisträngigen β -Faltblatt und einer α -Helix bilden, in deren Zentrum ein Zink-Ion tetraedrisch zum Beispiel über zwei Cystein- und zwei Histidinreste koordiniert wird. Der Zinkfinger kann mehrfach hintereinander auftreten und auch Abwandlungen dieser Grundstruktur sind möglich. Binden Zinkfinger-Proteine an die DNA, gelangen die Helices der Zinkfinger-Motive in die große Furche der DNA-Doppelhelix.

Eine andere DNA-Bindedomäne stellt das Helix-Turn-Helix-Motiv dar, bei dem zwei durch ein β -Faltblatt getrennte α -Helices den Kontakt zur großen Grube der DNA aufnehmen. Dieses Motiv ist z.B. in jedem MYB-Repeat zu finden.

1.1.6 Die Lichtsignaltransduktion als Beispiel einer Regulation durch nucleocytoplasmatische Partitionierung

Pflanzen können die Intensität, die Dauer, die Richtung und die spektrale Qualität des Lichts mit Hilfe verschiedener Photorezeptoren wahrnehmen. Während Phototropine eine Rolle beim Phototropismus, bei der Chloroplastenbewegung und bei der Stomataöffnung spielen (Christie *et al.*, 1998), fungieren Phytochrome und Cryptochrome in Signalwegen, die verschiedene Reaktionen der Pflanze auf Licht regulieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Pflanzenkeimung, beim Wachstum, bei der Pigmentierung, bei der circadianen Uhr, bei der Pflanzenentwicklung und beim Blühen (Ahmad und Cashmore, 1993; Hoffman *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996; Mathews und Sharrock, 1997; A. Batschauer, 1998; Sharrock und Quail, 1989; Briggs und Olney, 2001; C. Lin, 2002).

Für Phytochrom A (phyA) und Phytochrom B (phyB) wurde eine lichtabhängige Kernakkumulation gezeigt (Kircher *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999). Der lichtabhängige Kernimport der Phytochrome ist abhängig von einer Konformationsänderung der Proteine. Die im Dunkeln vorkommende Rotlicht-absorbierende Form wandelt sich nach einem Lichtimpuls in die Hellrotlicht-absorbierende Form um und gelangt in den Kern. Am C-Terminus von phyB befindet sich eine funktionale NLS. Matsushita *et al.* (2003) konnten zeigen, dass der N-terminale Teil alleine das phyB-Signal weiterleiten kann, wenn er einmal in den Kern gelangt ist. Der C-Terminus scheint hingegen eine abschwächende Wirkung auf die Signaltransduktion auszuüben.

Viele Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Lichtsignaltransduktion spielen, weisen nucleocytoplasmatische Partitionierung auf. COP1 (*Constitutive Photomorphogenesis 1*) wurde in einem Screen nach Mutanten identifiziert, die Eigenschaften lichtgewachsener Keimlinge im Dunkeln aufwiesen (Deng *et al.*, 1991). Es enthält eine N-terminale RING-Finger Domäne, eine coiled-coil Domäne und eine C-terminale WD-40 *repeat* Domäne (Deng *et al.*, 1991; Von Arnim und Deng, 1993). COP 1 fungiert als Repressor der Photomorphogenese, indem es die Expression lichtabhängiger Gene unterdrückt. Im Dunkeln ist COP1 im Kern lokalisiert, und zwar in sogenannten „speckles“. Werden Keimlinge ins Licht transferiert, nimmt die COP1 Konzentration im Kern von Hypokotylzellen stark ab.

Die COP1 Aktivität unterliegt somit einer negativen Lichtkontrolle und schließt eine lichtabhängige Relokalisation des Proteins in das Cytoplasma mit ein. Eine *bipartite* NLS ist verantwortlich für den Kernimport, die cytoplasmatische Retention wird der N-terminalen Domäne zugeschrieben (Stacey *et al.*, 1999; 2000). COP1 interagiert mit verschiedenen regulatorischen Proteinen im Kern, wie z.B. mit dem bZIP-Faktor HY5 (*Hypocotyl 5*; Chattopadhyay *et al.*, 1998a, 1998b). HY5 befindet sich immer im Zellkern und bindet an G-box Elemente in Promotoren lichtinduzierbarer Gene. Durch Bindung an HY5 inhibiert COP1 dessen Aktivität, was dazu führt dass HY5 im Dunkeln degradiert wird. In *cop1* Mutanten hingegen kann HY5 im Dunkeln akkumulieren.

Ballesteros *et al.* (2001) beschreiben den R2R3MYB Transkriptionsfaktor LAF1 (*long after far-red light 1*), der eine Rolle im phyA Signaltransduktionsweg spielt. LAF1 wurde bei einem Screen nach Mutanten mit langem Hypokotyl unter Hellrotbedingungen gefunden. Die Mutante besitzt eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber hellrotem Licht, aber verhält sich gegenüber anderen Lichtbedingungen normal. LAF1 ist ein Transkriptionsaktivator und vermutlich verantwortlich für die Regulation spezifischer phyA-Zielgene (Ballesteros *et al.*, 2001). Er ist wie COP1 ebenfalls im Kern in „speckles“ lokalisiert und besitzt eine NLS im N-Terminus. Es wird vermutet, dass die DNA-Bindedomäne für die Ausbildung der „speckles“ notwendig ist, die NLS alleine bewirkt nur die Kernlokalisation.

1.2 MYB Faktoren

1.2.1 Struktur und Funktion der MYB-Domäne

Proteine der MYB-Familie gehören zu einer phylogenetisch alten Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten. Sie kommen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen vor. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine konservierte DNA-Bindedomäne am N-Terminus des Proteins, die als MYB-Domäne bezeichnet wird (Martin und Paz-Arez, 1997). Die MYB-Domäne kann ein, zwei oder drei MYB-*Repeats* (R1, R2, R3) aus jeweils etwa 52 Aminosäureresten enthalten. Jedes MYB-*Repeat* besteht aus drei α -Helices, wobei die zweite und die dritte Helix eine

Helix-Turn-Helix-Konformation ausbilden und sich in die großen Grube der DNA anlagern können (Jin und Martin, 1999) (Abb. 2).

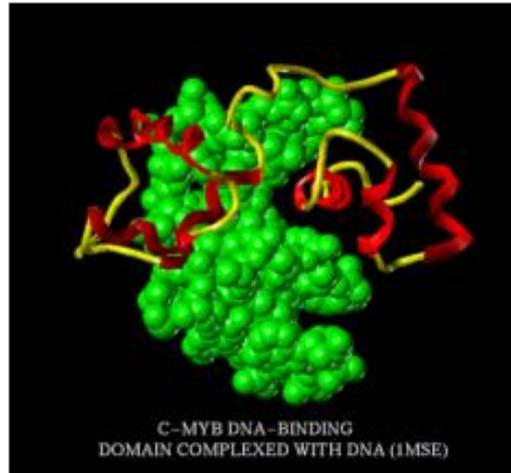


Abb. 2: Tertiärstrukturmodell des MYB-DNA Komplexes

Das Modell zeigt die minimale DNA-Bindedomäne von c-MYB aus Mensch, welche aus dem R2- und R3-Repeat besteht, und die Bindung an ihre Ziel-DNA. Für pflanzliche MYB-Proteine wird die gleiche Struktur vorhergesagt (Solano *et al.*, 1997). Die mit rot hervorgehobenen Regionen stellen die α -Helices der beiden MYB-Repeats dar. Jeweils die 2. und die 3. Helix stehen in direktem Basenkontakt mit der DNA, die 3. Helix spielt keine Rolle bei der DNA-Erkennung. Das R1-Repeat ist nicht dargestellt (aus <http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/dna-protein/all/all.html>).

MYB-Proteine binden sequenzspezifisch an Promotoren bestimmter Zielgene und aktivieren oder reprimieren deren Transkription. Vor allem die MYB-Repeats R2 und R3 sind an der sequenzspezifischen DNA-Bindung beteiligt, wobei besonders das dritte MYB-Repeat für die Sequenzspezifität verantwortlich zu sein scheint (Gabrielsen *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1992). Die MYB-Repeats bestehen aus einer Reihe von hochkonservierten Aminosäuren, z.B drei in regelmäßigen Abständen voneinander stehenden Tryptophanresten, die eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des MYB-DNA-Komplexes spielen (Martin und Paz-Arez, 1997). Bei pflanzlichen MYB-Proteinen ist der erste Tryptophanrest allerdings häufig durch eine andere aromatische oder hydrophobe Aminosäure ersetzt, wie beispielsweise bei AtMYB1, welches an dieser Stelle einen Phenylalaninrest besitzt. Tierische und pflanzliche MYB-Proteine unterscheiden sich in ihrer DNA-Bindesepezifität (Williams und Grotewold, 1997), diese divergiert allerdings auch innerhalb der pflanzlichen MYB-Proteine. MYB-Proteine in Vertebraten erkennen die

Konsensussequenz C/TAACGG, während das P-Protein von Mais an die Sequenz CCT/AACC bindet (Grotewold *et al.*, 1994). PhMYB3 von *Petunia hybrida* hingegen kann zwei verschiedene Sequenzen erkennen: MBSI (TAACC/GGTT) und MBSII (TAACTAAC) (Solano *et al.*, 1995).

Der C-terminale Bereich der MYB-Proteine ist normalerweise nicht konserviert, hier können sich strukturell sehr unterschiedliche Motive befinden, die funktionale Domänen darstellen und nach denen man die MYB-Proteine in mehrere Untergruppen einteilen kann (Stracke *et al.*, 2001).

1.2.2 MYB-Proteine in Tieren

Tierische MYB-Proteine besitzen meist drei MYB-*Repeats* (R1, R2 und R3) in ihrer MYB-Domäne und sind vor allem an Entwicklungs- und Zellteilungsvorgängen beteiligt. Sie werden hauptsächlich in undifferenzierten, sich teilenden Zellen exprimiert. Das erste MYB-Gen, das entdeckt wurde, war das Onkogen *v-MYB*, das ursprünglich von einem Vertebratengen abstammte, ins Virengenom integriert wurde, und dann mutierte. Viele Vertebraten besitzen drei Gene, die mit *v-MYB* verwandt sind: *c-MYB*, *A-MYB* und *B-MYB*. Während die MYB-Domänen dieser drei Proteine hochkonserviert sind und aus drei MYB-*Repeats* bestehen, unterscheiden sie sich sonst deutlich in ihrer Struktur, Funktion und Gewebelokalisation (Rosinski und Atchley, 1998). *c-MYB* ist das am besten charakterisierte Protein dieser Gruppe. Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation und Differenzierung unreifer hämatopoetischer Zellen. Es wurde gezeigt, dass es die Transkription des *CDC2-Kinase*-Gens aktiviert und dadurch im Zellzyklus den Übergang von der G1- zur S-Phase kontrolliert (Martin und Paz-Arez, 1997). *A-MYB* wird nur in den Hoden, wo es eine Rolle bei der Spermienentwicklung zu spielen scheint, und in peripheren Leukozyten exprimiert. *B-MYB* ist vermutlich ein zelltypspezifischer Transkriptionsaktivator, wahrscheinlich mit der Fähigkeit, *c-MYB* herunterzuregulieren. Ähnliche MYB-Proteine wurden auch in Insekten, Pflanzen und Pilzen identifiziert (J. Lipsick, 1996). Beispielsweise erkennen MYB-Proteine in *Drosophila* und *Dictyostelium* dieselbe DNA-Sequenz wie die vertebraten Proteine *c-MYB*, *A-MYB* und *B-MYB* (J. Lipsick, 1996).

In Vertebraten findet man zusätzlich noch eine kleine Gruppe an MYB-Proteinen, die nur ein MYB-Repeat besitzen, z.B. das humane Protein hTRF, welches an doppelsträngige, telomere Sequenzen bindet (Bilaud *et al.*, 1996). Wahrscheinlich binden Proteine mit einem einzigen MYB-Repeat in einer anderen Art und Weise an die DNA als solche mit drei MYB-Repeats, da beispielsweise c-MYB beide MYB-Repeats R2 und R3 für die Bindung an die DNA benötigt. Strukturelle Studien an hTRF1 zeigen, dass die C-terminale Helix länger ist als die äquivalenten Helices in den Repeats von c-MYB (Jin und Martin, 1999).

1.2.3 MYB-Proteine in Pflanzen

1.2.3.1 Einteilung pflanzlicher MYB-Proteine in drei Klassen

Im Gegensatz zu den Tieren, welche nur einige wenige MYB-Proteine besitzen, trifft man im Pflanzenreich eine sehr große Familie an MYB-Proteinen an (Kranz *et al.*, 1998).

Ihre Funktionen sind breit gefächert, sie spielen beispielsweise eine Rolle bei der Regulation des sekundären Metabolismus, bei der Kontrolle zellulärer Morphogenese, bei der Meristementwicklung, beim Zellzyklus, bei der circadianen Rhythmik, bei der Pathogenabwehr und bei der Antwort der Pflanze auf bestimmte Stressfaktoren (Meissner *et al.*, 1999).

Pflanzliche MYB-Proteine können bezüglich ihrer MYB-Domäne in drei Klassen eingeteilt werden: Die Proteine mit einem (MYB1R Faktoren), zwei (R2R3 MYB Faktoren) oder drei MYB-Repeats (MYB3R Faktoren) (Stracke *et al.*, 2001).

MYB1R-Proteine

MYB-Proteine mit nur einem MYB-Repeat werden auch als MYB-ähnliche Proteine bezeichnet (Stracke *et al.*, 2001) und können, wie die tierischen MYB1R-Faktoren, ebenfalls sequenzspezifisch an DNA binden. Das MYB-Repeat des StMYB1-Proteins aus Kartoffel zeigt mehr Ähnlichkeit zu dem dritten MYB-Repeat des menschlichen c-MYBs als zu pflanzlichen MYB-Domänen. StMYB1 besitzt zwei potentielle Aktivierungsdomänen, eine saure Region nahe der MYB-Domäne und ein Prolin-reicher Abschnitt nahe des C-Terminus. Es konnte gezeigt werden,

dass StMYB1 mit der Prolin-reichen Aktivierungsdomäne die Transkription in Protoplasten aktivieren kann (Baranowskij *et al.*, 1994). Obwohl StMYB1 nur ein einziges MYB-Repeat besitzt, bindet es spezifisch an einen DNA-Abschnitt, welcher das Motiv GGATA bzw. TATCC besitzt. Andere MYB1R-Proteine, wie z.B. LHY oder CCA1 aus *A. thaliana*, spielen eine Rolle bei der circadianen Rhythmik (Schaffer *et al.*, 1998; Carré und Kim, 2002) und können ebenfalls sequenzspezifisch an DNA binden. Auf ihre sequenzspezifische Bindung wird in Kap. 1.3.1.2 genauer eingegangen. Lu *et al.* (2002) konnten durch einen Vergleich aller bis dahin bekannter MYB1R-Proteine zeigen, dass manche, wie z.B. StMYB1 oder CCA1, das hochkonservierte SHAQK(Y/F)F-Motiv am 3'-Ende der MYB-Domäne besitzen. Innerhalb der MYB-Domäne befindet es sich an der Stelle, die die dritte α -Helix ausbildet, und die für die sequenzspezifische DNA-Bindung mitverantwortlich ist.

Es ist bekannt, dass sich unter den MYB1R-Faktoren auch solche befinden, die spezifisch an doppelsträngige, telomere DNA binden, vergleichbar mit den MYB1R-Faktoren in Vertebraten. Beispielsweise erkennt die isolierte DNA-Bindedomäne von AtTRP1 (*telomeric repeat-binding protein 1*), die telomere Sequenzwiederholung GGTTTAG. Das vollständige Protein kann mit dieser Sequenz allerdings keinen Komplex bilden. Die minimale Länge für die Bindung von AtTRP1 an telomere DNA besteht aus fünf GGTTTAG-Wiederholungen, die optimale Bindung benötigt vermutlich acht oder mehr Wiederholungen (Chen *et al.*, 2001). Die MYB-Domäne dieses Proteins ist nicht nur homolog zu den DNA-Bindemotiven anderer TRPs in Hefe und Tieren, sondern besitzt auch große Ähnlichkeit mit der DNA-Bindedomäne des MYB-ähnlichen Proteins RTBP1 aus Reis. Dies lässt vermuten, dass diese Domäne für die spezifische Bindung an telomere Sequenzen bei Pflanzen wichtig ist (Chen *et al.*, 2001). Möglicherweise spielt RTBP1 eine bedeutende Rolle bei der Funktion der Telomere in Pflanzen (Yu *et al.*, 2000), z.B. indem es die Telomeraseaktivität beeinflusst.

R2R3 MYB-Proteine

Die größte Gruppe der MYB-Faktoren in Pflanzen stellen die R2R3 MYB-Proteine dar, die bei *A. thaliana* aus 125 Mitgliedern besteht. Von Stracke *et al.* (2001) wurden sie nach konservierten Motiven im C-terminalen Bereich jenseits der MYB-Domäne in 24 Untergruppen eingeteilt.

Auch bei Mais, als Vertreter einer monokotylen Pflanze, wurden über 80 *R2R3 MYB*-Gene gefunden (Rabinowicz *et al.*, 1999). Die Funktionen der meisten *R2R3 MYB*-Gene sind noch unbekannt. Die wenigen, deren Funktion man kennt, regulieren hauptsächlich pflanzenspezifische Prozesse, sie spielen beispielsweise häufig eine Rolle in der Kontrolle des sekundären Pflanzenstoffwechsels.

R2R3 MYB-Proteine sind wichtige Faktoren bei der Regulation des Phenylpropanmetabolismus. Phenylalanin ist die Ausgangsverbindung im Phenylpropanstoffwechsel. Dieses wird durch die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) in Zimtsäure umgewandelt. Von Zimtsäure stammen alle Phenylpropane ab. Aus dem Phenylpropanstoffwechsel gehen einerseits die Flavonoide hervor, die vor allem für die Pigmentsynthese in Pflanzen verantwortlich sind, andererseits ist der Phenylpropanstoffwechsel für die Produktion der Vorläufer von Lignin zuständig. Die pflanzliche Stoffklasse der Flavonoide umfasst nicht nur gelbe, rote oder blaue Farbstoffe von Blüten und Früchten, sondern auch eine große Zahl von Substanzen, deren Funktion in der Abwehr von Stresseinflüssen im Organismus liegt. Sie dienen beispielsweise als epidermale Schutzpigmente gegen UV-Strahlung (Schopfer/Brennicke, 1999; S. 596).

Das R2R3 MYB-Protein C1 aus Mais aktiviert die Transkription von wahrscheinlich allen Genen, deren Produkte für die Biosynthese der Anthocyanpigmente in der äußeren Aleuronzellschicht des Maiskorns benötigt werden (Martin und Paz-Arez, 1997). In der restlichen Maispflanze übernimmt allerdings ein anderes, sehr ähnliches MYB-Protein, PL, diese Aufgabe. In anderen Pflanzen spielen MYB-Proteine ähnliche Rollen in der Kontrolle des Phenylpropanstoffwechsels. Beispielsweise aktiviert PhMYB3 von *Petunia hybrida* ein Gen, welches die Chalkonsynthase, das Schlüsselenzym des Flavonoidbiosynthesewegs, kodiert (Solano *et al.*, 1997). In *Antirrhinum majus* aktiviert AmMYB305 das Gen für PAL, das erste Enzym des Phenylpropanstoffwechsels. In *A. thaliana* resultiert eine

Überexpression der MYB-Gene *AtMYB75* und *AtMYB90* in einer Akkumulation von Anthocyanen (Borevitz *et al.*, 2000).

R2R3 MYB-Proteine können auch reprimierende Funktionen besitzen. *AtMYB4*, welches selbst negativ über UV-B Licht reguliert wird, reprimiert über seine C-terminale Repressordomäne die Transkription von *C4H* (Zimtsäure-4-Hydroxylase), welche normalerweise für die Synthese von Sinapinsäureestern und Flavonoiden zuständig ist (Jin *et al.*, 2000). Das orthologe Protein in *A. majus* ist *AmMYB308*, welches zusammen mit *AmMYB330* die Expression mehrerer Gene reprimiert, die am Phenylpropanstoffwechsel beteiligt sind (Tamagnone *et al.*, 1998).

Eine zweite große Aufgabe pflanzlicher MYB-Gene besteht in der Kontrolle der Zellform. Für das *Antirrhinum*-Gen *MIXTA* und das orthologe *Petunia hybrida*-Gen *PhMYB1* wurde gezeigt, dass sie wichtig für die Formentwicklung petaler Epidermiszellen sind (Noda *et al.*, 1994). *GL1 (glabra 1)* aus *A. thaliana* hingegen spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Blatt- und Stielzellen zu Trichomen (Oppenheimer *et al.*, 1991). Es wird für die initiale Expansion der Zelle benötigt, die sich zu einer Trichomzelle entwickelt. Das *TTG1*-Protein (*transparent testa glabra 1*) kontrolliert wahrscheinlich *GL1* und steuert die Trichombildung und die Anthocyanproduktion. *WER (werewolf)* ist ein MYB-Protein in Arabidopsis, welches in der Wurzel exprimiert wird. Es ist dort verantwortlich für die Spezifikation der Atrichoblasten (Lee und Schiefelbein, 2002).

Auch bei der Hormonantwort spielen pflanzliche MYB-Proteine eine Rolle. Während der Samenentwicklung und Samenkeimung aktiviert das durch Gibberellinsäure induzierte MYB-Protein *GAMYB* aus Gerste die Expression eines Gens für die α -Amylase. Diese spielt bei der Samenkeimung eine Rolle und wird in der Aleuronschicht synthetisiert (Martin und Paz-Arez, 1997). Abscisinsäure, ein anderes Pflanzenhormon, induziert in *A. thaliana* die Expression von *AtMYB2*, ein MYB-Protein, dessen Expression auch bei Trocken- oder Salzstress induziert wird (Urao *et al.*, 1993). Die Expression des *C1*-Gens aus Mais ist ebenfalls Abszisinsäure-abhängig.

MYB3R-Proteine

Auch Proteine mit drei MYB-*Repeats* konnten in Pflanzen gefunden werden. Es wird vermutet, dass diese Proteine konservierte Funktionen in Eukaryoten besitzen (Kranz *et al.*, 2000). *A. thaliana* besitzt fünf *AtMYB3R*-Gene. Sie spielen, ähnlich wie die tierischen *MYB*-Gene, eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, indem sie beispielsweise die Transkription von Cyclingenen regulieren (Ito *et al.*, 2001). Dies lässt vermuten, dass ihre Funktion bei Tieren und Pflanzen konserviert ist. In Tabak wurden drei MYB3R Gene gefunden (*NtmybA1*, *NtmybA2* und *NtmybB*), die Ähnlichkeiten mit dem tierischen *c-MYB* Gen aufweisen (Ito *et al.*, 2001). Hirayama und Shinozaki (1996) fanden in Arabidopsis ein MYB3R Protein (*AtMYBCDC5*), welches Ähnlichkeiten zu dem Zellzyklusprotein CDC5+ aus Hefe aufweist. Bei allen MYB3R *knockouts* in *A. thaliana* konnten bisher keine phänotypischen Unterschiede zu Wildtyp (wt)-Pflanzen detektiert werden (persönliche Mitteilung von R. Stracke, Universität Bielefeld).

1.2.3.2 Evolution und verwandtschaftliche Beziehung der MYB-Proteine

Es stellt sich die Frage, wie es zu der unterschiedlichen Anzahl an MYB-*Repeats* in einer MYB-Domäne kommen konnte und warum es überhaupt so viele MYB-Proteine in Pflanzen gibt. Ein Modell für die Evolution der MYB-Proteine liefert J. Lipsick (1996). Dieses Modell geht von einer sehr frühen Duplikation der MYB-Domäne aus, wodurch MYB-Proteine entstanden, die multiple MYB-*Repeats* besaßen. Laut diesem Modell fand die Duplikation vor über einer Milliarde Jahren statt und wurde gefolgt von einer späteren Vervielfältigung der MYB-Proteine durch Duplikation ganzer Gene. Diese Vermehrung verlief ziemlich eingeschränkt bei den MYB3R-Proteinen in Vertebraten, bei Pflanzen allerdings war die Expansion vor allem der R2R3 MYB-Proteine beträchtlich, und man kennt mittlerweile 125 Mitglieder in *A. thaliana*. Die dramatische Expansion der R2R3 MYB-Genfamilie in höheren Pflanzen geschah während der letzten 500 Millionen Jahre (Rabinowicz *et al.*, 1999). Diese MYB-Proteine stammen, laut Lipsick (1996), von einem MYB3R-Vorfahren ab und amplifizierten sich stark nach dem Verlust des R1 *Repeats*. Die Amplifikation geschah wohl noch vor der Aufspaltung in Monokotyledonen und Dikotyledonen (Riechmann und Ratcliffe, 2000). Nach

der selektiven Amplifikation der R2R3-MYB-Proteine während der pflanzlichen Phylogenese entstanden letztendlich drei distinkte R2R3-Subgruppen, die nach der Sequenz ihrer DNA-Bindedomänen in die Subgruppen A, B und C unterteilt werden (Jin und Martin, 1999).

Die pflanzlichen MYB3R-Proteine repräsentieren wohl Nachkommen eines uralten Mitglieds der MYB-Familie, dessen Struktur während der Evolution der Pflanzen und Tiere konserviert blieb. Man vermutet, dass eine DNA-Bindedomäne, die aus drei MYB *Repeats* besteht, schon vor der Aufspaltung des Tier- und Pflanzenreichs existierte (Kranz *et al.*, 2000).

Die MYB-Familie mit nur einem MYB-*Repeat* expandierte ebenfalls in Pflanzen, wenn auch nicht mit solch einem Ausmaß wie die R2R3-MYB-Proteine. Diejenigen von ihnen, die an telomere Sequenzen binden, sind während der Evolution der Hefen, Tiere und Pflanzen konserviert geblieben.

Die Frage nach dem Grund der großen Zahl von R2R3 MYB-Proteinen lässt sich nicht leicht beantworten. Es wird vermutet, dass die Expansion der MYB-Genfamilie parallel mit der Entwicklung neuer zellulärer Funktionen in höheren Pflanzen verlief (Martin und Paz-Arez, 1997). Mit steigender Komplexität der Entwicklungsvorgänge und Stoffwechselwege vervielfältigten sich die MYB-Genfunktionen, z.B. im Phenylpropanstoffwechsel und auch in der Antwort auf Phytohormone wie Gibberellin und Abscisinsäure, die selbst spezialisierte Signalmoleküle sind und dem Sekundärstoffwechsel entstammen. Pflanzen scheinen die R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren dafür zu nutzen, ihre spezialisierten physiologischen Funktionen zu kontrollieren, während sich im Gegensatz dazu bei Vertebraten nur eine kleine Gruppe von MYB-Proteinen entwickelte, die die zelluläre Proliferation und Differenzierung kontrollieren.

Die extensive Vermehrung der *MYB*-Gene in Pflanzen brachte spezifische Unterklassen an MYB-Proteinen hervor, bestehend aus Mitgliedern mit ähnlichen oder gleichen Funktionen. So werden z.B. die beiden MYB-Transkriptionsfaktor-Gene *WER* und *GL1* gewebsspezifisch mit einem nicht überlappenden Expressionsmuster während der Entwicklung von *A. thaliana* exprimiert (Lee und Schiefelbein, 2001). Durch reziproke Komplementationsexperimente mit verschiedenen Genfusionen wurde gezeigt, dass *WER* und *GL1* für funktional äquivalente Proteine kodieren und dass ihre gewebsspezifischen Funktionen nur

durch Unterschiede in ihren cis-regulatorischen Sequenzen herrühren (Bilaud *et al.*, 1996). Das *WER*-Gen reprimiert das Wachstum der Haare in der Wurzelepidermis und das Stomatawachstum im Hypokotyl. Das *GL1*-Gen reguliert die Trichomproduktion auf Blatt- und Stieloberflächen. Seine Expression ist auf die epidermalen Zellen im sich entwickelnden Sprossgewebe begrenzt. Obwohl *WER* und *GL1* nur eine Sequenzidentität von 57% besitzen (91% Identität in ihrer MYB-Domäne), sind sie funktionell gegenseitig vollständig austauschbar, wenn man sie mit den regulatorischen Sequenzen des jeweils anderen Gens ausstattet. So kann beispielsweise *GL1* die Musterbildung in der Wurzelepidermis bestimmen, wenn es durch die regulatorischen Sequenzen von *WER* kontrolliert wird. Umgekehrt kann das durch cis-regulatorische Sequenzen von *GL1* gesteuerte *WER*-Protein die *GL1*-Funktionen ersetzen.

Durch Sequenzanalysen vermutet man, dass die meisten MYB-Proteine transkriptionelle Aktivatoren sind, da für sie häufig eine aliphatische α -Helix im C-Terminus vorhergesagt wird. Die C-terminalen Regionen der MYB-Proteine sind allerdings nicht hoch konserviert, manche MYB-Proteine besitzen eine relativ saure Region im C-terminalen Teil, andere sind reich an Glutamin- und Prolinresten. Dies sind Eigenschaften von möglichen Aktivierungsdomänen, allerdings sind strukturelle Vorhersagen für Aktivierungsdomänen relativ unspezifisch (Jin und Martin, 1999).

Einige MYB-Proteine haben die Eigenschaft, die Expression ihrer Zielgene zu reduzieren (Jin *et al.*, 2000). Prinzipiell kann eine Verminderung der Genexpression auch dadurch erreicht werden, dass mit anderen Transkriptionsaktivatoren um DNA-Bindestellen konkurriert wird (Jin und Martin, 1999), was allerdings für MYB-Proteine bisher noch nicht gezeigt werden konnte.

1.3 Circadiane Rhythmik in *A. thaliana*

Die circadiane Uhr entwickelte sich als eine Adaptation an die Erdumdrehung. Der circadiane Rhythmus beträgt etwa 24 Stunden und ist sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten (z.B. Cyanobakterien) zu finden. Viele physiologische und entwicklungsabhängige Prozesse wie auch manche Verhaltensweisen bei Säugern werden circadian reguliert. Zwei prominente Beispiele sind die Regulation

der Photosyntheseaktivität in Pflanzen und die zeitabhängigen Schlaf- und Wachzyklen bei Säugetieren.

Schon 1729 entdeckte der französische Astronom *Jean Jacques d'Ortous de Mairan* einen ersten Hinweis auf die Fortdauer der endogenen Rhythmik bei Abwesenheit eines externen Stimulus (D. Somers, 1999). Er arbeitete mit *Mimosa pudica*, einer Pflanze, die ihre Blätter während der Nacht schließt und am Tag öffnet. Stellte er die Pflanze in konstante Dunkelheit, öffneten und schlossen sich die Blätter weiterhin, wie wenn die Pflanze noch immer einem Tag-Nacht Rhythmus ausgesetzt wäre. 100 Jahre später fand *Augustin de Candolle* heraus, dass die Periodenlänge der Blattbewegung von *Mimosa pudica* bei konstanter Dunkelheit nicht genau 24 Stunden, sondern etwa 22 bis 23 Stunden beträgt (D. Somers, 1999). Die Ergebnisse zahlreicher Studien, die mit diesen frühen Versuchen ihren Anfang nahmen, lieferten vier charakteristische Eigenschaften, die circadiane Rhythmen definieren: 1. Circadiane Rhythmen bestehen aus einer Periode von circa 24 Stunden. Erst wenn die Umwelt einen 24 Stunden Rhythmus vorgibt, beträgt die Periodenlänge genau 24 Stunden. Diese Synchronisation mit der Umgebung führt zu der 2. Eigenschaft einer circadianen Rhythmik: dem Zeitgeber („*entrainment*“). Durch ihn wird die endogene Uhr an die lokalen Licht-Dunkel Gegebenheiten angepasst. Dies wird durch zwei Stimuli erreicht: Temperatur und Licht. Diurnale Schwankungen in der Temperatur (hoch/niedrig) oder in den Lichtverhältnissen (Licht/Dunkel) sind die Signale, die den endogenen Rhythmus mit der Umwelt synchronisieren. Die 3. Eigenschaft der circadianen Rhythmik ist die Temperaturkompensation. Die meisten biologischen Prozesse sind stark temperaturabhängig, ihre Reaktionsraten verdoppeln sich, wenn die Temperatur um 10°C steigt ($Q_{10} \approx 2$) (D. Somers, 1999). Circadiane Rhythmen haben im Gegensatz dazu Q_{10} -Werte zwischen 0,8 und 1,4. Somers *et al.* (1998) untersuchten den circadianen Rhythmus von *A. thaliana* in einem Temperaturbereich von 20°C und fanden eine Änderung der Periodenlänge von lediglich 2,5 Stunden, dies entspricht einem Q_{10} -Wert von 1,0-1,1. Die 4. Eigenschaft beschreibt die Fortdauer der Rhythmik in Abwesenheit eines periodischen Stimulus, wie es *de Mairon* bei der Blattbewegung von *Mimosa pudica* schon gesehen hatte.

1.3.1 Molekulare Zusammensetzung der circadianen Uhr

Das circadiane System besteht aus drei Komponenten: einem *Input* Signalweg, der die circadiane Uhr mit der Umwelt synchronisiert (Zeitgeber), dem zentralen Oszillator, der aus einer „autoregulatorischen negativen *feedback* Schleife“ besteht und den *Output* Signalwegen, die molekulare Rhythmen mit unterschiedlichen Phasen generieren. Dies ist allerdings nur eine vereinfachte Beschreibung, da *Input* Komponenten, wie beispielsweise Photorezeptoren auch gleichzeitig in *Output* Signalwegen eine Rolle spielen (Bognar *et al.*, 1999) und *Output* Signale wiederum den zentralen Oszillator beeinflussen können (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

1.3.1.1 Der *Input* Signalweg

Der *Input* Signalweg synchronisiert den zentralen Oszillator mit der Umwelt. Dieser Prozess wird als Zeitgeber bezeichnet und wird hauptsächlich durch Licht als Stimulus gesteuert. Aber auch Temperaturänderungen (warm/kalt-Zyklen) können die endogene Uhr an die Umwelt anpassen. Obwohl die circadiane Uhr einer Temperaturkompensation unterliegt, können Temperaturänderungen die endogene Uhr neu einstellen und *Output* Signalwege verändern. Salomé und McClung (2005) konnten kürzlich zeigen, dass die *A. thaliana Pseudo-Response* Regulatoren APRR7 und APRR9 molekulare Faktoren sind, die entweder den Zeitgeber des Oszillators über die Temperatur steuern oder Komponenten des Oszillators selbst darstellen, die durch Temperaturänderungen ausgelöste *Input* Signale von anderen Faktoren erhalten können. Sie fanden heraus, dass *prp7 prp9* Doppelmutanten die circadiane Uhr nicht mehr über Temperaturänderungen an die Umwelt synchronisieren können und in konstanter Dunkelheit keine Rhythmik mehr aufweisen.

Lichtsignale regulieren über Phytochrom- und Cryptochrom-Photorezeptoren Komponenten der circadianen Uhr, um den Zeitgeber der Pflanze einzustellen (Millar, 2004). Phytochrome absorbieren differentiell im Hellrot- und Dunkelrotlicht, aber auch im Blaulicht und im UV-A Bereich, Cryptochrome absorbieren im Blaulicht- und im UV-A Bereich. *A. thaliana* besitzt fünf Gene für Phytochromrezeptoren, *PHYA-PHYE* (Nagy *et al.*, 2002; P. Quail, 2002) und zwei

für Cryptochrome, *CRY1* und *CRY2* (C. Lin, 2002). Um die circadiane Uhr beeinflussen zu können, muss ein Lichtsignal Komponenten des Oszillators regulieren. Es konnte noch nicht vollständig geklärt werden, welches die direkten Zielproteine der Photorezeptoren sind, die die circadiane Uhr ansteuern. Eines der möglichen Proteine ist PIF3 (*phytochrome-interacting factor 3*), welches über seine basische Helix-Loop-Helix-Domäne an G-Box-Sequenzen von Promotoren lichtregulierter Gene, wie z.B. *CCA1* und *LHY*, (*in vitro*) binden kann. Die lichtaktivierte Pfr-Form von phyB kann mit dem promotorgebundenen PIF3 interagieren (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass PIF3 ein Koaktivator im *Input* Signalweg darstellt. Für das verwandte Protein PIF1 hingegen wurde gezeigt, dass es sowohl mit phyA als auch mit phyB interagieren kann (Huq *et al.*, 2004). Interessanterweise konnten Khanna *et al.* (2004) ein Proteinbindemotiv identifizieren („*active phytochrome binding motif*“, APB), welches nur bei phyB-interagierenden AtbHLH-Proteinen vorkommt. Sie konnten zeigen, dass die bHLH-Proteine PIF3, PIF4, PIF5 und PIF6 spezifisch an die Pfr-Form von phyB (und nicht an phyA, C, D oder E) binden und dass Mutationen in deren APB-Motiv die Interaktion an phyB verhindern.

Eine mögliche Funktion im *Input* Signalweg wird auch von den Proteinen der Zeitlupe (ZTL)-Familie angenommen (Somers *et al.*, 2000). ZTL, FKF (*flavin-binding-kelch-F-box*) und LKP2 (*LOV-kelch protein 2*) besitzen eine PAS (*period-ARNT-sim*)-ähnliche Domäne, die an eine Proteindomäne erinnert, welche an ein Flavinchromophor im Phototropin-Photorezeptor bindet (Briggs und Christie, 2002). Das ZTL-Protein kann sowohl mit phyB als auch mit cry1 interagieren (Jarillo *et al.*, 2001) und besitzt zusätzlich zur PAS-ähnlichen Domäne eine F-Box und sieben Kelch-*Repeats*, was eine Beteiligung an der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation vermuten lässt (Kim *et al.*, 2003a).

Die *Arabidopsis Pseudo-Response* Regulatoren spielen auch beim lichtabhängigen *entrainment* eine Rolle. Zusammen mit TOC1 (*timing of CAP expression 1*) stellen sie eine Familie aus 5 Proteinen in *A. thaliana* dar, die rhythmisch exprimiert werden. Initiiert durch APRR9 erfolgt ihre Expression seriell (Matsushika *et al.*, 2000), sodass die *APRR*-Transkripte alle 2-3 Stunden rhythmisch akkumulieren, mit der zeitlichen Reihenfolge von *APRR9*→*APRR7*→*APRR5*→*APRR3*→*TOC1 (APRR1)* (Makino *et al.*, 2002). Es

konnte gezeigt werden, dass alle 5 Proteine die Fähigkeit besitzen, die circadiane Periode lichtabhängig zu modulieren (Más *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Michael *et al.*, 2003; Kaczorowski und Quail, 2003). Für die *APRR9*-Expression wurde außerdem gezeigt, dass sie zwar durch Licht aktiviert, aber durch die Überexpression von *TOC1* inhibiert wird (Makino *et al.*, 2002). Analysen von Eriksson *et al.* (2003) sprechen allerdings gegen eine lineare, gegenseitige Aktivierung der *APRR*-Gene, welche am Ende zur Aktivierung von *TOC1* führt. Hier wird vermutet, dass die fünf Gene komplementäre, lichtabhängige Funktionen bei der circadianen Uhr ausüben. Salome und McClung (2004) hingegen schlagen vor, dass die *Pseudo-Response* Regulatoren miteinander eine komplexe *feedback* Schleife ausbilden, über die sie circadiane Rhythmen in *Arabidopsis* kontrollieren. Bei *toc1* Mutanten findet man eine veränderte Antwort der Pflanze auf Licht (Más *et al.*, 2003). Makino *et al.* (2002) konnten außerdem zeigen, dass *TOC1* mit *PIF3* und anderen verwandten bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren kann. Zusammenfassend kann man sagen, dass die *Pseudo-Response* Regulatoren im Lichtsignaltransduktionsweg den Phytochromen nachgeschaltet sind, indem sie das Phytochromsignal entweder über *PIF3* oder über einen parallelen *Input* Signalweg weitergeben. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass mehrere Photorezeptoren die circadiane Uhr durch unterschiedliche Mechanismen regulieren.

Die Gene für Phytochrom- und Cryptochrom-Rezeptoren werden selbst circadian reguliert. Dies findet auf der Ebene der mRNA-Akkumulation statt (Bognar, *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2001; Toth *et al.*, 2001). Außerdem werden sie posttranskriptional durch Phosphorylierung und Kerntranslokation modifiziert (Nagy und Schäfer, 2002). Des Weiteren hemmt ein Signalweg, der als „*gating pathway*“ bezeichnet wird, die Aktivität des Licht *Input* Signalwegs am Abend, sodass die circadiane Uhr weniger sensitiv auf Licht reagiert. *ELF3* (*early-flowering 3*) spielt dabei eine wichtige Rolle (McWatters *et al.*, 2000; Covington *et al.*, 2001). Der *gating*-Prozess ist essentiell für eine fortlaufende Rhythmik unter konstanten Lichtbedingungen. Dies wird in *elf3* Mutanten deutlich, bei denen der Oszillator nach etwa 10 Stunden im Dauerlicht stehen bleibt (McWatters *et al.*, 2000). Liu *et al.* (2001) konnten zeigen, dass das *ELF3*-Protein mit *phyB* interagiert und somit möglicherweise dessen Funktion am Abend hemmt.

1.3.1.2 Der circadiane Oszillator

Elementare molekulare Mechanismen, die der Erzeugung circadianer Rhythmen zugrunde liegen, wurden im Wesentlichen in *Synechococcus elongatus*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster* und in der Maus aufgedeckt (J. Dunlap, 1999). Die Einblicke, die durch die Untersuchungen an diesen Organismen gewonnen wurden, führten zu dem Modell eines Oszillators, welcher als „autoregulatorische, negative *feedback* Schleife“ beschrieben wird. Das Prinzip basiert auf einer durch Transkriptionsfaktoren induzierten Expression von Genen, die ihre eigene Transkription negativ regulieren, sodass oszillierende Expressionsmuster entstehen. Dieser negative *feedback* geschieht gewöhnlicherweise auf der Ebene der Transkription, wobei posttranskriptionale Regulationen für eine korrekte Funktion des Oszillators ebenfalls von Bedeutung sind. Mindestens eine negative Komponente in solch einer *feedback* Schleife weist eine signifikante Verzögerung zwischen maximaler Genexpression und Proteinmenge auf, da sich ansonsten die Genexpression auf einen konstanten Wert einpendeln würden.

In *A. thaliana* wird angenommen, dass der circadiane Oszillator aus drei Komponenten besteht: LHY (*Late Elongated Hypocotyl*), CCA1 (*Circadian Clock Associated 1*) und TOC1 (D. Somers, 1999). LHY und CCA1 kodieren für sehr ähnliche MYB1R Transkriptionsfaktoren, die in ihrer MYB-DNA Bindedomäne eine 78%ige Identität aufweisen (Harmer, *et al.*, 2001). Überexpression dieser beiden Gene führt zu einer gestörten Funktion der circadianen Uhr aufgrund drastisch reduzierter LHY- bzw. CCA1-Transkriptmengen (Schaffer *et al.*, 1998; Wang und Tobin, 1998). Da sie ihre eigene Expression hemmen können, wird vermutet, dass sie Komponenten der negativen *feedback* Schleife sind. LHY und CCA1 sind sogenannte „*morning genes*“, da ihre mRNA-Mengen unter konstanten Bedingungen am Morgen ihr Maximum aufweisen. Pflanzen, denen sowohl CCA1 als auch LHY fehlt, haben die Fähigkeit verloren, circadiane Oszillationen aufrechtzuerhalten (Alabadí *et al.*, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002), was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass diese beiden MYB Transkriptionsfaktoren bedeutende Komponenten der circadianen Uhr darstellen.

Die Expression beider Gene wird durch Licht induziert. Dies erfolgt sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Wang und Tobin (1998) konnten zeigen, dass ein kurzer Rotlichtpuls eine Erhöhung der mRNA-Menge von *CCA1* zur Folge hat, und dass die Lichtinduktion von *CCA1* in etiolierten Keimlingen über *phyA* erfolgt. Die Expression von *LHY* hingegen wird auf der translationalen Ebene durch Licht reguliert (Kim *et al.*, 2003b). Pflanzen, die ein *LHY*-Transkript konstitutiv exprimierten, wiesen eine Akkumulation des *LHY*-Proteins während des Tages auf und zeigten eine Verringerung der *LHY*-Proteinmenge während der Nacht. Es wird vermutet, dass diese translationale Regulation über ein Sequenzelement innerhalb des 5'- oder 3' nicht translatierten Bereichs der mRNA vermittelt wird (Kim *et al.*, 2003b).

Die dritte Komponente des circadianen Oszillators in *A. thaliana* ist der *Pseudo-Response* Regulator *TOC1*, dessen mRNA-Menge ebenfalls rhythmisch exprimiert wird (Strayer *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu *LHY* und *CCA1* wird *TOC1* allerdings in die Gruppe der „*evening genes*“ eingeordnet, da dessen mRNA-Menge unter konstanten Bedingungen am Abend maximal ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die *LHY*- und *CCA1*-Expression am geringsten. Alabadí *et al.* (2001) konnten zeigen, dass *TOC1* negativ durch *LHY* und *CCA1* reguliert wird, da die konstante Überexpression sowohl von *LHY* als auch von *CCA1* im Dauerlicht eine niedrige, konstante *TOC1*-Transkriptmenge zur Folge hat. Umgekehrt scheint *TOC1* ein positiver Faktor für die Expression von *LHY* und *CCA1* zu sein (Alabadí *et al.*, 2001). Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob dies auf eine direkte oder indirekte Weise geschieht. Analysen von Más *et al.* (2003) deuten darauf hin, dass *TOC1* über die Phytochrom-abhängige Induktion die *CCA1*- und *LHY*-Expression positiv reguliert.

Die Repression von *TOC1* durch *LHY* und *CCA1* erfolgt direkt durch Bindung an ein Element in dessen Promotor (Alabadí *et al.*, 2001). Dieses Promotormotiv wurde in verschiedenen Promotorregionen von Genen gefunden, die circadian reguliert werden und deren Expression am Ende des Tages ihren Höhepunkt erreicht (*evening genes*).

Von früheren Studien ist bekannt, dass *CCA1* an der Phytochromregulation des LHCB1*3 (*light-harvesting chlorophyll a/b protein*) Proteins beteiligt ist, indem es mit seiner MYB-Domäne an zwei beinahe identische Sequenzwiederholungen im

Promotor von LHCb1*3 bindet (Wang *et al.*, 1997). Diese CCA1-Erkennungssequenz (AA^A/C AATCT) ist innerhalb der LHC-Gene stark konserviert, in 55 von 61 untersuchten LHC-Genen wurde ein AATCT Motiv in der Region von -350 bis -1 bp vor dem Transkriptionsstart gefunden. LHY und CCA1 scheinen bezüglich der CCA1-Erkennungssequenz jedoch positive Regulatoren darzustellen. Es wird vermutet, dass diese Sequenz ausreicht, die rhythmische Expression von Genen zu vermitteln, die morgens ihr Maximum besitzen (Michael und McClung, 2002).

Auch in der Promotorregion von *CCR2/GRP7* (*Glycine-rich RNA binding protein*) wurden zwei Sequenzelemente (AAATATCT) detektiert, die eine hohe Identität zu der CCA1-Erkennungssequenz aufwiesen (Staiger und Apel, 1999). Sie wurden als „*clock-responsive elements*“ beschrieben, die eine circadiane Oszillation der Genexpression vermitteln, welche abends ihr Maximum besitzt. Mutationen in diesem Element führten zu einer signifikanten Abnahme in der Fähigkeit eines circadian regulierten Promotors, Reportergene rhythmisch zu exprimieren. Genau dieses „*clock-responsive element*“ wurde in der Promotorregion von *TOC1*, als bedeutendes Element für eine Regulation der circadianen Uhr identifiziert (Alabadi *et al.*, 2001). Harmer *et al.* (2000) konnten zeigen, dass ein hochkonserviertes Motiv aus neun Nukleotiden (AAAATATCT), das sogenannte „*evening element*“, in den Promotoren von 31 Genen auftritt, die circadiane Genexpression aufweisen. Alabadi *et al.* (2001) erstellten ein Modell, welches die Interaktion zwischen LHY, CCA1 und TOC1 innerhalb der circadianen Uhr beschreibt (Abb. 3):

verknüpft zu sein (Nakamichi *et al.*, 2005). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Faktoren zusammen eine komplexe *feedback* Schleife bilden, über die sie circadiane Rhythmen in Arabidopsis modulieren können (Salomé und McClung, 2005; Harmer und Kay, 2005).

1.3.1.3 Der *Output* Signalweg

Der *Output* Signalweg übersetzt die Informationen, die vom zentralen Oszillator kommen, in physiologische Rhythmen (Young und Kay, 2001). Er besteht aus vielen verschiedenen einzelnen Signalwegen, den sogenannten „Händen“ der circadianen Uhr. Diese besitzen zwar die gleiche Periode wie der zentrale Oszillator, können allerdings in unterschiedlichen Phasen schwingen. So kommen maximale Transkriptmengen zu allen Zeitpunkten eines 24 Stunden Zyklus vor. Viele Prozesse in Pflanzen werden durch die circadiane Uhr kontrolliert. Intrazelluläre Prozesse, wie Gentranskription, Ca^+ -Level, Hormonregulationen und Enzymaktivitäten stehen unter circadianer Regulation (Harmer *et al.*, 2000). Auf einer höheren Organisationsstufe kann man Rhythmen bei der Stomataöffnung, der Blattbewegung und der Hypokotylelongation beobachten, die, gesteuert durch den circadianen Oszillator, durch koordinierte molekulare Abläufe in Zellen und Geweben entstehen (Dowson-Day und Millar, 1999). Die circadiane Uhr kann aber auch fundamentale Veränderungen in der Pflanzenentwicklung herbeirufen. Die photoperiodische Kontrolle des Blühzeitpunktes ist ein Beispiel dafür, wie eine Uhr, deren Periode etwa 24 Stunden beträgt, einen Prozess steuern kann, der auf einer nicht-circadianen Zeitskala basiert (Thomas und Vince-Prue, 1996).

Von Microarray-Analysen ist bekannt, dass 2-6% aller Gene in *A. thaliana* circadian reguliert werden (Schaffer *et al.*, 2001; Harmer *et al.*, 2000). Eines der best untersuchten dieser sogenannten *CCGs* (*clock-controlled genes*) ist *LHCB* (auch *CAB* genannt), dessen mRNA-Oszillation unter Angiospermen weit verbreitet ist. Auch viele andere Gene, die eine Rolle bei der Photosynthese spielen, oszillieren. Die mRNA-Mengen dieser Gene besitzen ihr Maximum meist kurz nach Sonnenaufgang. Zu ihnen gehören zum Beispiel Gene für das Reaktionszentrum von Photosystem I und II. Viele Gene, die bei der photosynthetischen Kohlenstoff-Assimilation (Pilgrim und McClung, 1993), dem

Kohlenstoffmetabolismus (Harmer *et al.*, 2000), der Photorespiration (McClung *et al.*, 2000) und der Nitratreduktion (Cheng *et al.*, 1991) eine Rolle spielen, unterliegen ebenfalls einer circadianen Regulation.

Die Zellelongation und somit die Wachstumsrate von Blattzellen wird gleichfalls circadian reguliert. Die Kotyledonenbewegungen von Arabidopsiskeimlingen basieren auf diesem Umstand. Nichtrhythmische Blattbewegungen können Hinweise darauf geben, dass ein Defekt in der circadianen Uhr vorliegt.

1.3.2 Zusätzliche Regulationsebenen des zentralen Oszillators

Im Laufe der letzten Jahre wurde deutlich, dass der zentrale Oszillator in *A. thaliana* wahrscheinlich aus multiplen positiven und negativen *feedback* Schleifen besteht, die zu den circadianen Oszillationen beitragen. Tatsächlich wurden in *Neurospora*, *Drosophila* und Säugern untereinander verschaltete circadiane *feedback* Schleifen gefunden (Lee *et al.*, 2000; Glossop *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000).

Es konnte einerseits gezeigt werden, dass Komponenten des *Input* Signalwegs oszillieren können und andererseits wurde deutlich, dass der *Output* Signalweg Einfluss auf den zentralen Oszillator ausüben kann (Harmer *et al.*, 2000). Außerdem wurde bekannt, dass Komponenten des zentralen Oszillators doppelte Funktionen ausüben können. Más *et al.* (2003) konnten beispielsweise zeigen, dass TOC1 sowohl an der Kontrolle des *Output* Signalweges beteiligt ist, als auch eine Rolle bei der Integration von Lichtsignalen spielt.

Der zentrale Oszillator besteht vermutlich aus mehreren zusätzlichen Regulationsebenen, die für die Feinregulation der *Output* Signalwege zuständig sind. Als Beispiel eines untergeordneten Oszillators („*slave oscillator*“) soll an dieser Stelle das MYB-Protein EPR1 (*early-phytochrome-responsive 1*) genannt werden. EPR1 ist ein kernlokalisiertes MYB1R-Protein, dessen MYB-Domäne eine 70%ige Identität zu den MYB-Domänen von CCA1 und LHY aufweist. Wie auch die beiden *Clock*-Proteine kann EPR1 die rhythmische Expression von LHCB steuern. Kuno *et al.* (2003) konnten zeigen, dass es durch phyA und phyB positiv reguliert wird und dass es seine eigene Expression hemmen kann. Dies und die Tatsache, dass es circadiane Expressionsmuster aufweist, lassen vermuten, dass

EPR1 Mitglied eines untergeordneten Oszillators ist (Abb. 4). Da die EPR1-Überexpression in *A. thaliana* keinen Einfluss auf die circadiane Rhythmik von LHY und CCA1 ausübt und da die rhythmische Expression von *EPR1* bei einer *LHY*-Überexpression aufgehoben wird, wird EPR1 nicht als Teil des zentralen Oszillators gesehen. Vielmehr wird vermutet, dass EPR1 den Feinabgleich des *Output* Signalweges vermittelt und zur korrekten Oszillation von Zielgenen beiträgt (Kuno *et al.*, 2003). In der Tat verursacht die Überexpression von *EPR1* eine Hemmung der circadianen Expression von *LHCB*, was vermuten lässt, dass die *LHCB*-Expression zumindest teilweise durch die Oszillation von EPR1 kontrolliert wird.

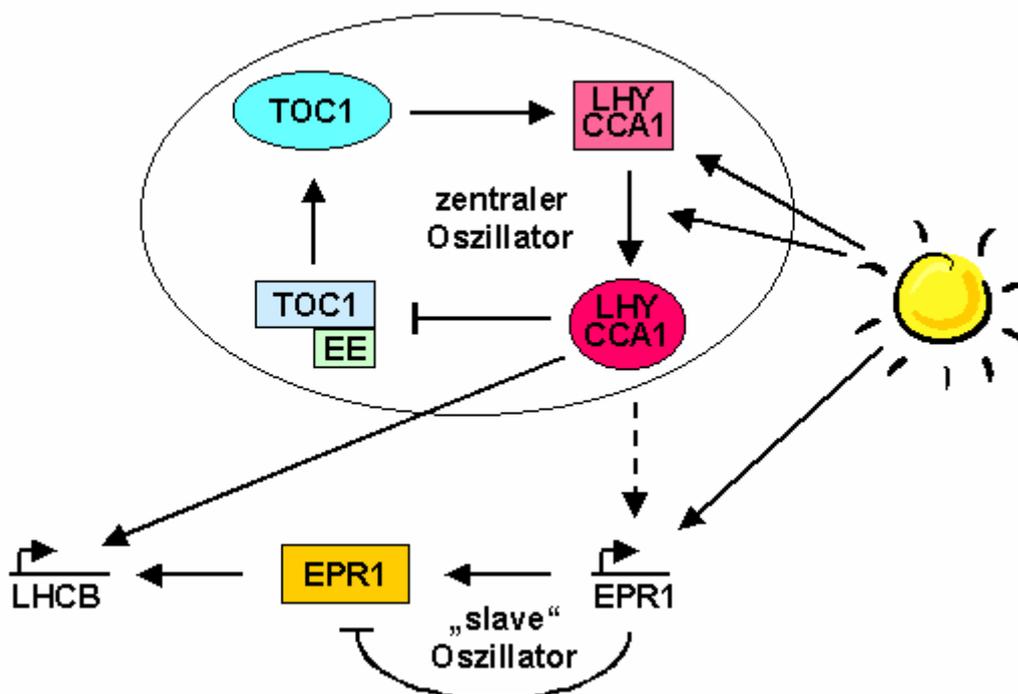


Abb. 4: Modell des zentralen Oszillators mit einer denkbaren Position von EPR1.

EPR1 wird durch Licht induziert und seine rhythmische Expression durch den zentralen Oszillator (wahrscheinlich durch LHY und CCA1, gestrichelter Pfeil) reguliert. EPR1 bildet einen „slave“ Oszillator aus, da es seine eigene Expression negativ regulieren kann. Es spielt zusätzlich eine Rolle bei der rhythmischen Expression von *LHCB* und trägt vermutlich zum Feinabgleich von *Output* Rhythmen bei (modifiziert nach Alabadi *et al.*, 2001 und Kuno *et al.*, 2003).

1.4 Zielsetzung

LCL1 (LHY/CCA1-*like*1) wurde als ein MYB-Protein mit einer NES identifiziert. Es gehört zu einer kleinen Proteinfamilie aus fünf Mitgliedern, der LCL-Familie. Alle fünf LCL-Proteine sind MYB1R-Transkriptionsfaktoren, die innerhalb ihrer MYB-Domäne nahezu identisch sind und große Ähnlichkeit mit der MYB-Domäne der beiden *Clock*-Proteine LHY und CCA1 aufweisen.

Im Laufe dieser Arbeit sollte die Charakterisierung der LCL-Proteinfamilie durchgeführt werden, wobei dabei das Augenmerk hauptsächlich auf LCL1 gerichtet war. Die Analyse der LCL-Familie sollte folgende Punkte beinhalten:

- Identifikation der Kerntransportsignale: Exakte Lokalisierung der NLS und der NES in LCL1 und Analyse der Kerntransportsignale in LCL2-LCL5
- Zelluläre Lokalisation der LCL-Proteine innerhalb der Pflanzenzelle.
- Analyse der DNA-Bindung: Binden die LCL-Proteine an die gleiche DNA *target*-Sequenz wie die *Clock*-Proteine LHY und CCA1?
- Proteininteraktionen: Dimerisierungspotential innerhalb der Proteinfamilie und Suche nach neuen Interaktionspartner von LCL1
- Charakterisierung der Proteindomänen der LCL-Proteine
- Expression von LCL1: Analyse der Lokalisation der LCL1-Promotoraktivität *in planta* und der tageszeitlichen Expression der LCL1-mRNA.
- Funktion: Warum braucht ein Transkriptionsfaktor wie LCL1 eine NES?

2 Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen hatten den höchsten Reinheitsgrad und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Difco, Duchefa, Fluka, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

2.2 Medien

2.2.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton
 5 g Bacto Hefeextrakt
 5 g NaCl
 mit H₂O_{deion} auf 1000 ml aufgefüllt

LB-Platten: LB-Medium mit 1,6% Bacto Agar

YEP-Medium: 10 g Bacto Pepton
 10 g Bacto Hefextrakt
 5 g NaCl
 mit H₂O_{deion} auf 1000 ml aufgefüllt

Für Selektionsmedien wurden die benötigten Antibiotika (Duchefa Biochemie, Niederlande) in folgenden Endkonzentrationen nach dem Autoklavieren zugegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Gentamycin	40 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml
Rifampicin	100 µg/ml

2.2.2 Medien für die Anzucht von Hefen

YPD-Medium:	10 g Bacto Pepton 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Glukose mit H ₂ O _{deion} auf 500 ml aufgefüllt
SD-U-Medium:	3,35 g yeast nitrogen base (YNB) 10 g Glukose 325 mg <i>dropout</i> HWU ⁻ ad 490 ml H ₂ O _{deion} nach dem Autoklavieren steril zugegeben: 2,5 ml 200 x Tryptophan (=10 mg) 2,5 ml 200 x Histidin (=10 mg)
SD-U-Platten:	SD-U-Medium + 1,8% Bacto Agar
<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 wurden eingewogen, durch Mörsern homogenisiert und bei RT gelagert.

2.2.3 Medien für die Anzucht von Pflanzen

Selektionsplatten:	1 x Murashige&Skoog-Medium mit Vitaminen (Duchefa) 1% Saccharose 0,5 g/l MES 0,8% Phytoagar 50 µg/ml Kanamycin
1/2 MS-Platten:	0,5 x Murashige&Skoog-Medium mit Vitaminen 0,8% Phytoagar (Merck)

2.3 Bakterien- und Hefestämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue :	<i>recA1, endA1, gyrA46, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, F⁻[proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)]</i>
<i>E. coli</i> KC8:	<i>his⁻, leu⁻, trp⁻</i>
<i>A. tumefaciens</i> GV3101:	pMP90RK, Gm ^R , Km ^R , Rif ^R
Hefestamm EGY48[p8op-lacZ]:	MATα, <i>his3, trp1, ura1, LexA_{op(x6)}-LEU2</i> , Reporterplasmid p8op-lacZ: lacZ unter Kontrolle des <i>lexA_{op(x8)}, URA3, Amp^r</i>
Hefestamm YM4271:	MATα, <i>ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, ade5, trp1-901, leu2-3, 112, tyr1-501, gal4-Δ512, gal80-Δ538, ade5::hisG</i>

2.4 Plasmid-Vektoren

pART27	Wesley <i>et al.</i> (2001)
pB42AD	Clontech BD Biosciences, Belgien
pBlueskript KS+/-	Stratagene, USA
CHS-GFP	CHS-cDNA in 5'GFP (S65T), T. Merkle
pESC-LEU	Stratagene, USA
pFFL	pBIN (Haseloff <i>et al.</i> , 1997), T. Merkle
pGAD424	Clontech BD Biosciences, Belgien
pGADT7	Clontech BD Biosciences, Belgien
pGEX 4T-1	Amersham Biosciences, Freiburg
3'GFP	mGFP4 (S65T), T. Merkle
5'GFP	5'GFP (S65T), T. Merkle
pGilda	Clontech BD Biosciences, Belgien
pGPTV-BAR	Becker <i>et al.</i> (1992)
pHANNIBAL	Wesley <i>et al.</i> (2001)
pLacZi	Clontech BD Biosciences, Belgien
pQE	Quiagen, Hilden
pUC19	Amersham Biosciences, Freiburg
pUC-SPYCE	Walter <i>et al.</i> (2004)
pUC-SPYNE	Walter <i>et al.</i> (2004)
5'YFP	EYFP-cDNA (Clontech) in pUC19-35S, T. Merkle

3 Methoden

3.1 DNA-Präparation

3.1.1 Aufreinigung und Elution von DNA

Die amplifizierte DNA wurde aus 50 µl einer PCR-Lösung mit Hilfe des *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia) aufgereinigt.

Die in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht lokalisiert und mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte ebenfalls mit dem *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

3.1.2 Auftrennung von DNA

Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in einem 0,5% bis 2% Agarosegel (in 1 x TAE-Puffer). Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, waren dem Gel 0,04 µg Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 3-5 Volt/cm aufgetrennt.

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris
 57,1 ml Essigsäure
 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 mit H₂O 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

3.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Pro μg DNA wurden 2 U der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet. Die Inkubationslänge und Temperatur der Reaktion wurden unter Beachtung der Herstellerangaben (NEB) gewählt.

Ein partieller Restriktionsverdau wurde durchgeführt, wenn ein DNA-Fragment mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen aus einem Vektor ausgeschnitten werden sollte und das Fragment gleichzeitig eine interne Schnittstelle für eines der beiden Restriktionsenzyme besaß. Hierbei wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym vollständig verdaut, für welches das Fragment keine interne Schnittstelle besaß. Anschließend wurde das zweite Restriktionsenzym unter suboptimalen Pufferbedingungen zugegeben und dem Ansatz nach verschiedenen Zeiten (meist nach 1, 2, 5, 10, 15 und 20 min) Aliquots zu 10 μl entnommen. Durch Zugabe von 5 x Probenpuffer wurde der Verdau abgestoppt. Anschließend wurden die Aliquots nebeneinander auf ein Gel aufgetragen, um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem das vollständige DNA-Fragment vorhanden und die interne Schnittstelle noch nicht geschnitten war. In einem zweiten Restriktionsansatz wurde der Verdau nach der so bestimmten Zeit mit Probenpuffer abgestoppt und vollständig auf ein Gel aufgetragen. Das DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

3.1.4 Dephosphorylierungsreaktion

Um eine Rückligation von Vektoren, die mit Restriktionsenzymen geschnitten waren, zu verhindern, wurden diese nach dem Verdau 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 10 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 min bei 37°C in einem aufgestockten Verdauansatz. Zur Denaturierung der SAP wurde die Reaktion anschließend wieder 10 min bei 65°C inkubiert, dann mit Probenpuffer versetzt und vollständig auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde der geschnittene, dephosphorylierte Vektor, wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben, mit 30-50 µl H₂O aus dem Gel eluiert.

3.1.5 Behandlung mit T4 DNA-Polymerase

Für *blunt-end*-Klonierungen wird die DNA in der Regel mit T4 DNA-Polymerase behandelt, um Einzelstrangüberhänge zu entfernen bzw. aufzufüllen. Diese entstehen durch versetzt schneidende Restriktionsenzyme, aber auch durch die Taq-Polymerase, die bei der PCR einen 3'-A-Überhang herstellt. Die T4 DNA-Polymerase spaltet überhängende Nukleotide am 3'-Ende doppelsträngiger DNA ab (3'-5'-Exonukleasefunktion) und kann ausserdem bei einem 5'-Überhang Nukleotide an das 3'-Ende anheften (Polymerase-Funktion).

Es wurden 5 µg DNA mit 3 U T4 DNA-Polymerase (NEB) in T4 DNA-Polymerase-Puffer, 1 x BSA und 200 µM dNTPs in einem 35 µl Ansatz für 20 min bei 16°C inkubiert und anschließend das Enzym für 10 min bei 75°C inaktiviert. Der Ansatz wurde vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen und nach dem Lauf die DNA aus dem Gel eluiert (Kap. 3.1.1).

3.1.6 Ligation

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Vor der Ligation wurden die relativen Konzentrationen des Fragments und des Vektors auf einem Agarosegel abgeschätzt und je nach Intensität der Banden für den Vektor 0,5 µl - 3 µl und für das DNA-Fragment 0,5 µl - 7 µl verwendet (2-bis 3-fache molare Menge des Fragments gegenüber dem Vektor). Der Vektor musste mit den gleichen Restriktionsenzymen wie das Fragment geschnitten sein oder kompatible Enden aufweisen und war mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert

worden. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C in T4 DNA-Ligase-Puffer (mit 1 mM ATP) mit 400 U T4 DNA-Ligase (NEB) statt.

3.1.7 Transformation von *E.coli*-Zellen

3.1.7.1 Chemotransformation

Zunächst mussten die Zellen (*E.coli*-Stamm XL1-Blue, Stratagene) für die Transformation kompetent gemacht werden. Mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms wurde eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft. Am nächsten 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 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 4100 g für 6 min pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden die Bakterienpellets 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 5 min auf Eis wurde bei 4°C und 1500 g für 6 min zentrifugiert und daraufhin das Pellet auf Eis in 4 ml TFB2 resuspendiert. Nach einer mindestens 15 min Inkubation auf Eis wurden die *E.coli*-Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Ein 100 µl Aliquot wurde zu einem vollständigen Ligationsansatz gegeben, der Ansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Anschließend wurde der Transformationsansatz kurz auf Eis gekühlt, dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 4100 g wurde der Überstand bis auf etwa 100 µl abpipettiert, das Bakterienpellet im restlichen Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

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
TFB2:	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ x2H ₂ O 10 mM RbCl 15% Glycerol pH 6,5 (mit KOH) sterilfiltriert

3.1.7.2 Elektrotransformation

Um die Effizienz einer Transformation mit großen Vektoren (wie beispielsweise pGPTV) zu steigern, wurden diese meist mittels Elektrotransformation in *E. coli*-Zellen eingebracht. Zunächst mußten die Zellen kompetent gemacht werden. Hierfür wurde 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue (oder des Stamms KC8 für Plasmide, die aus Hefezellen isoliert wurden) 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 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C für 15 min und 4000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen wie zuvor zentrifugiert, dann mit 0,5 l eiskaltem H₂O gewaschen und vorsichtig in 20 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation wie zuvor wurden die Zellen in einem Endvolumen von 2 ml bis 3 ml eiskaltem 10% Glycerol aufgenommen, in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Elektrotransformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl Ligationsansatz und 5 min 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 min bei 37°C geschüttelt, bei 4100 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 150 µl abgenommen. Das Zellpellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und der vollständige Ansatz auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

3.1.8 Plasmid-Isolierung

3.1.8.1 Plasmid-DNA Präparation im Minimaßstab (*Miniprep*)

2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (meist 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) wurden mit einer Einzelkolonie des Bakterienklons von Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Kultur in Eppendorfhütchen überführt und die Bakterien bei 20800 g für 2 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I (Zellsuspensionspuffer) resuspendiert, bis die Zellsuspension homogen war. Für die Zelllyse wurden 200 µl Lösung II zugefügt und nach mehrmaligem Invertieren der Eppendorfhütchen wurden die Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Versetzen mit 150 µl Lösung III. Durch anschließende Zentrifugation bei RT für 10 min bei 20800 g wurden ausgefallene Proteine und Bakterienchromosomen pelletiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Plasmiden wurde in ein neues Eppendorfhütchen überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 100% Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 20800 g und RT wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 20800 g und RT wurde der Überstand wieder verworfen, das Pellet in der Vakuumzentrifuge bei 30°C für etwa 15 min getrocknet und schließlich in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen (Kap. 3.1.3). Dafür wurden 3 µl von *high-copy* Plasmiden und 5 µl von *low-copy* Plasmiden eingesetzt. Der Restriktionsverdau wurde anschließend auf einem Agarosegel analysiert (Kap. 3.1.2).

Lösung I:	25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 50 mM Glukose
Lösung II:	200 mM NaOH 1% SDS (w/v)
Lösung III:	3 M Na-Acetat (pH 4,8)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA

3.1.8.2 Plasmid-DNA Präparation im Großmaßstab (*Midiprep*)

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

3.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung

Die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung wurde bei $\lambda=260$ nm mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu, Japan bzw. BioPhotometer, Eppendorf) in Quarzküvetten 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.

3.1.10 Polymerasekettenreaktion

3.1.10.1 Standardansatz

Ein PCR-Ansatz wurde in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Pro Ansatz wurden maximal 100 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol Primer, 250 µM dNTPs und 1 U Taq- (Amersham Pharmacia bzw. Roche Diagnostics) bzw. Pwo- (Roche Diagnostics) DNA-Polymerase in Taq- bzw. Pwo-Puffer eingesetzt. Die Pwo-Polymerase, die eine *proof-reading* Aktivität besitzt, wurde verwendet, wenn das PCR-Produkt kloniert werden sollte. Die PCR wurde im PCR-Robocycler von Stratagene bzw. im Mastercycler von Eppendorf durchgeführt. Jede Reaktion umfasste 20-30 Zyklen mit den Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung (*annealing*) und Extension, mit einer Dauer von jeweils 40-90 Sekunden. Die Denaturierungs- bzw. Extensions-Schritte wurden bei 94°C bzw. 72°C durchgeführt, die *annealing*-Temperatur betrug 51°C bis 65°C, abhängig von der jeweiligen Polymerase und den Hybridisierungseigenschaften der Primer.

3.1.10.2 *Overlapping extension PCR*

Diese Methode diente dem Austausch von Basenpaaren in einer cDNA und wurde angewendet um beispielsweise die NES- bzw. NLS-Sequenz von LCL1 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 basischen Aminosäuren Lysin und Arginin der NLS durch Asparagin. Die in dieser Weise mutierten Lokalisationssignale wurden nicht mehr von den Transportrezeptoren erkannt. Der Austausch der Aminosäuren wurde durch Verwendung von 5'-und 3'-Primern erreicht, die an der Position der Lokalisationssignale hybridisierten, aber für Alanin bzw. Asparagin statt der eigentlichen hydrophoben oder basischen Aminosäuren kodierten. Durch die *overlapping extension PCR* wurde die Sequenz $_{109}\text{RPKRK}_{113}$ der NLS zu der Sequenz $_{109}\text{RPNNK}_{113}$ verändert.

Die NES-Sequenz wurde nach mehreren *overlapping extension PCR* von der Sequenz $_{247}\text{LKEMDPINFETVLLLLMRNLTVNL}_{269}$ in die mutierte NES-Sequenz $_{247}\text{AxxAxxAxAAAxxxAxAx}_{269}$ umgewandelt, wobei x für eine nicht-mutierte Aminosäure steht. So wurden in einer ersten PCR-Runde der von dem jeweiligen Lokalisationssignal ausgehende vordere Teil des Gens und der hintere Teil des Gens mit den entsprechenden flankierenden Vektorprimern 5'pB42 und 3'pB42 und den an das Lokalisationssignal hybridisierenden Primern amplifiziert. Die beiden resultierenden PCR-Produkte wurden in einer zweiten PCR-Runde, ohne Aufreinigung der DNA, direkt in äquimolaren Mengen als *DNA-templates*, zusammen mit den Vektorprimern 5'-und 3'-pB42, für die eigentliche *overlapping extension PCR* eingesetzt. Alle Primer, die für die Mutationsanalyse der NLS und NES von LCL1 verwendet wurden, sind im Anhang aufgeführt.

3.1.11 Isolation von cDNA-Klonen

Die Vollängen-cDNA Sequenzen von *LCL1-LCL5*, *LHY*, *CCA1*, *EPR1*, *LIP13* und *LIP26* wurden aus der *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Col-0 Matchmaker cDNA-Bank (Clontech) oder der *A. thaliana* Col-0 pB42AD cDNA-Bank (D. Haasen, 2001) durch PCR mittels genspezifischer 5'- und 3'-Primer, die die entsprechenden Restriktionsschnittstellen zum Klonieren lieferten, amplifiziert. Für

die PCR wurden jeweils 1 µg -2 µg der cDNA-Bank eingesetzt. Deletionskonstrukte wurden mittels genspezifischer Primer und Vollängen-cDNA Klon (in pB42AD) als *template* durchgeführt. Die Sequenz aller hergestellter Klone wurde durch Sequenzierung verifiziert.

In die cDNA-Sequenz von *LHY* wurde eine „stumme“ Mutation eingeführt, da es eine interne EcoRI-Schnittstelle enthielt. Um die gesamte cDNA aber EcoRI/XhoI klonieren zu können, wurde eine Base in der internen EcoRI-Schnittstelle ausgetauscht, ohne dass dabei aber die Aminosäuresequenz verändert wurde. Da es nicht möglich war, die Vollängen-cDNA von *LHY* in einem Schritt zu klonieren, wurde sie durch Amplifikation und Ligation zweier Teilfragmente gewonnen. Mit den Primern LHY-3'3 und LHY-5'3 wurde zunächst das N-terminale *LHY* Fragment amplifiziert und EcoRI/SacI in den pKS-Vektor kloniert. Das C-terminale Fragment von *LHY* wurde mit den Primern LHY-5'2 und LHY-3'1 amplifiziert und SacI/XhoI in den pKS-Vektor kloniert. Durch Tripelligation, bei der beide Fragmente in äquimolaren Mengen gleichzeitig für eine Ligation eingesetzt werden, wurde die cDNA von *LHY* an der internen SacI-Stelle zusammengefügt und EcoRI/XhoI in pKS kloniert.

Die cDNA-Sequenz von CCA1 konnte nicht als vollständige Sequenz aus der cDNA-Bank amplifiziert werden. Mit den Primerpaaren 5'-pB42 und CCA1-3'2 bzw. CCA1-5'2 und 3'-pB42 wurden das N-terminale bzw. C-terminale Fragment amplifiziert und beide Fragmente wurden durch eine *overlapping extension PCR* zusammengesetzt.

Die in der cDNA von LIP13 vorhandene EcoRI-Schnittstelle wurde durch Einbringen einer stummen Mutation entfernt. Hierfür wurden zwei PCR mit den Primern L13-5'2 und 3'-pB42 bzw. 5'-pB42 und L13-3'2 durchgeführt. Das Zusammenfügen der Teilsequenzen erfolgte anschließend mittels *overlapping extension PCR* und den beiden Vektorprimern 5'- und 3'-pB42.

3.2 Analyse von DNA

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe

2 g Pflanzenmaterial von *A. thaliana* wurden mit flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver zermahlen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 5 ml vorgewärmten CTAB-Puffer (mit 10 µl frisch zugesetztem β-Mercaptoethanol) wurde der Ansatz für 30 min in einem Wasserbad bei 67°C unter Schütteln inkubiert, um Proteine zu denaturieren. Nach Extraktion mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die wässrige Phase abgenommen, diese mit 0,5 ml 10% CTAB versetzt und 10 min bei 67°C gemischt. Es folgte eine abermalige Extraktion mit 5 ml Chloroform. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei abgeschnittene Pipettenspitzen benutzt wurden, um das Scheren von DNA zu vermeiden. Durch Versetzen mit 0,7 Vol Isopropanol präzipitierte die DNA bei RT. Nach Zentrifugation (10 min, 4100 g, RT) und einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das Pellet bei RT für etwa 15 min getrocknet, in 100 µl H₂O aufgenommen und in ein Eppendorfhütchen überführt. Um eine Abtrennung der RNA zu erreichen, wurden 700 µl 4 M LiCl zugegeben und die Probe über Nacht auf Eis inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 18000 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand in ein neues Eppendorfhütchen überführt, zweimal mit 1 Vol Phenol/Chloroform und einmal mit 1 Vol Chloroform extrahiert, die wässrige Phase abgenommen und mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, mit 70% Ethanol bei RT gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Die Konzentration wurde durch Bestimmung der OD₂₆₀ und dem Vergleich mit einer Referenzprobe auf einem 1% Agarosegel ermittelt.

CTAB-Puffer: 3% CTAB (w/v)
 1,4 M NaCl
 0,1 M Tris (pH 8,0)
 20 mM EDTA
 0,2% β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

10% CTAB: 10% CTAB (w/v)
0,7 M NaCl

Phenol/Chloroform: Mischungsverhältnis 1:1

Chloroform: Chloroform:Isoamylalkohol, 24:1

3.2.2 Einfache DNA-Isolierung (*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. vier Wochen alten *A. thaliana*-Keimlings (unter Kurztagbedingungen gewachsen), der die Keimblätter und vier Folgeblätter besaß. Das Blatt wurde in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, gemörsert und mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt. Nach Zentrifugation für 5 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit wurden 350 µl des Überstands zu 350 µl Isopropanol pipettiert, das Reaktionsgefäß invertiert und für 10 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 400 µl TE-Puffer durch vortexen gelöst.

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

3.2.3 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 X_{Taq}-Polymerase (Cambrex, Belgien) verwendet.

2 µl der „*Shorty Prep*“-DNA, 12 pmol von jedem Primer, 250 µM X-Taq-dNTP-Mix und 4 µl 10 x X-Taq-Puffer wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt. Zu Beginn des PCR-Programms erfolgte eine Denaturierung der DNA bei 94°C für

5 min („hot start“), dann wurden bei 94°C 10 µl X-Taq-Polymerase-Mix (0,5 µl X-Taq-Polymerase, 1 µl X-Taq-Puffer, 8,5 µl H₂O) zugegeben und das eigentliche PCR-Programm gestartet. In diesem wurde die DNA für 15 Sekunden bei 94°C denaturiert und die Primer für 30 Sekunden bei 65°C hybridisiert. Die Elongation erfolgte für 2 min bei 72°C. Dieser Zyklus wurde 36 mal durchlaufen, dann erfolgte ein Schritt für 4 min bei 72°C, damit alle angefangenen DNA-Synthesen beendet werden konnten. Nach Beendigung des Programms wurden die Reaktionen bis zur Analyse auf einem Agarosegel (Kap. 3.1.2) auf 12°C gehalten.

3.3 Analyse von RNA

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus wenig Blattmaterial

Über drei Tage hinweg wurde alle 4 h je 0,1 g Blattmaterial von elf Wochen alten, im KT (Kurztag) gewachsenen *A. thaliana* Pflanzen geerntet.

Aus den in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Blättern wurde mit Hilfe des *RNeasy-Kits* (Quiagen) Gesamt-RNA isoliert.

3.3.2 Auftrennung von RNA

Die RNA wurde durch Elektrophorese in einem 1% Agarosegel (mit 6% Formaldehyd) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. Vor dem Gellauf wurde die Gelapparatur mit 0,2 M NaOH/1% SDS gewaschen und mit H₂O ausgespült. Vor dem Auftragen wurde die RNA in 4 Vol Denaturierungslösung für 10 min bei 65°C denaturiert. Pro Geltasche wurden 40 µg RNA geladen, die zuvor mit 0,1 µl einer 1% Ethidiumbromidlösung versetzt worden war, um die RNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Der Gellauf erfolgte bei 3-5 Volt/cm für etwa 2,5 Stunden.

10 x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 5,5-5,7 autoklaviert
-------------------	--

Denaturierungslösung: 50% Formamid (v/v)
 6% Formaldehyd (v/v)
 1 x MOPS
 0,05% Bromphenolblau

3.3.3 Northern blot

Direkt nach der Elektrophorese wurde die aufgetrennte, denaturierte RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Roche Diagnostics) durch kapillaren Sog über Nacht übertragen (Sambrook *et al.*, 1989). Als Transferpuffer diente 20 x SSC. Am nächsten Tag wurde der RNA-Transfer auf die Membran mit Hilfe eines Transilluminators kontrolliert und die RNA durch *crosslinking* in einem GS-Genelinker (Biorad, USA) mit 150 mJ irreversibel an die Membran gebunden. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC gewaschen.

20 x SSC: 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
 3 M NaCl

3.3.4 Radioaktive Hybridisierung und Markierung der Sonde

Die Membran wurde zunächst 6 Stunden bei 42°C mit 15 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Der Puffer enthielt 300 µl Lachssperma-DNA, die vor Zugabe 3 min bei 100°C denaturiert worden war. Während der Prähybridisierung der Membran erfolgte das Markieren der Sonden-DNA durch *primer-extension* mit einem spezifischen Primer. Dafür wurden 3 µg pKS-Vektor verdaut, der ein LCL1-Fragment enthielt, welches keine Homologie zu einer anderen *A. thaliana* DNA-Sequenz aufwies. Am 5'-Ende des LCL1-Fragments wurde der Vektor in einem 15 µl Ansatz mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten und anschließend mit 0,2 M NaOH/0,2 mM EDTA bei 65°C für 5 min denaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde die DNA mit 0,1 Vol 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 Vol eiskaltem 100% EtOH gefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und RT wurde die DNA mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für die *annealing*-Reaktion wurden 12 pmol des LCL1-spezifischen 3'-Primers LCL1-3'1 und 1 x Klenow-Puffer in einem Volumen von 10 µl für 15 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Reaktion langsam auf RT abgekühlt war, erfolgte die *primer-extension* Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM

dNTPs (ohne dCTP), 10 µl 10 mCi/ml [α - 32 P]dCTP (Amersham Biosciences), 3 µl 10 x Klenow-Puffer und 10 U Klenow-Polymerase in einer 30 µl Reaktion. Um einen Abbruch der Reaktion mangels dCTP zu verhindern, wurde nach 20 min bei 37°C 0,5 mM unmarkiertes dCTP zugegeben und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die überschüssigen Nukleotide wurden mittels *MicroSpin* S-300 HR Säulchen (Amersham Biosciences) abgetrennt, die Sonde für 5 min bei 100°C denaturiert und mit der prähybridisierten Membran über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran je zweimal 10 min bei 42°C mit 2 x SSC/0,1% SDS und 0,2 x SSC/0,1% SDS gewaschen, auf *Whatman*-Papier getrocknet und gegen Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

Phosphatpuffer:	1 M Phosphatpuffer aus NaH ₂ PO ₄ und Na ₂ HPO ₄ pH 7,2				
Lachssperma-DNA:	6,5 mg/ml				
Hybridisierungspuffer:	<table> <tr> <td>Lösung A:</td> <td>200 ml 1 M Phosphatpuffer 56 g SDS (7%) 1,6 ml 0,5 M EDTA 80 ml H₂O zum Lösen auf 60°C erhitzt, dann 40 ml 5 M NaCl zugegeben</td> </tr> <tr> <td>Lösung B:</td> <td>80 g PEG 6000 (33% Endkonzentration) 160 ml H₂O zum Lösen auf 60°C erhitzen, zu Lösung A geben, dann 320 ml Formamid (p.a.) zugegeben</td> </tr> </table>	Lösung A:	200 ml 1 M Phosphatpuffer 56 g SDS (7%) 1,6 ml 0,5 M EDTA 80 ml H ₂ O zum Lösen auf 60°C erhitzt, dann 40 ml 5 M NaCl zugegeben	Lösung B:	80 g PEG 6000 (33% Endkonzentration) 160 ml H ₂ O zum Lösen auf 60°C erhitzen, zu Lösung A geben, dann 320 ml Formamid (p.a.) zugegeben
Lösung A:	200 ml 1 M Phosphatpuffer 56 g SDS (7%) 1,6 ml 0,5 M EDTA 80 ml H ₂ O zum Lösen auf 60°C erhitzt, dann 40 ml 5 M NaCl zugegeben				
Lösung B:	80 g PEG 6000 (33% Endkonzentration) 160 ml H ₂ O zum Lösen auf 60°C erhitzen, zu Lösung A geben, dann 320 ml Formamid (p.a.) zugegeben				

3.3.5 RNA Dot Blot Analyse

20 µg RNA wurden mit Denaturierungslösung auf 160 µl Gesamtvolumen gebracht und bei 65°C für 10 min denaturiert. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden 240 µl eiskaltes 20 x SSC zugegeben. Die Proben enthielten nun eine Endkonzentration von 10 µg RNA/200 µl. Von dieser Konzentration ausgehend wurden je zwei Verdünnungen von 5 µg RNA/200 µl und 2,5 µg RNA/200 µl mit Verdünnungslösung hergestellt. Eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Boehringer) wurde mit H₂O_{deion} befeuchtet, mit

10 x SSC gespült, auf ein *Whatman*-Papier gelegt und in die Dot Blot Apparatur eingespannt, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Pro Vertiefung der Apparatur und Konzentration wurden 200 µl RNA-Lösung durch die Membran gesaugt („gedottet“), wobei die RNA auf der Membran haften blieb. Danach wurde jeweils mit 150 µl 10 x SSC gewaschen, die Apparatur auseinandergebaut und die Membran in 2 x SSC neutralisiert. Nachdem durch Inkubation der Membran bei 80°C für 3 h die RNA irreversibel gebunden war, wurde die Membran, wie beim *Northern Blot* unter Kap. 3.3.4 beschrieben, prähybridisiert. Hybridisierung und Markierung der Sonde erfolgten ebenfalls wie beim *Northern Blot*. Für die quantitative Auswertung der Signale wurden die radioaktiven *dots* nach Detektion des Signals auf Röntgenfilm aus der Membran ausgeschnitten und direkt in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth) im Szintillationszähler (Beckmann) vermessen.

10 x TBE:	0,5 M Tris-HCl (pH 8,3) 0,5 M Borsäure 10 mM Na ₂ EDTA
Denaturierungslösung:	50% Formamid 6% Formaldehyd 1 x TBE
Verdünnungslösung:	2 Vol Denaturierungslösung 3 Vol 20 x SSC

3.3.6 RT-PCR-Analyse

3.3.6.1 RNA-Isolation mit *RNeasy-Kit* für RT-PCR

Für die RNA-Isolation aus kleinen Mengen Blattmaterial wurden pro Pflanze 0,1 g Blattmaterial geerntet und Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasy-Kits* (Quiagen) isoliert. Um eventuell vorhandene DNA-Spuren aus der RNA-Präparation zu entfernen, wurde je 2 µg bzw. 10 µg RNA mit DNaseI behandelt. Die DNase-Reaktion wurde mit dem *DNA-free Kit* (Ambion) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.6.2 Reverse Transkription (RT)

0,4 µg bzw. 2 µg DNA-freie RNA wurde in einem 10 µl Volumen mit 20 pmol eines genspezifischen 3'-Primers versetzt. Zunächst wurde die RNA für 2 min bei 70°C denaturiert und dann der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (*primer annealing*). Anschließend wurden 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, Invitrogen) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend für 7 min bei 72°C abgestoppt.

3.3.6.3 RT-PCR Reaktion

Für die anschließende PCR wurden 1/5 bzw. 1/4 der RT-Reaktion (0,4 bzw. 0,1 µg cDNA) ohne Aufreinigung eingesetzt. Mit je 50 pmol eines cDNA-spezifischen 5'-Primers und des gleichen 3'-Primers, der bereits für die RT-Reaktion verwendet wurde, wurde eine PCR nach dem Standard-PCR Protokoll (Kap. 3.1.10.1) durchgeführt. Verwendet wurde die Taq-Polymerase (Roche) mit dem dazugehörigen Puffer. Als Negativkontrolle wurde für einige PCR-Reaktionen 0,1 µg bzw. 0,4 µg RNA ohne vorherige RT direkt als *template* eingesetzt. Nach 25 und nach 35 Zyklen wurden jedem Ansatz 10 µl entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert (Kap. 3.1.2).

3.4 Hefe *Two-Hybrid*-Analyse

Mit dem Y2H-System kann die Interaktion zweier Proteine *in vivo* getestet werden. Es basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsregulatoren aus physikalisch getrennten, funktionsunabhängigen Domänen bestehen. Solche transaktivierenden 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) stellt das prokaryotische LexA-Protein die DNA-BD dar. Diese ist mit einem *target*-Protein fusioniert. Die AD besteht aus dem B42-Peptid aus *E. coli*, welches auch eine Transkription in Hefe aktivieren kann. Die B42-AD ist mit einem Protein fusioniert, das entweder bekannt ist oder aus einer cDNA-Bank stammt. Durch Interaktion des *target*-Protein mit dem Protein aus der cDNA-Bank 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.

3.4.1 Detektion von 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 für das LexA-Protein 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 oder einem der MYB-Proteine mit dem zu untersuchenden MYB-Protein, wurden DNA-BD und AD in räumliche Nähe gebracht. Dadurch konnte das Reportergen *lacZ*, das durch die LexA-Operatoren gesteuert wurde, abgelesen werden. Die Hefezellen produzierten β -Galaktosidase, deren Aktivität sichtbar wurde und gemessen werden konnte.

SD-HWU⁻-Platten: 2,68 g YNB
8 g Glukose
7,2 g Bactoagar
260 mg *dropout* HWU⁻
mit H₂O_{deion} auf 400 ml aufgefüllt

Glycerol-Lösung: 65% (w/v) Glycerol
100 mM MgSO₄
25 mM Tris-HCl (pH 7,5)

3.4.3 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 min zentrifugiert und das Pellet 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 g YNB
10 g Glukose
325 mg *dropout* HWU⁻
mit H₂O_{deion} auf 500 ml aufgefüllt

20 x BU *salts*: 30 g NaH₂PO₄ x 7 H₂O
70 g Na₂HPO₄
in 1000 ml H₂O_{deion} gelöst
pH 7,0
autoklaviert

Gal-HWU ⁻ -Platten:	2,8 g YNB 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)
--------------------------------	--

3.4.4 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 jedem zu testenden Hefeklon wurden drei voneinander unabhängige Hefekulturen in 2 ml SD-HWU⁻-Medium aus den Glycerol-Dauerkulturen angeimpft und 2 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert. Hatten die Hefezellen die stationäre Phase erreicht, wurden sie folgendermaßen mit Galaktose induziert: 0,5 ml jeder Kultur wurde in 5 ml Gal-Raf-HWU⁻-Medium überimpft und 4 Stunden bei 30°C im Schüttler inkubiert.

Dann wurde das Wachstum gestoppt, indem die Kulturen auf Eis gestellt wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 g für 5-10 min. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Hefepellets in je 5 ml Z-Puffer resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nach Resuspension der Pellets 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 1-2 min aufgetaut 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 μ l Na₂CO₃-Lösung

abgestoppt. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min wurden die Ansätze 1:4 mit Z-Puffer verdünnt und die OD_{405} von zwei Proben pro Verdünnung in einem *ELISA-Reader* bestimmt. Die Ergebnisse wurden durch ein Balkendiagramm mit Hilfe des Programms *SigmaPlot* dargestellt. Als Referenzwert wurde die β -Galaktosidase Aktivität der Interaktion von LCL1 mit XPO1 verwendet. Dieser Wert wurde als 100% definiert und alle anderen Ergebnisse darauf bezogen.

Gal-Raf-HWU-Medium: 3,35 g YNB
 275 mg *dropout* HWU⁻
 5 g Raffinose
 445 ml H₂O
 autoklaviert, danach steril zugegeben:
 50 ml 20% Galaktose (sterilfiltriert)

Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
 40 mM NaH₂PO₄ x H₂O
 10 mM g KCl
 1 mM MgSO₄ x 7H₂O
 pH 7,0
 autoklaviert

Z-Puffer+BME: 0,27 ml β -Mercaptoethanol in 100 ml

ONPG-Lösung: 4 mg/ml ONPG in Z-Puffer

Na₂CO₃-Lösung: 1 M Na₂CO₃ x H₂O

3.4.5 Hefe *Three-Hybrid* Analyse

Während mit dem Y2H-System die Interaktion zweier Proteine untersucht wird, kann man sich des Hefe *Three-Hybrid* Systems bedienen, um ternäre Proteinkomplexe zu analysieren. Das dritte Protein fungiert hierbei als sogenanntes „Brückenprotein“, es bindet gleichzeitig an zwei andere Proteine, die ihrerseits nicht direkt miteinander interagieren. Die Bindedomäne des Vektors pGilda und die Aktivierungsdomäne des Vektors pB42AD kommen durch das „Brückenprotein“ in räumliche Nähe und dadurch kommt es zur Expression des Reportergens β -Galactosidase. Es wird eine Hefetransformation in der bereits

beschriebenen Weise durchgeführt (Kap. 3.4.2), mit dem Unterschied, dass drei Vektoren in den Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] eingebracht werden und der Stamm dementsprechend auf diese drei Vektoren selektiert wird.

Es wurde als dritter Vektor pESC-LEU (Stratagene) verwendet, der einen Selektionsmarker für Leucin trägt und zusammen mit pB42AD, pGilda und dem Hefestamm eine Selektion auf SD-HWLU⁻-Platten erlaubt. Die *LCL1*-cDNA wurde BamHI/XhoI in die *multiple cloning site 2* von pESC-LEU kloniert, sodass die Expression von LCL1 unter der Kontrolle des *pGAL1* Promotors stattfand. Es sollte untersucht werden, ob CCA1, das allein nicht direkt mit XPO1 interagiert, aktiv aus dem Kern exportiert wird, wenn LCL1 als Brückenprotein fungiert. Die *CCA1* cDNA war hierfür EcoRI/XhoI in den pB42AD-Vektor und *XPO1* war EcoRI/XhoI in den pGilda-Vektor kloniert. Die Expression der drei Proteine wurde, wie beim Y2H-System, durch eine Induktion mit Galaktose erreicht. Die Interaktion der drei Proteine sollte zur Expression des Reportergens *β-Galactosidase* führen. Das Enzym spaltet das Substrat X-Gal und ruft somit eine Blaufärbung der Hefekolonien auf Gal-HWLU⁻-Platten hervor.

SD-HWLU⁻-Platten: 2,68 g YNB
 8 g Glukose
 7,2 g Bactoagar
 220 mg *dropout* HWLU⁻
 400 ml H₂O_{deion}

Gal-HWLU⁻-Platten: 2,8 g YNB
 7,2 g Bactoagar
 220 mg *dropout* HWLU⁻ (= *dropout* HWU⁻ ohne Leucin)
 325 ml H₂O
 autoklaviert, danach steril zugeben:
 40 ml 20% Galaktose (sterilfiltriert)
 20 ml 20 x BU salts (Kap 3.4.3)
 0,64 ml 50 mg/ml X-Gal

3.4.6 Hefe *Two-Hybrid*-Screen

3.4.6.1 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 („*prey*“) 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 *LCL1* 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 $1,6 \times 10^6$ 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.

3.4.6.2 Plasmidisolation 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 2 min kräftig gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit folgte eine Chloroformextraktion, wobei 200 µl

Chlorophorm zum Überstand hinzugefügt wurde, 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 das DNA-Pellet 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: acid-washed
 425-600 µm (Sigma)

3.4.6.3 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 Elektrottransformation (Kap. 3.1.7.2) 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-Präparation im Mini-Maßstab (Kap. 3.1.8.1) 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

3.4.6.4 Retransformation in Hefe

Vor Sequenzierung der isolierten „*pray*“-Plasmide (mit 5'-pB42-Primer), wurden diese durch Retransformation in EGY48[p8op-lacZ] abermals auf Blaufärbung durch β -Galactosidaseaktivität auf Indikatorplatten verifiziert. Hierbei wurde eine Hefetransformation (Kap. 3.4.2) mit *LCL1* als „*bait*“ durchgeführt.

Die nach der Retransformation positiven Klone wurden sequenziert und mit genspezifischen Primern die Vollängen-cDNAs aus einer cDNA-Bank amplifiziert.

3.5 Hefe *One-Hybrid* Analyse

Mit einer Hefe *One-Hybrid* Analyse hat man die Möglichkeit, in einer cDNA-Bank nach Genen für Proteine zu suchen, die an ein bestimmtes DNA-*target* binden, oder man kann die Bindung bestimmter Proteine an dieses DNA-*target* testen. Hierfür muss zunächst ein neuer Hefestamm generiert werden, der die Sequenz eines spezifischen *target*-Elements vor einem Reporter gen durch sequenzspezifische Rekombination ins Hefegenom integriert hat. Es wurde der Vektor pLacZi (Clontech) verwendet, in den das *target*-Element über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/XhoI *upstream* des Reporter gens *lacZ* kloniert wurde. pLacZi enthält ein Gen für die Uracil-Biosynthese. Das *target*-Element war ein 59 bp langes DNA Fragment („CBS“ = CCA1-*binding-site*), welches die *evening-element* (EE)-Sequenz in drei Tandemkopien enthielt. Es sollte untersucht werden, ob *LCL1* eine DNA-Bindedomäne besitzt, die an die EE-Sequenz bindet und dadurch das Reporter gen in Hefe aktivieren kann. Die *LCL1*-cDNA war EcoRI/BamHI in den Vektor pGAD424 (Clontech) kloniert. Dieser Vektor kodiert für die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators, die an die zu untersuchenden Proteine fusioniert wird. Er enthält außerdem ein Gen für die

Leucin-Biosynthese. Findet eine Erkennung des *target*-Elements durch LCL1 statt, wird die Transkription der β -Galactosidase aktiviert.

3.5.1 Herstellung des *target*-Reporterkonstrukts

Die Hybridisierung der beiden antiparallelen Oligonukleotide CBS-5'1 und CBS-3'1, die das EE in drei Tandemkopien enthielten und eine EcoRI/XhoI-Schnittstelle aufwiesen, Restriktionsverdau des Reporterplasmids pLacZi mit EcoRI/XhoI und Ligation des *targets* in das Reporterplasmid erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers (Matchmaker *One-Hybrid* System, Clontech).

3.5.2 Integration des *target*-Reporterkonstrukts in das Hefegenom

Vor der Integration des *target*-Reporterkonstrukts in das Hefegenom des Hefestammes YM4271 wurde der pLacZi-Vektor vollständig linearisiert. Dies wurde durch einen NcoI-Verdau erreicht. Das linearisierte *target*-Reporterkonstrukt wurde daraufhin in den Hefestamm transformiert und durch sequenzspezifische Rekombination ins Hefegenom integriert (nach Protokoll von Clontech). Nach der Transformation wurden die Hefezellen auf SD-U-Platten ausplattiert, nach drei Tagen wurden einzelne Kolonien gepickt und diese erneut auf SD-U-Platten ausgestrichen. Diese stellten die „*Masterplates*“ für den neu generierten Hefestamm YM4271[pEE-lacZi] dar.

3.5.3 Analyse des Reporter-Hefestamms auf Hintergrundexpression

Von einer *Masterplatte* des Hefestamms YM4271[pEE-lacZi] wurden einige Kolonien abgekratzt und in 200 μ l H₂O resuspendiert. Davon wurden mehrere „Hefedots“ zu je 3 μ l auf eine SD-U-Platte pipettiert und diese für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurden die „Hefedots“ mit Hilfe eines *colony-lift filter assays* (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech) auf Expression der β -Galactosidase analysiert. Es wurde die Zeit bis zu einer deutlichen Blaufärbung der Hefekolonien

bestimmt. Dauerte dies länger als 15 min, wurde die Hintergrundexpression des *lacZ*-Gens als niedrig eingestuft und der Reporter-Hefestamm YM4271[pEE-*lacZi*] konnte für den *One-Hybrid Assay* genutzt werden.

3.5.4 Hefe *One-Hybrid Assay*

Der Hefestamm YM4271[pEE-LacZi] wurde einmal mit LCL1-pGAD424, mit CCA1-pGAD424 (Positivkontrolle) und mit dem leeren pGAD424-Vektor (Negativkontrolle) transformiert (Kap. 3.4.2). Die transformierten Hefezellen wurden auf SD-LU⁻-Platten ausplattiert und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Kolonien von den Platten gekratzt, in je 100 µl H₂O resuspendiert und mehrere „Hefedots“ zu je 3 µl erneut auf SD-LU⁻-Platten pipettiert. Diese wurden abermals für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein *colony-lift filter assay* (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech), wobei die Zeit bestimmt wurde, wann die mit LCL1-pGAD424 transformierten Hefezellen im Vergleich zu den Kontrollen eine Blaufärbung zeigten.

SD-LU⁻-Platten: 2,68 g YNB
 8 g Glukose
 7,2 g Bactoagar
 220 mg *dropout* HWLU⁻
 mit H₂O_{deion} auf 400 ml aufgefüllt
 autoklaviert, danach steril zugegeben:
 2 ml 200 x Tryptophan (10 mg)
 2 ml 200 x Histidin (10 mg)

3.6 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Für die Analyse von DNA-Protein Komplexen *in vitro* wird mittels EMSA untersucht, ob ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment nach Zugabe eines Proteins ein verändertes Laufverhalten in einem Agarose-/Polyacrylamidgel zeigt. DNA-Protein Komplexe wandern aufgrund ihrer relativen Größe langsamer durch das Gel als nicht-komplexierte DNA. 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 man nicht unmittelbar auf die Größe der beteiligten Proteine schließen.

3.6.1 Herstellung des radioaktiv markierten DNA-Fragments

Ein 76 bp langes DNA-Fragment, welches das EE enthielt ($\Delta 4$ *construct* in pUC19, zur Verfügung gestellt von D. Staiger, Bielefeld; Staiger, D., Apel, K., 1999), wurde BamHI/SacI aus dem Vektor ausgeschnitten, auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des QIAEX II Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Die Abschätzung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des DNA-Markers DNA-Hae III Digest Φ X174 (NEB) auf einem 2% Agarosegel.

Für die radioaktive Markierung des DNA-Fragments, wurden in einem *fill-in* Ansatz 200 ng DNA-Fragment, 3 μ l 10 x Klenow-Puffer, 7 μ l H₂O, 1 μ l 10 mM dGTP, 1 μ l 10 mM dATP, 1 μ l 10 mM dTTP, 5 μ l 10 mCi/ml [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences) und 5 U Klenow DNA-Polymerase (NEB) in einem Endvolumen von 30 μ l eingesetzt. Nach einer Inkubation bei RT für 20 min wurden die freien Nukleotide durch eine G-25 *Spin Column* (Amersham Biosciences) abgetrennt und die Einbaurrate radioaktiver dCTP-Nukleotide mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen.

3.6.2 *In vitro* Translation der Proteine

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

3.6.3 DNA-Protein Bindungsassay

Um für alle Ansätze eine absolute Gleichheit der DNA-Lösung zu garantieren, wurde ein DNA-*Mastermix* hergestellt, der für 20 Ansätze ausreichte. Die DNA-Menge wurde entsprechend 1 Mio cpm eingesetzt, 36 µl Bindungspuffer, 10 µl poly [dl/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 0 - 9 µl Proteinlösung direkt aus dem Translationsansatz (Kap. 3.6.2) versetzt, mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt und bei RT für 20 min inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Proteinlösung wurde mit 4 µl Färbepuffer versetzt. Die Bindungsansätze konnten direkt auf das Gel geladen werden.

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)

3.6.4 Gelpräparation und Gellauf

Das Agarose-/Polyacrylamidgel musste einen Tag vor dem Versuch gegossen werden. Hierfür 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 abgedampfte H₂O ersetzt und die restlichen Komponenten hinzugefügt und gemischt. Das noch flüssige Gel wurde dann sofort luftblasenfrei in eine vorbereitete, mit Isopropanol gereinigte Gelkammer gegossen und der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Das Gel musste mindestens 30 min auspolymerisieren. Dann wurde es mit Gelkammer und Kamm in feuchte Tücher und Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht bei

4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Luftblasen unter dem Gel und in den Geltaschen entfernt. Nach einem Vorlauf von 1 h 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 enthielt. Hatte die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht, 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 H₂O
4,8 ml Rotiphorese Gel 40 (Roth)
150 µl 10% APS
75 µl TEMED

3.6.5 Gelanalyse

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Glasplatten vorsichtig auseinandergedrückt, wobei das Gel an einer der beiden Platten haften blieb und so für 20 min mit Fixierlösung überschichtet werden konnte. Die Fixierung war beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande eine gelbe Färbung annahm. Dann wurde das Gel von der Glasplatte auf *Whatman*-Papier übertragen, luftblasenfrei mit Frischhaltefolie überzogen und in einem Geltrockner bei 70°C für 2 h getrocknet. Anschließend konnte das Gel in einer Filmkassette gegen Röntgenfilm bei -80°C über Nacht exponiert werden.

Fixierlösung: 10% Essigsäure
20% Methanol

3.6.6 DNA-Kompetitionsanalysen

Um zu untersuchen, ob die Bindung eines Proteins an das DNA-Fragment sequenzspezifisch war, wurde in den Bindungsassay zusätzlich unmarkierte DNA gleicher Größe in 10-, 50- und 100-fach molarem Überschuss zugegeben. War die Bindestelle der unmarkierten DNA identisch mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment, sollte der autoradiographisch nachweisbare Komplex schwächer

werden, da die radioaktiv markierte DNA aus dem Komplex verdrängt wurde. Konnte keine Abschwächung des autoradiographisch nachweisbaren Komplexes durch Zugabe von unmarkierter DNA ohne Sequenzhomologie zum markierten DNA-Fragment beobachtet werden, war die Bindung des untersuchten Proteins an die markierte DNA sequenzspezifisch. Als unspezifisches DNA-Fragment wurde ein 91 bp langes pKS-Fragment eingesetzt, das durch einen XhoI/SacI Verdau aus dem Vektor gewonnen wurde. Außerdem wurde ein Fragment, welches spezifisch an der EE-Bindestelle mutiert war, als Kompetitor-DNA eingesetzt. Dieses wurde aus zwei antiparallelen Oligonukleotiden hergestellt (EEMUT-5'1 und EEMUT-3'1), die miteinander hybridisiert und BamHI/SacI in pKS kloniert wurden. Die Hybridisierung der beiden Oligonukleotide und die Ligation in den Vektor erfolgte wie in Kap. 3.5.1 nach dem Protokoll des Matchmaker *One-Hybrid* Systems (Clontech).

3.6.7 Protein-Kompetitionsanalysen

Um zu untersuchen, ob MYB-Proteine untereinander um ihre DNA-Bindestelle konkurrieren, wurden Protein-Kompetitionsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene Proteinlösungen gleichzeitig mit *Mastermix* (Kap. 3.6.3) inkubiert, wobei eine davon in größerer Menge zugegeben wurde. Zugabe einer größeren Menge des einen Proteins sollte die DNA-Retardierung, die durch das andere Protein verursacht wurde, verringern. Dies konnte allerdings nur mit unterschiedlich großen Proteinen, wie beispielsweise LCL1 (293 AS) und CCA1 (608 AS), durchgeführt werden, damit die Protein-DNA Komplexe eindeutig zuzuordnen waren.

3.7 Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen

3.7.1 Tabak BY-2 Zellkultur

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

3.7.2 Protoplastierung der BY-2 Zellkultur

Die Protoplastierung wurde drei Tage nach Subkultivierung vorgenommen.

Etwa 20 ml der Kultur wurden in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für 5 min bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 25 ml Waschlösung gewaschen und nach einer Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie zuvor in 13 ml Verdaulösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Petrischale überführt, diese 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

3.7.3 Transfektion der Tabak BY-2 Protoplasten

Am Tag nach der Protoplastierung wurden die Protoplasten vorsichtig von der Petrischale in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100 g ohne Bremse für 5 min bei RT pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Protoplasten in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Daraufhin wurden insgesamt 25 ml Waschlösung in Aliquots zugegeben. Nach einer Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie zuvor wurde das Pellet nach der Entfernung des

Überstands in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und insgesamt 10 ml W5-Lösung in mehreren Aliquots zugefügt. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie oben und eine Resuspendierung des Pellets in 5 ml W5-Lösung. Die Zellen wurden im Dunkeln für 20-30 min bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde danach vollständig entfernt und die Protoplasten schrittweise in 10 ml MMM-Lösung resuspendiert. Nach einer Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie oben, Abnahme des Überstands, erneutem schrittweise Hinzufügen von 10 ml MMM-Lösung wurde wieder zentrifugiert, dann etwa 6 ml des Überstands abgenommen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. So wurde eine Protoplastendichte von etwa 2×10^6 /ml erreicht.

Für jeden Transfektionsansatz wurde ein Plastikzentrifugenröhrchen mit je 30 µg DNA vorbereitet und dazu je 300 µl der Protoplasten-Suspension gegeben und gemischt. Nach der tropfenweisen Zugabe von 300 µl PEG, dem Mischen durch Drehen des Zentrifugenröhrchens und einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurden schrittweise insgesamt 10 ml W5-Lösung zugegeben. Nach einer Zentrifugation wie oben wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt, das Protoplastenpellet vorsichtig resuspendiert und schrittweise mit 0,7 ml *MS+Sucrose* versetzt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit nicht ganz verschlossenem Deckel in fast waagrecht Position über Nacht bei 26°C im Dunkeln inkubiert.

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

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

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)
steril filtriert

3.7.4 Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Axioskop Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), ausgerüstet mit einem 20 x Objektiv und einem FITC-Filtersatz, verwendet.

Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurden die transfizierten Zellen 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.

3.8 BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*)

Y2H-Interaktionen liefern wertvolle *in vivo* Informationen über interagierende Proteine in stabilen und transienten Proteinkomplexen (Kersten *et al.*, 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Proteininteraktionen im heterologen Hefesystem und nicht in *A. thaliana* stattfinden. Eine erst kürzlich entwickelte Methode von Hu *et al.* (2002) in tierischer Zellkultur nennt sich BiFC. Hier macht man sich die Eigenschaft von YFP zunutze, dass es durch das Zusammenbringen zweier nicht fluoreszierender YFP-Teilfragmente zu einer Rekonstitution der grün-gelben Fluoreszenz kommt. Dies wird erreicht, wenn zwei Proteine, die mit den YFP-Fragmenten fusioniert sind, miteinander interagieren. BiFC besitzt eine hohe Spezifität und es hat sich gezeigt, dass die rekonstituierten Chromophorkomplexe eine hohe Stabilität aufweisen (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Bracha-Drori *et al.* konnten zeigen, dass sich BiFC als einfache, verlässliche und relativ schnelle Methode eignet, auch in Pflanzen Proteininteraktionen zu analysieren. Im Gegensatz zum Hefe *Two-Hybrid* System kann man mit dieser Methode die subzelluläre Lokalisation der Proteininteraktion sichtbar machen, was zusätzliche Informationen über Proteininteraktionsnetzwerke liefert.

3.8.1 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 EcoRI/XbaI in 5'GFP kloniert. Der Vektor 5'YN entstand, indem die cDNA von *GFP* durch die von *YN* ersetzt wurde. Der C-terminale Teil 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 stand jeweils unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Die Vektoren 5'YN und 5'YC ermöglichten es nun, Fusionsproteine zu generieren, bei denen das N- bzw. C-terminale YFP-Fragment N-terminal an das Protein fusioniert war. Die cDNAs der zu untersuchenden MYB-Proteine wurden EcoRI/XhoI in 5'YN und 5'YC kloniert. Zusätzlich wurde die cDNA von *LCL1* XbaI/XhoI in die beiden Vektoren pUC-SPYCE und pUC-SPYNE kloniert, um C-terminale Fusionsproteine mit *YN* und *YC* zu generieren. Als Kontrolle wurde die cDNA von *bZIP63* in pUC-SPYCE und pUC-SPYNE verwendet (Walter *et al.*, 2004). Diese beiden Klone, sowie die beiden Vektoren pUC-SPYCE und pUC-SPYNE wurden von Klaus Harter (Tübingen) zur Verfügung gestellt. Alle MYB-Proteindimere wurden gegenseitig sowohl als *YN*- als auch als *YC*-Fusionen getestet .

BY-2 Protoplasten wurden mit den *YN*- und *YC*-Konstrukten kotransfiziert. Da die Konstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors standen, kam es in den Protoplasten zu einer transienten Überexpression der Fusionsproteine. Die Transfektion der Protoplasten erfolgte wie in Kap. 3.7.3 beschrieben. Pro Konstrukt wurden hier 20 µg DNA eingesetzt, sodass eine Transfektion mit 40 µg Gesamt-DNA durchgeführt wurde.

3.8.2 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.

3.9 Anzucht von *A. thaliana*

3.9.1 Anzucht auf Erde

Es wurden etwa 20 bis 30 Samen von *A. thaliana* Col-0 pro Topf auf Blumenerde mit 1/3 Vermiculit ausgesät. Die Töpfe wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt und nach einer dreitägigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln (Stratifikation) in die Phytokammer gebracht. Die Bedingungen für den Tag/Nacht-Rhythmus in der Phytokammer waren folgende: Langtag (LT) war 16 Stunden Licht bei 24°C und 8 Stunden Dunkel bei 16°C, Kurztag (KT) war 8 Stunden Licht bei 24°C und 16 Stunden Dunkel bei 16°C.

Nach einer Woche wurde die Folie abgenommen. Die Pflanzen bildeten im LT etwa vier Wochen nach der Aussaat Blüten, im KT war der Blühzeitpunkt etwa acht Wochen später als im LT.

Weißlicht in der Phytokammer (340-1100 nm):

- 16 Quecksilberdampflampen (Power Star HQIL, 400 W, Osram, München) in Kombination mit 4 Leuchtstoffröhren
- Energiefluss: 30 Wm⁻²

3.9.2 Sterile Anzucht von *A. thaliana*

Um *A. thaliana* unter sterilen Bedingungen anzuziehen, wurden die Samen zuerst für 2 min mit 70% Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend genau 10 min in 0,5 ml 5% Natriumhypochloridlösung mit 0,05% Tween20 unter Schütteln inkubiert und 5 x mit sterilem deionisiertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Samen in steriles Wasser aufgenommen und auf 1/2 MS Platten (mit dem entsprechendem Antibiotikum für die Selektion) gleichmäßig verteilt. Die

Platten wurden für drei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend in die jeweils erforderlichen Lichtbedingungen gebracht.

3.10 Transformation von *A. thaliana*

3.10.1 Transformation von Agrobakterien

Für die Transformation von *A. thaliana* mussten zunächst chemokompetente Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*, Stamm GV3101, Rifampicin- und Gentamycin-resistent) hergestellt werden. Dafür wurden 2 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Rifampicin und 40 µg/ml Gentamycin) mit Agrobakterien angeimpft. Nach zwei Tagen Inkubation im Schüttler bei 28°C wurden 50 ml LB (mit den entsprechenden Antibiotika) mit dieser Vorkultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen nach einer kurzen Abkühlung auf Eis bei 2800 g und 4°C für 5-10 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml eiskaltem 20 mM CaCl₂ resuspendiert. Aliquots von je 0,1 ml wurden in flüssigem Stickstoff weggefroren und konnten bei -80°C gelagert werden.

Für die Transformation der Agrobakterien wurden 5 µg des binären Plasmids (pFFL, pGPTV-BAR oder pART27) verwendet. Die DNA wurde direkt zu den noch gefrorenen, kompetenten Bakterien gegeben. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 5 min mit anschließender Inkubation auf Eis für wenige Minuten. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen bei 28°C für vier Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 150 µl verworfen, das Zellpellet im restlichen Medium resuspendiert und vollständig auf LB-Platten mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und dem entsprechendem Antibiotikum für die Vektorselektion ausplattiert. Nach einer Inkubation für zwei bis drei Tage bei 28°C konnten Kolonien gepickt werden.

3.10.2 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Für die Herstellung transgener Pflanzen wurde der Ökotyp Columbia Col-0 von *A. thaliana* verwendet, die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde unter LT-Bedingungen.

28 Tage nach der Aussaat wurden die Infloreszenzen nahe der Rosette abgeschnitten, um den Blühzeitpunkt aller Pflanzen für die Transformation zu synchronisieren und um die Bildung von mehr Blüten zu induzieren. Eine Woche nach dem Abschneiden der Blüten waren die neuen Infloreszenzen zwischen 5 cm und 15 cm lang und die Pflanzen konnten für die Transformation verwendet werden. Damit die Stomata am Tag der Transformation geöffnet waren, wurden die Pflanzen am Tag zuvor gut gegossen. An diesem Tag wurden auch 150 ml YEP-Medium (mit 100 µg/ml Rifampicin, 40 µg/ml Gentamycin und dem entsprechenden Antibiotikum für die Vektorselektion) mit einer 5 ml Übernachtskultur der mit dem binären Plasmid transformierten Agrobakterien angeimpft und bei 28°C im Schüttler über Nacht inkubiert.

Am Tag der Transformation (die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension war über 2,0) wurde die Kultur bei 4000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und in ein 250 ml Becherglas gefüllt. Jeder bepflanzte Topf wurde etwa 2 min, mit den Blüten voran, in das Infiltrationsmedium mit den Agrobakterien getaucht, die Pflanzen anschließend in Frischhaltefolie eingepackt und über Nacht im Dunkeln bei RT im waagrechten Zustand inkubiert. Pro Konstrukt wurden sieben Töpfe auf diese Art behandelt. Am Tag darauf wurden die Pflanzen ausgepackt, jeder Topf in ein Aracon (Lehle Seeds) gestellt und in der Phytokammer weitergezogen. Vier Tage später wurde die Transformationsprozedur mit den gleichen Pflanzen wiederholt, um die Effizienz der Transformation zu steigern. Die Pflanzen wurden noch drei Wochen lang in der Phytokammer bis zur Samenreife weitergezogen, anschließend getrocknet und die Samen der T1-Generation geerntet.

Infiltrationsmedium (1 Liter):	50 g Saccharose
	0,5 g MES
	pH 5,7 (mit KOH)
	200 µg Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)

3.10.3 Selektion transgener *A. thaliana* Pflanzen

Pflanzen, die mit dem pGPTV-BAR Vektor transformiert waren, enthielten das *bar*-Gen, welches eine Resistenz gegen BASTA hervorruft. BASTA ist ein Kontaktherbizid, welches von der Pflanze über die Blätter aufgenommen wird. Es blockiert die Glutamin-Synthetase, die Ammoniak in Glutamat einbaut, um Glutamin zu bilden. Ist dieses Enzym blockiert, reichert sich das Zellgift Ammoniak an, wodurch das Pflanzengewebe zerstört wird.

Drei Wochen alte, unter LT-Bedingungen angezogene Keimlinge der T1-Generation, die die Kotyledonen und drei bis vier Folgeblätter besaßen, wurden zweimal im Abstand von einer Woche mit BASTA-Lösung besprüht. Die Transformationseffizienz war etwa 3 - 4%. Die transgenen Pflanzen wurden bis zur Samenreife weitergezogen und die Samen geerntet.

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

3.11 Promotor-GUS Analysen

Eine weitverbreitete Methode für die Detektion von Promotoraktivität in Pflanzen ist der Gebrauch des Reportergens *uidA*, welches für das Enzym β -Glucuronidase (GUS) kodiert. Diese Hydrolase katalysiert unter anderem die Spaltung des farblosen Substrats X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid). Hierbei entsteht der unlösliche, blaue Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo, welcher nur in den Geweben gebildet wird, in denen auch der davorgeschaltete Promotor aktiv ist.

3.11.1 Herstellen der Promotor-GUS Pflanzen

Die Aktivität eines kurzen (373 bp) und eines langen (1830 bp) Promotor-Fragments von *LCL1* sollte analysiert werden. Um eine Transkriptionsfusion der *LCL1*-Promotorfragmente und des *uidA*-Gens herzustellen, wurden beide Promotorfragmente mittels PCR, mit den Primern X112-3'4 und X112-5'4 für den langen bzw. X112-3'4 und X112-5'5 für den kurzen Promotor, aus dem BAC-Klon

F9G14 (AL162973) amplifiziert und HindIII/XmaI in den binären Vektor pGPTV-BAR kloniert. Das ATG-Startkodon stammte hierbei vom *uidA*-Gen.

Transformation der Agrobakterien und Transformation von *A. thaliana* Col-0 wurden wie in Kap. 3.10 beschrieben durchgeführt. Die T1-Generation transformierter *A. thaliana* Pflanzen wurde ausgesät und mit BASTA selektiert.

3.11.2 Histochemischer Nachweis von GUS in Pflanzen

A. thaliana Pflanzen der T2-Generation wurden auf Erde angezogen und Pflanzengewebe unterschiedlichen Alters geerntet. Pro Promotor-Fragment wurden mindestens sechs Linien analysiert. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst für 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln in Fixans fixiert und anschließend 45 min in Waschlösung gewaschen. Das fixierte Gewebe wurde über Nacht bei 37°C in X-Gluc-Lösung nach vorheriger Vakuuminfiltration inkubiert. Am nächsten Tag wurde es zur Entfärbung jeweils für 1 bis 2 Stunden in 100% und anschließend in 60% Ethanol geschüttelt, bis das Chlorophyll ausgewaschen war. Das Pflanzengewebe konnte direkt mikroskopisch untersucht oder in 60% EtOH bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Fixans: 0,3 % (v/v) Formaldehyd
 10 mM MES pH 5,6
 0,3 M Mannitol

X-Gluc-Lösung: 5 mg X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Glucuronid),
 Cyclohexylammoniumsalz, Duchefa Biochemie, Niederlande
 in 50 µl DMF gelöst
 mit Waschlösung auf 10 ml aufgefüllt

Waschlösung: 50 mM Na₂HPO₄
 pH 7,0 (mit Phosphorsäure)

3.11.3 Herstellen von Gewebeschnitten

Um die Expression des Reportergens auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, wurden dünne Blatt- und Blütenschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellt. Dazu mussten die Pflanzenteile zuvor in Kunststoff eingebettet werden. Das Gewebe wurde zunächst in mehreren Schritten und mit steigender

Konzentration von TBA (2-Methyl-2-Propanol) dehydriert. Pflanzenteile wurden direkt nach einem GUS-Assay aus 60% EtOH in Lösung 2 gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag folgten vier Inkubationsschritte für jeweils 1 h in den Lösungen 3, 4, 5 und 6. Die Pflanzenteile wurden daraufhin noch einmal für 1 h und dann über Nacht mit frischer Lösung 6 inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine Inkubation für 3 h in 2 Vol Lösung 6/1 Vol Präparationslösung (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und abermals für 2 h in 1 Vol Lösung 6/2 Vol Präparationslösung. Über Nacht wurde das Gewebe in Präparationslösung inkubiert. Am folgenden Tag konnten die dehydrierten Pflanzenteile eingebettet werden. Sie wurden auf eine Schicht Einbettungslösung (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in eine Form gelegt und mit Einbettungslösung überschichtet. Nach einer Polymerisation von mehreren Stunden konnten mit einem Mikrotom Schnitte von 5 - 20 µm Dicke hergestellt werden.

Lösung 2:	30% H ₂ O 50% EtOH 20% TBA (2-Methyl-2-Propanol, Fluka)
Lösung 3:	15% H ₂ O 50% EtOH 35% TBA
Lösung 4:	45% EtOH 55% TBA
Lösung 5:	25% EtOH 75% TBA
Lösung 6:	5% EtOH 95% TBA
Präparationslösung:	100 ml technovit 7100 1 g hardener I
Einbettungslösung:	15 ml Präparationslösung 1 ml hardener 2

3.12 *In planta* Analyse des LCL1 Exports

Der durch Exportin1 vermittelte Kernexport von Proteinen wird spezifisch durch Leptomycin B (LMB) gehemmt. Um den aktiven Export von LCL1 durch XPO1 mikroskopisch *in planta* zu analysieren, musste die Lokalisation von LCL1 zunächst mit einer YFP-Fusion sichtbar gemacht werden. Bei einer LMB-vermittelten Hemmung des Exports von LCL1 sollte sich das YFP-Fusionsprotein nur noch im Kern befinden.

3.12.1 Herstellung der YFP-Fusionsproteine

Die cDNA von *GFP* wurde aus dem 5'GFP-Vektor XbaI/EcoRI ausgeschnitten und durch die *YFP*-cDNA (Clontech BD Biosciences) ersetzt. In den resultierenden YFP-Vektor wurden die cDNAs von *LCL1* und *LCL1(NESmut)* kloniert, um YFP-LCL1 bzw. YFP-LCL1_{mut1} Fusionen zu generieren. Hierfür wurden die EcoRI/XhoI Schnittstellen des Vektors genutzt. Die Fusionen wurden zusammen mit dem 35S-Promotor des YFP-Vektors HindIII/SacI in den binären Vektor pGPTV-BAR kloniert, und ersetzen hier das *uidA*-Gen. Wie in Kap. 3.10 beschrieben, wurden *A. thaliana* Col-0 Pflanzen mittels Agrobakterien transformiert.

3.12.2 Expressionsanalyse der EYFP-LCL1- bzw. -LCL1(NESmut)-Pflanzen

Die BASTA selektierten T1-Pflanzen, die das 35S::YFP-LCL1 bzw. -LCL1(NESmut) Konstrukt besaßen, wurden einer Expressionsanalyse unterzogen, um festzustellen, welche Linien das eingebrachte Konstrukt am stärksten exprimierten. Die Reverse Transkription wurde mit 2 µg RNA und dem LCL1-spezifischen 3'-Primer X112-3'10 durchgeführt. Dieser wurde, zusammen mit dem YFP-spezifischen 5' Primer YFP-5'3, für die anschließende PCR-Reaktion verwendet, bei der 1/5 der RT-Reaktion als *template* eingesetzt wurde. Es wurden mindestens vier Linien pro Konstrukt mit dem stärksten PCR-Signal für die weitere Analyse ausgewählt.

3.12.3 LMB-vermittelte Hemmung des Exports von LCL1

Es wurde mit etiolierten Keimlingen gearbeitet, um die Chlorophyll-Fluoreszenz bei der Detektion der YFP-Fluoreszenz zu unterbinden. Hierfür wurden *A. thaliana*-Samen der T2-Generation, die in der T1-Generation eine starke Expression des eingebrachten Konstrukts aufgewiesen hatten, steril auf 1/2 MS-Platten ausgesät. Nach der Stratifikation (drei Tage bei 4°C) wurden die Keimlinge für fünf Tage im Dunkeln bei RT angezogen. Die Keimlinge wurden auf einem Objektträger, mit einem Deckgläschen abgedeckt, für 45 min mit 0,5 µM LMB in 2,7% EtOH im Dunkeln inkubiert. Kontrollexperimente wurden parallel mit 2,7% EtOH, ohne LMB durchgeführt. Die Lokalisation des YFP-Fusionsproteins wurde mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss), das mit einem EYFP-Filter ausgestattet war, detektiert. Die Aufnahme- und Bildbearbeitungsbedingungen waren für alle Aufnahmen gleich.

3.13 Analyse der LCL1 T-DNA Insertionslinien

Die Analyse der Pflanzen mit einer LCL1 T-DNA Insertion wurde mit der Linie Garlic_7_G06.b.1a.Lb3Fa von Syngenta (*Torrey Mesa Research Institute*, San Diego, USA) durchgeführt. Bei dieser Linie liegt die T-DNA innerhalb des Promotors von LCL1, 83 bp vor dem ATG Startcodon. Der LB3-Primer (*left border*) der T-DNA liest über das ATG hinweg in das LCL1 Gen hinein.

Die LCL1 T-DNA Insertionslinie von Syngenta wurde unter KT-Bedingungen angezogen. Aus Blättern dieser Pflanzen wurde mittels *Shorty Prep* genomische DNA isoliert und durch PCR analysiert. Dafür wurden verschiedene Primerkombinationen gewählt, um die Lage der T-DNA im Promotor von *LCL1* zu bestätigen, nämlich der T-DNA-spezifischer LB3-Primer (*left border*) mit einem genspezifischen 3'-Primer (X112-3'10) und ein T-DNA-spezifischer QRB3-Primer (*right border*) mit einem *upstream* liegenden promotorspezifischen 5'-Primer (X112-5'12). Die PCR-Produkte wurden durch Sequenzierungen mit den T-DNA-spezifischen Primern analysiert. Eine weitere PCR wurde mit dem promotorspezifischen 5'-Primer und einem genspezifische 3'-Primer (X112-3'10) durchgeführt, um die heterozygoten Pflanzen zu detektieren. Hier sollte bei

homozygoten Pflanzen kein PCR-Produkt entstehen, da die T-DNA eine Größe von über 7 kb besitzt und die Amplifikation kurzer Fragmente bei einer PCR deutlich bevorzugt wird.

Eine homozygote T-DNA Insertionslinie wurde mit *A. thaliana* Col-0 Pflanzen rückgekreuzt, um mögliche DNA-Rearrangements, die durch die T-DNA Insertion verursacht wurden, zu eliminieren. Die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Linien, die heterozygot für die T-DNA Insertion waren, wurden einer Selbstung unterzogen. Diese F₂-Pflanzen wurden abermals mit Hilfe von PCR analysiert und die Samen der homozygoten Pflanzen geerntet.

Die aus diesen Kreuzungen hervorgegangene homozygote LCL1 T-DNA Insertionslinie wurden phänotypisch analysiert und die Expression von *LCL1* durch RT-PCR untersucht. Die RT-Reaktion wurde mit 0,4 µg RNA und einem Oligo-dT-Primer durchgeführt. Für die anschließende PCR wurde jeweils 0,1 µg *template* (1/4 der RT-Reaktion) eingesetzt und die LCL1-spezifischen Primer X112-5'7 und LCL1-3'1 verwendet. Die Negativkontrolle wurde mit 0,1 µg RNA ohne vorherige RT als *template* durchgeführt.

3.14 RNA *interference* (RNAi)

Eine Methode, mit der man relativ schnell und einfach einzelne Gene unterdrücken kann, ist die RNA *interference* (RNAi). Sie ist eine Form des *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) und kann durch Einbringen doppelsträngiger RNA (dsRNA) in eine Zelle ausgelöst werden. dsRNA wird in Pflanzen von dem RNaseIII-ähnlichen Enzym *Dicer-like 1* (DCL1) in kurze Fragmente von 21-23 nt, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs), zerlegt, die dann in RNA-Protein-Komplexe namens *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut werden. Aktivierte RISCs enthalten eine kurze, einzelsträngige RNA, die den Komplex zum endogenen komplementären mRNA-Molekül leitet. Nach der Bindung an die homologe mRNA wird diese etwa zwölf Nukleotide vom 3'-Ende der siRNA entfernt geschnitten und so der Degradation zugeführt. Effizientes *gene silencing* in Pflanzen kann durch stabile Transformation mit Konstrukten erreicht werden, die für selbstkomplementäre „*hairpin*“ RNA (hpRNA) kodieren. hpRNAs bestehen aus zwei Kopien einer *target*-Sequenz in einer entgegengesetzten Orientierung,

sodass sich doppelsträngige RNA ausbilden kann. Die zueinander komplementären „Arme“ eines *hairpins* sind durch einen *spacer* oder *loop* voneinander getrennt und die Effizienz des *gene silencing* kann deutlich erhöht werden, wenn dieser *loop* durch eine funktionale Intronsequenz ersetzt wird (Wesley *et al.*, 2001).

3.14.1 Herstellen des RNAi-Konstrukts

Mit der RNAi-Methode hat man die Möglichkeit, durch das Einbringen eines Konstrukts in der Pflanze gleichzeitig mehrere Gene zu unterdrücken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, *gene silencing* der gesamten LCL-Familie zu induzieren. Dafür wurden Sequenzbereiche von *LCL1* - *LCL5* ausgewählt, die untereinander und zu anderen Genen keine Sequenzhomologien aufwiesen, sodass spezifisch nur die Expression diese fünf Gene unterdrückt werden konnte. Die 260 bp - 280 bp langen Fragmente wurden im pKS-Vektor *Smal/BamHI* hintereinanderkloniert. Diese gesamte Kasette wurde durch PCR amplifiziert und in den RNAi-Klonierungsvektor *pHannibal* (Wesley *et al.*, 2001) kloniert. Für die PCR wurde ein 5'-Primer verwendet, der eine *XhoI*- und eine *BamHI*-Schnittstelle besaß (*LCL1-5'4*), der 3'-Primer lieferte eine *ClaI* und eine *KpnI*-Erkennungssequenz (*LCL5-3'3*). So konnte das PCR-Produkt einmal *BamHI/ClaI* und in einem zweiten Klonierungsschritt *XhoI/KpnI* in *pHannibal* kloniert werden. Beide Fragmente waren nun in entgegengesetzter Orientierungen im Vektor vorhanden, getrennt von einem etwa 3 kb langen Intron und unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Die RNAi-Kasette mitsamt Intron, 35S-Promotor und Terminator konnte im folgenden Schritt mit Hilfe des Restriktionsenzym *NotI* in den binären Vektor *pART27* kloniert werden.

3.14.2 Herstellen und Analyse transgener RNAi-Pflanzen

Zunächst wurde der Agrobakterienstamm *GV3101* mit dem *pART27*-Konstrukt transformiert (Kap. 3.10.1). Die Vektorselektion erfolgte durch Spectinomycin, das in einer Konzentration von 50 µg/ml Medium und Platten zugesetzt war. Die Transformation von im LT angezogenen *A. thaliana* Col-0 Pflanzen erfolgte wie in

Kap. 3.10.2 beschrieben. Die Selektion der T1-Generation erfolgte unter sterilen Bedingungen auf 1/2 MS-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin. Die selektierten Keimlinge wurden nach etwa zwei Wochen auf Erde umgesetzt und im LT weitergezogen.

Mittels *Shorty-Prep* wurde aus ihnen DNA isoliert und durch PCR mit einem 35S-spezifischen 5'-Primer (p35S-5'1) und einem LCL5-spezifischen 3'-Primer (LCL5-3'3) das Vorhandensein des RNAi-Konstrukts kontrolliert. Die transgenen Linien wurden bis zur Samenreife weitergezogen, die Samen geerntet und die Pflanzen der T2-Generation phänotypischen Analysen unterzogen.

Außerdem wurde in diesen Pflanzen die Expression des RNAi-Konstrukts mit Hilfe einer RT-PCR von jeweils einer Pflanze pro Linie untersucht. Die RT-Reaktion wurde mit jeweils 0,4 µg RNA und einem Oligo-dT-Primer durchgeführt. Für die anschließende PCR wurde jeweils 0,1 µg *template* (1/4 der RT-Reaktion) eingesetzt und die LCL1-spezifischen Primer X112-5'7 und LCL1-3'1 verwendet.

3.15 Überexpression von LHY MYB-Proteinen *in planta*

Neben der phänotypischen Analyse von LCL1 T-DNA Insertionslinien sollten LCL1-überexprimierende Pflanzen generiert werden, um Informationen über die Funktion von LCL1 zu erlangen. Dabei wurde zum Einen das LCL1-Volllängen Protein bzw. dessen NES-Mutante (LCL1_{mut1}) unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *A. thaliana* überexprimiert und zum Anderen ein Teilprotein von LCL1, welches nur die MYB-Domäne enthielt und dessen C-terminaler Teil fehlte (AS 1-126). Außerdem wurden Pflanzen hergestellt, die LHY überexprimierten.

3.15.1 Überexpression von LCL1 und LCL1(NESmut)

Die Klonierung des Überexpressionskonstrukts wurde mit Hilfe des 35S::YFP-LCL1 Vektorkonstrukts durchgeführt. Hierfür wurde das YFP-LCL1 Fusionskonstrukt aus dem Vektor XmaI/XhoI ausgeschnitten und durch *LCL1* bzw. *LCL1(NESmut)* ersetzt. *LCL1* und *LCL1(NESmut)* wurden zuvor mit den Primern LCL1-5'5 und X112-31 durch PCR amplifiziert und XmaI/XhoI in den pKS-Vektor kloniert. Nach einem partiellen HindIII/SacI Verdau (siehe Kap. 3.1.3; *LCL1* besitzt

eine interne HindIII-Stelle) wurde die 35S::LCL1- bzw. die 35S::LCL1_{mut1}-Kassette in den pGPTV-BAR-Vektor kloniert und damit das *uidA* Gen ersetzt. Es folgte die Transformation chemokompetenter Agrobakterien (Kap. 3.10.1) und anschließend eine Transformation von *A. thaliana* (Kap. 3.10.2). Die T1-Pflanzen wurden mit BASTA selektiert. Transgenen T2-Pflanzen wurden dann mittels RT-PCR auf die Expression des Transgens untersucht. Die RT-Reaktion wurde mit 0,4 µg RNA und einem Oligo-dT-Primer durchgeführt. Für die anschließende PCR wurden jeweils 0,1 µg template (1/4 der RT-Reaktion) eingesetzt und die LCL1-spezifischen Primer X112-5'7 und LCL1-3'1 benutzt. Die Negativkontrolle wurde mit 0,1 µg RNA ohne vorherige RT als *template* durchgeführt.

3.15.2 Überexpression der MYB-Domäne von LCL1

Für die Klonierung der MYB-Domäne von *LCL1* wurde der 35S::YFP-LCL1-pGPTV Vektor XmaI/XhoI verdaut und das ausgeschnittene YFP-LCL1-Insert durch die MYB-Domäne von *LCL1* ersetzt. Diese wurde zuvor mit den Primern LCL1-5'5 und 3-MYB1 durch PCR amplifiziert und XmaI/XhoI in den pKS-Vektor kloniert. Mit dem 35S::MYB-pGPTV-Konstrukt wurden anschließend Agrobakterien transformiert (Kap. 3.10.1), um mit ihnen *A. thaliana* zu transformieren (Kap. 3.10.2). Die Pflanzen der T1-Generation wurden einer BASTA Selektion unterzogen.

3.15.3 Überexpression von LHY

Für die Klonierung der cDNA von *LHY* wurde die MYB-Domäne von *LCL1* XmaI/XhoI aus dem pGPTV-Vektor ausgeschnitten und durch die *LHY* cDNA ersetzt, die zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen aus dem pKS-Vektor gewonnen wurde. Mittels Agrobakterien-vermittelte Transformation (Kap. 3.10) wurde das 35S::LHY-pGPTV Konstrukt in *A. thaliana* eingebracht und die T1-Samen geerntet. Die T1-Pflanzen wurden im LT angezogen, einer BASTA Selektion unterzogen und die selektierten Pflanzen durch PCR mit den Primern p35S-5'1 und LHY-3'3 auf das Vorhandensein des eingebrachten Konstrukts untersucht. Die transgenen Pflanzen wurden phänotypischen Analysen

unterzogen und die Expression einiger Linien mittels RT-PCR untersucht. Die RT-Reaktion wurde mit 0,4 µg RNA und einem Oligo-dT-Primer durchgeführt, für die anschließende PCR wurden die LHY-spezifischen Primer LHY-5'2 und LHY-3'1 verwendet und 0,1 µg *template* (1/4 der RT-Reaktion) eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde mit 0,1 µg RNA ohne vorherige RT als *template* durchgeführt. Um zu untersuchen, ob eine veränderte *LCL1*-Transkriptmenge vorliegt, wenn LHY in Pflanzen überexprimiert wurde, wurden die RT-Reaktionen einer zweiten PCR unterzogen. Diesmal wurden die *LCL1*-spezifischen Primer X112-5'7 und LCL1-3'1 benutzt. Die transgenen Pflanzen wurden bis zur Samenreife weitergezogen und die Samen geerntet.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des nucleocytoplasmatischen Transports von LCL1

4.1.1 Interaktion von LCL1 mit XPO1 und Identifizierung der NES

Exportin1 (XPO1) aus *A. thaliana* ist ein Kernexportrezeptor, der den Export von Proteinen aus dem Kern vermittelt, die ein Leucin-reiches Kernexportsignal (NES) besitzen (Haasen *et al.*, 1999). Um neue Bindungspartner von XPO1 zu identifizieren, wurde ein Hefe *Two-Hybrid* (Y2H) *Screen* mit XPO1 als *bait* und einer *A. thaliana* cDNA Bank als *prey* durchgeführt (D. Haasen, 2001). Hierbei wurde unter anderem ein cDNA-Klon identifiziert, der bei Koexpression mit XPO1 im Y2H-System eine starke Transaktivierung des Reportergens β -Galaktosidase verursachte. Beim Sequenzieren dieser cDNA wurde eine hohe Sequenz-ähnlichkeit des Proteins mit den MYB1R-Proteinen LHY (*late elongated hypocotyl*) und CCA1 (*circadian clock associated1*) festgestellt. Daher wurde das abgeleitete Protein LCL1 (*LHY/CCA1-like1*) genannt. Zunächst wurde die Vollängen-cDNA mit den genspezifischen Primern X112-52 und X112-31 aus einer *A. thaliana* cDNA-Bank amplifiziert, da bei dem 2YH-*Screen* keine vollständige cDNA isoliert worden war (Kap. 3.1.11). Wie LHY und CCA1 besitzt auch LCL1 im N-terminalen Bereich eine MYB-Domäne, die aus einem MYB-Repeat besteht. C-terminal der MYB-Domäne schließt sich eine putative NLS an, die Ähnlichkeit mit der *monopartite* NLS des Simian-Virus 40 aufweist. Eine putative NES befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins.

Zunächst sollte die NES von LCL1 durch Deletions- und Mutationsanalysen lokalisiert werden. Von der Vollängen LCL1-cDNA wurden durch PCR mit verschiedenen genspezifischen Primern cDNA-Konstrukte hergestellt und die entsprechenden Teilproteine im Y2H-System auf Interaktion mit XPO1 getestet (Kap. 3.4). Die Interaktionen wurden auf Indikatorplatten, die das Substrat X-Gal besaßen, durch Blaufärbung der Hefe sichtbar gemacht.

Das LCL1-Volllängenprotein, LCL1(1-293), interagiert spezifisch mit XPO1. Eine Transaktivierung im Y2H-System konnte nur detektiert werden, wenn LCL1 mit XPO1 koexprimiert wurde aber nicht im Falle der Kontrolle, bei der LCL1 gegen den pGilda-Vektor alleine getestet wurde (Abb. 5A). Damit wurde gezeigt, dass LCL1 kein Transkriptionsaktivator ist, da es sonst selbstständig die Expression der β -Galaktosidase auslösen könnte. Zunächst wurde das N-terminal verkürzte LCL1(88-293), das im Y2H-Screen gefunden wurde, auf Interaktion mit XPO1 getestet. Es fand eine starke Transaktivierung statt (Abb. 5B). Durch eine weitere Verkürzung des N-Terminus wurde LCL1(117-293) hergestellt, das weiterhin eine Interaktion mit XPO1 aufwies (Abb. 5C). Ein C-terminal verkürztes LCL1(1-244) wies im Y2H-System bei Koexpression mit XPO1 keine Transaktivierung mehr auf (Abb. 5D). Ein N- und C-terminal verkürztes LCL1(117-244) zeigte ebenfalls keine Interaktion mit XPO1 mehr (Abb. 5E). Diese Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass der C-terminale Teil von LCL1 die Interaktion mit XPO1 stark beeinflusst, da die Deletion der letzten C-terminalen 49 Aminosäuren (AS) dazu führt, dass LCL1 nicht mehr mit XPO1 interagieren konnte. Im Folgenden wurde daher nur der C-Terminus durch Mutationen untersucht. Bei LCL1(117-258) konnte eine leichte Transaktivierung im Hefesystem festgestellt werden (Abb. 5F). Das kurze Peptid LCL1(254-293) verursachte bei Koexpression mit XPO1 im Y2H-System ebenfalls eine leichte Transaktivierung (Abb. 5G).

Um die NES exakt zu lokalisieren, wurden in den nächsten sechs LCL1 Proteinen auf Basis des Volllängen-Proteins sukzessiv einzelne basische AS zu Alanin ausgetauscht und diese mutierten Proteine im Y2H-System gegen XPO1 getestet. In LCL1mut1 wurden die AS Isoleucin an Position 153 und Phenylalanin an Position 255 gegen Alanin ausgetauscht. Bei Koexpression von LCL1mut1 mit XPO1 fand noch immer eine Transaktivierung in Hefe statt (Abb. 5H). Daraufhin wurden in LCL1mut2 die beiden AS Leucin an Position 265 und Valin an Position 267 zu Alanin ausgetauscht. Auch hier konnte eine Aktivierung des Reportergens bei Koexpression mit XPO1 festgestellt werden (Abb. 5I). In LCL1mut3 waren die vier Aminosäureaustausche miteinander kombiniert. Auch dieses Protein konnte noch mit XPO1 interagieren (Abb. 5J). Auf Basis von LCL1mut1 wurden zwei weitere AS durch Alanin ersetzt: Leucin an Position 247 und Methionin an Position 250. Es entstand LCL1mut4, welches bei Koexpression mit XPO1 eine deutliche

Transaktivierung des Reportergens verursachte (Abb. 5K). Wurden zusätzlich drei weitere AS, Leucin an Position 265, Valin an Position 267 und Leucin an Position 269, durch Alanin ausgetauscht, konnte die Aktivierung der β -Galaktosidase bei Koexpression von LCL1mut5 mit XPO1 deutlich herabgesetzt werden (Abb. 5L).

Insgesamt mussten elf AS von LCL1 punktmutiert werden, um die Interaktion mit XPO1 vollständig zu unterbinden (Abb. 5M). LCL1(NESmut) besaß folgende Aminosäureaustausche: L247A, M250A, I253A, F255A, V258A, L259A, L260A, L261A, L265A, V267A, L269A. Die NES von LCL1 verläuft demzufolge von AS 247 bis AS 269. Wurde der Vektor pB42 alleine gegen XPO1 oder gegen den leeren pGilda Vektor getestet, fand keine Transaktivierung im Hefesystem statt (Abb. 5N).

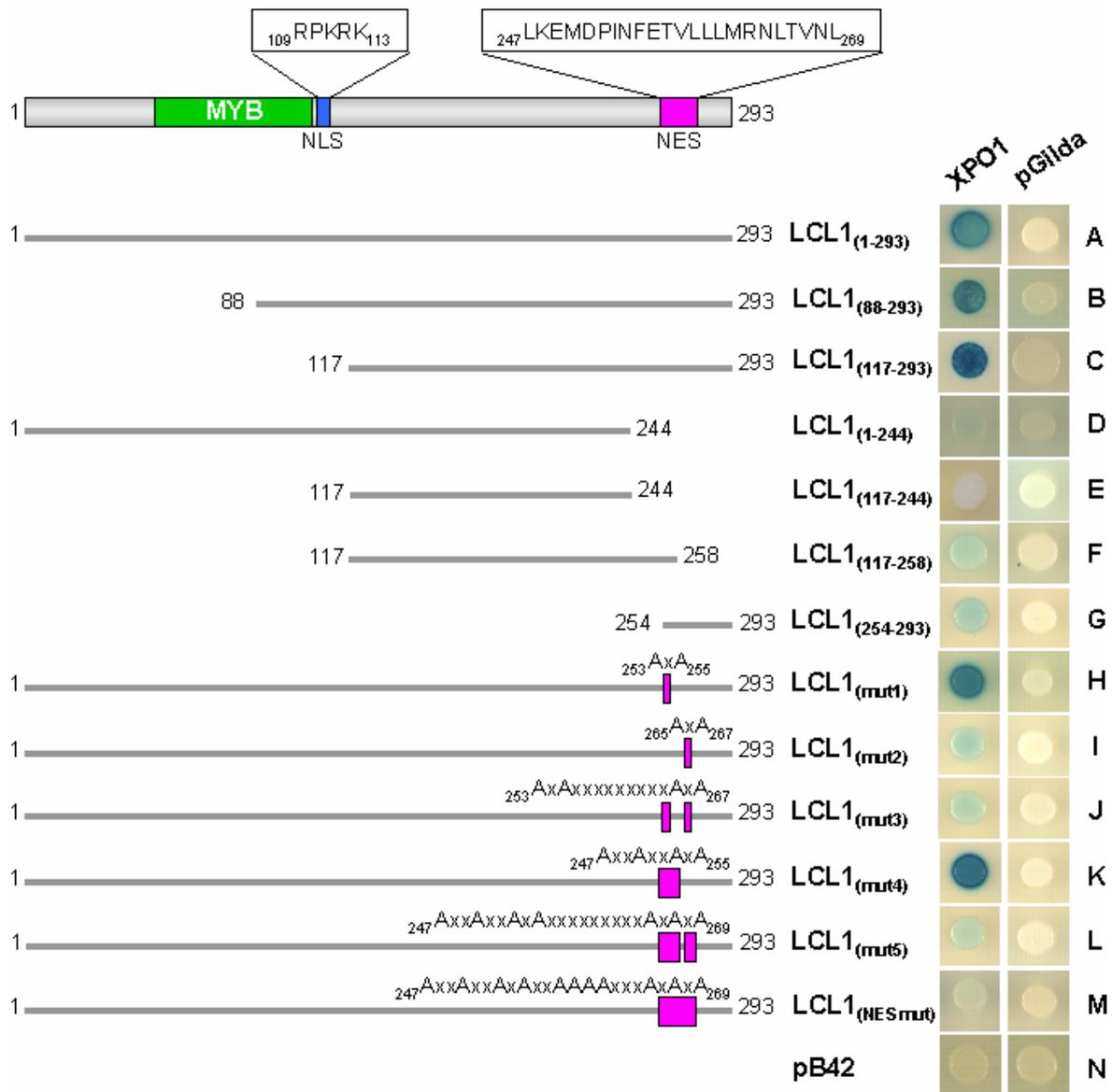


Abb. 5: Deletions- und Mutationsanalysen von LCL1. Interaktion im Y2H-System mit XPO1 auf Indikatorplatten.

Unterschiedliche cDNA-Fragmente von *LCL1* wurden in den Vektor pB42AD kloniert. Die Fusionsproteine mit der B42-Aktivierungsdomäne wurden auf Interaktion mit XPO1 durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet. XPO1 war mit der LexA-Bindedomäne im Vektor pGilda fusioniert, welche an die LexA-Operatoren, die sich vor dem *lacZ*-Gen befinden, binden kann. Interaktion der Fusionsproteine führte zur Transkription des *lacZ*-Gens, wodurch β -Galaktosidase synthetisiert wurde. Diese spaltet das Substrat X-Gal, was zu einer Blaufärbung der Hefekolonien führte. Mit pGilda bzw. pB42 sind die Vektorkontrollen bezeichnet. Die Struktur von LCL1 mit den entsprechenden Domänen ist in der Abbildung ganz oben gezeigt, die Ziffern entsprechen AS-Positionen.

4.1.2 Quantitative Analyse der β -Galaktosidase Aktivität

Um die im Y2H-System auf Indikatorplatten gezeigten Interaktionen von verschiedenen LCL1-Konstrukten mit XPO1 zu quantifizieren, wurde ein ONPG-Assay durchgeführt, in dem die entsprechend transformierten Hefezellen in Flüssigkultur angezogen und induziert wurden (Kap. 3.4.4). Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde anschließend in Extrakten von Hefezellen photometrisch gemessen. Die β -Galaktosidase-Aktivität der Interaktion von LCL1 und XPO1 wurde hierbei auf 100% gesetzt und alle weiteren Interaktionen damit in Relation gebracht.

Abb. 6-3 und -5 zeigt, dass die C-terminale Verkürzung LCL1(1-244), wie auch die NES-Mutante LCL1(NESmut) nur etwa 5% der β -Galaktosidase-Aktivität der Interaktion von LCL1 mit XPO1 (Abb. 6-1) erreichten. Diese Werte befanden sich selbst unter den Werten der Negativkontrolle des pB42-Vektors alleine mit XPO1 (Abb. 6-7). Der ONPG-Assay bestätigte die Ergebnisse der Y2H-Analyse auf Indikatorplatte und war ein Maß für die relative Stärke der Interaktionen.

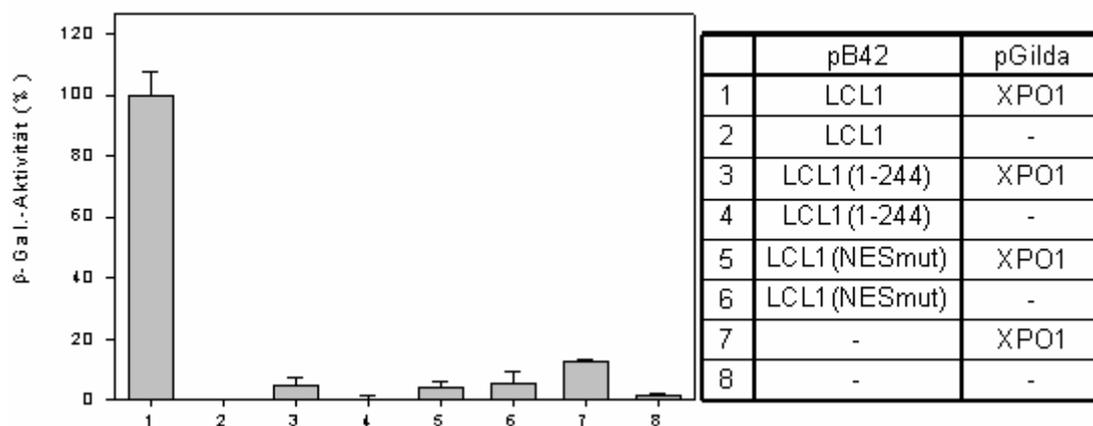


Abb. 6: Quantifizierung der Interaktionsexperimente im Y2H-System. Relative β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion der LCL1-Konstrukte mit XPO1. Die Tabelle gibt die Plasmid-Kombinationen an, mit denen der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert wurde. (1, 3, 5, 7) Interaktion der LCL1-Konstrukte mit XPO1. (2, 4, 6, 8) Negativkontrollen der LCL1-Konstrukte gegen den leeren pGilda-Vektor. Für jeden Interaktionstest wurde der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwerts von sechs Messungen berechnet. Die Zahlen unter dem Balkendiagramm entsprechen der Numerierung in der Tabelle. Die prozentualen Werte der β -Galaktosidaseaktivität sind zur Interaktion von LCL1 mit XPO1 in Relation gesetzt, welche 100% beträgt.

4.1.3 Lokalisation von GFP-LCL1 Proteinen und Identifizierung der NLS

Für die Analyse des Kernexports und -imports von LCL1, wurde die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in BY-2 Tabakprotoplasten mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops untersucht (Kap. 3.7). Alle cDNAs, deren kodierte Teilproteine im Y2H-System getestet wurden, wurden auch im Protoplastensystem analysiert. Sie wurden in einen Vektor kloniert, der die GFP-cDNA bzw. Chalconsynthase-GFP (CHS-GFP)-cDNA beinhaltet. In den Protoplasten kommt es zur Expression von Fusionsproteinen, die aus (CHS-) GFP und den kodierten Proteinen der entsprechenden cDNA bestehen. Der CHS-GFP-Vektor wurde genutzt, wenn die Größe des fusionierten Proteins weniger als 20 kDa betrug. Durch Fusion mit der Chalkonsynthase wurde die molekulare Masse des Proteins vergrößert, um die im transienten Expressionssystem beobachtete Diffusion von GFP-Fusionsproteinen soweit wie möglich zu unterbinden. Da die Chalconsynthase selbst kein Lokalisationssignal besitzt, beeinflusst sie nicht die Lokalisation des Fusionsproteins (Haasen *et al*, 1999).

Das an GFP fusionierte LCL1-Volllängenprotein befand sich gleichmäßig verteilt zwischen Kern und Cytoplasma (Abb. 7A). Die N-terminale Verkürzung LCL1(88-293) war ebenfalls in beiden Kompartimenten zu finden (Abb. 7B). Bei weiterer Verkürzung des N-Terminus befand sich das GFP-Fusionsprotein mit LCL1(117-293) ausschließlich im Cytoplasma (Abb. 7C), was darauf schließen ließ, dass diesem Protein die NLS fehlte. Wurde ausgehend von diesem Protein zusätzlich der die NES enthaltende C-Terminus deletiert, zeigte das Fusionsprotein mit LCL1(117-244) wieder eine Gleichverteilung der grünen Fluoreszenz zwischen Kern und Cytoplasma (Abb. 7D). Das von beiden Seiten noch weiter verkürzte Protein LCL1(127-222) befand sich ebenfalls in beiden Kompartimenten (Abb. 7E). Verkürzte man allerdings nur den C-Terminus, war das Fusionsprotein mit LCL1(1-244) ausschließlich im Kern lokalisiert (Abb. 7F).

Da die Deletion der N-terminalen 116 AS zu einer Lokalisation des GFP-Fusionsproteins im Cytoplasma führte (Abb. 7C), das Protein, dem die N-terminalen 87 AS fehlten aber gleichverteilt in der Zelle vorlag, konnte davon ausgegangen werden, dass der N-terminale Teil zwischen AS 88 und AS 117 die

NLS enthält. Darum wurden in diesem Bereich zwei basische AS (K111N, R112N) punktmutiert (LCL1(NLSmut)). Im Gegensatz zur NES-Mutation LCL1(NESmut), deren GFP-Fusionsprotein ausschließlich im Kern zu finden war (Abb. 7G), konnte durch diese Sequenzveränderungen der aktive Transport des Volllängenproteins in den Kern unterbunden werden (Abb. 7H). Das GFP-LCL1(NLSmut)-Fusionsprotein befand sich ausschließlich im Cytoplasma. Durch diese Analysen wurde davon ausgegangen, dass die NLS von LCL1 die AS 109 bis AS 113 umspannt (Abb. 7I).

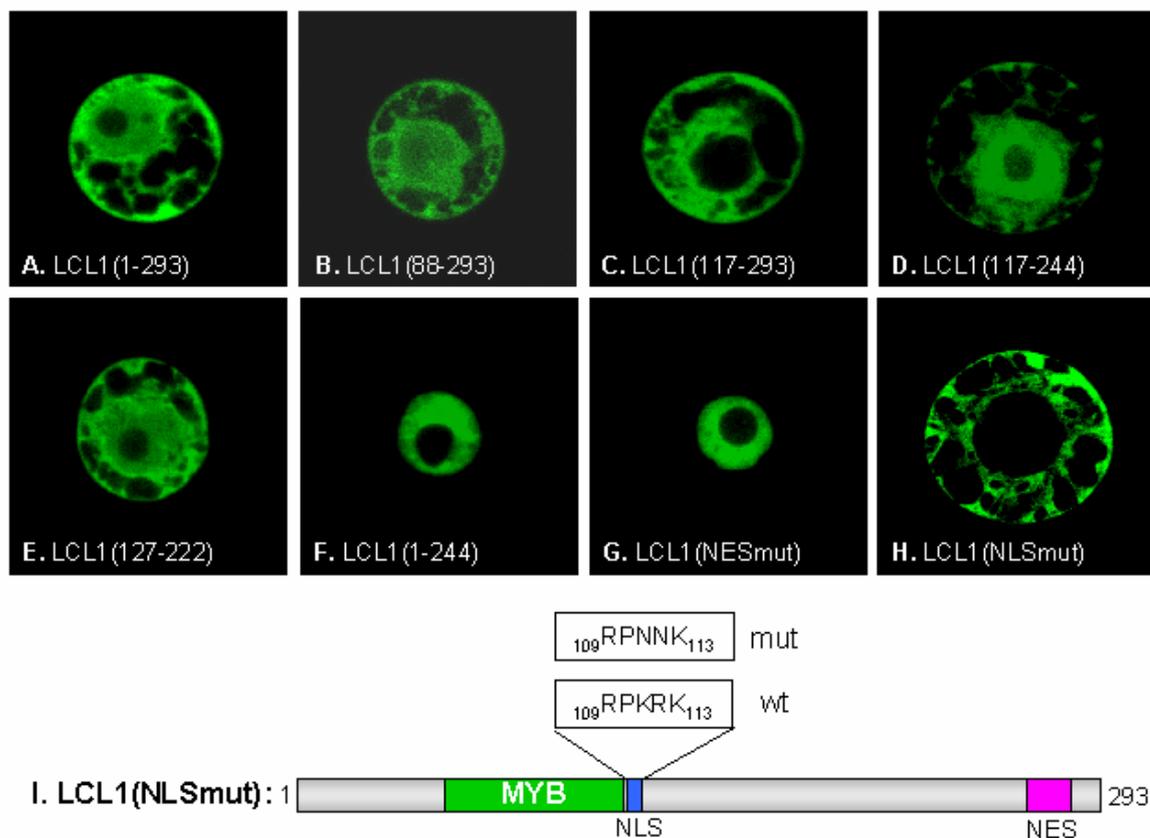


Abb. 7: *In vivo* Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in BY-2 Protoplasten.

BY-2 Protoplasten wurden transient mit Konstrukten für GFP-Fusionsproteine transfiziert und die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Repräsentative Aufnahmen von (A) GFP-LCL1; (B) GFP-LCL1(88-293); (C) GFP-LCL1(117-293); (D) GFP-LCL1(117-244); (E) GFP-LCL1(127-222); (F) GFP-LCL1(1-244); (G) GFP-LCL1(NESmut); (H) GFP-LCL1(NLSmut); (I) Struktur der NLS-Mutante von LCL1, die Ziffern entsprechen AS-Positionen. Oben ist die mutierte NLS angezeigt (mut), unten die NLS des Wildtyp (wt)-Proteins.

4.1.4 Analyse des Kernexports von LCL1 *in planta*

Der durch XPO1 vermittelte Kernexport von Proteinen wird spezifisch durch Leptomycin B (LMB) gehemmt. Es konnte gezeigt werden, dass LMB *in vitro* humanes XPO1 kovalent modifiziert (Kudo *et al.*, 1999) und auch in Pflanzenzellen konnte nachgewiesen werden, dass LMB spezifisch den Kernexport von Proteinen, die eine NES besitzen, hemmt (Haasen *et al.*, 1999).

Um zu analysieren, ob der Kernexport von LCL1 *in planta* tatsächlich durch XPO1 vermittelt wird, wurden transgene *A. thaliana* Pflanzen hergestellt, die ein YFP-LCL1- bzw. YFP-LCL1(NESmut)-Fusionsprotein überexprimierten (Kap. 3.12). Mit Hilfe der YFP-Fusion konnte die Lokalisation von LCL1 in der Zelle sichtbar gemacht werden. Bei einer LMB vermittelten Hemmung des Exports von LCL1 sollte sich das YFP-Fusionsprotein nur noch im Kern befinden.

4.1.4.1 Expressionsanalyse der YFP-LCL1/LCL1(NESmut)-Pflanzen

Es wurden zwölf T1-Linien von *A. thaliana*, die mit dem YFP-LCL1-Konstrukt und 28 T1-Linien von *A. thaliana*, die mit dem YFP-LCL1(NESmut)-Konstrukt transformiert waren, auf die Expression des eingebrachten Transgens untersucht. Es sollte festgestellt werden, welche Linien das eingebrachte Transgen am stärksten exprimierten. Hierfür wurde eine Reverse Transkription (RT) mit einem genspezifischen 3'-Primer durchgeführt, der daraufhin zusammen mit einem YFP-spezifischen 5'-Primer für die anschließende PCR-Reaktion benutzt wurde. Es wurde bei beiden Konstrukten ein Fragment mit der Größe von etwa 550 bp erwartet. Zur Kontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen eine PCR mit RNA ohne vorherige RT durchgeführt. Hier wurde keine Bande erwartet.

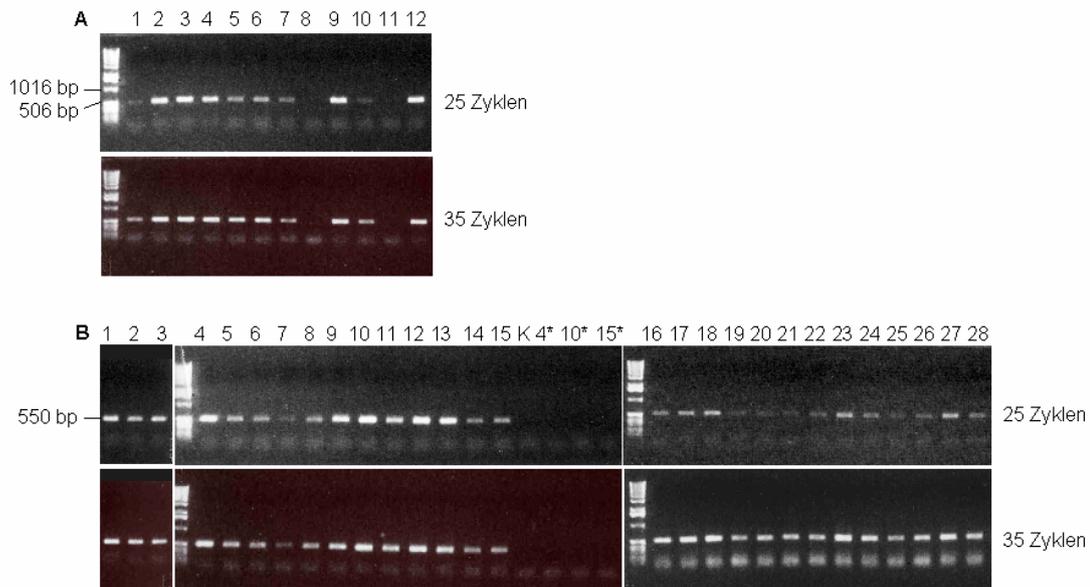


Abb. 8: Expressionsanalyse der YFP-LCL1- und YFP-LCL1(NESmut)-Konstrukte.

(A) RT-PCR mit RNA aus 12 transgenen Linien, die mit dem 35S::YFP-LCL1-Konstrukt transformiert waren.

(B) RT-PCR mit RNA aus 28 transgenen Linien, mit dem 35S::YFP-LCL1(NESmut)-Konstrukt.

(K) Negativkontrolle mit RNA von Linie 9 aus (A), ohne vorherige RT.

(4*, 10*, 15*) Negativkontrollen mit RNA von Linien 4, 10 und 15 aus (B), ohne vorherige RT. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einem YFP-spezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach 25 und 35 Zyklen wurden jedem PCR-Ansatz 10 µl entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert.

In Abb. 8 ist die Auftrennung der PCR-Fragmente und die der Kontrollen in einem Agarosegel gezeigt. Bei zehn der zwölf YFP-LCL1 Linien konnte ein DNA-Fragment der erwarteten Größe nach 25 Zyklen detektiert werden, bei Linie 8 und Linie 11 war selbst nach 35 Zyklen kein Signal nachzuweisen (Abb. 8A). DNA-Fragmente der Linien 1, 7 und 10 waren zwar sowohl nach 25 als auch nach 35 Zyklen zu sehen, aber immer deutlich schwächer als Fragmente der übrigen Linien. Für die Negativkontrolle wurde RNA der Linie 9 ohne vorherige RT für die PCR eingesetzt. Im Gel konnte keine Bande detektiert werden (Abb. 8B-K).

Bei allen 28 YFP-LCL1(NESmut)-Linien waren nach 25 Zyklen Signale im Gel zu detektieren (Abb. 8B). Von den Linien 19-21 und 25 waren nach 25 Zyklen kaum DNA-Fragmente im Gel nachweisbar, nach 35 Zyklen waren eindeutig Fragmente vorhanden. Besonders stark exprimierende Linien waren 1, 4, 9, 10, 12, 13, 16-18, 23 und 27, bei ihnen konnte ein deutliches Signal im Gel nachgewiesen werden. Für die Negativkontrollen wurde RNA der Linien 4 (Abb. 8B-4*), 10 (Abb. 8B-10*)

und 15 (Abb. 8B-15*) ohne vorherige RT für die PCR eingesetzt, im Gel konnten keine Signale detektiert werden. Die Linien 3, 4, 6 und 9 der Pflanzen, die das YFP-LCL1-Fusionsprotein und die Linien 4, 10, 12, 16 und 18 der Pflanzen, die das YFP-LCL1(NESmut)-Fusionsprotein überexprimierten, wurden bis zur Samenreife weitergezogen. Die Samen wurden geerntet und die etiolierten Keimlinge der T2-Generation mikroskopisch analysiert.

4.1.4.2 LMB-Experiment

Hier sollte *in planta* untersucht werden, ob der Export von LCL1 XPO1-abhängig verläuft. LMB besitzt die Fähigkeit, XPO1 kovalent zu modifizieren und kann somit den Kernexport von Proteinen hemmen. Darum wurde erwartet, dass auch der Export von LCL1 verhindert wird, wenn Keimlinge mit LMB inkubiert werden. Das YFP-LCL1-Fusionsprotein sollte sich nur noch im Kern befinden.

Etiolierte Keimlinge der T2-Generation der ausgewählten *A. thaliana*-Linien wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop mit EYFP-Filter analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sich bei Linie 4, die das YFP-LCL1-Konstrukt überexprimierte, die YFP-Fluoreszenz sowohl im Kern als auch im Cytoplasma befand (Abb. 9A). Der Kern und ein Cytoplasmasaum nahe der Plasmamembran waren deutlich zu erkennen. Wurden diese Keimlinge mit LMB inkubiert, verlagerte sich die Lokalisation des YFP-LCL1-Fusionsproteins in den Kern (Abb. 9B). Diese LMB-behandelten YFP-LCL1-Keimlinge zeigten die gleiche Lokalisation der grün-gelben Fluoreszenz wie unbehandelte Keimlinge, die ein YFP-LCL1(NESmut)-Fusionsprotein überexprimierten (Linie 10), das konstitutive Kernlokalisierung zeigte (Abb. 9C).

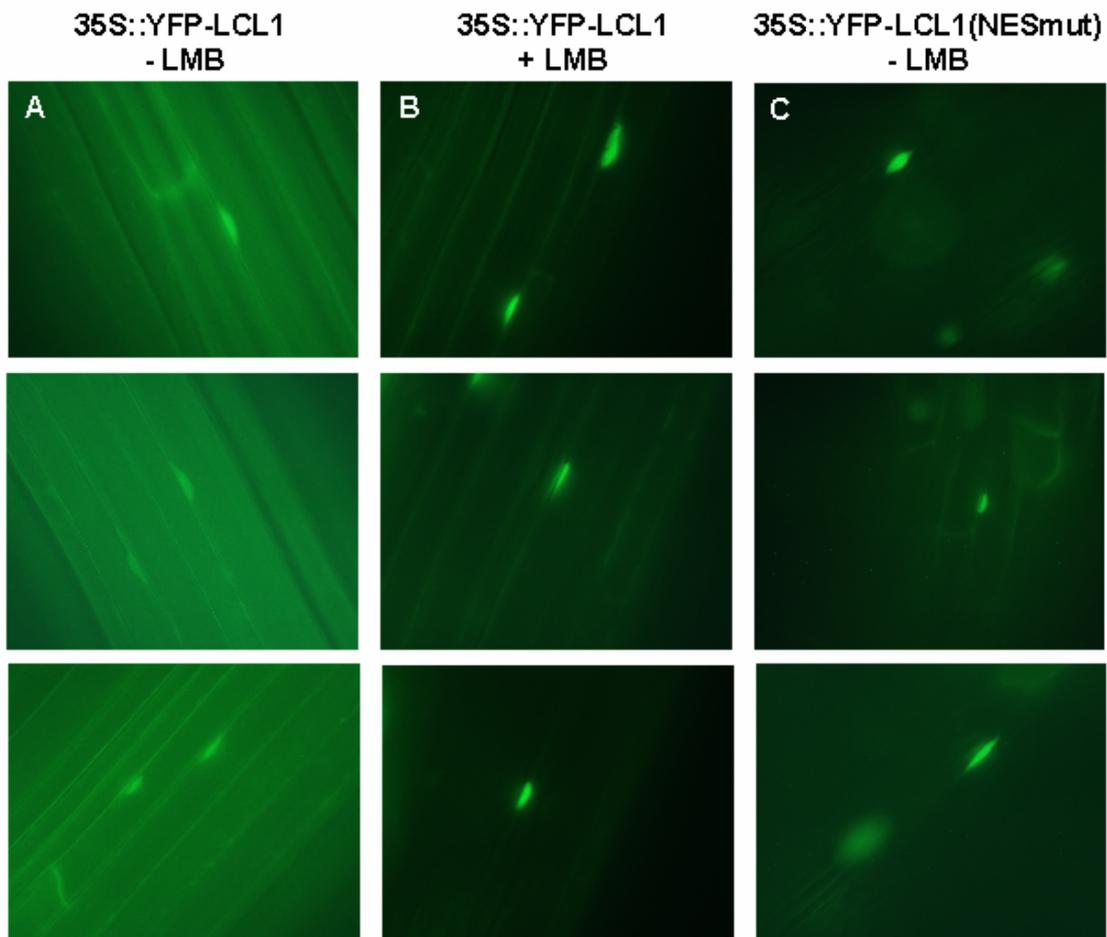


Abb. 9: Hemmung des LCL1 Exports durch Leptomycin B (LMB) *in planta*. Epifluoreszenzaufnahmen transgener, etiolierter Keimlinge, die das YFP-LCL1 Fusionsprotein (A, B) bzw. das YFP-LCL1(NESmut) Fusionsprotein (C) überexprimierten. Das Mikroskop war mit einem EYFP-Filter ausgestattet. Es werden jeweils drei repräsentative Bilder gezeigt. In (B) wurden die Keimlinge für 45 min mit 0,5 mM LMB (in 2,7% EtOH) inkubiert, in (A) und (C) mit 2,7% EtOH ohne LMB.

4.2 Sequenzvergleich der LHY MYB Familie

LCL1 gehört zu einer Gruppe von elf MYB1R Proteinen, die wir als „LHY MYB Familie“ bezeichneten (Abb. 10). Alle Mitglieder dieser Gruppe besitzen eine MYB-Domäne mit einem MYB-Repeat und weisen in diesem Bereich eine hohe Similarität untereinander auf.

Die LHY MYB Familie kann in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die LCL-Proteinfamilie stellt mit fünf Mitgliedern die größte Untergruppe dar. Sie besteht aus LCL1, LCL2, LCL3, LCL4 und LCL5.

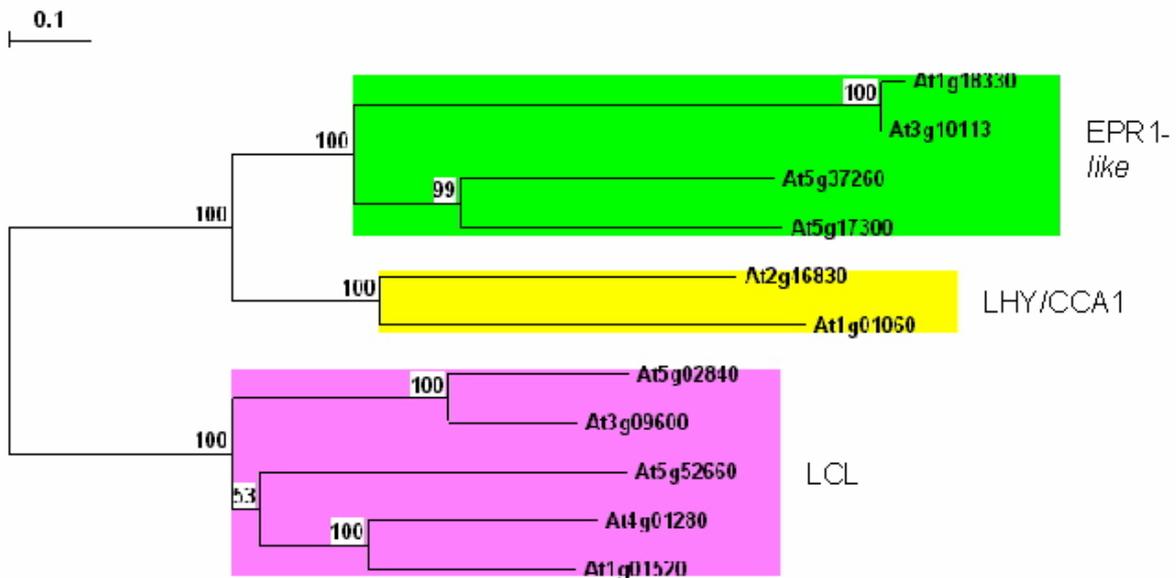


Abb. 10: Phylogenetischer Stammbaum der LHY MYB Familie.

Verwendet wurden die Algorithmen von CLUSTAL W (Thomson *et al.*, 1994) und *TreeCon* (Van de Peer, Yves, Belgien). Der Sequenzvergleich wurde mit den Vollängenproteinen durchgeführt. Die EPR1-like Untergruppe besteht aus EPR1 (At1g18330), EPR1-like1 (At3g10113), EPR1-like2 (At5g37260) und EPR1-like3 (At5g17300). LHY (At1g01060) und CCA1 (At2g46830) bilden eine eigene Untergruppe. Die Untergruppe der LCL-Proteine besteht aus: LCL1 (At5g02840), LCL2 (At5g52660), LCL3 (At1g01520), LCL4 (At4g01280) und LCL5 (At3g09600). Die phylogenetische Distanz wurde nach Tajima und Nei (1984) kalkuliert. Insertionen und Deletionen wurden mitberücksichtigt. Die *bootstrap* Werte wurden aus 100 Berechnungen erstellt, die Topologie des Stammbaums ergab sich aus der *neighbour joining* Methode (Saitou und Nei, 1987).

Die beiden *Clock*-Proteine bilden eine eigene Untergruppe mit den Proteinen LHY und CCA1. Innerhalb ihrer MYB-Domäne weisen sie eine hohe Similarität zu den übrigen LHY MYB Proteinen auf. Im C-terminalen Teil sind sie sich nur untereinander ähnlich, es finden sich keine Sequenzhomologien zu anderen Mitgliedern der LHY MYB Familie. Auch ihre Größe unterscheidet sie deutlich von den LCL-Proteinen. Während die LCL-Proteine eine Länge zwischen 282 AS (LCL5) und 330 AS (LCL2) besitzen, sind LHY mit 645 und CCA1 mit 608 AS ungefähr doppelt so groß.

EPR1 (Kuno *et al.*, 2003) ist ein Protein der dritten Untergruppe (EPR1-like Proteinfamilie), die aus vier Mitgliedern besteht: EPR1, EPR1-like1, EPR1-like2 und EPR1-like3. Abgesehen von der MYB-Domäne, besitzt auch diese Untergruppe keine Homologie zu den LCL-Proteinen. Die Proteine sind allerdings von ähnlicher Länge, EPR1 besteht aus 246 AS.

Die MYB-Domäne aller elf MYB1R-Proteine und daran angrenzende Bereiche wurde als „LHY MYB *family* Domäne“ bezeichnet. Sie reicht in LCL1 von AS 37 bis AS 124, enthält die MYB-Domäne (AS 48-93) und wird von zwei basischen Bereichen flankiert, die in allen LHY MYB Proteinen ähnlich sind, sowie einer Prolin-reichen Sequenz, die C-terminal der MYB-Domäne liegt (Abb. 11). Im basischen Bereich hinter der MYB-Domäne von LCL1 befindet sich die NLS (AS 109-113). Die Sequenz der NLS ist in allen LHY MYB Proteinen identisch.

Die LHY MYB *family* Domäne weist zwischen LHY und CCA1 eine Identität von 95,6% auf. Die LCL-Familie besitzt ebenfalls eine sehr ähnliche LHY MYB *family* Domäne. Die Similarität innerhalb dieser Domäne zu LHY reicht von 75,6% in LCL3 zu 82,2% in LCL5. Auch zur dritten Untergruppe, der EPR1-*like* Proteinfamilie, besteht eine hohe Similarität innerhalb der LHY MYB *family* Domäne. Zwischen EPR1 und LHY beträgt sie 91,1%.

Die MYB-Domäne der LCL-Proteinfamilie ist in die sogenannte SHAQKYF Klasse einzuordnen. Dieses Motiv aus sieben AS tritt am C-terminalen Ende der MYB-Domäne auf (Lu *et al.*, 2002). Bei den *Clock*-Proteinen und bei den EPR1-*like* Proteinen ist dieses Motiv zu SHAQKFF modifiziert.

```

LHY      : KARKPYTIKQERWTEDEHERFLEALRLYGRAWRRIEHEVGTCTAVQIRSHAQKFFTKLDEAEVKGIPVQCALDIEIPPPRPKRRPNTIPYPRK
CCA1     : KTRKPYTIKQERWTEDEHNRFLAALRLYGRAWRRIEHEVGTCTAVQIRSHAQKFFSKVWEAEAKGVAMGQALDIAIPPPRPKRRPNNIPYPRK
LCL1     : KVRKPYTIKKSRESUTECEHDKFLEALCLFDRDWKRIEDFVGSKTWVQIRSHAQKYFLKVOQNG-----TLAH---VPPRPKRRRAHPYPRK
LCL2     : KTRKPYTIKKSRESUTEPEHDKFLEALCLFDRDWKRIEAFVGSKTWVQIRSHAQKYFLKVOQSG-----TGEH---LPPRPKRRRAHPYPRK
LCL3     : KVRKPYTIKKSRESUTECEHDKFLEALCLFDRDWKRIEAFVGSKTWVQIRSHAQKYFLKVOQNG-----TKEH---LPPRPKRRRAHPYPRK
LCL4     : KTRKPYTIKKSRENWTDCEHDKFLEALCLFDRDWKRIEAFVGSKTWVQIRSHAQKYFLKVOQSG-----ANEH---LPPRPKRRRAHPYPRK
LCL5     : KVRKPYTIKKSRESUTEPEHDKFLEALCLFDRDWKRIEDFVGSKTWVQIRSHAQKYFLKVOQNG-----TLAH---VPPRPKRRRAHPYPRK
AT1G18330 : KVRKPYTVKQERKUSEEHRFLAALRLYGRGWRCIQEHICTKAVQIRSHAQKFFSKMAQEAADSRSEGSVKA--IVPPRPKRRRAHPYPRK
AT3G10113 : KVRKPYTVKQERKUSEEHRFLAALRLYGRGWRCIQEHICTKAVQIRSHAQKFFSKMAQEAADSRSEGSVKA--IVPPRPKRRRAHPYPRK
AT5G37260 : KTRKPYTIKQERKUTEAEHEKRFVEALRLYGRAWRRIEHEVGTCTAVQIRSHAQKFFTKVARDF----GVSSSE--IEIPPPRPKRRPNTIPYPRK
AT5G17300 : KVRKPYTIKQERWTEDEHKKRFVEALRLYGRAWRRIEHEVGSKTAVQIRSHAQKFFSKVARDFATGGDGSSEVPEP--IVIPPPRPKRRRAHPYPRK

```

Abb. 11: Sequenzvergleich der LHY MYB *family* Domäne.

Der Sequenzvergleich innerhalb der LHY MYB *family* Domäne der Proteine LHY, CCA1, LCL1-LCL5, EPR1 (At1g18330), EPR1-*like*1 (At3g10113), EPR1-*like*2 (At5g37260) und EPR1-*like*3 (At5g17300) aus *A. thaliana* wurde mit dem Programm CLUSTAL W angefertigt. Um den Grad der Similarität zwischen den Sequenzen zu verdeutlichen, wurden ähnliche Sequenzen in *GeneDoc* hervorgehoben (schwarz = 100%, dunkelgrau = 80-100%, hellgrau = 60-80%). Die MYB-Domäne ist mit einem schwarzen Balken hervorgehoben, der graue Balken kennzeichnet die NLS. Am C-terminalen Ende der MYB-Domäne befindet sich das hochkonservierte SHAQK(Y/F)F-Motiv.

Eine Gemeinsamkeit der LCL-Proteine ist die charakteristische LCL-Domäne. Sie liegt im C-terminalen Bereich, reicht bei LCL1 von AS 223-272 (Abb. 12) und enthält die NES (AS 244-269) und einen weiteren konservierten Bereich aus 16 AS, der sich N-terminal der NES befindet (AS 223-238).

Abb. 12 stellt den Vergleich der Aminosäuresequenzen innerhalb der LCL-Vollängenproteine dar:

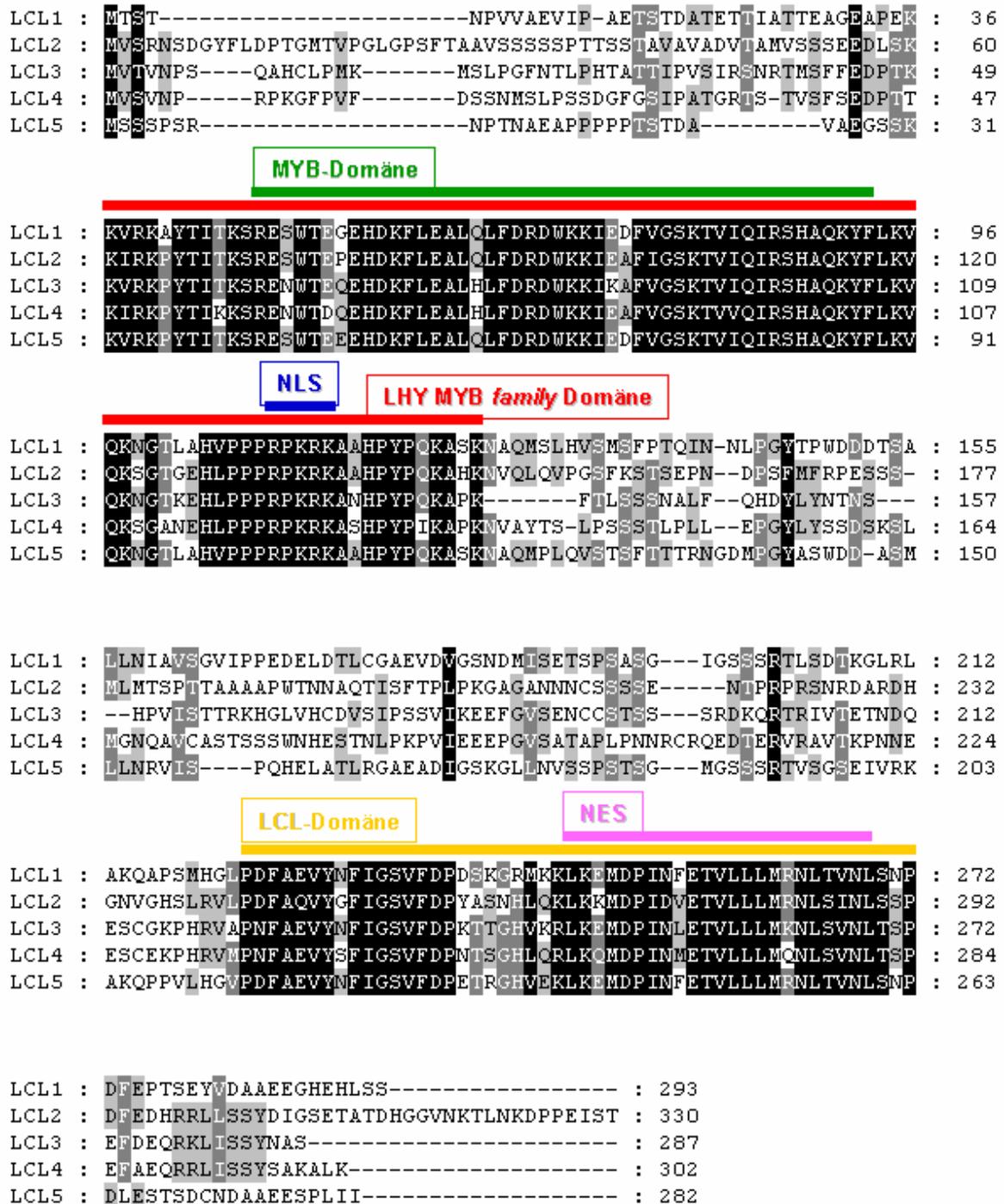


Abb. 12: Sequenzvergleich der LCL-Vollängenproteine.

Der Sequenzvergleich der LCL-Proteine LCL1-LCL5 aus *A. thaliana* wurde mit dem Programm CLUSTAL W angefertigt. Um den Grad der Similarität zwischen den Sequenzen zu verdeutlichen, wurden ähnliche Sequenzen in *GeneDoc* hervorgehoben (schwarz = 100%, dunkelgrau = 80%, hellgrau = 60%). Die LHY MYB *family* Domäne ist durch einen roten Balken gekennzeichnet und reicht von AS 37-124 in LCL1, sie enthält die MYB-Domäne (AS 48-93, grüner Balken) und die NLS (AS 109-113, blauer Balken). Ein gelber Balken markiert die LCL-Domäne, die in LCL1 von AS 223-272 reicht. Die NES umspannt in LCL1 die AS 247-269 (pinkfarbener Balken).

4.3 Bindung der LHY MYB Proteinfamilie an das *evening element*

CCA1 und LHY spielen eine bedeutende Rolle bei der circadianen Uhr von *A. thaliana*. Die konstitutive Überexpression beider Gene stört die Rhythmik vieler circadian regulierter Prozesse (Wang und Tobin, 1998; Schaffer *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass CCA1 und LHY für die negative Regulation von TOC1 verantwortlich sind, da sie direkt an ein funktional wichtiges Element im TOC1-Promotor binden können (Alabadí *et al.*, 2001). Dieses sogenannte *evening element* (EE) wurde in der Promotorregion von 31 circadian regulierten Genen (*evening genes*) gefunden, deren Expression am Abend maximal ist (Harmer *et al.*, 2000). Die Bedeutung des *evening elements* für die circadiane Regulation wurde am Beispiel von CCR2/GRP7 *in vivo* untersucht (Staiger and Apel, 1999). Alabadí *et al.* (2001) zeigten, dass eine Mutation des *evening elements* eine starke Reduktion der circadianen Rhythmik zur Folge hat.

4.3.1 Hefe *One-Hybrid* Analyse

Das *evening element* wurde in drei Tandemkopien zusammen mit dem Reporter gen *LacZ* in das Hefegenom integriert (Kap. 3.5). Durch die Fähigkeit zur Aktivierung des Reportergens wurde die Bindung von CCA1 und LCL1 an die *target*-Sequenz untersucht.

Zunächst musste die Hintergrundexpression des *LacZ* Gens im neu generierten Hefestamm YM4271[pEE-LacZi] bestimmt werden. Er wurde auf U-Platten ausgebracht und nach zwei Tagen wurde ein *colony-lift filter assay* durchgeführt, um die Expression der β -Galactosidase zu bestimmen. 30 min nach dem *filter lift* zeigten einige Kolonien eine leichte Blaufärbung und nach 40 min war eine deutliche Blaufärbung aller Kolonien zu sehen. Nach Angaben des Herstellers (Matchmaker *One-Hybrid* System, Clontech) konnte die Hintergrundexpression somit als niedrig eingestuft werden.

Wurde zusätzlich LCL1 in den Hefestamm transformiert, zeigte sich nach 15 min eine Blaufärbung der Kolonien, wohingegen die Transformation mit dem leeren pGAD-Vektor erst nach 30 min zu einer Blaufärbung der Hefekolonien führte. Als

Positivkontrolle wurde in einem Parallelansatz CCA1 in den Hefestamm transformiert, dies lieferte das gleiche Ergebnis wie mit LCL1, die Blaufärbung der Hefe setzte schon nach 15 min ein.

Durch diesen Versuch konnte *in vivo* gezeigt werden, dass LCL1, genauso wie CCA1, an das *evening element* bindet und die Expression der β -Galaktosidase aktivieren kann. Die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators, welche an LCL1 bzw. CCA1 fusioniert war, gelangte in räumliche Nähe des Transkriptionsstarts und konnte die Transkription des Reportergens aktivieren.

4.3.2 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Alle Mitglieder der LHY MYB Familie weisen eine sehr große Identität innerhalb ihrer DNA-Bindedomäne auf. Die Bindung von LCL1 und CCA1 an das EE wurde durch die *One-Hybrid* Analyse in Hefe und die von CCA1 durch Alabadí *et al.* (2001) gezeigt. Ein EMSA sollte dieses Ergebnis bestätigen und es sollte weiter analysiert werden, ob die anderen Mitglieder der LHY MYB Familie ebenfalls an das EE binden können. Hierbei wurde zunächst das *in vitro* Bindevermögen verschiedener Vollängenproteine der LHY MYB Familie an ein 61 bp großes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment aus der Promotorregion von *GRP7* untersucht, welches eine EE-Sequenz enthielt (Kap. 3.6). Die LHY MYB-cDNAs wurden in den Translationsvektor pGADT7 kloniert und mit Hilfe des *TnT Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) transkribiert und translatiert. Steigende Mengen des Translationsansatzes wurden mit gleicher Menge an radioaktiv markiertem DNA-Fragment inkubiert und daraufhin die Protein-DNA-Komplexe auf einem Gel aufgetrennt. Dieses wurde gegen Röntgenfilm exponiert, um das Laufverhalten der markierten DNA zu analysieren.

Abb. 13 zeigt, dass sowohl LCL1 und LCL1(NESmut) als auch CCA1, LCL2, LCL4 und LCL5 eine Retardierung des DNA-Fragments im Gel verursachten, also an das EE binden konnten. In der Kontrolle ohne Translationsansatz und der Vektorkontrolle, ist nur das freie EE zu sehen. Die *in vitro* Bindung des LCL3-Vollängenproteins, LCL3(1-287), an das EE (Abb. 13, Spur 12-14) konnte nicht gezeigt werden.

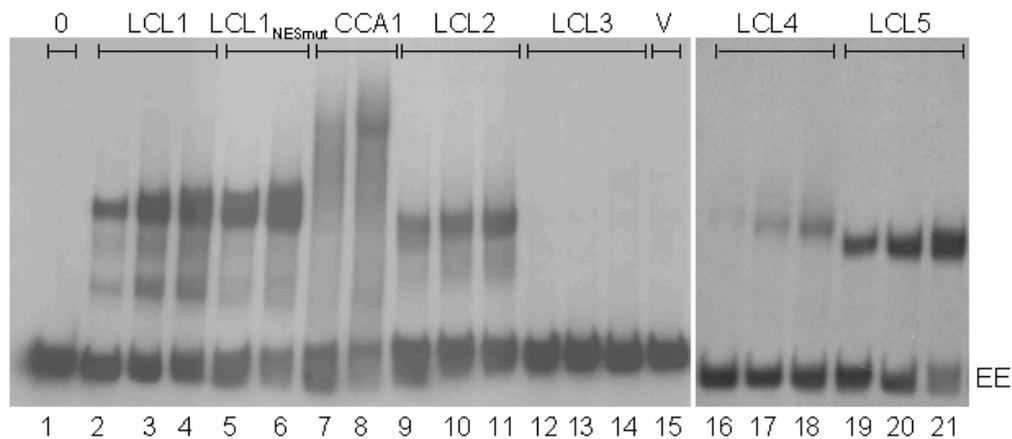


Abb. 13: EMSA mit *in vitro* translatierten LHY MYB Proteinen und Analyse ihrer Bindung an das EE.

(1) Bindungsreaktion mit EE ohne Translationsansatz, (2-4) mit 1, 2 bzw. 3 µl LCL1-Translationsansatz, (5, 6) mit 1 bzw. 3 µl LCL1(NESmut)-Translationsansatz, (7, 8) mit 1 bzw. 3 µl CCA1-Translationsansatz, (9-11) mit 1, 2 bzw. 3 µl LCL2-Translationsansatz, (12-14) mit 1, 2 bzw. 3 µl LCL3-Translationsansatz, (15) Bindungsreaktion mit 3 µl Translationsansatz des leeren pGADT7-Vektors (Vektorkontrolle), (16-18) mit 1, 2 bzw. 3 µl LCL4-Translationsansatz, (19-21) mit 1, 2 bzw. 3 µl LCL5-Translationsansatz. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Wurden die C-terminalen 148 AS von LCL3 deletiert, konnte LCL3(1-139), welches die MYB-Domäne enthielt, eine Retardierung des DNA-Fragments im Gel verursachen (Abb. 14, Spur 3 und 4).

Zum Vergleich wurden Bindungsansätze mit den Vollängenproteinen von LCL2 und LCL3 aufs Gel geladen. Die Kontrolle ohne Translationsansatz und die Vektorkontrolle zeigten keine Retardierung des radioaktiv markierten EE im Gel.

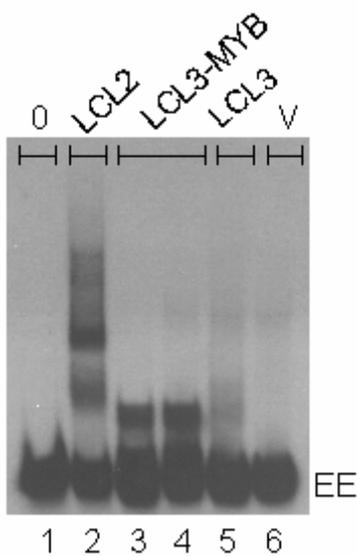


Abb. 14: EMSA mit *in vitro* translatiertem LCL3 und dessen C-terminaler Deletion.

(1) Bindungsreaktion mit EE ohne Translationsansatz, (2) mit 3 μ l LCL2-Translationsansatz, (3, 4) mit 1 bzw. 3 μ l LCL3 (1-139)-Translationsansatz, (5) mit 3 μ l Volllängen LCL3-Translationsansatz, (6) pGADT7-Vektorkontrolle mit 3 μ l Translationsansatz. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Die Bindung von EPR1 an das EE wurde ebenfalls getestet. In Abb. 15 ist dargestellt, dass das Volllängenprotein *in vitro* an das EE binden konnte.

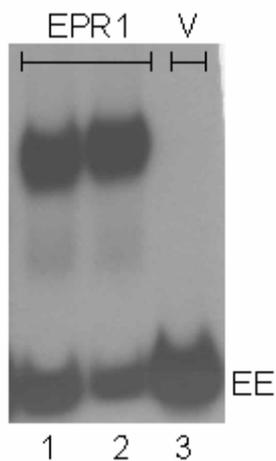


Abb. 15: Bindung von EPR1 an das EE.

(1, 2) Bindungsreaktion mit 1 bzw. 3 μ l Volllängen EPR1-Translationsansatz, (3) pGADT7-Vektorkontrolle mit 3 μ l Translationsansatz. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Abb. 16 zeigt weitere EMSA Experimente. Um zu untersuchen, ob die DNA-Bindung von LCL1 durch die Fusion mit YFP gestört wird, wurde ein EMSA mit dem Translationsprodukt des YFP-LCL1-Fusionsproteins durchgeführt. Abb. 16A zeigt eine zunehmende Retardierung des DNA-Fragments im Gel bei Inkubation mit steigenden Mengen des Translationsprodukts mit dem radioaktiv markierten EE. Das Fusionsprotein konnte folglich an das EE binden.

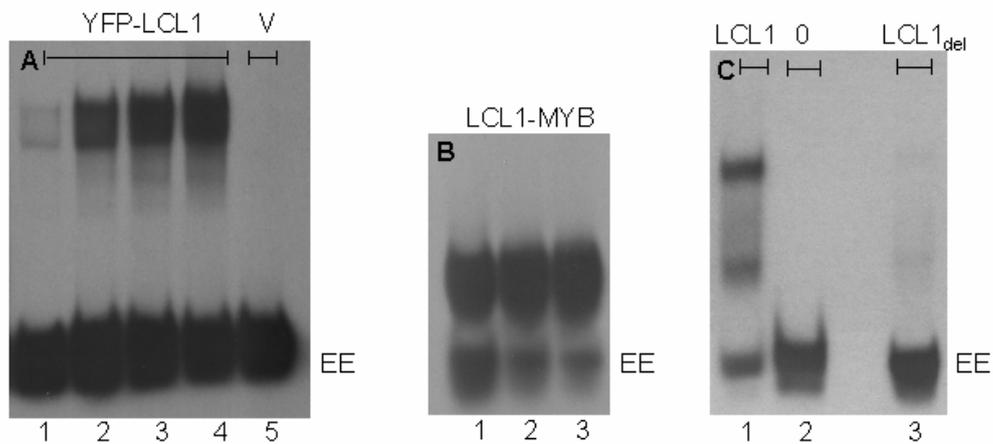


Abb. 16: Bindungspotential von LCL1 an das EE.

(A) Bindung des YFP-LCL1 Fusionsproteins an das EE. (1-4) Bindungsreaktion mit 1, 2, 3 bzw. 4 µl YFP-LCL1-Translationsansatz, (5) pGADT7-Vektorkontrolle mit 3 µl Translationsansatz. (B) Bindung der MYB-Domäne von LCL1 (LCL1-MYB; LCL1(1-126)) an das EE. (1-3) Bindungsreaktion mit 1, 2 und 3 µl LCL1-MYB-Translationsansatz. (C) Bindungsassay mit LCL1 ohne MYB-Domäne (LCL1_{del}, LCL1(117-244)). (1) Bindungsreaktion mit 3 µl Vollängen LCL1-Translationsansatz, (2) Bindungsreaktion mit EE ohne Translationsansatz, und (3) mit 3 µl LCL1(117-244)-Translationsansatz. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Abb. 16B verdeutlicht die Notwendigkeit der MYB-Domäne für die DNA-Bindung. LCL1(1-126), welches die MYB-Domäne enthielt, konnte alleine an das EE binden und eine Retardierung des DNA-Fragments verursachte.

War die MYB-Domäne von LCL1 hingegen deletiert, konnte LCL1(117-244) nicht mehr an das EE binden. Im Gegensatz zum Vollängenprotein (Abb. 16C, Spur 1), konnte es keinen Protein-DNA-Komplex bilden (Abb. 16C, Spur 3) und es konnte keine Retardierung des radioaktiven DNA-Fragments im Gel festgestellt werden.

Des Weiteren wurde die Spezifität der Bindung von LCL1 an die DNA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass LCL1 und LCL1(NESmut) spezifisch die EE-Sequenz binden, denn bei gleichzeitiger Zugabe von markiertem und

unmarkiertem EE im Überschuss ging die Signalstärke des retardierten DNA-Fragments zurück. Abb. 17 veranschaulicht die Abnahme der Signalstärke des retardierten DNA-Fragments bei gleichzeitiger Zugabe von markiertem EE in konstanten Mengen und 10-, 50- und 100-fach molarem Überschuss an unmarkiertem EE.

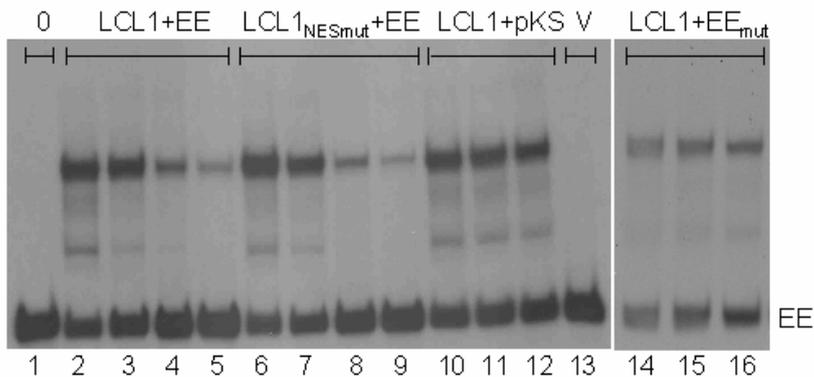


Abb. 17: DNA-Kompetitionsanalyse mit unmarkierter DNA.

(1) Bindungsreaktion mit EE ohne Translationsansatz, (2) mit 2 µl LCL1-Translationsansatz und 10- (3), 50- (4) und 100- fach molarem (5) Überschuss an unmarkiertem EE, (6) mit 2 µl LCL1(NESmut)-Translationsansatz und 10- (7), 50- (8) und 100- fach molarem (9) Überschuss an unmarkiertem EE, (10) mit 2 µl LCL1-Translationsansatz und 10-, 50- (11) und 100- fachem (12) Überschuss an unmarkiertem pKS-Fragment, (13) pGADT7-Vektorkontrolle mit 3 µl Translationsansatz, (14) mit 2 µl LCL1-Translationsansatz und 10-, 50- (15) und 100- fach molarem (16) Überschuss an unmarkiertem, mutierten EE. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Die Zugabe von markiertem EE und einem unspezifischen pKS-Fragment im 10-, 50- und 100-fach molarem Überschuss (Abb. 17, Spur 10-12), wie auch einer mutierten EE-Sequenz in gleichen Mengen (Abb. 17, Spur 14-16), zeigte hingegen keinen Effekt.

Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Proteine um das EE kompetieren. Dieser Versuch konnte nur mit unterschiedlich großen Proteinen durchgeführt werden, um die Protein-DNA-Komplexe im Gel voneinander unterscheiden zu können. Da CCA1 etwa die doppelte Größe von LCL1 besitzt, wurden diese beiden Proteine dafür ausgewählt. Steigerte man gleichzeitig die Mengen von LCL1 und CCA1 in einer Reaktion, resultierte das in einer stärkeren Retardierung des DNA-Fragments im Gel (Abb. 18, Spur 2-4).

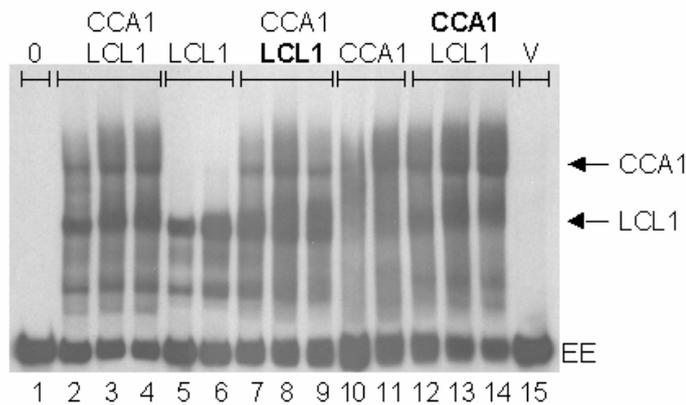


Abb. 18: Protein-Kompetitionsanalyse mit LCL1 und CCA1.

(1) Bindungsreaktion mit EE ohne Translationsansatz, (2-4) mit jeweils 1, 2 und 3 µl CCA1- und LCL1-Translationsansatz, (5, 6) mit 1 bzw. 3 µl LCL1-Translationsansatz, (7-9) mit 1, 2 und 3 µl CCA1-Translationsansatz und mit jeweils der doppelten Menge an LCL1-Translationsansatz, (10, 11) mit 1 bzw. 3 µl CCA1-Translationsansatz, (12-14) mit 1, 2 und 3 µl LCL1-Translationsansatz und mit jeweils der doppelten Menge an CCA1-Translationsansatz, (15) pGADT7-Vektorkontrolle mit 3 µl Translationsansatz. Mit (EE) ist das markierte DNA-Fragment, welches keinen Protein-DNA-Komplex ausbildete, bezeichnet.

Erhöhte man die Zugabe von LCL1 noch mehr, inhibierte das die Bildung von CCA1-DNA-Komplexen, erkennbar an der Abnahme des Signals, das langsamer im Gel lief (Abb. 18, Spur 7-9). Steigerte man umgekehrt die CCA1-Menge konnte man ein abgeschwächtes Signal der unteren Bande im Gel erkennen, welche den LCL1-DNA-Komplex darstellte (Abb. 18, Spur 12-14).

4.4 Dimerisierungspotential der LHY MYB Familie

4.4.1 Charakterisierung der Dimerisierungsdomäne von LCL1

Mit Hilfe des Y2H-Systems wurde nicht nur die Interaktion von LCL1 mit XPO1 untersucht. Auch Dimerisierungseigenschaften von LCL1 mit LCL1-Teilproteinen konnten damit analysiert werden (Kap. 3.4).

Wurde LCL1 im Y2H-System in pB42 und zugleich in pGilda exprimiert, fand eine starke Transaktivierung des β -Galaktosidase-Gens statt (Abb. 19A). Eine Transaktivierung des Reportergens konnte im Falle der Kontrolle nicht detektiert werden, bei der LCL1 gegen den pGilda-Vektor alleine getestet wurde (Abb. 19A). LCL1 besitzt also die Fähigkeit zur Homodimerisierung. Um die Dimerisierungsdomäne von LCL1 einzugrenzen, wurde ein verkürztes LCL1-

Protein hergestellt, LCL1(117-244), und auf die Fähigkeit zur Dimerisierung mit dem Volllängen LCL1-Protein getestet. Obwohl dem verkürzten Protein sowohl die N-terminale MYB-Domäne als auch die C-terminale NES fehlten, konnte es mit dem Volllängen LCL1-Protein interagieren (Abb. 19B). Koexpression mit XPO1 in Hefe führte zu keiner Aktivierung des Reportergens, da die NES fehlte (Abb. 19B). Verkürzte man LCL1 an beiden Enden weiter, konnte das Protein LCL1(127-222) nicht mehr an das Volllängen LCL1-Protein binden (Abb. 19C). Die minimale Proteindimerisierungsdomäne von LCL1 reicht somit von AS 117 bis AS 244.

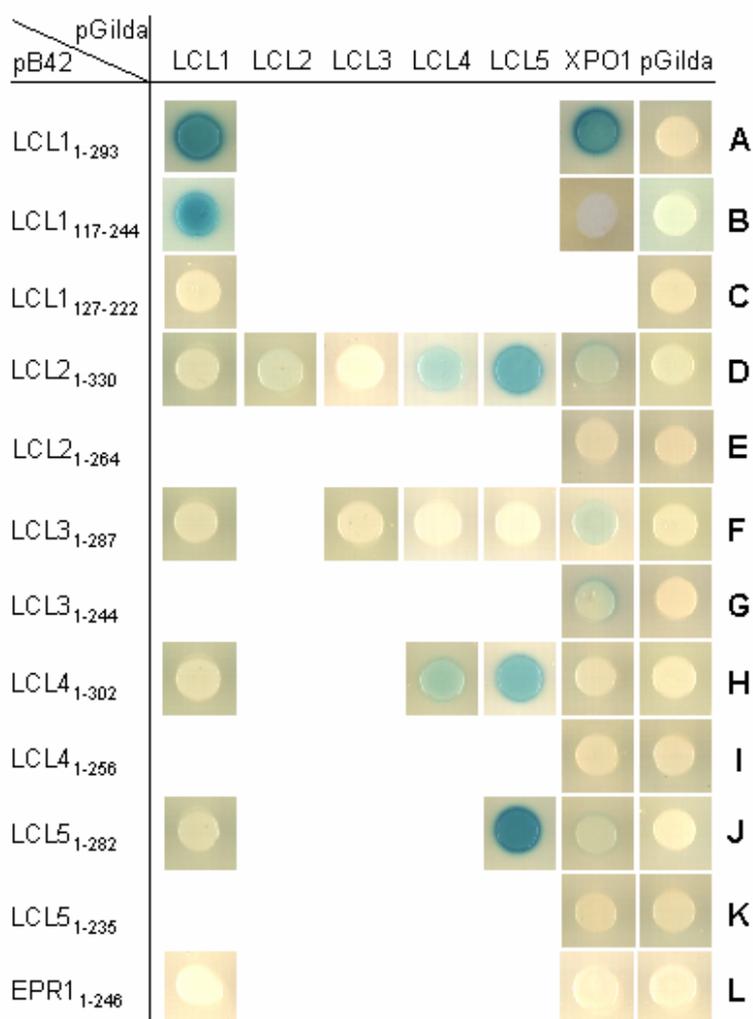


Abb. 19: Dimerisierungspotential der LHY MYB Familie. Interaktionsanalyse auf Indikatorplatten.

Die Volllängen- und Deletionskonstrukte von LCL1-LCL5 und die EPR1 Volllängen-cDNA wurden in den Vektor pB42AD kloniert. Die Fusionsproteine mit der B42-Aktivierungsdomäne wurden auf Interaktion mit LCL1-LCL5 und mit XPO1 durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet. (A) LCL1(1-293); (B) LCL1(117-244); (C) LCL1(127-222); (D, F, H, J, L) Volllängenproteine von LCL2-LCL5 und EPR1; (E, G, I, K) C-terminale Verkürzungen von LCL2-LCL5.

4.4.2 Dimerisierung von LCL2-LCL5 und EPR1 und Interaktion mit XPO1

Homo- und Heterodimerisierungseigenschaften der LCL-Proteine und EPR1, sowie ihre Interaktion mit XPO1 konnten bei Koexpression der entsprechenden Proteine im Y2H-System getestet werden.

Abb. 19D zeigt die Dimerisierungseigenschaften von LCL2. Im Gegensatz zu LCL1 konnte LCL2 keine Homodimere im Hefesystem bilden, eine leichte Blaufärbung der Hefe war allerdings bei Koexpression mit LCL4 festzustellen. Mit LCL5 fand eine deutliche Interaktion statt. Mit LCL1 und LCL3 interagierte LCL2 nicht. LCL2 ist wie LCL1 ein Protein, welches eine NES besitzt und mit Hilfe des Exportrezeptors XPO1 aktiv aus dem Kern transportiert wird. Die Interaktion des LCL2-Volllängenproteins, LCL2(1-330), mit XPO1 war schwach aber spezifisch, die Deletion der C-terminalen 66 AS bewirkte, dass XPO1 mit dem verkürzten LCL2(1-264)-Protein keine Interaktion mehr aufwies (Abb. 19E).

LCL3 zeigte im Y2H-System weder Fähigkeiten zur Homodimerisierung noch zur Heterodimerisierung mit einem anderen LCL-Protein (Abb. 19D, F). Koexpression mit XPO1 in Hefe resultierte in einer leichten Transaktivierung des Reportergens, die C-terminale Deletion von 43 AS verhinderte die Transaktivierung nicht. Das verkürzte LCL3(1-244)-Protein verursachte bei Koexpression mit XPO1 noch immer eine leichte Blaufärbung der Hefe auf Indikatorplatten (Abb. 19G).

LCL4 wies sowohl Homo- als auch Heterodimerisierungseigenschaften auf (Abb. 19H). LCL4 konnte sowohl mit LCL2 (Abb. 19D) als auch mit LCL5 interagieren (Abb. 19H). Das LCL4-Volllängenprotein, LCL4(1-302), wie auch die C-terminale Verkürzung, LCL4(1-256), zeigten allerdings keine Blaufärbung der Hefe auf Indikatorplatten bei Koexpression mit XPO1 (Abb. 19I).

Auch LCL5 hat die Fähigkeit zur Homo- und Heterodimerisierung. Es interagierte deutlich mit LCL2 (Abb. 19D), mit LCL4 (Abb. 19H) und mit sich selbst (Abb. 19J). Eine leichte Transaktivierung des Reportergens war bei Koexpression des LCL5-Volllängenproteins, LCL5(1-282), mit XPO1 festzustellen, die schwach, aber spezifisch war. Die C-terminale Verkürzung von 47 AS, LCL5(1-235), führte zu keiner Aktivierung der β -Galaktosidase (Abb. 19K). LCL5 ist somit ebenfalls ein Protein mit einer funktionalen NES.

EPR1 (Kuno *et al.*, 2003) ist ein Mitglied der EPR1-*like* Familie, welche neben der LHY/CCA1-Familie und der LCL-Familie die dritte Gruppe der LHY MYB Proteinfamilie darstellt. Hier wurde dessen Fähigkeit zur Dimerisierung mit LCL1 und mit XPO1 getestet und in beiden Fällen keine Transaktivierung im Hefesystem festgestellt (Abb. 19L). Durch das Y2H-System konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass EPR1 eine NES besitzt und mit XPO1 interagieren kann.

Die quantitative Analyse der Proteininteraktionen mittels ONPG-Assay bestätigte die vorherigen Ergebnisse.

Abb. 20 zeigt, dass nur LCL1 und LCL5 die Fähigkeit zur Homodimerisierung besitzen (Abb. 20-1, -2 und -7). Wurde die Proteindimerisierungsdomäne von LCL1(117-244) gegen den pGilda-Vektor alleine getestet, fand keine Aktivierung des Reportergens statt (Abb. 20-3). LCL2, 3 und 4 bildeten keine Homodimere aus (Abb. 20-4, -5 und -6). Die Fähigkeit zur Homodimerisierung von LCL4, die auf Indikatorplatten gezeigt wurde (Abb. 19H), konnte im ONPG-Assay nicht reproduziert werden. Die hier aufgezeigte schwache Homodimerisierung von LCL3 wurde wegen des hohen Fehlerbalkens als unspezifisch erachtet.

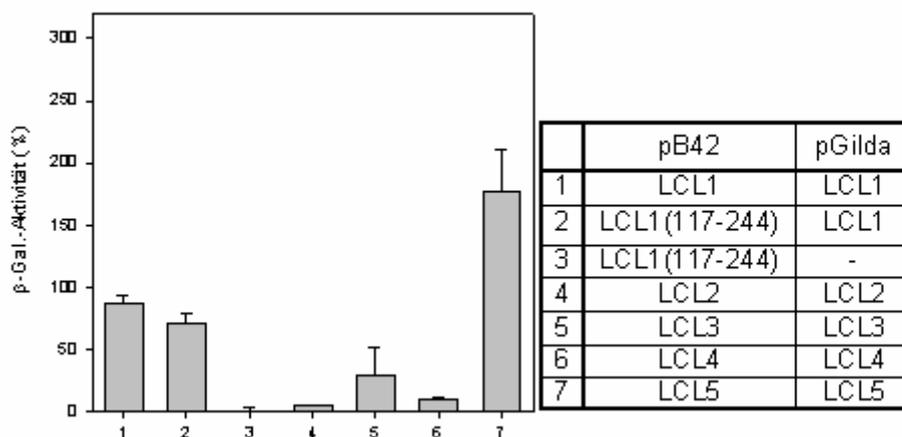


Abb. 20: Quantifizierung der Interaktionsexperimente im Y2H-System. Relative β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion der Homodimere.

Die Tabelle gibt die Plasmid-Kombinationen an, mit denen der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] kotransformiert wurde. Es wurde das Homodimerisierungspotential von LCL1-LCL5 getestet. (1-3) Charakterisierung der Homodimerisierungsdomäne von LCL1, (4-7) Test auf Homodimerisierung von LCL2-LCL5. Für jeden Interaktionstest wurde der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwerts von sechs Messungen berechnet. Die Zahlen unter dem Balkendiagramm entsprechen der Numerierung in der Tabelle. Die prozentualen Werte der β -Galaktosidaseaktivität sind zur Interaktion von LCL1 mit XPO1 in Relation gesetzt, welche 100% beträgt.

Heterodimere konnten sich zwischen LCL5 und LCL4 ausbilden (Abb. 21-11). LCL5 konnte außerdem mit LCL2 interagieren, allerdings war diese Proteinbindung weniger als halb so stark als diejenige mit LCL4 (Abb. 21-8). LCL4 wiederum bildete Dimere mit LCL2 (Abb. 21-7), die Stärke dieser Interaktion betrug nur etwa 1/10 der Interaktion von LCL4 zu LCL5. Auch im ONPG-Assay konnte keine Interaktion zwischen LCL1 und LCL2, 3, 4, 5 oder EPR1 (Abb. 21-1 bis -5) oder zwischen LCL3 mit LCL2, 4 oder 5 nachgewiesen werden (Abb. 21-6, -9 und -10).

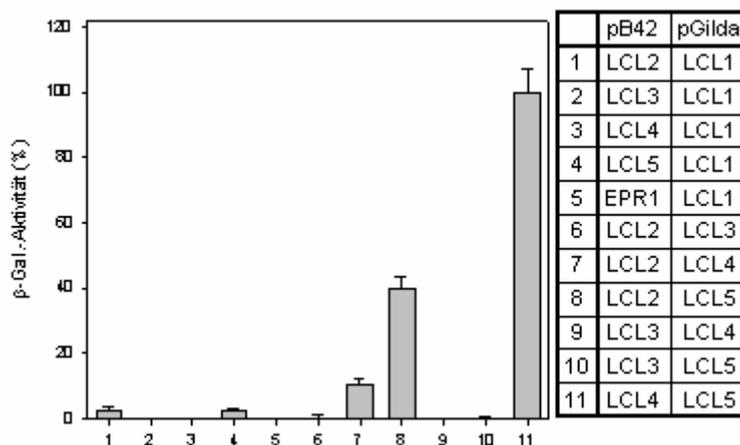


Abb. 21: Quantifizierung der Interaktionsexperimente im Y2H-System. Relative β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion der Heterodimere.

Die Tabelle gibt die Plasmid-Kombinationen an, mit denen der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert wurde. Es wurde das Heterodimerisierungspotential von LCL1-LCL5 getestet. (1-5) Test auf Interaktion zwischen LCL1 und LCL2-LCL5 bzw. EPR1, (6-8) zwischen LCL2 und LCL3-LCL5, (9, 10) zwischen LCL3 und LCL4 bzw. LCL5, (11) und zwischen LCL4 und LCL5. Die Zahlen unter dem Balkendiagramm entsprechen der Numerierung in der Tabelle. Die prozentualen Werte der β -Galaktosidaseaktivität sind zur Interaktion von LCL1 mit XPO1 in Relation gesetzt, welche 100% beträgt.

In Abb. 22 sind die Ergebnisse des ONPG-Assays mit den Interaktionen von LCL2-LCL5 mit XPO1 zusammengestellt. Es zeigte sich, dass die Interaktion von LCL2 mit XPO1 nicht so schwach war, wie der Test auf Indikatorplatte (Abb. 19D) vermuten ließ (Abb. 22-1). Die β -Galaktosidaseaktivität im ONPG-Assay lag bei 100%, und entsprach genau der Interaktionsstärke von XPO1 mit LCL1. Die Kontrolle mit der Koexpression des pGilda-Vektor alleine zeigte dagegen keine Aktivität (Abb. 22-2). Die Aktivität, die durch Koexpression der C-terminalen

Verkürzung von LCL2(1-264) mit XPO1 verursacht wurde, lag bei etwa 5% und kann deshalb vernachlässigt werden (Abb. 22-3).

Wie auf den Indikatorplatten schon durch Blaufärbung der Hefe zu erkennen war, interagierte auch im ONPG-Assay LCL3 mit XPO1 leicht (Abb. 22-4). Die Vektorkontrolle war negativ (Abb. 10-5) aber die Koexpression der C-terminalen Verkürzung (AS 1-244) mit XPO1 bewirkte eine deutlich höhere Aktivität an β -Galaktosidase als das Volllängenprotein und als der Test auf Indikatorplatten vermuten ließ (Abb. 10-6).

Im Gegensatz zum Interaktionstest auf Indikatorplatten, bei dem keine Aktivierung des Reportergens detektiert werden konnte (Abb. 19H), zeigte der ONPG-Assay, dass es bei Koexpression von LCL4 und XPO1 zu einer β -Galaktosidase-Aktivität von etwa 20% kam (Abb. 22-7). Diese Interaktion schien trotz ihrer Schwäche spezifisch zu sein, da die Vektorkontrolle negativ war (Abb. 22-8) und die C-terminale Verkürzung von LCL4(1-256) bei Koexpression mit XPO1 in Hefe eine deutlich schwächere β -Galaktosidase Aktivität hervorrief (Abb. 22-9).

Die Interaktionsstärke zwischen LCL5 und XPO1 entsprach etwa 70% des Wertes zwischen LCL1 mit XPO1 (Abb. 22-10). Die Vektorkontrolle (Abb. 22-11) war negativ und die Aktivität des Reportergens bei Koexpression von XPO1 und der C-terminalen Verkürzung, LCL5(1-235), war im Vergleich zu der mit dem Volllängenprotein vernachlässigbar (Abb. 22-12).

Wie bereits auf den Indikatorplatten zu erkennen war, fand keine Interaktion zwischen EPR1 und XPO1 statt (Abb. 22-13), die β -Galaktosidase-Aktivität von etwa 10% wurde als unspezifisch angesehen.

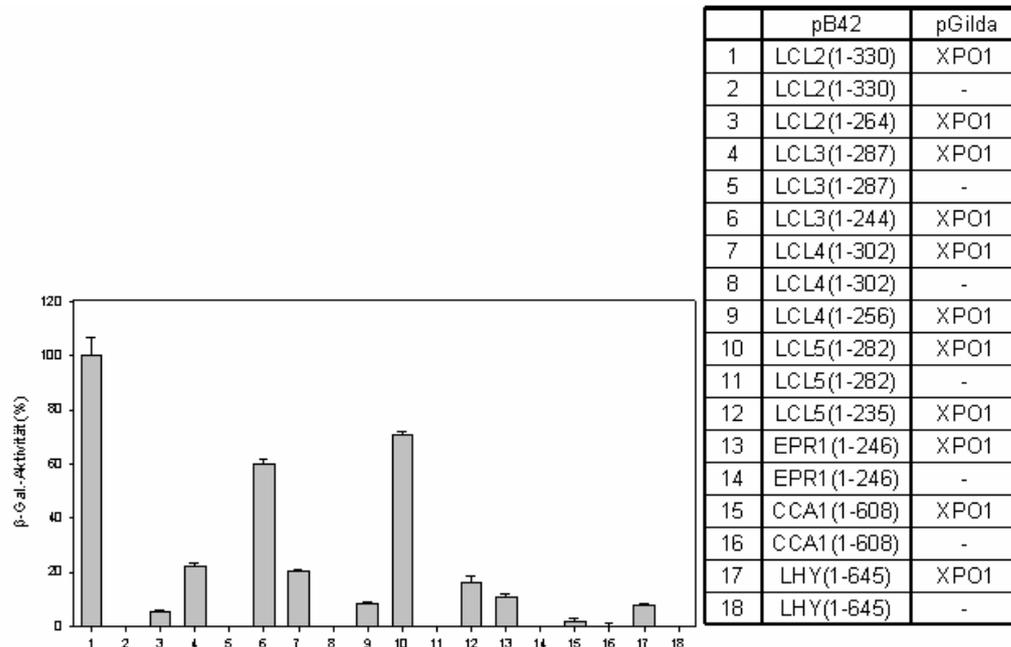


Abb. 22: Quantifizierung der Interaktionsexperimente im Y2H-System. Relative β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion der LHY MYB-Konstrukte mit XPO1. Die Tabelle gibt die Plasmid-Kombinationen an, mit denen der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert wurde. Es wurden die Interaktionen von LCL1-LCL5 und deren C-terminaler Verkürzung (1-12), EPR1 (13, 14), CCA1 (15, 16) und LHY (17, 18) gegen XPO1 und gegen den pGilda-Vektor alleine getestet. Die Zahlen unter dem Balkendiagramm entsprechen der Numerierung in der Tabelle. Die prozentualen Werte der β -Galaktosidaseaktivität sind zur Interaktion von LCL1 mit XPO1 in Relation gesetzt, welche 100% beträgt.

4.4.3 Dimerisierungspotential von LHY und CCA1 im Y2H-System

In einem Y2H-Assay wurden die Dimerisierungseigenschaften der beiden *Clock*-Proteine untersucht. Sowohl LHY als auch CCA1 können Homo- und Heterodimere untereinander bilden. Koexprimierte man beide Proteine in Hefe, fand eine starke Transaktivierung der β -Galaktosidase statt (Abb. 23A und B).

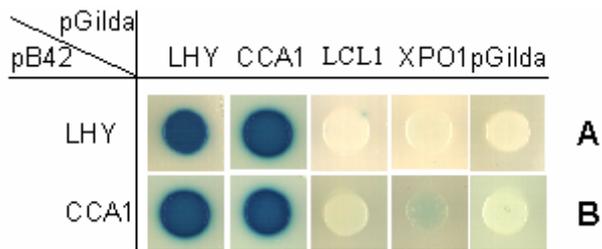


Abb. 23: Dimerisierungspotential von LHY und CCA1. Interaktionsanalyse im Y2H-System auf Indikatorplatten.

Vollängenkonstrukte von LHY (A) und CCA1 (B) wurden in den Vektor pB42AD kloniert. Die Fusionsproteine mit der B42-Aktivierungsdomäne wurden auf Interaktion mit LHY, CCA1, LCL1 und XPO1 durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet.

Die Interaktionen zwischen LHY und CCA1 wurden durch den ONPG-Assay bestätigt (Abb. 24-1, -2 und -3). Im Vergleich zur Homodimerisierung von LCL1 (Abb. 20-1) war die Homodimerisierung von LHY fünfmal, die von CCA1 sechsmal stärker. Die Stärke der Heterodimerisierung von LHY und CCA1 entsprach mit etwa 500% der Stärke der jeweiligen Homodimerisierung. LHY und CCA1 interagierten nicht mit LCL1 (Abb. 23, Abb. 24-4, -5). CCA1 zeigte eine leichte Blaufärbung der Hefekolonien bei Koexpression mit XPO1 (Abb. 23B). Diese leichte Interaktion konnte im ONPG-Assay jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 22-15). Auch LHY interagierte nicht mit XPO1 (Abb. 22-18, Abb. 23A). Die Y2H-Analyse zeigte, dass LHY und CCA1 keine klassische NES besitzen.

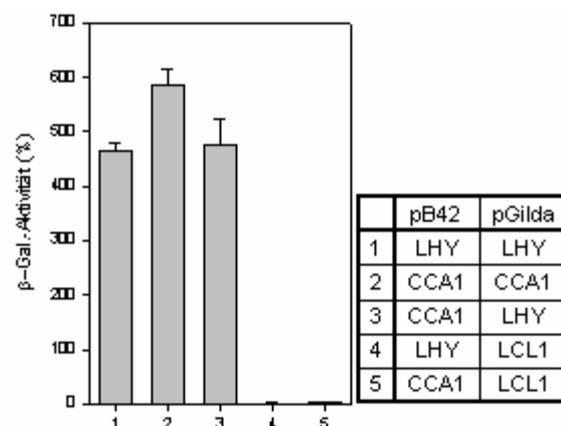


Abb. 24: Quantifizierung der Interaktionsexperimente im Y2H-System. Relative β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion von LHY, CCA1 und LCL1.

Die Tabelle gibt die Plasmid-Kombinationen an, mit denen der Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] transformiert wurde. Es wurde die Homodimerisierung von LHY (1) und CCA1 (2) und die Heterodimerisierung untereinander (3) und mit LCL1 (4, 5) getestet. Die Zahlen unter dem Balkendiagramm entsprechen der Numerierung in der Tabelle. Die prozentualen Werte der β -Galaktosidaseaktivität sind zur Interaktion von LCL1 mit XPO1 in Relation gesetzt, welche 100% beträgt.

4.4.4 BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*)

Mit Hilfe des Y2H-Systems konnte bereits gezeigt werden, dass LCL1 Homodimere bildet, da es bei Koexpression von pB42AD-LCL1 mit pGilda-LCL1 in Hefe zur Transaktivierung des Reportergens kommt (Abb. 19A, Abb. 20-1). Ein Nachteil der Y2H-Methode ist, dass die Dimerisierung der Proteine im heterologen Hefesystem stattfindet. Koexprimiert man *Split*-YFP-Fusionsproteine in Protoplasten, ist es möglich, die Dimerisierung der pflanzlichen Proteine durch Zusammenfügung beider YFP-Teilproteine (YN und YC) in Pflanzenzellen, d. h. im homologen System, sichtbar zu machen (Kap. 3.8). Durch die Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz wird das Dimerisierungsvermögen der an YC bzw. YN fusionierten Proteine sichtbar (Hu *et al.*, 2002).

Abb. 25A zeigt, dass die Koexpression von YC-LCL1 und YN-LCL1 zur Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz führte. Zur besseren Abhebung von GFP-Fusionsproteinen ist das grün-gelbe Fluoreszenzsignal von YFP hier gelb dargestellt. Im Gegensatz zum GFP-LCL1 Fusionsprotein, welches in der Zelle gleichverteilt zwischen Kern und Cytoplasma vorlag (Abb. 7A), befand sich die Lokalisation des LCL1-Dimers fast ausschließlich im Cytoplasma. BiFC liefert somit zusätzliche Informationen über den subzellulären Ort der Dimerbildung. Als Positivkontrolle für eine bekannte Proteindimerisierung (Walter *et al.*, 2004) wurde das Protein bZIP63 ausgewählt, welches als Homodimer nur im Kern der Protoplasten zu finden war (Abb. 25D) und mit den untersuchten MYB-Proteinen keine Dimere bildete. Fusionierte man YN und YC an das 3'-Ende von *LCL1* (wie es bei bZIP63 der Fall war) und exprimierte diese Fusionsproteine (LCL1-YC und LCL1-YN) in Protoplasten, konnte keine Rekonstitution der Fluoreszenz beobachtet werden. Die beiden YFP-Teile konnten sich bei Fusion mit dem LCL1-Protein nur zusammenfügen, wenn sie an den N-Terminus des Proteins fusioniert waren (YC-LCL1 und YN-LCL1). Koexpression von YC-LCL1(NESmut) und YN-LCL1(NESmut) führte zu einer Rekonstitution der Fluoreszenz mit einer Lokalisation des dimeren Proteins ausschließlich im Kern (Abb. 25B). Dies wird besonders beim *overlay* mit der Hellfeld-Aufnahme deutlich (Abb. 25C). Als Negativkontrollen wurden LCL1-YC mit bZIP63-YN, LCL1-YN mit bZIP63-YC, YC-

LCL1 mit bZIP63-YN und bZIP63-YC mit YN-LCL1 in Protoplasten koexprimiert, hier konnte keine Rekonstitution der grün-gelben Fluoreszenz festgestellt werden. Außer LCL1 bildeten auch LCL4 und LCL5 Homodimere aus (Abb. 25E, F), wohingegen LCL2 und LCL3 nicht die Fähigkeit zur Homodimerisierung besaßen. Dies wurde durch den Hefe *Two-Hybrid* Interaktionstest auf Indikatorplatten bestätigt (Abb. 19). Das LCL4-Homodimer befand sich ausschließlich im Kern, wohingegen das LCL5-Homodimer eine Gleichverteilung der YFP-Fluoreszenz in der Zelle aufwies.

Wurde LCL1 mit anderen LCL-Proteinen koexprimiert, konnte in allen Fällen, außer mit LCL3, eine Rekonstitution der grün-gelben Fluoreszenz beobachtet werden. Dabei waren LCL1-LCL2 (Abb. 25G), LCL1-LCL4 (Abb. 25H) und LCL1-LCL5 (Abb. 25I) sowohl im Kern als auch im Cytoplasma aufzufinden. Die Interaktion von LCL5 und LCL4 konnte mit dieser Methode ebenfalls gezeigt werden (Abb. 25J), die Dimerbildung fand dabei hauptsächlich im Nukleus statt. Dies war auch bei der Koexpression von LCL2 mit LCL5 (Abb. 25K) und LCL4 (Abb. 25L) zu beobachten. Koexpression von YC-LCL5 mit bZIP63-YN bzw. bZIP63-YC mit YN-LCL5 führte zu keiner Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz.

Schließlich wurde das Dimerisierungspotential der *Clock*-Proteine LHY und CCA1 durch BiFC getestet. In Abb. 25M sieht man, dass CCA1 Homodimere ausbildet, Abb. 25N zeigt, dass LHY ebenfalls die Fähigkeit zur Homodimerisierung besitzt und Abb. 25O verdeutlicht, dass die beiden Proteine auch Heterodimere miteinander ausbilden können. In allen Fällen waren die *Clock*-Protein-Dimere ausschließlich im Kern lokalisiert.

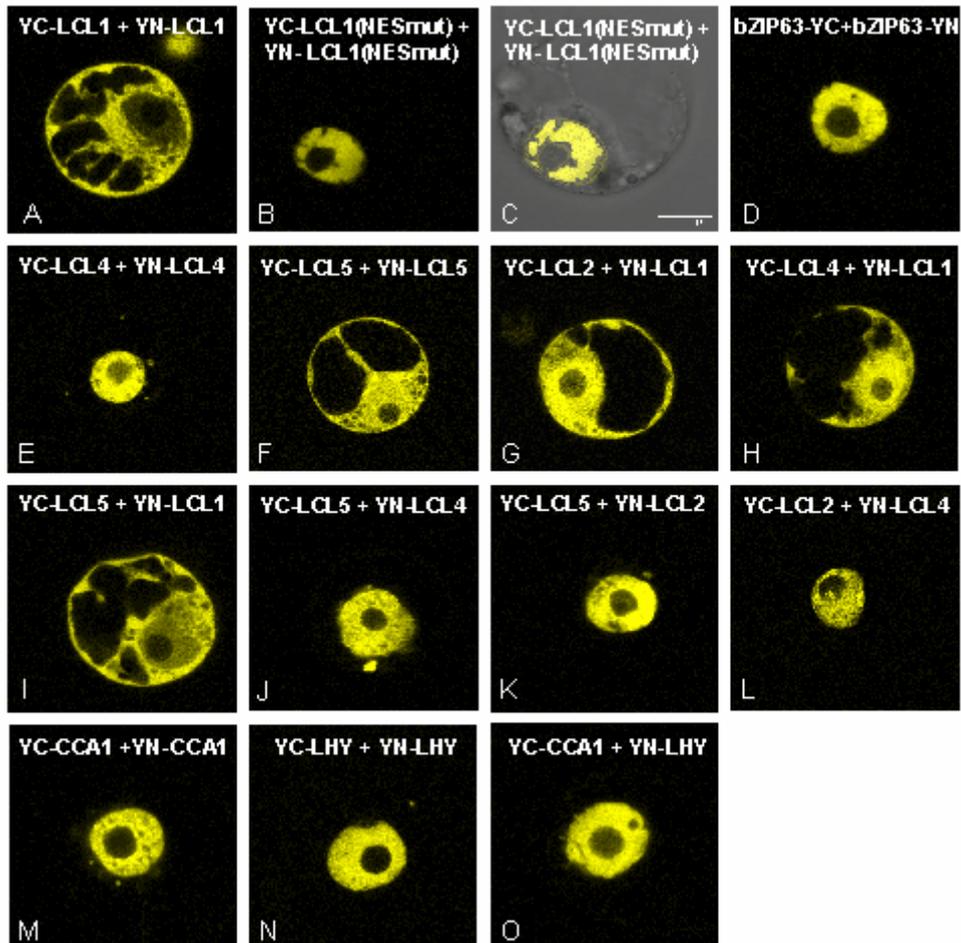


Abb. 25: *In vivo* Lokalisation von koexprimierten *Split*-YFP-Fusionsproteinen in BY-2 Protoplasten.

BY-2 Protoplasten wurden transient mit *Split*-YFP-Fusionsproteinkonstrukten kotransformiert und die Lokalisation der YFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Bilder transformierter Protoplasten wurden nur gezeigt, wenn eine Rekonstitution der Fluoreszenz detektiert werden konnte. Alle MYB-Proteine wurden gegenseitig sowohl als YN- als auch als YC-Fusionen getestet. Für die Abbildung wurde pro Dimerisierung jeweils eine repräsentative Aufnahme ausgewählt. (A) YC-LCL1+YN-LCL1, (B) YC-LCL1(NESmut)+YN-LCL1(NESmut), (C) *overlay* von (B) mit der Hellfeld-Aufnahme, (D) bZIP63-YC+bZIP63-YN, (E) YC-LCL4+YN-LCL4, (F) YC-LCL5+YN-LCL5, (G) YC-LCL2+YN-LCL1, (H) YC-LCL4+YN-LCL1, (I) YC-LCL5+YN-LCL1, (J) YC-LCL5+YN-LCL4, (K) YC-LCL5+YN-LCL2, (L) YC-LCL2+YN-LCL4, (M) YC-CCA1+YN-CCA1, (N) YC-LHY+YN-LHY, (O) YC-CCA1+YN-LHY.

4.4.5 Identifizierung neuer Interaktionspartner von LCL1

Auf der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von LCL1 wurde ein Y2H-Screen mit LCL1 als *bait* durchgeführt (Kap. 3.4.6). Dabei wurden vier cDNAs identifiziert, die für Proteine kodierten, die auch in der Y2H-Testinteraktion mit LCL1 eine Transaktivierung des Reportergens aufwiesen (Abb. 26A-D). Die LCL1-interagierenden Proteine wurden als LIP5, LIP13, LIP26 und LIP93 bezeichnet (für LCL1 interacting protein). LIP13 wies eine leichte Blaufärbung der Hefekolonien in der Kontrolle auf, bei der es gegen den pGilda-Vektor alleine getestet wurde (Abb. 26B).

Die vier cDNAs wurden durch Sequenzierung analysiert und mit den erhaltenen Sequenzen die *A. thaliana* Datenbanken durchsucht (BlastN). LIP5 erwies sich als LCL1 selbst. Dieses Ergebnis machte die Fähigkeit von LCL1 zur Homodimerisierung deutlich. Die übrigen LCL1-interagierenden Proteine sind in der Datenbank als „*unknown proteins*“ charakterisiert, es sind also Proteine unbekannter Funktion, die mit LCL1 interagieren. Das LIP13-Volllängenprotein (At3g46780) besteht aus 510 AS und besitzt nach 885 bp eine alternative Splice-Stelle, sodass eine kürzere mRNA gebildet wird. Laut Datenbank enthält es eine NAD-Bindestelle. LIP26 (At5g06980) ist 246 AS lang. Es wurden bisher keine bekannten Proteindomänen in LIP26 identifiziert. Wurde es als GFP-Fusionsprotein in Protoplasten exprimiert, befand sich die grüne Fluoreszenz sowohl im Kern als auch im Cytoplasma (Abb. 26).

LIP93 (At5g64170) weist 567 AS auf und besitzt Sequenzähnlichkeit zu einem Dentin-Sialophosphoprotein aus *Homo sapiens*, es wird in der Datenbank als „*dentin sialophosphoprotein-related*“ beschrieben.

Die Volllängen-cDNA von *LIP13* wurde mit den genspezifischen Primern L13-5'1 und LIP13-3'3 aus einer cDNA-Bank amplifiziert. Zur Amplifizierung der Volllängen-cDNA von *LIP26* wurden die Primer LIP26-5'1 und LIP26-3'1 verwendet. Aus Zeitgründen konnte nur die weitere Charakterisierung von LIP26 durchgeführt werden.

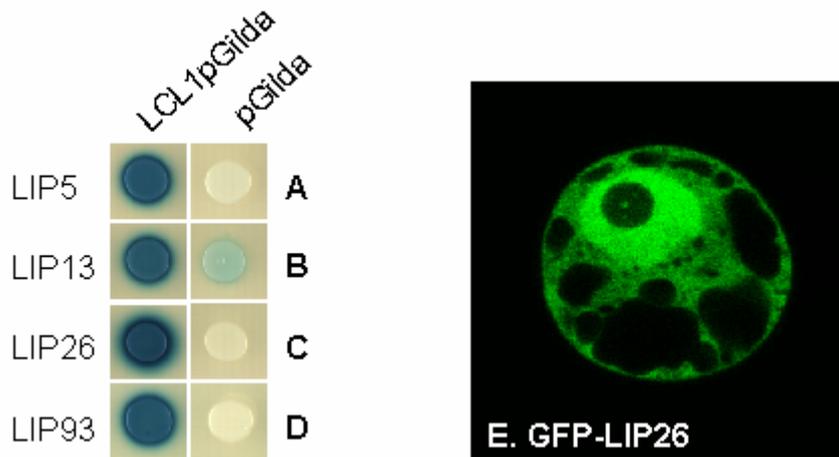


Abb. 26: Y2H-Testinteraktion mit LCL1 und Lokalisation von GFP-LIP26.

Die cDNAs, die durch den Y2H-Screen identifiziert worden waren, wurden auf Interaktion mit dem LCL1-Volllängenprotein durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] rückgetestet. (A) LIP5 (=LCL1), (B) LIP13, (C) LIP26 und (D) LIP93.

(E) *In vivo* Lokalisation von GFP-LIP26 in BY-2 Protoplasten. Die mikroskopische Analyse wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops durchgeführt.

4.4.6 Dimerisierungspotential von LIP26

LIP26 ist ein Protein unbekannter Funktion. Mit Hilfe eines Y2H-Assays wurde die Fähigkeit von LIP26 untersucht, mit anderen Mitgliedern der LHY MYB Familie und mit XPO1 zu interagieren. Diese Analyse wurde mit dem LIP26-Volllängenprotein durchgeführt. Abb. 27 zeigt, dass LIP26 im Hefesystem mit der gesamten LCL-Familie interagieren kann (Abb. 27A-E). Koexpression mit LHY, CCA1 oder XPO1 in Hefe ergab dagegen keine Aktivierung der β -Galaktosidase (Abb. 27F-H). Wurde gegen die entsprechenden Vektoren alleine getestet, konnte keine Transaktivierung des Reportergens festgestellt werden.

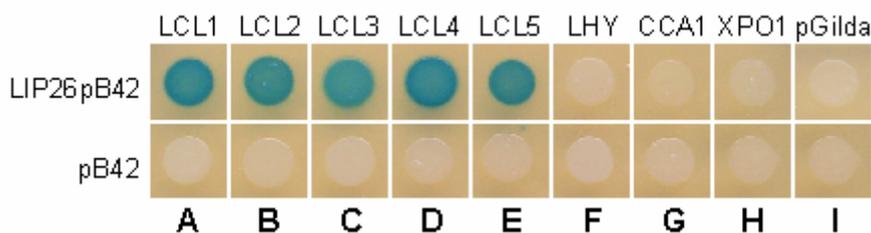


Abb. 27: Interaktionsanalysen von LIP26 im Y2H-System.

Das Fusionsprotein LIP26 mit der B42-Aktivierungsdomäne wurde auf Interaktion mit LCL1-LCL5 (A-E), LHY (F), CCA1 (G) und XPO1 (H) durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet. Mit pB42 und pGilda (I) sind die Vektorkontrollen bezeichnet.

Des Weiteren wurde untersucht, mit welcher Proteindomäne von LCL1 das LIP26-Volllängenprotein interagiert. Wurde LIP26 mit einem LCL1-Teilprotein koexprimiert, dem die C-terminalen 49 AS fehlten, fand noch immer eine Aktivierung des Reportergens statt (Abb. 28B). Wurden die N-terminalen 116 AS von LCL1 deletiert, konnte ebenfalls eine Interaktion detektiert werden (Abb. 28C). Koexpression von LIP26 mit der minimalen LCL1-Homodimerisierungsdomäne in LCL1(117-244) führte ebenfalls zur Aktivierung des Reportergens (Abb. 28D). Dies bestätigte, dass sowohl die MYB-Domäne von LCL1, als auch die NLS und die NES keinen Einfluss auf die Bindung an LIP26 haben. Fehlen diese Proteindomänen, kommt es noch immer zu einer Dimerisierung von LIP26 und LCL1.

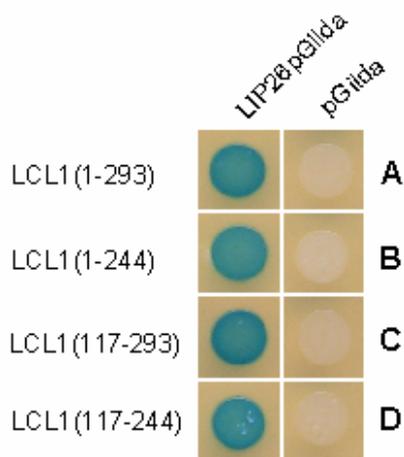


Abb. 28: Deletionsanalyse von LCL1: Interaktion mit LIP26 auf Indikatorplatten.

cDNA-Fragmente von LCL1 wurden in den Vektor pB42AD kloniert und die resultierenden Fusionsproteine mit der B42-Aktivierungsdomäne wurden auf Interaktion mit dem Volllängenprotein LIP26 durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet. (A) Test auf Interaktion von LIP26 mit dem Volllängen LCL1-Protein, (B) mit der C-terminalen Verkürzung, (C) mit der N-terminalen Verkürzung und (D) mit der minimalen Homodimerisierungsdomäne von LCL1.

4.4.7 Hefe *Three-Hybrid* Assay mit CCA1, LCL1 und XPO1

Das Hefe *Two-Hybrid* System zeigte, dass XPO1 nicht direkt den Export von CCA1 aus dem Kern vermittelt (Abb. 23B, Abb. 22-15). CCA1 selbst hat demnach keine NES, mit der es an XPO1 binden kann. Um zu untersuchen, ob CCA1 mit Hilfe von LCL1 als Brückenprotein ins Cytoplasma exportiert wird, wurde ein Hefe *Three-Hybrid* Assay durchgeführt (Kap. 3.4.5). Die Idee dabei war, dass LCL1 bei Bindung an XPO1 möglicherweise seine dreidimensionale Struktur dahingehend

verändert, dass es auch an CCA1 binden kann. LCL1 würde die Bildung eines Heterotrimeren ermöglichen, bei dem CCA1 und XPO1 nicht direkt miteinander interagieren. Bei Koexpression mit CCA1 alleine konnte LCL1 in Hefe das Reporteragen nicht aktivieren (Abb. 23B).

Abb. 29A zeigt, dass die Proteine LCL1, CCA1 und XPO1 im heterologen Hefesystem kein Heterotrimer ausbilden. Nach der Transformation konnten die Kolonien zwar auf SD-HWLU-Platten wachsen, es waren also alle drei Plasmide in den Hefezellen vorhanden, auf Indikatorplatten konnte allerdings keine Blaufärbung der Hefekolonien festgestellt werden. In Abb. 29B-H sind die Vektorkontrollen dargestellt, welche ebenfalls keine Blaufärbung der Hefezellen aufwiesen.

	pESC	pB42	pGilda	
A	LCL1	CCA1	XPO1	
B	-	CCA1	XPO1	
C	LCL1	-	XPO1	
D	LCL1	CCA1	-	
E	-	-	XPO1	
F	LCL1	-	-	
G	-	CCA1	-	
H	-	-	-	

Abb. 29: Hefe *Three-Hybrid* Analyse. Untersuchung der Ausbildung eines trimären Proteinkomplexes aus LCL1, CCA1 und XPO1.

Die *LCL1*-cDNA wurde in den Vektor pESC kloniert um als Brückenprotein zwischen CCA1 und XPO1 zu fungieren. Das Fusionsprotein CCA1-B42 wurde in Anwesenheit von LCL1 auf Interaktion mit XPO1 durch Koexpression im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] getestet (A). (B)-(H) stellen Vektorkontrollen dar.

4.5 Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen

4.5.1 GFP-LCL-Fusionsproteine

Um die Lokalisation der LCL-Proteine innerhalb der Zelle zu analysieren, wurden GFP-Fusionsproteine mit LCL2-LCL4 hergestellt und transient in BY-2 Protoplasten überexprimiert (Kap. 3.7). Hierbei sollten sowohl die Lokalisation der jeweiligen Vollängenproteine als auch die der C-terminalen Verkürzungen, bei denen die putative NES deletiert waren, untersucht werden. Abb. 30 zeigt, dass das GFP-LCL2(1-330) Fusionsprotein gleichverteilt in der Zelle vorlag (Abb. 30A), wohingegen das Fusionsprotein mit der C-terminalen Verkürzung, LCL2(1-264), ausschließlich im Kern zu finden war (Abb. 30B). Bei LCL2(1-264) handelt es sich um eine Proteinverkürzung, deren funktionale NES deletiert wurde, wodurch die Interaktion mit XPO1 nicht mehr möglich war. Der ONPG-Assay bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 22-3). Die Lokalisation des GFP-LCL3 Fusionsproteins ist hingegen eine andere. Im Gegensatz zu LCL2 befand sich schon das LCL3-Vollängenprotein (1-287) ausschließlich im Kern (Abb. 30C), die Deletion des C-Terminus in LCL3(1-244) änderte nichts an seiner Lokalisation in der Zelle (Abb. 30D). GFP-LCL4(1-302) hingegen wies wieder eine Gleichverteilung der Lokalisation des Fusionsproteins auf (Abb. 30E), es befand sich gleichermaßen im Kern und im Cytoplasma. Die C-terminale Verkürzung LCL4(1-256) war vom Cytoplasma ausgeschlossen, das GFP-Fusionsprotein befand sich ausschließlich im Kern (Abb. 30F). Dies entspricht den Ergebnissen des ONPG-Assays, bei dem gezeigt werden konnte, dass die Stärke der Interaktion mit XPO1 um die Hälfte reduziert war, wenn der C-terminale Bereich in LCL4 fehlte (Abb. 22-9). In Abb. 30G und H ist die Lokalisation des GFP-LCL5(1-282) Fusionsproteins und dessen C-terminaler Verkürzung, LCL5(1-235), gezeigt. Das LCL5-Vollängenprotein befand sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma (G), die C-terminale Verkürzung war ausschließlich im Kern lokalisiert (H). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch den ONPG-Assay bestätigt, der die Interaktion des Vollängenproteins mit XPO1 aufzeigte (Abb. 22-10) und aus dem ersichtlich war dass der C-terminalen Verkürzung die funktionale NES fehlte, da die Interaktion mit XPO1 deutlich reduziert war (Abb. 22-12).

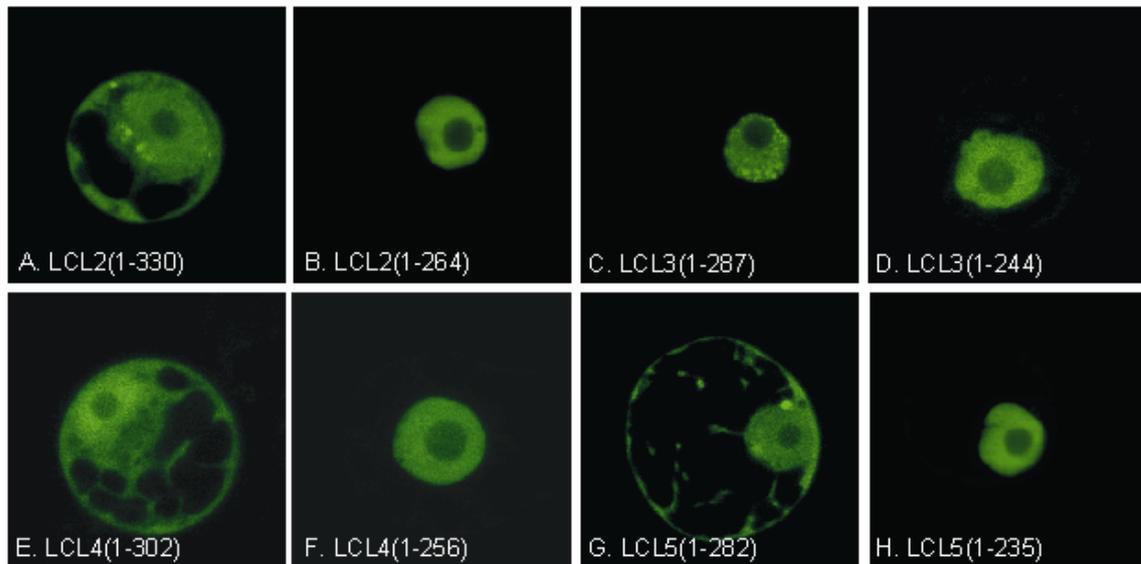


Abb. 30: *In vivo* Lokalisation von GFP-LCL Fusionsproteinen in BY-2 Protoplasten.

BY-2 Protoplasten wurden transient mit GFP-Fusionsproteinkonstrukten transfiziert und die Lokalisation der grünen Fluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Repräsentative Aufnahmen von (A) GFP-LCL2(1-330); (B) GFP-LCL2(1-264); (C) GFP-LCL3(1-287); (D) GFP-LCL3(1-244); (E) GFP-LCL4(1-302); (F) GFP-LCL4(1-256); (G) GFP-LCL5(1-282); (H) GFP-LCL5(1-235).

4.5.2 GFP-Fusionen mit den *Clock*-Proteinen

Auch mit den *Clock*-Proteinen LHY und CCA1 wurden GFP-Fusionsproteine hergestellt. Die Vollängenproteine wurden transient in BY-2 Protoplasten überexprimiert und die Lokalisation der grünen Fluoreszenz analysiert. Abb. 31A stellt die Lokalisation des GFP-CCA1 Fusionsproteins dar. Die grüne Fluoreszenz war ausschließlich im Zellkern zu detektieren. Auch die Lokalisation des GFP-LHY Fusionsproteins war auf den Kern beschränkt, wie Abb. 31B verdeutlicht.

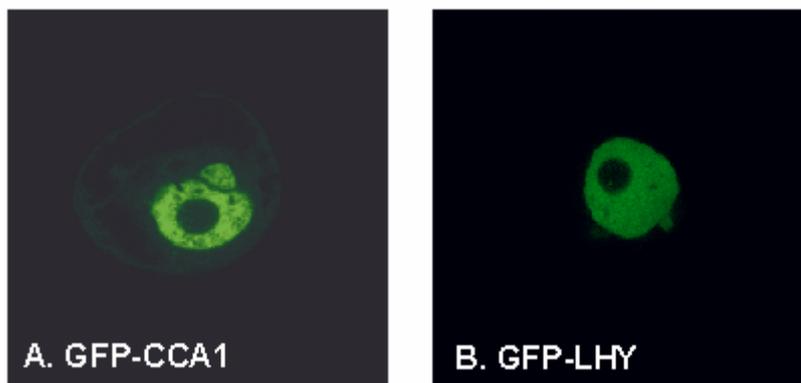


Abb. 31: *In vivo* Lokalisation von GFP-CCA1- und -LHY-Fusionsproteinen in BY-2 Protoplasten. BY-2 Protoplasten wurden transient mit GFP-Fusionsproteinkonstrukten transfiziert und die Lokalisation der grünen Fluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Repräsentative Aufnahmen von (A) GFP-CCA1, (B) GFP-LHY.

4.6 Expression von LCL1

4.6.1 Circadiane Expression von LCL1

LHY und CCA1 sind wichtige Komponenten der circadianen Uhr in *A. thaliana* (Wang und Tobin, 1998; Schaffer *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1999). Beide Gene werden circadian kontrolliert, ihre rhythmische Expression hält auch unter konstanten Lichtbedingungen an (Schaffer *et al.*, 1998; Wang und Tobin, 1998). Die Expression der Transkripte ist am Morgen maximal.

Aufgrund der Homologien zwischen LCL1 und den *Clock*-Proteinen CCA1 und LHY, und der Tatsache, dass LCL1 an das gleiche Promotorelement wie die beiden *Clock*-Proteine bindet, sollte analysiert werden, ob LCL1 ebenfalls circadian reguliert wird, um einen Hinweis auf seine Funktion als Transkriptionsregulator zu erhalten.

Über drei Tage hinweg wurde alle 4 h Blattmaterial von elf Wochen alten, im KT (Kurztag) gewachsenen *A. thaliana* Pflanzen geerntet. Die Zeitpunkte 0 (ZP 0), 24 und 48 entsprachen der Uhrzeit 10 Uhr morgens (10 am), zu der das Licht anging. Zum ZP 8, 32 und 56 (6 pm) wurde das Licht ausgeschaltet, um KT-Bedingungen zu gewährleisten. Pflanzenmaterial wurde während der Nacht unter Grünlicht-Bedingungen geerntet, sodass die Pflanzen keinem induzierendem Lichtsignal

ausgesetzt waren. Aus dem Blattmaterial wurde RNA isoliert und diese mit Hilfe eines *Northern Blots* und eines *Dot blots* analysiert (Kap. 3.3).

Abb. 32 zeigt, dass die Expression von *LCL1* einem diurnalen Rhythmus unterliegt und morgens am höchsten ist. Zum ZP 0 war die Expression von *LCL1* hoch, es war ein deutliches Signal zu erkennen. Zum ZP 4 hatte die Stärke des Signals schon deutlich abgenommen und war zu den Zeitpunkten 8 und 12 beinahe verschwunden. Die *LCL1*-mRNA Menge stieg zum ZP 16 langsam wieder an und erreichte zum ZP 24, wenn das Licht anging, ihr Maximum. Zwischen ZP 28 und ZP 40 konnte kaum ein Transkript detektiert werden. Zum ZP 44 stieg die Transkriptmenge wieder an, erreichte ihre maximale Stärke zum ZP 48 und fiel zum ZP 52 wieder ab. Zum ZP 56 und 60 lag kein Signal vor, erst zum ZP 64 und 68 war wieder ein Transkript zu detektieren. Der *Northern Blot* und die *Dot Blot* Analyse lieferten hierbei die gleichen Ergebnisse.

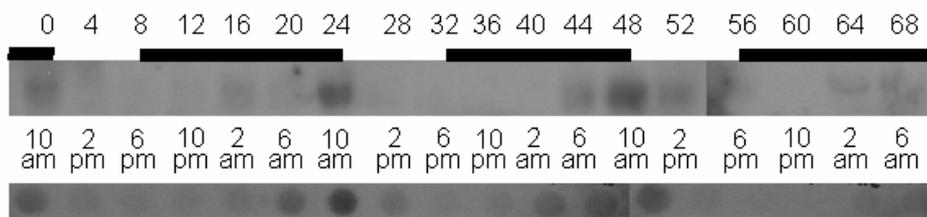


Abb. 32: Diurnale Expression der *LCL1*-mRNA.

Die obere Zahlenreihe gibt die Zeitpunkte [h] an, zu denen Blattmaterial geerntet wurde. In der unteren Zahlenreihe wurden die entsprechenden Uhrzeiten angegeben. Das Experiment wurde unter KT-Bedingungen durchgeführt, die schwarzen Balken repräsentieren die Dunkelphasen. Oben ist die *Northern*-Analyse, unten die *Dot Blot*-Analyse dargestellt.

Diese Ergebnisse konnten durch „digitale“ Northern Experimente bestätigt werden (www.genevestigator.ethz.ch). *NASC Array* Experimente konnten darüberhinaus zeigen, dass eine circadiane Expression von *LCL1* vorliegt. Die rhythmische Expression von *LCL1* hält selbst unter konstanten Lichtbedingungen an.

4.6.2 Lokalisation der *LCL1*-Promotoraktivität in *A. thaliana*

Um das Expressionsmuster von *LCL1* in Keimlingen und unterschiedlichen Pflanzengeweben zu untersuchen, wurden Promotor-GUS Analysen durchgeführt (Kap. 3.11). Hierbei wurden transgene Pflanzen analysiert, die das Reporter-gen β -Glucuronidase unter der Kontrolle zweier verschieden langer Promotorfragmente von *LCL1* exprimierten. Da das Gen *upstream* von *LCL1* in einer Kopf an Kopf Orientierung nur 373 bp entfernt liegt, wurden zwei Promotor-GUS Konstrukte hergestellt. Beide Promotorkonstrukte wurden als Transkriptionsfusionen in den pGPTV-BAR-Vektor kloniert. Ein Konstrukt enthielt lediglich das kurze 373 bp lange Promotorfragment, wohingegen das zweite einen 1830 bp langen Abschnitt genomischer DNA umfasste, welcher weit in das *upstream* liegende Gen hineinragte. Es wurden Pflanzen der T2-Generation untersucht.

Das kurze Promotorfragment schien die vollständige Aktivität des *LCL1*-Promotors zu besitzen, da keine Expressionsunterschiede des Reportergens bezüglich Stärke oder Gewebelokalisation im Vergleich zum langen Promotorfragment festgestellt werden konnten. In Abb. 33 wurden Bilder von Pflanzen ausgewählt, die das Reporter-gen unter der Kontrolle des langen Promotorfragments exprimierten. Der *LCL1*-Promotor war in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien aktiv. Die GUS-Expression war in den Kotyledonen und im Hypokotyl von Keimlingen zu detektieren (Abb. 33A), sowie in Blättern adulter Pflanzen (Abb. 33B, C), in den Leitgeweben (Abb. 33C, D) und Trichomen (Abb. 33D, E). Der Blattquerschnitt von 5 μ m Dicke verdeutlicht, dass sich die Blaufärbung hauptsächlich um die Spaltöffnungen der Blätter herum konzentrierte, eine leichte Färbung aber auch überall in den Blattparenchymzellen und der Epidermis zu finden war (Abb. 33 F). In Knospen und Blüten war der *LCL1*-Promotor ebenfalls aktiv (Abb. 33G, H). Abb. 33I zeigt eine Blaufärbung der Antheren und Filamente, in Abb. 33J sieht man die blaugefärbte Narbe und Abb. 33K stellt einen Querschnitt durch eine Anthere dar, in der eine Aktivität des Reportergens in den Pollen und dem umgebenden Pollensackgewebe festgestellt werden konnte. Auch in Schoten war das Reporter-gen aktiv (Abb. 33L), wobei sich dort die Blaufärbung hauptsächlich auf Gewebe beschränkte, die die Samen umgeben. In Wurzeln konnte ebenfalls eine leichte Blaufärbung festgestellt

werden (Abb. 33M, N), die am deutlichsten in den Leitbündeln und in den Spitzen der Haupt- und Seitenwurzeln auftrat.

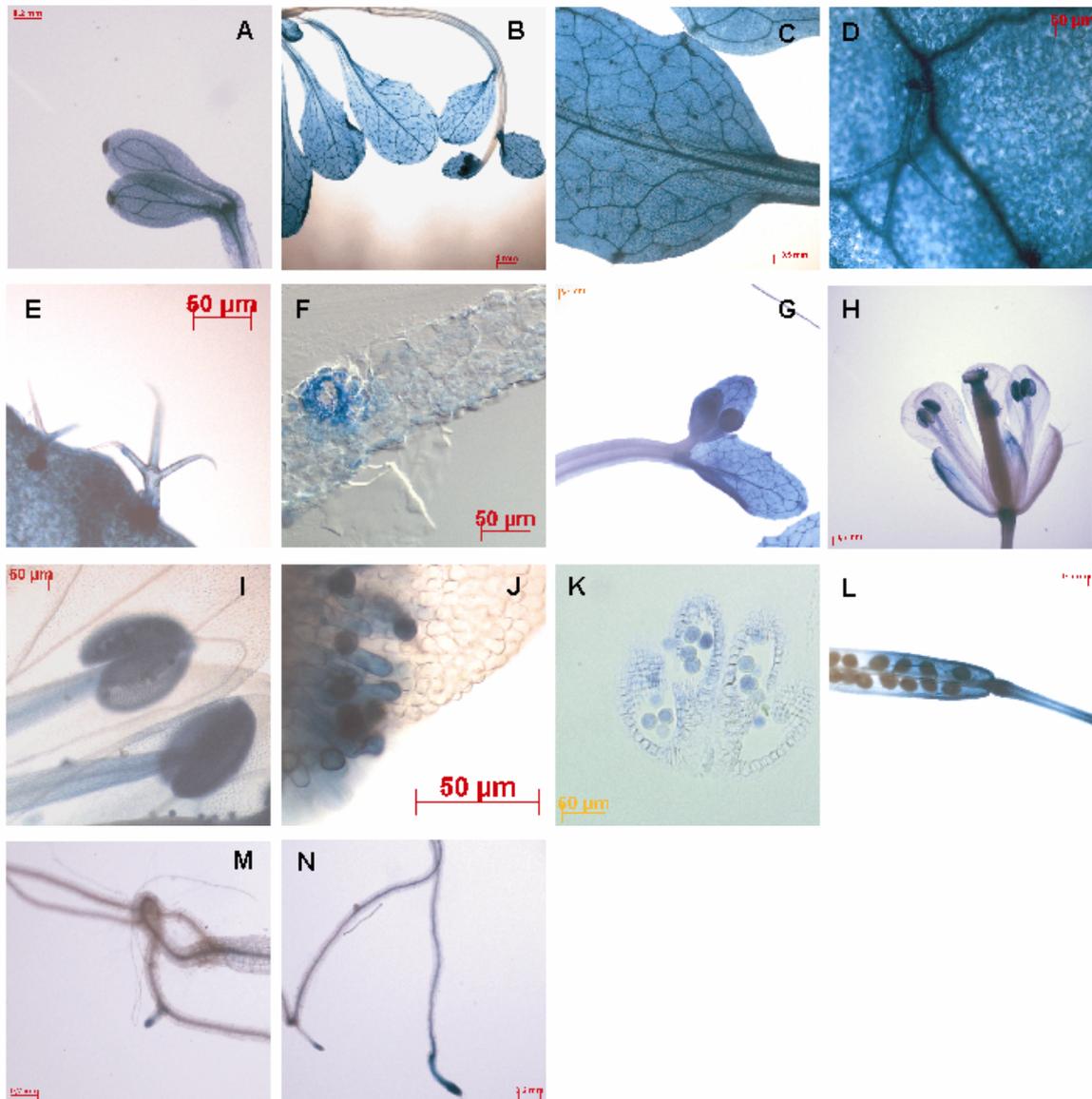


Abb. 33: Lokalisation der LCL1-Promotoraktivität in *A. thaliana*.

Hellfeldaufnahmen von Pflanzen, die das *GUS*-Reportergen unter der Kontrolle des *LCL1*-Promotors exprimierten. Repräsentative Aufnahmen von (A) Kotyledonen, (B, C) adulten Blättern, (D, E) Trichome, (F) eines Blattquerschnitts, (G) Knospen, (H) einer Blüte, (I) Antheren, (J) einer Narbe, (K) eines Antherenquerschnitts, (L) einer Schote und (M, N) Wurzeln.

4.7 Analyse transgener *A. thaliana* Pflanzen

4.7.1 LCL1 T-DNA Insertionslinien

Um Hinweise auf die Funktion eines Gens zu erlangen, kann man Pflanzen untersuchen, die einen Defekt in diesem Gen aufweisen, sodass das dafür kodierende Protein nicht mehr gebildet werden kann. Die phänotypische Analyse dieser Pflanzen ermöglicht es gegebenenfalls, Rückschlüsse auf die Funktion des defekten Gens zu ziehen. In dieser Arbeit wurden *A. thaliana* Pflanzen von Syngenta analysiert, die eine T-DNA im Promotorbereich von *LCL1* aufwiesen. Die Pflanzen wurden zunächst auf Insertion dieser T-DNA untersucht. Anschließend wurden homozygote LCL1 T-DNA Insertionslinien hergestellt, die dann auf *LCL1*-Expression analysiert wurden.

Von insgesamt 20 Pflanzen, die durch Aussaat der Syngenta-Samen erhalten wurden, wurde genomische DNA isoliert (Kap. 3.2.2) und mit Hilfe mehrerer PCR analysiert. Zunächst wurde mit einem genspezifischen 3'-Primer und einem T-DNA-spezifischen 5'-Primer ein DNA-Fragment von etwa 1100 bp amplifiziert, welches in der T-DNA Insertionslinie den Bereich der *left border* der T-DNA bis hinein in das *LCL1*-Gen darstellte.

Abb. 34 zeigt die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Agarosegel. Es wird deutlich, dass 16 der 20 Linien die T-DNA Insertion aufwiesen. Die PCR ergab ein Fragment von 1100 bp Länge. Aus DNA der Linien 8, 12, 14 und 17 wurde kein PCR Produkt erhalten. Diese Pflanzen ohne T-DNA Insertion wurden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

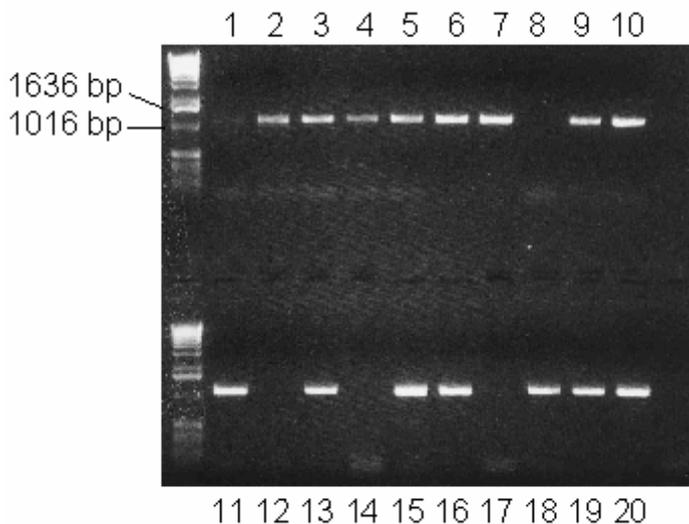


Abb. 34: PCR-Analyse auf Integration der T-DNA. Untersuchung des Bereichs der *left border* der T-DNA.

Die genomische DNA 20 putativer LCL1 T-DNA Insertionslinien wurde durch PCR mit einem T-DNA-spezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf einen Bereich der *left border* der T-DNA untersucht. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Daraufhin wurde mit einem T-DNA-spezifischen 3'-Primer und einem promotorspezifischen 5'-Primer ein im Bereich der *right border* der T-DNA liegendes, etwa 700 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse dieser PCR-Analysen. Alle 16 Linien waren bezüglich dieser PCR positiv, es wurde ein Fragment von 700 bp amplifiziert. Zusätzlich wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit den T-DNA-spezifischen Primern gezeigt, dass im Zuge der Insertion der T-DNA ein 22 bp großes DNA Fragment im Promotorbereich von LCL1 deletiert war.

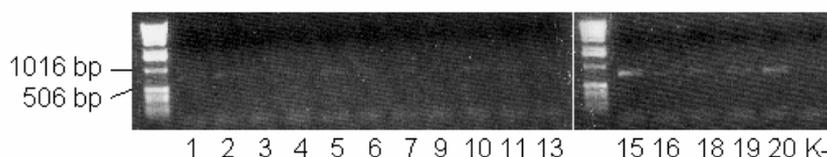


Abb. 35: PCR-Analyse auf Integration der T-DNA. Untersuchung des Bereichs der *right border* der T-DNA.

Die genomische DNA von 16 LCL1 T-DNA Insertionslinien wurde durch PCR mit einem promotorspezifischen 5'-Primer und einem T-DNA-spezifischen 3'-Primer auf einen Bereich der *right border* der T-DNA untersucht. (K-) Negativkontrolle mit *A. thaliana* wt-DNA als *template*. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Bei einer weiteren PCR wurden nun heterozygote Pflanzen von homozygoten Pflanzen unterschieden. Dies wurde mit dem promotorspezifischen 5'-Primer und dem genspezifischen 3'-Primer durchgeführt. Bei Vorhandensein der T-DNA sollte hier kein PCR-Produkt entstehen, da es die Amplifikation der gesamten T-DNA vorausgesetzt hätte und diese etwa 7 kb groß ist.

Die Ergebnisse der PCR sind in Abb. 36 dargestellt. Sechs der 16 Linien wiesen das Wildtyp (wt)-Fragment von etwa 1800 bp auf und waren somit heterozygot bezüglich der T-DNA Insertion. Linien 1, 2, 5, 6, 7, 11, 15, 16, 19 und 20 waren homozygote LCL1 T-DNA Insertionslinien, bei diesen wurde kein Signal im Gel detektiert.

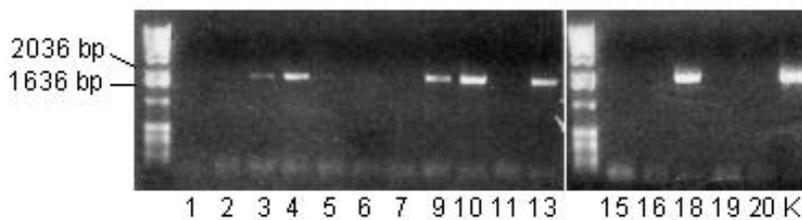


Abb. 36: PCR-Analyse zur Unterscheidung homozygoter und heterozygoter LCL1 T-DNA Insertionslinien.

Die genomische DNA von 16 LCL1 T-DNA Insertionslinien wurde durch PCR mit einem promotorspezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein eines wt-Allels untersucht. (K) Positivkontrolle mit *A. thaliana* wt-DNA als *template*. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Die homozygote Linie 6 wurde mit Wildtyp Col-0 rückgekreuzt. Aus dieser Rückkreuzung konnten sieben F1-Samen geerntet werden. Diese wurden ausgesät, aus den Blättern genomische DNA isoliert und mit Hilfe von PCR-Analysen genotypisiert. Eine PCR mit dem T-DNA spezifischen 5'-Primer und dem genspezifischen 3'-Primer, zur Amplifikation des Bereichs der *left border* der T-DNA, ergab, dass zwei der sieben Linien, die aus der Kreuzung hervorgegangen waren, eine T-DNA Insertion besaßen. Abb. 37A stellt die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Agarosegel dar.

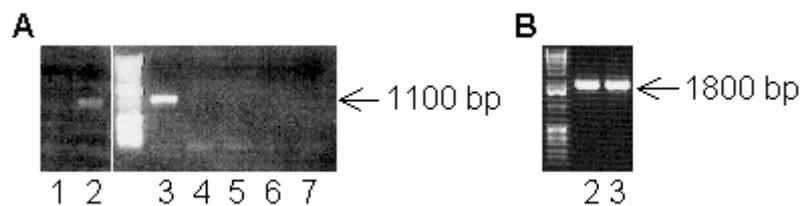


Abb. 37: PCR-Analyse der rückgekreuzten Linien auf Integration einer T-DNA

(A) Die genomische DNA von sieben aus einer Kreuzung hervorgegangene Linien wurde durch PCR mit einem T-DNA-spezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein einer T-DNA untersucht.

(B) Die genomische DNA der zwei Linien, die die T-DNA besaßen (Linien 2 und 3), wurde durch PCR mit einem promotorspezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein eines wt-Fragments untersucht. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Linien 2 und 3 waren im Besitz eines wt-Allels, sie waren, wie zu erwarten war, heterozygot bezüglich der T-DNA Insertion. Eine PCR mit dem promotorspezifischen 5'-Primer, dem genspezifischen 3'-Primer und genomischer DNA dieser Linien als *template* ergab ein PCR-Produkt von 1800 bp Länge. Dies ist in Abb. 37B dargestellt. Von beiden Linien wurden die Samen geerntet, DNA von den daraus resultierenden 30 Pflanzen (F2-Generation) isoliert und mittels PCR mit dem T-DNA spezifischen 5'-Primer und LCL1-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein der T-DNA übergeprüft.

Abb. 38 zeigt die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Agarosegel. Von den 30 Pflanzen besaßen 27 die T-DNA Insertion. Die PCR, durch die der Bereich der *left border* der T-DNA amplifiziert wurde, ergab eine Bande bei 1100 bp. Pflanzen der Linien 5, 19 und 27 besaßen keine T-DNA Insertion an dieser Stelle, von ihnen wurde kein Produkt erhalten.

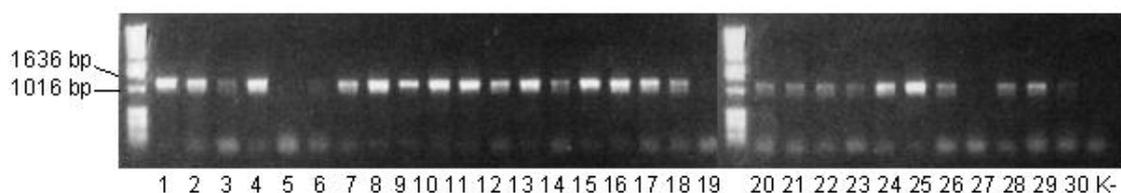


Abb. 38: PCR-Analyse von aus der Kreuzung hervorgegangenen F2 T-DNA Insertionslinien.

Die genomische DNA von 30 Linien wurde durch PCR mit einem T-DNA spezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf den Bereich der *left border* der T-DNA untersucht. (K-) Negativkontrolle mit *A. thaliana* wt-DNA als *template*. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Die heterozygoten Pflanzen, die das wt-Allel besaßen, wurden daraufhin durch eine PCR mit dem promotor- und dem genspezifischem Primer aussortiert.

In Abb. 39 ist zu sehen, dass die Linien 5, 19 und 27 auch bei dieser PCR kein Signal zeigten. Sie wurden verworfen, da die DNA vermutlich degradiert war. Von den Linien 1, 2, 6, 7, 9, 11, 16 und 24 wurde ein PCR-Produkt von 1800 bp erhalten. Die restlichen 19 der 30 aus der Kreuzung hervorgegangenen F2-Pflanzen waren homozygot bezüglich der T-DNA Insertion, sie lieferten kein wt-Signal.

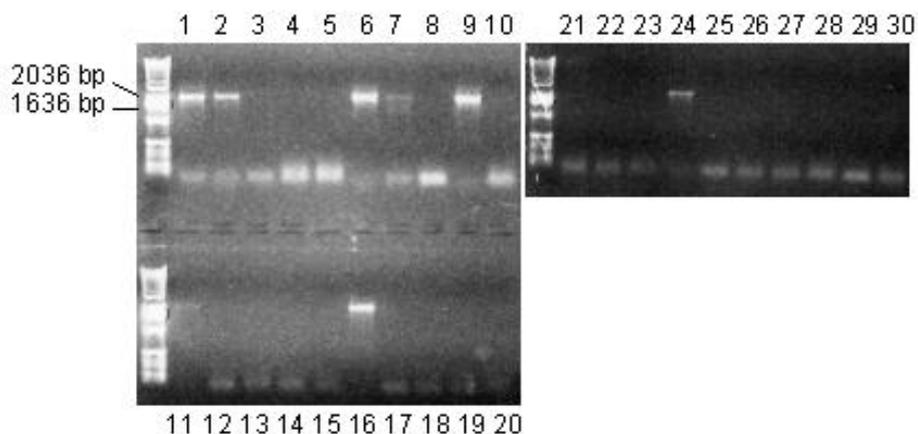


Abb. 39: PCR-Analyse zur Unterscheidung homozygoter und heterozygoter T-DNA Insertionslinien

Die genomische DNA von aus der Kreuzung hervorgegangenen F2 T-DNA Insertionslinien wurde durch PCR mit einem promotorspezifischen 5'-Primer und einem LCL1-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein eines wt-Allels untersucht. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Eine Analyse von im KT und im LT angezogenen homozygoten LCL1 T-DNA Insertionslinien ergab keinen phänotypischen Unterschied zu wt-Pflanzen, die unter gleichen Lichtbedingungen wuchsen. Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob die Insertion der T-DNA im Promotorbereich von *LCL1* die Expression von LCL1 verhindert. Die RT-Reaktion der RNA aus den T-DNA Insertionslinien wurde mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers durchgeführt. Damit wurde zunächst die gesamte mRNA-Population der Proben in cDNA umgeschrieben. Die PCR-Reaktion erfolgte mit LCL1-spezifischen Primern, mit deren Hilfe ein etwa 700 bp großes *LCL1*-Fragment amplifiziert werden konnte.

In Abb. 40 ist dargestellt, dass sowohl die homozygoten T-DNA Insertionslinien von Syngenta als auch die aus der Rückkreuzung hervorgegangenen homozygoten Linien ein *LCL1*-Transkript besaßen und sich nicht als *LCL1-knockouts* erwiesen. Das amplifizierte Fragment wies die erwartete Länge von 700 bp auf. Das PCR-Produkt ließ sich in allen sechs untersuchten Linien schon nach 25 Zyklen detektieren. Linien 6, 17, 18 und 26 besaßen weniger *LCL1*-Transkript als der Wildtyp, Linie 14 zeigte ein dem Wildtyp entsprechend starkes Signal und Linie 24 schien sogar mehr *LCL1*-mRNA zu besitzen. Die Negativkontrolle wurde mit RNA von Linie 26 ohne vorherige RT durchgeführt und lieferte kein PCR Produkt.

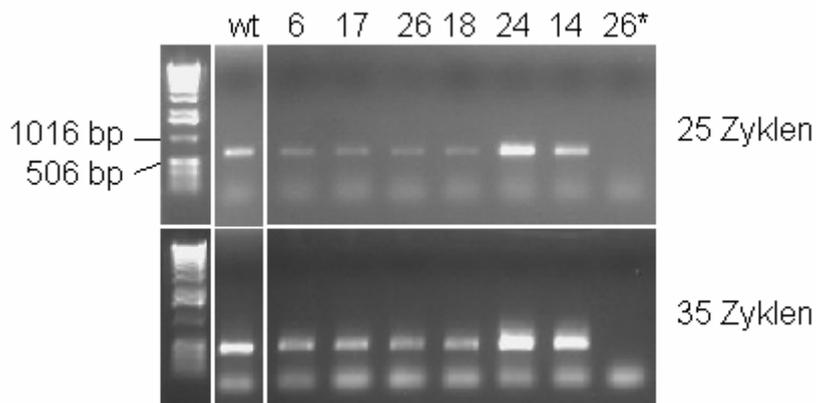


Abb. 40: Expressionsanalyse der *LCL1* T-DNA Insertionslinien.

RT-PCR mit RNA aus sechs *LCL1* T-DNA Insertionslinien. Nach 25 Zyklen und nach 35 Zyklen wurden dem PCR-Ansatz jeweils 10 µl entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert. Linien 6, 17 und 18 waren homozygote T-DNA Insertionslinien von Syngenta, Linien 26, 24 und 14 waren F2 T-DNA Insertionslinien, die aus den Kreuzungen hervorgegangen waren. (26*) Negativkontrolle mit RNA von Linie 26 ohne vorherige RT.

4.7.2 *LCL*-RNAi Pflanzen

Die *LCL*-Proteine weisen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit in ihrer MYB-Domäne und der *LCL*-Domäne auf. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass eine gewisse funktionale Redundanz auftreten könnte. Stört man die Expression eines der *LCL*-Gene, könnte ein anderes dessen Funktion teilweise übernehmen. Diese Tatsache würde eine phänotypische Analyse erschweren, bei der man durch das Ausschalten eines Gens Hinweise auf dessen Funktion erlangen

möchte. Die RNAi-Methode ermöglicht es nun, die Expression mehrerer Gene gleichzeitig in einem Organismus zu unterdrücken (sogenannter „*knockdown*“). Um Rückschlüsse auf ihre Funktion zu erzielen, wurde dieser Ansatz auch für die LCL-Familie gewählt (Kap. 3.14). Hierbei wurden 260-280 bp große Sequenzbereiche der einzelnen LCL-Gene ausgewählt, die keine Ähnlichkeiten zu den anderen LCL-Genen aufwiesen, sodass sichergestellt war, dass spezifisch die Expression jedes einzelnen LCL-Gens unterdrückt wurde. Diese Sequenzen wurden zweimal hintereinander in den Pflanzenvektor pART27 kloniert, sodass sie in entgegengesetzten Orientierungen, getrennt durch eine Intronsequenz und unter der Kontrolle des 35S-Promotors, im Vektor vorlagen. Durch die Transkription dieser gesamten RNAi-Kassette in der Pflanzenzelle kann sich dabei eine *hairpin* Struktur ausbilden, die durch das Enzym *Dicer-like 1* (DCL1) in kurze Fragmente zerlegt wird. Die dabei entstehenden siRNAs werden dann in einen RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut und haben die Funktion, den Komplex an die endogenen homologen mRNA-Moleküle zu leiten. Diese werden dann durch den RISC-Komplex geschnitten, was zur Degradation der endogenen mRNAs und damit zur Unterdrückung der LCL-Expression führt. Nach der Transformation mit dem LCL-RNAi-pART27-Konstrukt wurden die T1-Pflanzen selektiert. Zehn Pflanzen konnten aus der Selektion auf Platte gewonnen werden, wurden auf Erde umgesetzt und bis zur Samenreife weitergezogen. Aus den Blättern der transgenen T1-Pflanzen wurde genomische DNA isoliert und diese mittels PCR mit einem 35S-spezifischen 5'-Primer und einem LCL5-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein des LCL-RNAi Konstrukts im Genom untersucht. Hierbei wurde ein PCR-Fragment von etwa 1500 bp erwartet.

Abb. 41 stellt die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Agarosegel dar. Sie zeigt, dass acht der zehn Linien die RNAi-Kassette in ihr Genom integriert hatten, die Größe des PCR-Fragments entsprach wie erwartet etwa 1500 bp. Als Positivkontrolle wurden 100 ng des LCL-RNAi Konstrukts im Plasmid pHannibal als *template* verwendet. Für die Negativkontrolle der PCR wurde genomische DNA aus einer wt-Pflanze eingesetzt. Linien 2 und 4, sowie die Negativkontrolle ergaben kein PCR-Produkt. Die Samen der Linien 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 wurden geerntet.

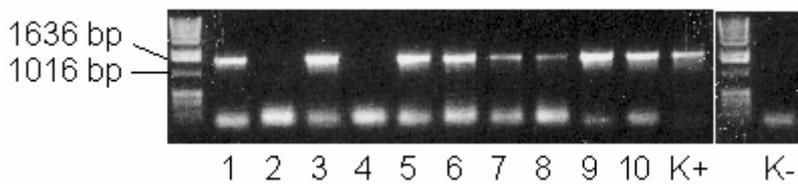


Abb. 41: PCR-Analyse auf Integration der RNAi-Kassette in das *A. thaliana* Genom.

Die genomische DNA zehn transgener Linien wurde durch PCR mit einem 35S-spezifischen 5'-Primer und einem LCL5-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein der LCL-RNAi-Kassette untersucht. Bei der Positivkontrolle (K+) wurden 100 ng des LCL-RNAi-Vektors als *template* eingesetzt, als Negativkontrolle (K-) wurde DNA einer wt-Pflanze verwendet. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Pflanzen der T2-Generation wurden daraufhin auf die Expression der LCL-RNAi-Kassette analysiert. Dies wurde mittels RT-PCR durchgeführt, bei der zunächst eine Reverse Transkription die aus Pflanzen isolierte mRNA in cDNA umschreibt, die dann als *template* für eine PCR eingesetzt werden kann. Durch die richtige Wahl der Primer kann so die relative Menge an spezifischer mRNA ermittelt werden.

Die RT-Reaktion der RNA aus den LCL-RNAi-Pflanzen wurde mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte mit LCL1-spezifischen Primern, mit deren Hilfe ein etwa 700 bp großes LCL1-Fragment amplifiziert werden konnte. Da das verwendete LCL1-RNAi-Konstrukt aber nur 260 bp betrug, wurde gewährleistet, dass nur cDNA, die aus endogener mRNA stammte, amplifiziert wurde.

Abb. 42 zeigt die Expressionsanalyse der acht transgenen Linien mit LCL1-spezifischen Primern. Linien 1, 3 und 5 wiesen ein dem Wildtyp entsprechend starkes Signal auf. Die Größe des PCR-Produkts entsprach der zu erwarteten Größe von 700 bp. In diesen Pflanzen schien die Expression von *LCL1* nicht herunterreguliert zu sein. Linie 6 exprimierte *LCL1* sogar noch stärker als der Wildtyp. Linien 7 und 8 wiesen selbst nach 35 Zyklen nur ein sehr schwaches Signal auf und in Linien 9 und 10 war auch nach 35 Zyklen kein *LCL1*-Transkript detektierbar. In diesen beiden Linien war die *LCL1*-Expression eindeutig herunterreguliert.

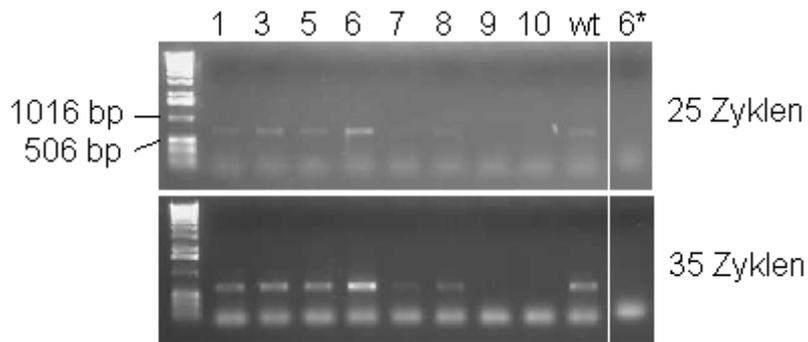


Abb. 42: Analyse der Expression von LCL1 in LCL-RNAi Pflanzen.

Acht transgene Linien, die die RNAi-Kassette inseriert hatten, wurden durch RT-PCR analysiert. Nach 25 Zyklen und nach 35 Zyklen wurden dem PCR-Ansatz jeweils 10 μ l entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert. (wt) Expression von LCL1 im Wildtyp. (6*) Negativkontrolle mit RNA von Linie 6 ohne vorherige RT.

Für die phänotypische Analyse der acht Linien wurden jeweils mehrere Pflanzen pro Linie untersucht. Jeweils fünf Pflanzen pro Linie wurden sowohl unter LT- als auch unter KT-Bedingungen angezogen und alle drei bis fünf Tage der Phänotyp mit wt-Pflanzen gleichen Alters verglichen. Weder die Pflanzen im LT noch die Pflanzen im KT zeigten einen phänotypischen Unterschied zu den wt-Pflanzen, die unter gleichen Bedingungen wuchsen. Auch Linien 9 und 10 machten dabei keine Ausnahme.

4.7.3 LHY MYB-überexprimierende Pflanzen

4.7.3.1 LCL1- und LCL1(NESmut)-überexprimierende Pflanzen

Durch die Überexpression eines Proteins in der Pflanze erhofft man sich einen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp und somit Hinweise auf die Funktion des Proteins. Hier wurden Pflanzen generiert, die mit einem Vektor transformiert waren, bei dem LCL1 bzw. LCL1(NESmut) unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand (Kap. 3.15.1). Durch die Überexpression der NES-Mutante könnte ein veränderter Phänotyp entstehen, der auf einen defekten Export von LCL1 rückzuführen wäre.

Transgene Pflanzen der T2-Generation wurden im LT angezogen und phänotypisch analysiert. Weder die Pflanzen, die LCL1 überexprimieren sollten,

noch die Pflanzen, die putativ *LCL1(NESmut)* überexprimierten, zeigten einen phänotypischen Unterschied zu wt-Pflanzen.

Pflanzen von jeweils zwei Linien der T2-Generation wurden mit Hilfe einer RT-PCR auf die Expression der Transgens hin untersucht. Die RT-Reaktion wurde mit einem Oligo-dT-Primer durchgeführt, für die PCR wurden *LCL1*-spezifische Primer benutzt. Diese amplifizierten ein Fragment von etwa 700 bp. Linien 1 und 2 waren Pflanzen, die *LCL1(NESmut)* überexprimieren sollten, Linien 5 und 6 enthielten das *LCL1*-Transgen.

Abb. 43 stellt dar, dass die PCR mit den Linien 1, 5 und 6 ein PCR-Produkt von 700 bp Länge ergab. Linie 2 lieferte kein detektierbares Signal. Die Expressionsanalyse zeigte, dass Linie 1 mehr *LCL1(NESmut)*-Transkriptmenge besaß als die wt-Pflanze. Nach 25 Zyklen war bei dieser ein stärkeres Signal zu detektieren. Nach 35 Zyklen glichen sich die beiden Signale allerdings mehr an, sodass nur noch eine leicht erhöhte *LCL1(NESmut)*-mRNA-Menge vorlag. Linien 5 und 6 sollten *LCL1* überexprimieren. Es war bei beiden Linien sowohl nach 25 Zyklen als auch nach 35 Zyklen ein Transkript zu detektieren, allerdings waren die Signale schwächer als bei der wt-Pflanze. Für die Negativkontrolle wurde 100 ng RNA der Linie 5 ohne vorherige RT eingesetzt. Diese PCR ergab kein Produkt.

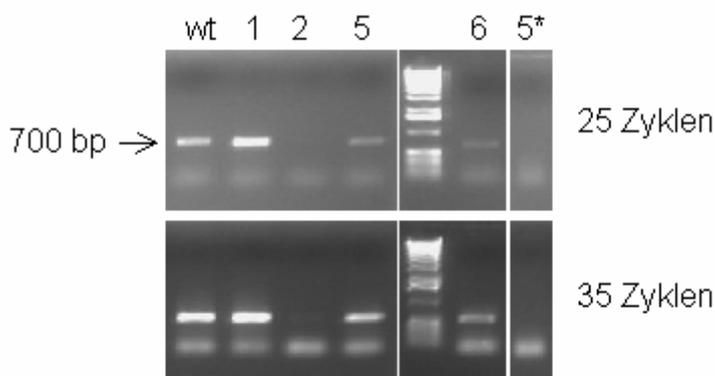


Abb. 43: Expressionsanalyse der *LCL1*- und *LCL1(NESmut)*-überexprimierenden Pflanzen. RT-PCR mit RNA aus vier transgenen Linien, die das 35S::*LCL1*- (5, 6) bzw. 35S::*LCL1(NESmut)*-Konstrukt (1, 2) trugen. Nach 25 Zyklen und nach 35 Zyklen wurden dem PCR-Ansatz jeweils 10 µl entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert. (5*) Negativkontrolle mit RNA von Linie 5 ohne vorherige RT.

4.7.3.2 Überexpression der MYB-Domäne von LCL1 in *A. thaliana*

Die EMSA-Analyse zeigte, dass die MYB-Domäne von LCL1 alleine an die DNA binden kann (Abb. 16B). Mit der Überexpression der MYB-Domäne von LCL1 in *A. thaliana* wurde der Frage nachgegangen, ob die MYB-Domäne *in planta* an Promotoren von *evening genes* bindet und damit den Zugang zum EE für andere MYB-Transkriptionsfaktoren blockiert. Unter diesen Umständen könnten LHY und CCA1 eventuell nicht mehr an ihre Zielsequenz binden und man könnte erwarten, dass die Pflanzen einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie LHY/CCA1 *knockout* Pflanzen. Pflanzen, denen sowohl CCA1 als auch LHY fehlt, haben die Fähigkeit verloren, circadiane Oszillationen aufrechtzuerhalten (Alabadí *et al.*, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002)

T1-Samen von Pflanzen, die mit dem 35S::MYB-Konstrukt transformiert worden waren (Kap. 3.15.2), wurden mehrmals einer BASTA-Selektion unterworfen, aber es konnten keine transgenen Pflanzen gewonnen werden.

4.7.3.3 LHY-überexprimierende Pflanzen

Pflanzen, in denen LHY überexprimiert war, sollten auf die Expression von LCL1 untersucht werden (Kap. 3.15.3). Hier wurde der Frage nachgegangen, ob die LHY-Überexpression in einer Pflanze Auswirkungen auf die Expression von LCL1 hat.

Zunächst wurden Pflanzen mit einem Vektor transformiert, der die LHY-cDNA unter der Kontrolle des 35S-Promotors trug. Samen der transformierten Pflanzen wurden ausgesät und mit BASTA selektiert.

44 Pflanzen der T1-Generation waren resistent gegenüber BASTA und ihre genomische DNA wurde durch eine PCR mit einem 35S-spezifischen 5'-Primer und einem LHY-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein des 35S::LHY-Konstrukts analysiert. Dabei wurde ein PCR-Produkt mit 1100 bp Länge erwartet.

Abb. 44 stellt die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem Agarosegel dar. 37 der 44 Pflanzen besaßen das Transgen, sie lieferten ein Fragment in erwarteter Länge. Von den Linien 8, 9, 10, 23, 30, 33 und 36 war kein PCR-Produkt im Gel zu detektieren.

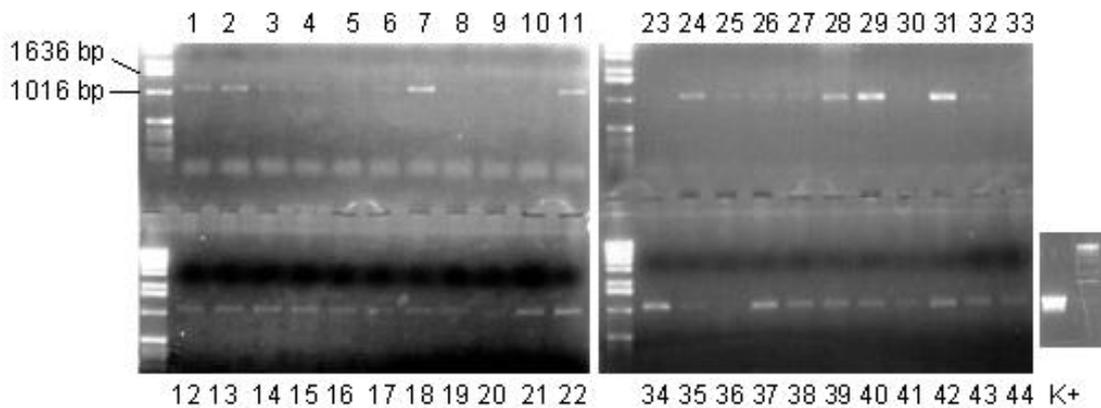


Abb. 44: PCR-Analyse auf Integration der 35S::LHY-Kassette in das *A. thaliana* Genom. Die genomische DNA von 44 Pflanzen wurde durch PCR mit einem 35S-spezifischen 5'-Primer und einem LHY-spezifischen 3'-Primer auf das Vorhandensein des Transgens analysiert. (K+) Positivkontrolle mit 100 ng des 35S::LHY-Plasmids als *template*. Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem 1% Ararosegel analysiert.

Die transgenen T1-Pflanzen wurden einer phänotypischen Analyse unterzogen. Pflanzen der Linien 4, 5, 14, 16, 27 und 35 zeigten einen KT-Phänotyp, obgleich sie im LT angezogen wurden. Sie bildeten eine Blattrosette aus, blühten und entwickelten Schoten erst nach drei Monaten. Die übrigen Linien zeigten einen normalen KT-Phänotyp, dem Wildtyp vergleichbar. Sie blühten schon nach vier bis fünf Wochen, entwickelten keine Blattrosette und waren deutlich kleiner.

Um die Expression von *LHY* in den Pflanzen, die einen KT-Phänotyp im LT zeigten, zu untersuchen, wurde eine RT-PCR mit RNA dieser sechs Linien durchgeführt. Die RT-Reaktion erfolgte mit einem Oligo-dT-Primer. Bei der PCR mit den *LHY*-spezifischen Primern wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 920 bp erwartet. Zusätzlich zu den sechs Linien wurde eine RT-Reaktion mit RNA aus einer wt-Pflanze durchgeführt.

Die Ergebnisse der PCR sind in Abb. 45A dargestellt. Nach 25 Zyklen war noch kein *LHY*-Transkript der wt-Pflanze zu detektieren, nach 35 Zyklen allerdings war ein deutliches Signal in der erwarteten Größe vorhanden. Linien 4, 5, 14, 16, 27 und 35 wiesen schon nach 25 Zyklen ein schwaches PCR-Produkt mit 920 bp auf, nach 35 Zyklen war deutlich mehr Transkript der Linien 4, 5, 14, 16 und 27 entstanden als bei der wt-Pflanze. Die Expression von *LHY* der Linien 14, 16 und 27 war besonders stark. Das Signal von Linie 35 war selbst nach 35 Zyklen nur schwach zu erkennen und lag deutlich unter der Stärke des wt-Signals. Die

Negativkontrolle mit RNA von Linie 14 ohne vorherige RT ergab kein PCR-Produkt.

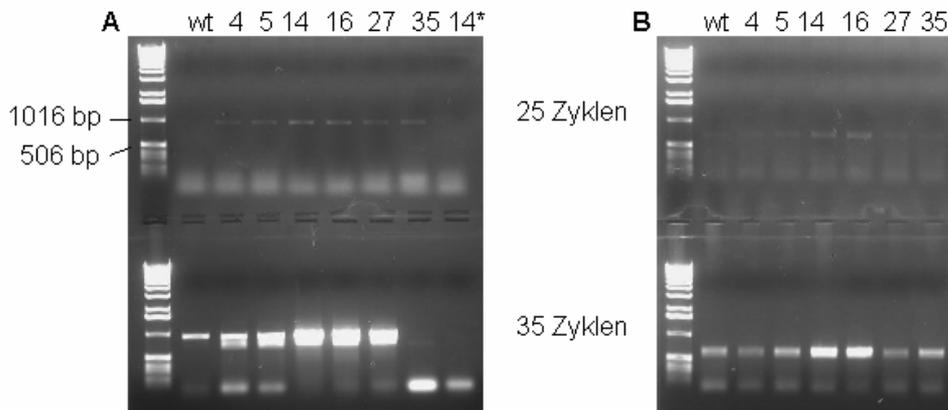


Abb. 45: Expressionsanalyse der LHY-überexprimierenden Pflanzen.

RT-PCR mit RNA aus sechs transgenen Linien, die mit dem 35S::LHY-Konstrukt transformiert waren.

(A) Analyse der Expressionsstärke von *LHY* mit *LHY*-spezifischen Primern. (14*) Negativkontrolle mit RNA von Linie 14 ohne vorherige RT.

(B) Analyse der Expressionsstärke von *LCL1* mit *LCL1*-spezifischen Primern. Nach 25 Zyklen und nach 35 Zyklen wurden dem PCR-Ansatz jeweils 10 µl entnommen und auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Parallel dazu wurde mit den gleichen Proben eine zweite PCR durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die *LHY*-überexprimierenden Pflanzen auch eine veränderte *LCL1*-Transkriptmenge aufwiesen. Hierfür wurden *LCL1*-spezifische Primer verwendet, mit deren Hilfe ein Fragment von 700 bp amplifiziert werden konnte.

Abb. 45B zeigt, dass die *LCL1*-Transkriptmenge der Linien 4, 5, 27 und 35 im Vergleich zum Wildtyp nach 35 Zyklen nur unwesentlich verstärkt waren. Nach 25 Zyklen waren lediglich von den Linien 5, 14 und 16 schwache Signale in der erwarteten Größe zu sehen. Linien 14 und 16, die *LHY* besonders stark exprimierten, besaßen nach 35 Zyklen allerdings ein deutlich stärkeres *LCL1*-Signal als die wt-Pflanze. Bei Linie 27 war dies nicht der Fall, obwohl sie *LHY* ebenfalls stark exprimierte.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Proteindomänen

5.1.1 Die LHY MYB *family* Domäne

Die LHY MYB Familie besteht aus elf Mitgliedern von MYB1R-Proteinen. Vergleicht man ihre Aminosäuresequenz, fällt sofort die hohe Similarität innerhalb der in dieser Arbeit definierten LHY MYB *family* Domäne auf. Diese Domäne enthält die MYB-Domäne, die aus einem MYB-Repeat besteht, und die N- und C-terminal angrenzenden Bereiche, die aus basischen Aminosäuren, die putative Kernlokalisierungssignale darstellen, sowie aus einer Prolin-reichen Sequenz bestehen.

Die elf LHY MYB Proteine lassen sich in drei Untergruppen einteilen (Abb. 10). Die beiden *Clock*-Proteine LHY und CCA1 bilden eine Untergruppe. Die Vollängenproteine weisen untereinander eine Similarität von 54,5% auf. Die zweite Untergruppe besteht aus den fünf LCL-Proteinen. Sie besitzen zusätzlich zur LHY MYB *family* Domäne die hochkonservierte LCL-Domäne, die in LCL1 von AS 223 bis AS 272 reicht. Die LCL-Proteine weisen eine 37,4% (LCL2) bis 43,7%ige (LCL4) Similarität zu LHY auf. Verglichen mit den beiden *Clock*-Proteinen haben die LCL-Proteine nur eine geringe Größe. Sie sind nur etwa halb so groß wie LHY (welches 645 AS besitzt) und CCA1 (mit 608 AS). Ihre Größe reicht von 282 AS bei LCL5 bis 330 AS bei LCL2.

EPR1 gehört zur dritten Untergruppe der LHY MYB Familie. Zusammen mit EPR1-*like1*, EPR1-*like2* und EPR1-*like3* besteht sie aus vier Proteinen. Das EPR1-Vollängenprotein weist eine 41,7%ige Similarität zu LHY auf. Die Größe der Proteine dieser Untergruppe ist vergleichbar mit der der LCL-Proteine. EPR1-*like3* ist mit 385 AS das größte Protein dieser Untergruppe, EPR1-*like2* mit 287 AS das kleinste.

Die in LCL1 charakterisierte NLS (AS 109-113) schließt sich C-terminal an die MYB-Domäne an (Abb. 11) und ist innerhalb der LHY MYB *family* Domäne lokalisiert. Sie ist bei den übrigen 10 Mitgliedern mit 100%iger Identität ebenfalls

zu finden. Obwohl ihre exakte Lokalisation nur bei LCL1 experimentell gezeigt wurde, kann man davon ausgehen, dass alle LHY MYB Proteine eine funktionale NLS an dieser Stelle besitzen. Da MYB-Proteine Transkriptionsfaktoren sind, die sequenzspezifisch an DNA binden, müssen sie eine NLS besitzen, um mit Hilfe von Importrezeptoren in den Zellkern zu gelangen. Unsere Ergebnisse über die Verteilung der GFP-LCL Fusionsproteine in Protoplasten bestätigen diese Behauptung. Alle LCL-Proteine sind im Kern lokalisiert. LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 befinden sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma, LCL3 befindet sich beinahe ausschließlich im Zellkern.

Eine weitere Gemeinsamkeit aller LHY MYB Proteine ist das hochkonservierte SHAQK(Y/F)F-Motiv am C-terminalen Ende der MYB-Domäne. Dieses Motiv befindet sich auch in MYB1R-Proteinen anderer Pflanzen wie Reis (OsMYB1-3) und Kartoffel (StMYB1) und es wird vermutet, dass es zur sequenzspezifischen Bindung an die DNA beiträgt, da es sich in der MYB-Domäne an der Stelle befindet, die die dritte α -Helix ausbildet (Lu et al., 2002). Allerdings scheinen auch andere Aminosäuren N-terminal dieses Motivs an der Erkennung von Promotorelementen beteiligt zu sein, denn das Konsensuselement TATCC wird beispielsweise nur von OsMYB1-3 und StMYB1 erkannt und nicht von CCA1 (Lu et al., 2002).

5.1.1.1 Bindung an das *evening element*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle analysierten Mitglieder der LHY MYB Familie (LCL1-LCL5, LHY, CCA1 und EPR1) sequenzspezifisch an ein bestimmtes Promotorelement, genannt *evening element* (EE), binden (Abb. 13 und Abb. 15). Dieses EE befindet sich in Promotoren circadian regulierter Gene (Harmer et al., 2000), wie z.B. in *TOC1* und *CCR2/GRP7*, deren Expression am Abend maximal ist.

Die MYB-Domäne alleine ist ausreichend für die Bindung an das EE. Ein LCL1-Teilprotein, welches fast ausschließlich aus der MYB-Domäne besteht (AS 1-126), kann, wie das LCL1-Volllängenprotein, noch immer an das EE binden (Abb. 16B). Im Gegensatz zu den übrigen LHY MYB Proteinen besitzt das LCL3-Volllängenprotein nicht die Fähigkeit, an das EE zu binden. Ein LCL3-Teilprotein

(AS 1-139), welches die MYB-Domäne enthält, kann im EMSA hingegen an die DNA binden (Abb. 14). Der C-terminale Teil des LCL3-Proteins, welcher beim Teilprotein deletiert wurde, scheint zumindest *in vitro* die Bindung der MYB-Domäne an das EE zu inhibieren. Es ist denkbar, dass durch regulierte Konformationsänderungen des LCL3-Proteins in der Pflanze die Bindung an die DNA in bestimmten Fällen ermöglicht oder verhindert werden kann.

CCA1 und LHY bilden zusammen mit TOC1 den zentralen Oszillator von *A. thaliana* aus. Die Fähigkeit der LCL-Proteine und von EPR1, an die gleiche Ziel-DNA wie die beiden *Clock*-Proteine zu binden, ist ein Hinweis darauf, dass sie ebenfalls eine Rolle bei der circadianen Uhr spielen. Darüberhinaus konnte in einem EMSA gezeigt werden, dass LCL1 und CCA1 um die Bindung an ihre Ziel-DNA kompetieren (Abb. 18).

5.1.1.2 Charakterisierung der NLS von LCL1

Das Fusionsprotein aus GFP und dem LCL1-Volllängenprotein befand sich gleichmäßig verteilt im Cytoplasma und im Kern von BY-2 Protoplasten (Abb. 7). Ein Protein, das sowohl eine NES als auch eine NLS besitzt, kann in beiden Kompartimenten lokalisiert sein. Es kommt zu einem Gleichgewichtszustand zwischen Kernimport und Kernexport, wenn beide Lokalisationssignale des Proteins funktional sind. Die N-terminale Verkürzung von 87 AS in LCL1 beeinflusste nicht die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins. Eine weitere Verkürzung des N-Terminus führte allerdings dazu, dass das GFP-LCL1 (AS 117-293)-Fusionsprotein einen Kernausschluss zeigte. Die NLS musste sich demnach zwischen AS 88 und AS 116 befinden. Wurde zusätzlich eine Deletion des C-Terminus eingeführt, zeigte das dabei resultierende GFP-LCL1(AS 117-244) Fusionsprotein wieder eine gleichverteilte Lokalisation in der Zelle. Dieses Teilprotein besaß weder eine NES noch eine NLS. Proteine ohne Kernlokalisierungssignale liegen in der Regel gleichverteilt vor, da sie aufgrund von Diffusion durch die NPCs in den Kern und ins Cytoplasma gelangen können. Auch große Proteine, die das Ausschlussvolumen übersteigen, haben die Fähigkeit langsam durch die Kernporen zu diffundieren. Die durch Diffusion entstandene gleichmäßige Verteilung eines Reporters, der das Ausschlussvolumen übersteigt,

wurde auch in Säugerzellen beschrieben (Kudo *et al.*, 1998). Sie resultiert vermutlich aus der massiven Überexpression des GFP-Reporterkonstrukts bei der transienten Expression. Auch die hohe Sensitivität des Systems, welches selbst eine niedrige Diffusionsaktivität sichtbar macht, könnte dazu beitragen.

Vom T-Antigen des Simian-Virus 40 weiß man, dass eine NLS aus einem kurzen Abschnitt basischer AS besteht (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford und Butel, 1984). In der Aminosäuresequenz von LCL1 befinden sich zwei Bereiche, die solch eine *monopartite* NLS darstellen könnten. Das Vorhandensein von zwei NLS wurde auch schon von anderen MYB-Proteinen berichtet. B-Myb aus *Xenopus laevis* enthält zwei NLS, die wahrscheinlich eine kooperative Funktion ausüben (Humbert-Lan und Pieler, 1999).

Die beiden putativen NLS von LCL1 liegen beide innerhalb der LHY MYB *family* Domäne. Eine putative NLS liegt vor der MYB-Domäne und reicht von AS 36 bis 40. Die zweite putative NLS reicht von AS 109 bis AS 113 und schließt sich C-terminal an die MYB-Domäne an. Die Mutation zweier AS in dem Bereich der zweiten putativen NLS (K111N, R112N) führte dazu, dass sich das GFP-LCL1(NLSmut)-Fusionsprotein ausschließlich im Cytoplasma befand. Dies war der Nachweis, dass die NLS von LCL1 in diesem Bereich liegt.

5.1.2 Die LCL-Domäne

Spezifisch für die Untergruppe der LCL-Proteine ist die LCL-Domäne (Abb. 12). Sie besteht aus zwei konservierten, durch fünf Aminosäuren getrennten Bereichen. Über die Funktion des N-terminal liegenden Bereichs, welcher in LCL1 von AS 223 bis AS 238 reicht, ist nichts bekannt. Der hintere Bereich umfasst in LCL1 die NES, die sich zwischen den Aminosäuren 247 bis einschließlich 269 befindet. Aufgrund der hohen Identität in diesem Bereich innerhalb der LCL-Proteine bestand die Vermutung, dass eine NES in allen LCL-Proteinen an dieser Stelle lokalisiert sein könnte.

5.1.2.1 Charakterisierung der NES von LCL1

Durch Deletions- und Mutationsanalysen von LCL1 und Koexpression der LCL1-Fragmente mit XPO1 in Hefe wurde die genaue Position der NES lokalisiert (Abb. 5).

Das LCL1-Volllängenprotein, sowie die N-terminal verkürzten Proteine, denen 87 AS bzw. 116 AS fehlten, konnten im Y2H-System bei Koexpression mit XPO1 die Transaktivierung der β -Galaktosidase auslösen. Diese Proteine waren im Besitz einer funktionalen NES. Wurde der C-Terminus von LCL1 deletiert, konnte LCL1 (AS1-244) das Reportergeren nicht mehr aktivieren. Dies war auch der Fall, wenn zusätzlich der N-terminale Bereich fehlte (AS 117-244). Die NES musste sich demnach innerhalb der C-terminalen 49 AS befinden, da ihre Deletion die Interaktion mit XPO1 deutlich beeinflusste. Eine leichte Transaktivierung des Reportergerens konnte bei einem Protein festgestellt werden, welches von AS 117 bis AS 258 reichte, das kurze Peptid aus den AS 254 bis AS 293 besaß ebenfalls die Fähigkeit, bei Koexpression mit XPO1 in Hefe das Reportergeren leicht zu aktivieren. Diese beiden Teilproteine waren offensichtlich nicht mehr im vollen Besitz der NES, da aber bei beiden eine leichte Transaktivierung des Reportergerens bei Koexpression mit XPO1 stattfand, konnte davon ausgegangen werden, dass sie jeweils einen Teil der NES besaßen, sodass noch eine leichte Interaktion mit XPO1 stattfinden konnten. Die NES musste demnach über die AS 254 und 258 reichen.

Im Weiteren wurden sukzessiv auf Basis des Volllängenproteins einzelne Leucinreste oder andere langkettige, hydrophobe Aminosäurereste in diesem Bereich zu Alanin ausgetauscht und die resultierenden Proteine auf Interaktion mit XPO1 analysiert.

Zunächst wurden Isoleucin an Position 253 und Phenylalanin an Position 254 ausgewählt, da sie hydrophobe Eigenschaften besitzen und aufgrunddessen mögliche Komponenten einer NES darstellten. Der Austausch dieser beiden Aminosäuren zu Alanin hatte keine Auswirkungen auf die Interaktion mit XPO1 (LCL1mut1). Wurden aber zusätzlich die beiden hydrophoben Aminosäuren Leucin an Position 265 und Valin an Position 267 zu Alanin ausgetauscht (LCL1mut3), war die Stärke der Interaktion zu XPO1 schon deutlich herabgesetzt.

Diese beiden Aminosäuren hatten einen starken Einfluss auf die XPO1-Interaktion. Wurden stattdessen Isoleucin an Position 253 und Phenylalanin an Position 255 zu Alanin ausgetauscht (LCL1mut4), war die Interaktion zu XPO1 nicht gestört. Der Austausch von allen sechs Aminosäuren mit einem zusätzlichen Austausch von Leucin an Position 269 reduzierte die Aktivierung des Reportergens wieder deutlich. Wurden zusätzlich Valin an Position 258 und die Leucinreste an den Positionen 259 bis 261 zu Alanin ausgetauscht, konnte die *β-Galaktosidase* im Y2H-System nicht mehr aktiviert werden. Der Austausch dieser elf Aminosäuren zu Alanin resultierte in LCL1(NESmut), welches keine funktionale NES mehr besaß. Ausschlaggebend waren dabei die C-terminal liegenden Aminosäuren an den Positionen 258, 259, 260, 261, 265, 267 und 269, die vier N-terminalen Aminosäuren an den Positionen 247, 250, 253 und 255 hatten eine geringere Bedeutung für die Interaktion von LCL1 mit XPO1.

Die Y2H-Ergebnisse konnten durch die Analyse der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen bestätigt werden. Sowohl die Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren von LCL1, als auch der Austausch der elf hydrophoben Aminosäuren zu Alanin resultierten in einer ausschließlich nukleären Lokalisation der GFP-Fusionsproteine.

Die NES von LCL1 war bedeutend länger als die klassische NES des HIV-Proteins Rev mit der Sequenz LxxLxL. Bei dieser war es ausreichend, zwei Leucinreste zu Alanin auszutauschen, um eine ausschließliche Lokalisation des Proteins im Kern zu erreichen (Meyer und Malim, 1994). Das Beispiel von LCL1 zeigt, dass eine NES nicht immer der Sequenz LxxLxL entsprechen muss.

Dass die NES in LCL1(NESmut) mutiert war, konnte auch *in planta* bestätigt werden (Abb. 9). Wurden etiolierte Keimlinge, die ein YFP-LCL1 Fusionsprotein überexprimierten, mit LMB inkubiert, wurde der Export von LCL1 gestört. Das Fusionsprotein befand sich beinahe ausschließlich im Zellkern, da LMB XPO1 kovalent modifiziert und somit der Export von LCL1 verhindert wird. Die Lokalisation von YFP-LCL1(NESmut) hing hingegen nicht von LMB ab, das Fusionsprotein war zu jeder Zeit vom Cytoplasma ausgeschlossen und nur im Kern detektierbar. Da die NES mutiert war, konnte LCL1(NESmut) nicht mehr als Substrat von XPO1 erkannt werden. Durch diesen Versuch konnte eindeutig

gezeigt werden, dass XPO1 der Exportrezeptor für LCL1 ist und dass aufgrund der Interaktion zu XPO1 LCL1 nicht nur im Kern, sondern auch im Cytoplasma lokalisiert ist.

Um auszuschließen, dass die DNA-Bindung von LCL1 durch die Fusion mit YFP gestört war, wurde ein EMSA durchgeführt, bei dem das YFP-LCL1 Fusionsprotein auf die Bindung an das EE untersucht wurde. Das Ergebnis ließ darauf schließen, dass das YFP-LCL1 Fusionsprotein in seiner Funktionalität nicht beeinträchtigt war, es konnte im EMSA einen Protein-DNA Komplex ausbilden (Abb. 16A). Die transgenen Pflanzen, die das YFP-LCL1 Fusionsprotein überexprimierten, besaßen somit ein funktionsfähiges LCL1-Protein, welches an YFP fusioniert war. Diese Fusion mit YFP übte keinen Einfluss auf die Fähigkeit von LCL1 aus, an seine Ziel-DNA zu binden. Die *in planta* Analyse zeigte außerdem, dass die YFP-Fusion die Bindung von XPO1 an LCL1 ebenfalls nicht beeinträchtigte.

5.1.2.2 Nucleocytoplasmatische *Shuttle*-Proteine

Durch Deletionsanalysen konnte auch für LCL2, LCL4 und LCL5 gezeigt werden, dass sich die NES in der konservierten LCL-Domäne befindet (Abb. 19 und Abb. 22). LCL3 bildete eine Ausnahme, da die Deletion des Bereichs, der in LCL1 die NES enthält, keine Auswirkung auf die Lokalisation des Proteins hatte (Abb. 30). Die Interaktion von LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 an XPO1 war im Y2H-System verschieden stark (Abb. 22). Setzte man die Interaktion von LCL1 mit XPO1 auf 100%, war die LCL2-XPO1 Interaktion genauso stark, die LCL4-XPO1 Interaktion entsprach dabei aber lediglich 20% und LCL5 wies eine Interaktionsstärke mit XPO1 von etwa 70% auf. In jedem Fall war die Interaktion zu XPO1 aber eindeutig der NES in der LCL-Domäne zuzuschreiben, da die Deletion der LCL-Domäne die Stärke der XPO1-Interaktion bei LCL2 um 90%, bei LCL4 um 50% und bei LCL5 um etwa 70% herabsetzte.

Durch den Besitz einer funktionalen NLS und einer funktionalen NES erlangt ein Protein die Fähigkeit, als nucleocytoplasmatisches *Shuttle*-Protein zu fungieren. Besonders bei einem Transkriptionsfaktor spielt die nucleocytoplasmatische

Verteilung in der Zelle eine wichtige Rolle. Er kann seine Funktion – Bindung an einen Promotor und Regulation der Genexpression – nur dann ausüben, wenn er in den Kern gelangen kann. Der Besitz einer NES deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor nicht konstitutiv im Kern vorhanden ist, sondern auch eine gewisse Zeit im Cytoplasma verbringt, während dieser er nicht zur Aktivierung bzw. Reprimierung seiner Zielgene zur Verfügung steht. Hierbei kann die Affinität zu XPO1 bzw. die Stärke der Interaktion mit XPO1 eine regulatorische Rolle spielen. Die Y2H-Daten zeigen, dass LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 *Shuttle*-Proteine darstellen, die durch nucleocytoplasmatische Partitionierung reguliert werden. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in Tabakprotoplasten, die eine gleichmäßige Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma aufwiesen. Deletierte man den C-terminalen Bereich von LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5, der die NES enthielt, konnte man eine veränderte Lokalisation der grünen Fluoreszenz beobachten (Abb. 30). Die GFP-Fusionsproteine befanden sich ausschließlich im Kern.

Bei LCL3 ist die Situation eine andere. Das Vollängen-Proteine interagiert nur schwach mit XPO1 im Y2H-System, obwohl seine LCL-Domäne zu der von LCL1 beinahe identisch ist. Die Deletion der LCL-Domäne in LCL3 bewirkte hingegen eine Verstärkung der Interaktion zu XPO1 von 20% auf 60%. Man kann hier nur mutmaßen, dass bei LCL3 die putative NES, die sich in der LCL-Domäne befindet, nicht funktional ist. Es besteht die Möglichkeit, dass sich N-terminal der LCL-Domäne eine weitere NES befinden, die im Vollängenprotein normalerweise durch intramolekulare Wechselwirkungen mit der LCL-Domäne maskiert ist. Deletion der LCL-Domäne oder eine Konformationsänderung des Vollängenproteins bewirken, dass die funktionale NES nicht mehr abgeschirmt wird und mit XPO1 interagieren kann. Für diese Mutmaßung gibt es allerdings keine weiteren experimentellen Beweise. Was die Bindung an die DNA betrifft, zeigt aber gerade LCL3 einen ähnlichen Regulationsmechanismus. Der C-Terminus des Proteins scheint die Bindung an die DNA zu inhibieren, denn nur die MYB-Domäne alleine besitzt im EMSA die Fähigkeit, an DNA zu binden. Auch die Verteilung des GFP-LCL3 Fusionsproteins ist, verglichen mit den anderen LCL-Proteinen, eine andere.

Sowohl das Volllängenprotein, als auch die C-terminale Verkürzung ohne LCL-Domäne befinden sich ausschließlich im Kern der Protoplasten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass LCL3 keine funktionale NES besitzt und es im heterologen Hefesystem im Gegensatz zum Protoplastensystem aber fälschlicherweise zur Interaktion mit XPO1 kommt. Vielleicht liegt eine Proteinmodifikation in der Nähe der putativen NES vor, die verhindert, dass die NES von LCL3 in *Arabidopsis* funktional ist. Diese Proteinmodifikation ist in Hefe eventuell nicht vorhanden. Dann wäre die Regulation dieses Transkriptionsfaktors nicht durch nucleocytoplasmatische Partitionierung gegeben, sondern alleine dadurch, dass durch intramolekulare Maskierung seiner MYB-Domäne die Bindung an seine Ziel-DNA unterbunden wird.

Die beiden *Clock*-Proteine LHY und CCA1 konnten keine Interaktion mit XPO1 eingehen. Dies wurde durch den Interaktionstest auf Indikatorplatten und den ONPG-Assay deutlich (Abb. 22 und Abb. 23). Auch ihre Zelllokalisierung spricht dagegen, dass sie nucleocytoplasmatische *Shuttle*-Proteine sind. Die GFP-Proteinfusionen befanden sich hauptsächlich im Nukleus (Abb. 31).

5.2 Protein-Dimerisierungspotential

5.2.1 Interaktionen der LCL-Proteine

Das Y2H-System und die BiFC-Analysen haben gezeigt, dass die LCL-Proteine untereinander interagieren können (Abb. 21 und Abb. 25). LCL1, LCL4 und LCL5 besitzen darüber hinaus die Fähigkeit zur Ausbildung von Homodimeren (Abb. 20 und Abb. 25). Nicht alle Interaktionen, die in der BiFC-Analyse detektiert wurden, konnten durch das Y2H-System bestätigt werden, umgekehrt war dies aber der Fall. Hier liegt die Vermutung nahe, dass schwache Interaktionen im Hefesystem weniger gut detektiert werden können als in der BiFC-Analyse. Die Affinität der LCL-Proteine zueinander scheint in manchen Fällen nicht auszureichen, die Aktivierung der β -Galactosidase zu veranlassen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass manche Dimere nur sehr kurze Zeit miteinander interagieren und diese Zeit nicht zur Transaktivierung des Reportergens ausreicht. Der Vergleich der beiden Methoden macht deutlich, dass BiFC die sehr viel sensitivere Methode ist. Starke

Interaktionen, wie beispielsweise die Homodimerisierung von LCL5, konnten immer auch im Hefesystem detektiert werden. Im ONGP-Assay waren die entsprechenden Aktivitäten dann auch besonders hoch. Schwache Interaktionen, wie die Heterodimerisierungen von LCL1 mit LCL2, LCL4 und LCL5 oder die Homodimerisierung von LCL4 wurden hingegen nur durch die Rekonstitution der Fluoreszenz in der BiFC-Analyse nachgewiesen. Es konnten folgende Interaktionen gezeigt werden: LCL1-LCL1, LCL1-LCL2, LCL1-LCL4, LCL1-LCL5, LCL2-LCL4, LCL2-LCL5, LCL4-LCL4, LCL4-LCL5, LCL5-LCL5. LCL3 bildete weder Homodimere noch Heterodimere mit einem der anderen LCL-Proteine aus. Durch die Fähigkeit zur Dimerisierung ergeben sich zusätzliche Regulationsebenen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die LCL-Proteine, zumindest *in vitro*, an die gleiche DNA *target*-Sequenz binden können. Folglich können sie wahrscheinlich die gleichen Gene ansteuern und deren Transkription beeinflussen. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Tatsache, dass alle LCL-Proteine keine Transkriptionsaktivatoren darstellen, da sie im Y2H-System das Reporteragen nicht alleine aktivieren können (Abb. 19). Allerdings besitzen sie nur in der LHY MYB family Domäne und in der LCL-Domäne eine hohe Identität untereinander. Im Bereich dazwischen, der in LCL1 für Proteininteraktionen verantwortlich ist, sind sie nicht konserviert. Das erklärt, warum die Dimerisierungseigenschaften jedes LCL-Proteins unterschiedlich sind und lässt vermuten, dass jedes LCL-Protein eine eigenständige Funktion besitzt. Möglicherweise kann jedes LCL-Protein andere Proteine an die DNA rekrutieren, die ihrerseits entweder Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren darstellen. Proteindimerisierungen spielen auch eine Rolle bei der Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle. Durch unterschiedliche Interaktionspartner kann sich ein Protein entweder im Kern oder im Cytoplasma aufhalten. Dies soll in Kap. 5.2.5 eingehender diskutiert werden.

5.2.2 Interaktionen der *Clock*-Proteine

Mit Hilfe des Y2H-Systems und der BiFC-Analyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden *Clock*-Proteine CCA1 und LHY sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden (Abb. 23 und Abb. 25). Dabei war die Affinität der beiden *Clock*-Proteine zueinander besonders stark (Abb. 24). Die Stärke der Homodimerisierung von LHY und der Heterodimerisierung von LHY und CCA1 war etwa fünfmal so groß wie die Interaktion zwischen LCL1 und XPO1. Die Stärke der Homodimerisierung von CCA1 betrug sogar das sechsfache. Durch das Y2H-System konnte gezeigt werden, dass sie mit LCL1 keine Dimere bilden.

5.2.3 Neue Interaktionspartner von LCL1

Mit einem Y2H-Screen wurden neue Interaktionspartner von LCL1 identifiziert (Abb. 26). Eine der cDNAs, die isoliert wurden, codierte für LCL1. Dies lieferte einen ersten Hinweis auf die Fähigkeit von LCL1 zur Homodimerisierung. Andere LCL-Proteine wurden nicht gefunden, die Interaktionen zwischen diesen und LCL1 waren wohl zu schwach, als dass sie durch den Screen identifiziert werden konnten.

Außer *LCL1* wurden noch drei weitere cDNAs identifiziert: *LIP13*, *LIP26* und *LIP93*. Sie kodieren für Proteine unbekannter Funktion. Mit Ausnahme von *LIP13*, welches eine NAD-Bindestelle besitzt, weisen sie keine bekannten Proteindomänen auf. *LIP93* besitzt Ähnlichkeiten zu einem Dentin-Sialophosphoprotein aus *Homo sapiens*. Diesem Datenbankeintrag muss allerdings keine große Bedeutung beigemessen werden, da Pflanzen kein Dentin besitzen. *LIP13*, *LIP26* und *LIP93* interagierten spezifisch mit LCL1, wobei eine Transaktivierung im Y2H-System nur detektiert werden konnte, wenn sie mit LCL1 koexprimiert wurden und nicht im Falle der Kontrolle, bei der sie gegen den pGilda-Vektor alleine getestet wurden. *LIP13* zeigte bei Koexpression mit dem pGilda-Vektor zwar eine leichte Aktivierung des Reportergens, die Blaufärbung der Hefekolonien auf der Indikatorplatte war aber deutlich schwächer, als bei Koexpression von *LIP13* und LCL1. Wahrscheinlich wurden die Indikatorplatten dabei zu lange bei 30°C inkubiert, sodass es zu einer Hintergrundexpression kam.

In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung von LIP26 begonnen. Durch Y2H-Analysen konnte gezeigt werden, dass es nicht nur mit LCL1, sondern mit allen anderen LCL-Proteinen interagieren kann (Abb. 27). Bei Koexpression mit CCA1 oder LHY im Y2H-System konnte keine Transaktivierung der β -Galaktosidase festgestellt werden, auch mit XPO1 bildete LIP26 kein Dimer. Durch Transfektion eines GFP-LIP26-Fusionsproteins in BY-2 Protoplasten wurde die Lokalisation von LIP26 innerhalb der Pflanzenzelle untersucht (Abb. 26E). Die grüne Fluoreszenz befand sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma. Die Tatsache, dass LIP26 im Y2H-System keine Interaktion mit XPO1 eingehen kann, das GFP-Fusionsprotein innerhalb der Zelle aber eine gleichmäßige Verteilung zeigt, deuten auf das Fehlen einer NLS hin. Vermutlich besitzt es keine Kernlokalisierungssignale und ist aufgrund von Diffusion in beiden Kompartimenten zu finden.

5.2.4 Charakterisierung der Proteindimerisierungsdomäne

LCL1 besitzt die Fähigkeit zur Homodimerisierung, da die Koexpression von LCL1, fusioniert an die Aktivierungsdomäne, und LCL1, fusioniert an die DNA-Bindedomäne, im Y2H-System eine starke Transaktivierung der β -Galaktosidase auslöst (Abb. 19). Ein C- und N-terminal verkürztes LCL1-Protein (AS 117-244) besaß ebenfalls die Fähigkeit, mit dem LCL1-Volllängenprotein zu interagieren. Wurde das Teilprotein von beiden Enden her weiter verkürzt (AS 127-222), war die Fähigkeit zur Dimerisierung gestört. Die Proteindimerisierungsdomäne von LCL1 liegt somit zwischen den AS 117-244. Dieses Teilprotein konnte weder mit XPO1 interagieren, noch an das EE binden.

Es konnte gezeigt werden, dass das LCL1-Volllängenprotein nicht nur Homodimere ausbildet, sondern auch mit LCL2, LCL4 und LCL5 interagieren kann. Durch den Y2H-Screen mit LCL1 als *bait* wurden LIP13, LIP26 und LIP93 als neue Interaktionspartner für LCL1 identifiziert. Die Bindung an LIP26 wurde dabei näher charakterisiert (Abb. 28). Hierbei konnte gezeigt werden, dass LIP26 spezifisch mit der Proteindimerisierungsdomäne von LCL1 interagiert, die auch zuständig für die Homodimerisierung war. Die Proteindimerisierungsdomäne von

LCL1 ist somit nicht nur verantwortlich für die Homodimerisierung, sondern auch für die Heterodimerisierung mit anderen Proteinen.

Es ist anzunehmen, dass sich die Proteindimerisierungsdomänen von LCL2-LCL5 ebenfalls zwischen der LHY MYB *family* Domäne und der LCL-Domäne befinden. Dies ist der einzig mögliche Bereich, der für die unterschiedlichen Dimerisierungseigenschaften der Proteine verantwortlich sein kann, da sie sich dort unterscheiden und die Identität in den anderen Bereichen zu hoch sein dürfte. Interessanterweise besitzt LIP26 die Fähigkeit, mit allen LCL-Proteinen zu interagieren. Selbst mit LCL3, welches mit keinem LCL-Protein interagiert, bildet es Heterodimere aus. Dies lässt die Vermutung zu, dass LIP26 an eine dreidimensionale Struktur innerhalb des Proteindimerisierungsbereichs der LCL-Proteine bindet, die in der Primärstruktur nicht als konservierte Sequenz zu erkennen ist, die aber alle LCL-Proteine gemeinsam haben.

5.2.5 Zelllokalisierung der Monomere und Dimere

Betrachtet man die Lokalisation der grünen Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen in einer Zelle, kann man keine Aussagen darüber machen, ob das an GFP fusionierte Protein als Monomer oder als Dimer vorliegt. Bei den BiFC-Analysen hingegen findet die Rekonstitution der grün-gelben Fluoreszenz nur statt, wenn es zu einer Dimerisierung der Proteine kommt, die mit den beiden Teilfragmenten von YFP fusioniert sind. Nur wenn die beiden Proteine in räumliche Nähe zueinander kommen, kann sich das vollständige YFP-Protein zusammensetzen und den Chromophor, der für die Fluoreszenz verantwortlich ist, ausbilden. BiFC-Analysen liefern somit nicht nur Informationen über die Formation von Dimeren, sondern auch darüber, wo sich die Dimere innerhalb der Zelle befinden. Monomere werden mit dieser Technik nicht sichtbar gemacht.

Durch direkten Vergleich der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen mit der Lokalisation der Split-YFP Fusionen ist es demzufolge möglich, den subzellulären Aufenthaltsort von Proteinen zu bestimmen, die sowohl in der monomeren, als auch in der dimeren Form vorliegen.

Interessanterweise kann man zwischen den LHY MYB Proteinen deutliche Unterschiede bei der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine (Abb. 7 und Abb. 30) und der Dimere (Abb. 25) feststellen. Die Lokalisation des LCL1-Homodimers ist deutlich zum Cytoplasma hin verschoben, wohingegen die GFP-Fusionsproteine mit LCL1 gleichverteilt in der Zelle vorliegen. Da die Homodimere hauptsächlich im Cytoplasma zu finden sind, kann man davon ausgehen, dass im Kern hauptsächlich GFP-Fusionsproteine in monomerer Form vorliegen. Ist die NES in LCL1 mutiert (LCL1(NESmut)), sind das Monomer und das Dimer ausschließlich im Kern zu finden. Nun stellt sich die Frage, in welcher Form der aktive LCL1-Transkriptionsfaktor vorliegt. Für die Bindung an die DNA wird offensichtlich nur die monomere Form von LCL1 benötigt. Ein LCL1-Teilprotein, welches die MYB-Domäne aber keine Proteindimerisierungsdomäne besitzt, kann im EMSA noch immer an das EE binden (Abb. 16B). Die Fähigkeit von LCL1 zur Homodimerisierung ist demzufolge für die Aktivität des Transkriptionsfaktors nicht zwingend notwendig. Da das LCL1-Dimer hauptsächlich im Cytoplasma vorliegt, liegt der Schluss nahe, dass sich LCL1 durch intermolekulares Abschirmen seiner NLS selbst daran hindert, uneingeschränkt in den Kern zu gelangen. Dies kann sowohl durch Homodimerisierung als auch durch Dimerisierung mit LCL5 geschehen. Die Lokalisation des LCL1-LCL5 Dimers ist ebenfalls deutlich in Richtung Cytoplasma verschoben. Die Dimerisierung von LCL1 mit LCL2 und LCL4 zeigt hingegen ein anderes Verteilungsmuster. Sowohl die GFP-Fusionsproteine mit LCL1, LCL2 und LCL4 als auch die LCL1-Heterodimere mit LCL2 und LCL4 liegen gleichverteilt in der Zelle vor. Hier scheint keine Regulation durch Maskierung eines Transportsignals vorzuliegen.

Im Gegensatz zu LCL1 ist das LCL4-Homodimer ausschließlich im Kern zu finden, obwohl das GFP-LCL4 Fusionsprotein in beiden Kompartimenten gleichverteilt vorliegt. LCL4 befindet sich also in der monomeren Form hauptsächlich im Cytoplasma. Möglicherweise verlagert LCL4 durch intermolekulare Maskierung seiner NES seinen Aufenthaltsort in den Kern, um dort an das EE zu binden. Dieser Vorgang tritt auch auf, wenn LCL4 mit LCL2 oder LCL5 Heterodimere ausbildet. Diese befinden sich ebenfalls ausschließlich im Kern.

Auch bei LCL5 kann man diese Form der Regulation beobachten. Heterodimere mit LCL2 und LCL4 besitzen eine ausschließlich nukleäre Lokalisation obwohl das

GFP-LCL5 Fusionsproteine bzw. das LCL5-Homodimer sowohl im Kern als auch im Cytoplasma anzutreffen sind.

Die beiden *Clock*-Proteine LHY und CCA1 befinden sich als Homo- und auch als Heterodimere ausschließlich im Kern. Dass sich CCA1 im Kern befindet, konnten Wang *et al.* (1997) durch GUS-Reporteranalysen ebenfalls zeigen. Das GUS-CCA1 Fusionsprotein, welches unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand, befand sich im Zellkern. Mit diesem Experiment konnte aber, im Gegensatz zu den BiFC-Analysen, keine Aussage darüber getroffen werden, ob CCA1 als Monomer oder Dimer vorlag. Unsere Analysen bestätigen die Kernlokalisierung von CCA1. GFP-Fusionen der *Clock*-Proteine zeigten ebenfalls eine deutliche Kernlokalisierung (Abb. 31). LHY und CCA1 sind offensichtlich keine nukleocytoplasmatischen *Shuttle*-Proteine, ihre Lokalisation wird durch das Vorhandensein der NLS bestimmt, eine NES besitzen sie nicht. Dies wurde durch Koexpression mit XPO1 im Y2H-System gezeigt. Eine Regulation durch inter/intramolekulare Abschirmung der NES ist hier nicht gegeben.

Durch einen Hefe *Three-Hybrid* Assay wurde untersucht, ob sich ein trimärer Komplex aus LCL1, CCA1 und XPO1 ausbilden kann (Abb. 29). Hierbei konnte ausgeschlossen werden, dass LCL1 den Kernexport von CCA1 über XPO1 vermittelt, da die Koexpression dieser drei Proteine in Hefe nicht zur Aktivierung des Reportergens führte.

In Abb. 46 wurden die Proteininteraktionen der LCL- und LHY/CCA1-Untergruppen zusammengestellt. Die beiden Untergruppen können untereinander keine Dimere ausbilden, das Dimerisierungspotential innerhalb der Untergruppen ist aber stark ausgeprägt.

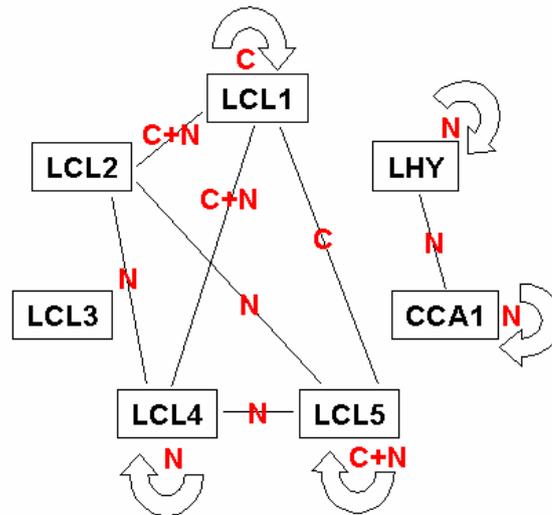


Abb. 46: Dimerisierungspotential der LCL- und *Clock*-Proteine.

Dargestellt ist das Homo- und Heterodimerisierungsvermögen von LCL1-LCL5, CCA1 und LHY. Die Fähigkeit zur Dimerisierung wird durch Verbindungslinien angezeigt. Die Fähigkeit zur Homodimerisierung ist durch runde Pfeile gekennzeichnet. Rote Buchstaben stellen die Lokalisation der Dimere in der Zelle dar. C=Cytoplasma, N=Nukleus, C+N=Gleichverteilung zwischen Cytoplasma und Nukleus.

5.3 Expression und *in planta* Lokalisation von LCL1

5.3.1 Circadiane Expression

LHY und CCA1 stellen wichtige Komponenten des zentralen Oszillators dar. Es ist bekannt, dass die beiden *Clock*-Proteine circadian exprimiert werden, ihre rhythmische Expression hält auch unter konstanten Bedingungen an (Schaffer *et al.*, 1998; Wang und Tobin, 1998). Sie besitzen ihre maximale Expression am Morgen, sind also *morning genes*.

Um festzustellen, ob LCL1 vergleichbare Eigenschaften besitzt, wurde in dieser Arbeit die Expression von LCL1 in Pflanzen, die unter KT-Bedingungen wuchsen, mit Hilfe eines *Northern Blots* untersucht. Hierbei konnte eine diurnale Expression der *LCL1*-mRNA festgestellt werden (Abb. 32). Wie *LHY* und *CCA1* besitzt auch *LCL1* eine maximale Expression am Morgen, es ist also ein *morning gene*. Die Expression nimmt im Laufe des Tages immer weiter ab und erreicht ihr Minimum am Abend. Interessanterweise steigt die *LCL1*-Transkriptmenge am frühen Morgen an, noch bevor das Licht angeht. Die Pflanze „weiß“ also schon im Voraus, dass bald die Lichtphase einsetzt. Durch den Zeitgeber wird die Pflanze

auf KT-Bedingungen eingestellt und kann sich so auf vorhersehbare Lichtveränderungen frühzeitig einstellen. Dieser Prozess wird auch als „*entrainment*“ bezeichnet und wurde auch bei Genen gezeigt, die eine Rolle bei der Photosynthese spielen (Aoki *et al.*, 2004). Noch am Ende der Dunkelphase steigt die Expression dieser Gene an, damit der Photosyntheseapparat schon optimal für die Lichtphase vorbereitet ist.

In dieser Arbeit konnte die diurnale Expression von *LCL1* beschrieben werden, digitale *Northern* bestätigen dieses Ergebnis und zeigen darüberhinaus die circadiane Expression von *LCL1*. Die rhythmische Expression von *LCL1* hält also unter konstanten Bedingungen an, so wie es bei den *Clock*-Proteinen der Fall ist.

5.3.2 Lokalisation der *LCL1*-Promotoraktivität in *A. thaliana*

GUS-Analysen, bei denen das Reporter-gen *β -Glucuronidase* unter die Kontrolle des *LCL1*-Promotors gestellt wurde, zeigen, dass *LCL1* in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien von *A. thaliana* exprimiert wird (Abb. 33). Am deutlichsten war die Expression in adulten Blättern, aber auch in Keimlingen, in der Blüte, in den Leitgefäßen und in Wurzeln war der Promotor aktiv.

Wie für einen Transkriptionsfaktor erwartet wird, der eine Rolle bei der circadianen Uhr spielt, befindet sich die Lokalisation von *LCL1* in allen Geweben der Pflanze. Es liegen Hinweise vor, dass der circadiane Oszillator einen autonomen Charakter in verschiedenen Organen und Geweben aufweist, oder sogar zellautonome Eigenschaften besitzen. Entfernt man beispielsweise die Epidermis eines Blattes von *Vicia faba*, bleibt die rhythmische Bewegung der Stomataöffnung erhalten. Dies zeigt, dass die circadiane Regulation des Stomataapparates zellautonom abläuft (Gorton *et al.*, 1989). Von einzelligen Dinoflagellaten (*Gonyaulax polyedra*) weiß man, dass sie zwei verschiedene circadiane Oszillatoren exprimieren (Morse *et al.*, 1994). Dies lässt vermuten, dass ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Funktion bei der circadianen Uhr besitzt, in jedem Gewebe und jeder Zelle der Pflanze vorhanden sein sollte, um *Output* Signale zu steuern.

Die Expression von *LCL1* ist nicht nur auf ein Gewebe beschränkt, sondern findet überall in der Pflanze statt. Die GUS-Analysen fügen sich in die Vermutung ein, dass *LCL1* eine Rolle bei der circadianen Uhr von *A. thaliana* spielen könnte.

5.4 Experimente zur Analyse der Funktion von LCL1

5.4.1 LCL1 T-DNA Insertionslinien

Die Analyse der LCL1 T-DNA Insertionslinien hat gezeigt, dass alle bezüglich der Insertion homozygoten Pflanzen noch immer *LCL1*-mRNA exprimierten (Abb. 40). Die T-DNA befand sich 83 bp vor dem Startkodon und durch Sequenzierung des flankierenden genomischen Bereichs um die T-DNA konnte gezeigt werden, dass im Zuge des Insertionsereignisses ein DNA-Fragment von 22 bp deletiert worden war. Vier von sechs untersuchten Linien besaßen aufgrund der Deletion und der T-DNA Insertion nur noch etwa die Hälfte der mRNA-Menge als der Wildtyp, bei zwei Linien war die mRNA-Menge nicht reduziert. Phänotypisch konnte bei den Pflanzen mit reduzierter mRNA-Menge keinen Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Der kurze Promotorbereich von 83 bp scheint für die Expression von *LCL1* auszureichen, oder diese nur auf die Hälfte zu reduzieren. Phänotypisch hat die Verkürzung des Promotors auf 83 bp keine Auswirkungen. Entweder genügt die geringere *LCL1*-Expression für die Funktion von LCL1 aus, oder es liegt eine gewisse funktionale Redundanz mit den anderen LCL-Proteinen vor. Diese können eventuell die Funktion von LCL1 teilweise übernehmen, wenn es in geringerer Menge vorliegt.

5.4.2 LCL-RNAi Pflanzen

Um die Expression der gesamte LCL-Familie herunterzuregulieren, wurden RNAi-Pflanzen hergestellt, die ein Konstrukt besaßen, welches spezifisch die Expression aller fünf *LCL*-Gene unterdrücken sollte. Stellvertretend für alle *LCL*-Gene wurde bei der Expressionsanalyse die *LCL1*-mRNA gemessen. Vier von acht Linien wiesen keine Reduktion der *LCL1*-mRNA auf (Abb. 42). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Linien 1, 3, 5 und 6 das LCL-RNAi Konstrukt nicht überexprimierten. Möglicherweise wurde das LCL-RNAi Konstrukt in einen Bereich des Genoms integriert, der die Überexpression, die durch den 35S-Promotor gesteuert wird, nicht erlaubte. So konnte es in diesen Linien nicht zur Unterdrückung der endogenen LCL-Expression kommen.

Linien 7 und 8 wiesen eine deutlich reduzierte *LCL1*-mRNA Menge auf, in diesen wurde teilweise die Expression der *LCL*-Gene unterdrückt. Bei den Linien 9 und 10 konnte keine *LCL1*-Expression detektiert werden, hier wurde die gesamte endogene *LCL1*-mRNA, und somit wahrscheinlich die gesamte mRNA aller *LCL*-Gene, durch das Einbringen des *LCL*-RNAi Konstrukts degradiert.

Bei der phänotypischen Analyse der beiden Linien, die die Expression der *LCL*-Familie unterdrückten, konnten keine Unterschiede zu *wt*-Pflanzen festgestellt werden. Die Pflanzen zeigten einen normalen Habitus, sowohl im LT als auch im KT. Dies läßt vermuten, dass die *LCL*-Proteine keine lebenswichtigen Funktionen für die Pflanze ausüben. Unter normalen Wachstumsbedingungen, wenn die Pflanze keinen Stressfaktoren ausgesetzt ist, kann sie vermutlich den Ausfall dieser Genfamilie kompensieren. Darum wäre es interessant zu wissen, welche Gene bei diesen Pflanzen ein verändertes Expressionmuster aufweisen würden. Dies konnte allerdings in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht analysiert werden.

5.4.3 *LCL1*- und *LCL1(NESmut)*-überexprimierende Pflanzen

Pflanzen, die eine deutlich vermehrte *LCL1*- bzw. *LCL1(NESmut)*-mRNA-Menge aufwiesen, konnten nicht identifiziert werden (Abb. 43). Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass diese Pflanzen einen Phänotyp wie der Wildtyp besaßen.

Für *LHY* und *CCA1* als Komponenten des zentralen Oszillators wurde gezeigt, dass sie ihre eigene Expression negativ kontrollieren (Schaffer et al, 1998; Wang und Tobin, 1998). Bei Überexpression dieser *Clock*-Gene befinden sich also geringere Transkriptmengen in der Pflanze als im Wildtyp. Dies könnte auch für *LCL1* zutreffen. Die beiden Linien, die *LCL1* überexprimieren sollten, besaßen eine deutlich reduzierte Transkriptmenge als der Wildtyp. Bei den beiden Linien, die *LCL1(NESmut1)* überexprimieren sollten, befand sich eine Linie, bei der keine Expression des Transkripts detektiert werden konnte. Diese Linie besaß eine vollständig herunterregulierte Expression von *LCL1* und *LCL1(NESmut)*. Bei der Expressionsanalyse konnte nicht zwischen endogener *LCL1*-mRNA und der mRNA des eingebrachten *LCL1(NESmut)*-Konstrukts unterschieden werden, da die Primer, die für die PCR benutzt wurden, beide Fragmente amplifizieren

konnten. Die zweite analysierte Linie besaß hingegen eine leicht erhöhte Menge an *LCL1(NESmut)*-mRNA. Hier könnte man vermuten, dass diese Linie das eingebrachte Konstrukt nicht oder nur schwach exprimierte, sodass die Menge für eine negative Expressionsregulation nicht ausreichte.

An dieser Stelle sollte der Versuch erwähnt werden, einen *in planta* Transkriptionsassay zu etablieren, bei dem *LCL1* unter der Kontrolle des 35S-Promotors zusammen mit dem *Luciferase*-Reporter gen unter der Kontrolle des *TOC1*-Promotors in Protoplasten kotransfiziert wurde. Die Hoffnung war, die Transkriptionsrepression von *TOC1* durch *LCL1* anhand des Reportergens sichtbar machen zu können. Als Positivkontrolle wurde eine parallele Kotransfektion mit *LHY* unter der Kontrolle des 35S-Promotors durchgeführt. Leider konnten bei dem Versuch keine reproduzierbaren Daten erlangt werden. Auch die Positivkontrolle, bei der gezeigt werden sollte, dass *LHY* die Transkription von *TOC1* reprimiert, zeigte keine eindeutigen Ergebnisse. Dies mag daran gelegen haben, dass die Transfektionseffizienz von Protoplasten bei jeder Transfektion unterschiedlich war und darum die einzelnen Luciferase-Werte pro µg Proteingehalt nicht miteinander verglichen werden konnten. Eine Standardisierung mit einem zweiten Reporter gen (35S::GUS oder 35S::GFP), welches als Marker für die Transfektionseffizienz dienen sollte, lieferte leider keine verlässlicheren Daten.

5.4.4 Überexpression der *LCL1* MYB-Domäne

Es sollten Pflanzen generiert werden, die die MYB-Domäne von *LCL1* überexprimierten. Die vergeblichen Versuche, transgene Pflanzen zu selektieren, deuten aber darauf hin, dass es nicht möglich war, solche Pflanzen herzustellen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass diese Pflanzen nicht lebensfähig waren. Es ist bekannt, dass sich das EE in Promotoren von 31 circadian regulierter Gene befindet. Die Überexpression der *LCL1*-MYB Domäne könnte möglicherweise bewirken, dass die MYB-Domäne an alle EE-Sequenzen in den Promotoren dieser Gene bindet und diese für andere Transkriptionsfaktoren blockiert. So könnten z.B. *CCA1* und *LHY* nicht mehr an den *TOC1*-Promotor

binden und der circadiane Oszillator würde zusammenberechnen. Alle *Output* Signalwege wären gestört und es könnte keine Regulation in der Pflanze durch die circadiane Uhr mehr erfolgen.

Alabadí *et al.* (2002) und Mizoguchi *et al.* (2002) zeigten, dass Pflanzen, denen sowohl CCA1 als auch LHY fehlt, die Fähigkeit verloren haben, circadiane Rhythmen unter konstanten Lichtbedingungen aufrecht zu erhalten. Dies verdeutlicht aber, dass Pflanzen mit einer gestörten Funktion des Oszillators immernoch lebensfähig sind. Unsere Daten könnten darauf hindeuten, dass die Blockade des *evening elements* die Lebensfähigkeit der Pflanze offensichtlich bedeutend mehr beeinflussen könnte als es ein gestörter Oszillator tut. Pflanzen mit einem blockierten EE besäßen nämlich nicht nur einen funktionsunfähigen Oszillator, auch andere Vorgänge in der Pflanze wären gestört. Da sich das EE in vielen Promotoren befindet, würde dessen Blockade die Regulation aller dieser Gene stören können.

5.4.5 LHY-überexprimierende Pflanzen

LHY-überexprimierende Pflanzen sollten auf die *LCL1*-mRNA Menge untersucht werden (Abb. 45). Von den drei Linien, die *LHY* massiv überexprimierten (Linien 14, 16 und 27) besaßen zwei eine deutlich erhöhte *LCL1*-mRNA Menge (Linien 14 und 16). Dies deutet darauf hin, dass LHY die *LCL1*-Expression positiv beeinflussen kann. LHY und CCA1 sind in der Tat Transkriptionsfaktoren, die gleichzeitig reprimierende und aktivierende Funktionen besitzen. Es wurde gezeigt, dass sie einerseits an Promotorelemente von *morning genes* binden und diese positiv regulieren (Wang und Tobin, 1998; Michael und McClung, 2002), andererseits können sie an *evening elements* von Genen binden, deren Expression am Abend maximal ist, und diese negativ regulieren (Alabadí *et al.*, 2001). In der Promotorregion von *LCL1* befindet sich tatsächlich ein putatives CCA1-*responsive element*, dies liegt allerdings sehr weit vom Transkriptionsstart entfernt im *upstream* liegenden Gen auf Position -1348 relativ zum Transkriptionsstart von *LCL1*. Da die Expression von *LCL1* am Morgen maximal ist, wäre es möglich, dass dieses Element bei der Transkriptionsregulation von *LCL1* eine Rolle spielt, da die *Clock*-Proteine auf *morning genes* eine aktivierende

Funktion ausüben und die *LCL1*-mRNA in erhöhter Menge in LHY-überexprimierenden Pflanzen vorliegt.

Es konnte gezeigt werden, dass LCL1 circadian reguliert wird. Diese rhythmische Expression wird möglicherweise durch LHY gesteuert. Die Regulation auf Transkriptionsebene scheint aber nur einen leichten Einfluss auf die LCL1-Aktivität zu besitzen. Die Insertion einer T-DNA 83 bp vor den Transkriptionsstart trennt das *CCA1-responsive element* von dem LCL1-Gen. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass Pflanzen, die homozygot bezüglich der T-DNA Insertion sind, keinen phänotypischen Unterschied zu wt-Pflanzen besitzen, obwohl ihnen die Aktivierung durch LHY fehlen sollte. Vier der sechs analysierten T-DNA Insertionslinien besitzen etwa die Hälfte der *LCL1*-mRNA Menge. Dies könnte daran liegen, dass in ihrem Fall die Expression von LCL1 nicht mehr durch LHY aktivierbar ist.

Eine Regulation auf Proteinebene von LCL1 durch die *Clock*-Proteine wird durch unsere Daten nicht unterstützt. Weder im Y2H-System noch durch BiFC-Analysen konnten Hinweise auf eine direkte Proteininteraktion der LCL-Proteine mit den *Clock*-Proteinen erlangt werden.

5.5 Die mögliche Rolle von LCL1 im zentralen Oszillator

In dieser Arbeit wurde die Analyse der LCL-Familie aus *A. thaliana* durchgeführt. Dabei wurde vor allem auf die Funktion von LCL1 als ein Mitglied dieser MYB1R-Proteinfamilie eingegangen und seine Rolle im zentralen Oszillator untersucht. LCL1 und die restlichen LCL-Proteine wurden aufgrund folgender Erkenntnisse in das Modell des zentralen Oszillators eingeordnet:

1. Durch einen Hefe *One-Hybrid* Assay und durch EMSA-Analysen wurde deutlich, dass alle LCL-Proteine, die *Clock*-Proteine, sowie das sequenzverwandte MYB1R-Protein EPR1 an das EE binden können. Dieses Element befindet sich im Promotor circadian regulierter Gene, die am Abend ihre maximale Expression aufweisen, wie z.B. in *TOC1* und *CCR2/GRP7*. Durch frühere Studien ist bekannt, dass es sich beim EE um die *target*-Sequenz der *Clock*-Proteine CCA1 und LHY

handelt. In dieser Arbeit konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass CCA1 und LHY miteinander um die EE-Bindestelle konkurrieren.

2. Die LCL-Proteine sind keine Transkriptionsaktivatoren. Sie können im Y2H-System die Aktivierung des Reportergens nicht ohne Koexpression mit dem LexA-Protein, was als Aktivierungsdomäne fungiert, auslösen. Diese Funktion als Repressor ist auch für CCA1 und LHY bekannt. Im zentralen Oszillator reprimieren sie die Expression von *TOC1* und *CCR2/GRP7*.

3. Die im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Mengen an *LCL1*-mRNA in putativen *LCL1*-überexprimierenden Pflanzen deuten darauf hin, dass *LCL1* seine eigene Expression hemmt. Diese Eigenschaft zur negativen *feedback* Regulation wird für Komponenten eines zentralen Oszillators gefordert, damit rhythmische Expressionsmuster entstehen können. Auch LHY und CCA1 sind Komponenten einer negativen *feedback* Schleife. Bei *EPR1* wurde ebenfalls gezeigt, dass es sich selbst negativ regulieren kann. Für *LCL1* wäre, wie es für *EPR1* gezeigt wurde, eine Rolle als untergeordneter Oszillator denkbar.

4. *Northern* Analysen zeigen, dass die *LCL1*-mRNA eine circadiane Expression aufweist. *LCL1* ist ein *morning gene*, seine Expression ist am Morgen maximal. Dies ist auch von CCA1 und LHY bekannt.

5. Wir konnten Hinweise darüber erlangen, dass in LHY-überexprimierenden Pflanzen die Expression von *LCL1* erhöht ist. Es ist bekannt, dass die *Clock*-Proteine bezüglich der *morning genes* aktivierende Eigenschaften besitzen können. Dabei konnten wir ausschließen, dass diese Aktivierung durch direkte Proteininteraktionen erfolgt. Vermutlich geschieht sie auf transkriptioneller Ebene. Die rhythmische Expression von *LCL1* wird somit vermutlich direkt über LHY gesteuert.

Im folgenden Modell ist die mögliche Position der LCL-Proteine im zentralen Oszillator dargestellt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass *LCL1*, *LCL2*, *LCL4*, *LCL5* und auch die beiden *Clock*-Proteine CCA1 und LHY ihre Funktion als

Homo- bzw. Heterodimere ausüben. Die rhythmische Expression von LCL1 wird wahrscheinlich direkt über LHY (und vielleicht auch CCA1) positiv reguliert. Wie auch bei den beiden *Clock*-Proteinen ist die Expression von *LCL1* am Morgen maximal, es ist also ein *morning gene*. LCL1 kann wahrscheinlich seine eigene Expression negativ beeinflussen und es könnte eine Funktion als untergeordneter Oszillator einnehmen. Es liegen Hinweise vor, dass LCL1, zusammen mit den anderen LCL-Proteinen und den *Clock*-Proteinen, die Expression von Genen hemmt, die ein *evening element* in ihrem Promotor aufweisen. Da sich die Expression der *Clock*-Proteine und von LCL1 gegen Abend verringert, wird die Hemmung der *TOC1*-Expression am Abend aufgehoben und kann ansteigen. *TOC1* aktiviert im Laufe der Nacht die Expression der *Clock*-Proteine, die wiederum die LCL1-Expression aktivieren könnten.

Da die LCL-Proteine potentiell alle Gene regulieren können, die ein EE in ihrem Promotor besitzen, besteht die Möglichkeit, dass sie zum Feinabgleich von *Output* Rhythmen beitragen.

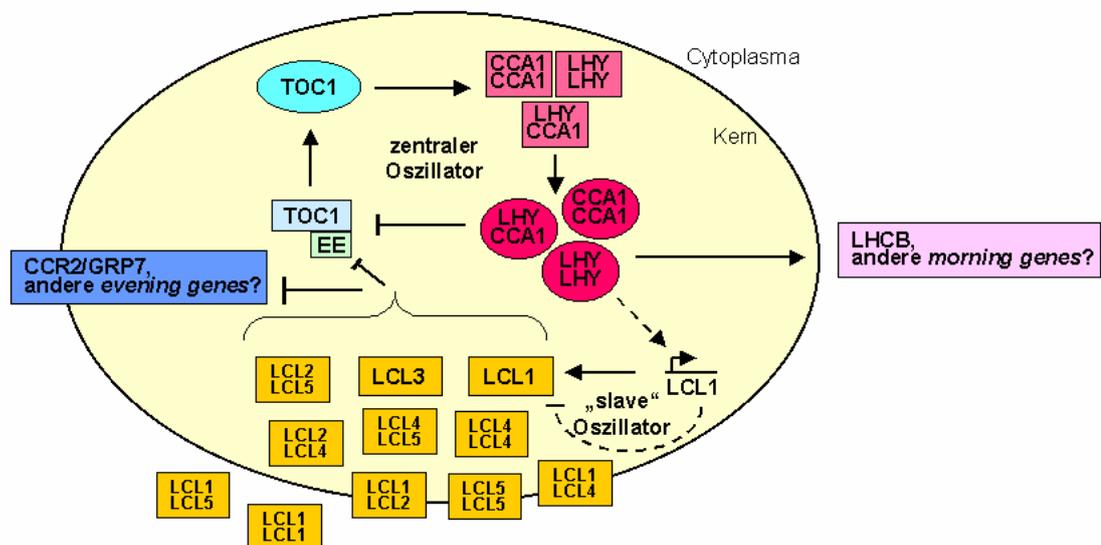


Abb. 47: Modell des zentralen Oszillators mit denkbarer Position der LCL-Proteine.

Die rhythmische Expression von LCL1 wird durch den zentralen Oszillator (wahrscheinlich durch LHY und CCA1, gestrichelter Pfeil) reguliert. LCL1 könnte einen „slave“ Oszillator bilden, da es vermutlich seine eigene Expression negativ regulieren kann. Die *Clock*-Proteine CCA1 und LHY, sowie die LCL-Proteine LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 üben ihre Funktion als Homo- bzw. Heterodimere aus. LCL1 könnte, zusammen mit den restlichen LCL-Proteinen, die Expression circadian regulierter Gene hemmen, die ein EE in ihrem Promotor besitzen. Das Modell stellt die Verteilung der Proteinmonomere und -dimere zwischen Kern und Cytoplasma dar. Proteine, die auf die Grenze zwischen Kern und Cytoplasma plaziert sind, liegen gleichverteilt in der Zelle vor (modifiziert nach Alabadi *et al.*, 2001 und Kuno *et al.*, 2003).

Eine zusätzliche Regulationsebene der LCL-Proteine ergibt sich aus der Tatsache, dass LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 nucleocytoplasmatische *Shuttle*-Proteine darstellen. Sie besitzen sowohl eine NLS, um in den Kern zu gelangen, als auch eine NES, um aktiv ins Cytoplasma transportiert zu werden. Durch die Möglichkeit zur nucleocytoplasmatischen Partitionierung ergeben sich neue Regulationsmechanismen für die Transkription circadian regulierter Gene, die ein EE in ihrem Promotor besitzen. Über LCL2-LCL5 liegen keine Hinweise einer rhythmischen Expression vor. Denkbar wäre, dass sie aufgrund ihres unterschiedlichen Homo- und Heterodimerisierungspotentials und die daraus resultierende unterschiedliche Verteilung innerhalb der Zelle, modulierend auf den zentralen Oszillator einwirken können.

Die mögliche funktionale Einordnung der LCL-Proteine erinnert an andere Faktoren, die als Koregulatoren der circadianen Uhr angesehen werden. Von der Familie der *Pseudo-Response* Regulatoren ist ebenfalls bekannt, dass sie ihre Funktion in der Nähe des zentralen Oszillators ausüben (Nakamichi *et al.*, 2005). Von APRR3, APRR5, APRR7 und APRR9 vermutet man, dass sie miteinander eine komplexe *feedback* Schleife bilden, über die sie circadiane Rhythmen kontrollieren können (Salomé und McClung, 2004; Harmer und Kay, 2005).

5.6 Perspektiven

Mit der Identifizierung und Charakterisierung der LCL-Proteine ist es gelungen, Einblicke in verschiedene Regulationsmechanismen dieser MYB1R-Proteinfamilie zu erlangen, die eine potentielle Rolle bei der Regulation der circadianen Uhr in *A. thaliana* spielt.

Um auf die genaue Funktion der LCL-Proteine Rückschlüsse ziehen zu können, wurden verschiedene transgene Pflanzen generiert. Pflanzen, bei denen die Expression der gesamten *LCL*-Genfamilie unterdrückt war, wiesen einen Phänotyp auf, der dem Wildtyp entsprach. Es steht noch aus, diese Pflanzen auf molekularer Ebene detailliert zu untersuchen. Es konnten Linien gefunden werden, bei denen die Expression von *LCL1* komplett herunterreguliert war. Was die Expression der übrigen *LCL*-Gene in diesen Linien angeht, konnte noch nicht untersucht werden. Interessant wäre außerdem, die Expression von *TOC1* in diesen Pflanzen zu analysieren. Hier würde man eine erhöhte Transkriptmenge erwarten, da die geforderte Reprimierung der *TOC1*-Expression durch die LCL-Proteine wegfällt.

Die molekulare Analyse der Pflanzen, die *LCL1* bzw. *LCL1(NESmut)* überexprimieren sollten, sollte in Zukunft ebenfalls fortgesetzt werden. Eine Expressionsanalyse mit Primern, die spezifisch im untranslatierten Bereich der *LCL1*-mRNA hybridisieren, würde Aufschluss darüber geben, ob tatsächlich die endogene *LCL1*-mRNA Menge in diesen Pflanzen herabgesetzt ist.

Des Weiteren könnte man Pflanzen, die die MYB-Domäne überexprimieren sollen, mit einem induzierbaren Promotor ausstatten, sodass es möglich ist, lebensfähige, transgene Pflanzen zu generieren. Zu verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze könnte man den Promotor induzieren, um so Erkenntnisse über die Auswirkungen zu erlangen, die eine Blockade des EE mit sich bringt.

Die Analyse der LIP-Proteine ist ebenfalls noch nicht abgeschlossen. T-DNA Insertionslinien von LIP13 und LIP26 liegen bereits vor und es steht noch aus, diese zu charakterisieren. Untersuchungen an Pflanzen, die LIP13 oder LIP26 überexprimieren, sollten zusätzliche Informationen über ihre Funktion in der Pflanze liefern.

6 Zusammenfassung

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der LCL-Proteine aus *A. thaliana* durchgeführt. Diese wurden, zusammen mit den *Clock*-Proteinen CCA1 und LHY, die wichtige Komponenten des zentralen Oszillators darstellen, und den vier *EPR1-like* Proteinen, in die LHY MYB Proteinfamilie eingeeordnet.

Das gemeinsame Kennzeichen der LHY MYB Proteine ist ihre LHY MYB *family* Domäne, die die MYB-Domäne enthält. Diese ist verantwortlich für die spezifische DNA-Bindung. Von LHY und CCA1 weiß man, dass sie damit an ein Promotorelement namens *evening element* binden, welches sich in Promotoren circadian regulierter Gene befindet. In dem Bereich, der sich C-Terminal an die MYB-Domäne anschließt, befindet sich die NLS, deren Sequenz in allen elf Proteinen identisch ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle LCL-Proteine, wie auch EPR1, die Fähigkeit besitzen, an das gleiche Promotorelement wie LHY und CCA1 zu binden. Dies wurde einerseits *in vitro* durch EMSA-Analysen festgestellt und konnte andererseits *in vivo* durch eine Hefe *One-Hybrid* Analyse bestätigt werden. Dabei konkurrieren LCL1 und CCA1 um die EE-Bindestelle.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 um nucleocytoplasmatische *Shuttle*-Proteine handelt, die sowohl eine NLS als auch eine NES besitzen. Das Vorhandensein eines Kernexportsignals in einem Transkriptionsfaktor lässt vermuten, dass seine Regulation über nucleocytoplasmatische Partitionierung gesteuert wird. Denn nur wenn ein Transkriptionsfaktor im Kern zur Verfügung steht, kann er seine Funktion als Transkriptionsaktivator oder -repressor ausüben.

Charakteristisch für die LCL-Proteine ist ein nahezu identischer Sequenzbereich am C-terminalen Ende der Proteine, den wir LCL-Domäne genannt haben und der in LCL1, LCL2, LCL4 und LCL5 die NES enthält.

Die Proteine der LHY MYB Familie üben ihre Funktionen vermutlich als Dimere aus. Die Proteindimerisierungsdomäne liegt zwischen der LHY MYB *family* Domäne und der LCL-Domäne. Durch Erkenntnisse aus Y2H-Versuchen und BiFC-Analysen wissen wir, dass das Dimerisierungspotential sehr ausgeprägt ist.

Wir konnten zeigen, dass die beiden *Clock*-Proteine untereinander sowohl Homodimere als auch Heterodimere ausbilden können. Die LCL-Proteine liegen ebenfalls als Dimere in der Pflanzenzelle vor. Hierbei können potenziell folgende Proteine dimerisieren: LCL1-LCL1, LCL1-LCL2, LCL1-LCL4, LCL1-LCL5, LCL2-LCL4, LCL2-LCL5, LCL4-LCL4, LCL4-LCL5 und LCL5-LCL5. Interessanterweise ist die Verteilung der Dimere zwischen Kern und Cytoplasma sehr unterschiedlich. Untersuchungen mit GFP-Fusionsproteinen und BiFC-Analysen verdeutlichen, dass die *Clock*-Proteine als Monomere und als Dimere ausschließlich im Kern vorhanden sind, wohingegen die LCL-Dimere unterschiedliche Verteilungsmuster aufweisen. Hierbei konnten spezifische Veränderung in der Lokalisation der LCL-Proteine in Abhängigkeit zum Interaktionspartner aufgezeigt werden. Dies lässt auf eine weitere Regulation dieser Proteine durch nucleocytoplasmatische Lokalisation schließen.

Wie für einen Transkriptionsfaktor erwartet wird, der möglicherweise eine Rolle im zentralen Oszillator einnimmt, konnte durch Promotor-GUS Analysen gezeigt werden, dass der *LCL1*-Promotor in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien aktiv ist. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass *LCL1*, wie die beiden *Clock*-Proteine, eine circadiane Expression mit einer maximalen mRNA-Menge am Morgen aufweist.

Den LCL-Proteinen kann möglicherweise eine modulierende Rolle im zentralen Oszillator der circadianen Uhr von *A. thaliana* zugesprochen werden, da sie die gleiche DNA-Zielsequenz erkennen wie die *Clock*-Proteine. Es liegen Hinweise vor, dass sie, genauso wie LHY und CCA1, Transkriptionsrepressoren von Genen darstellen, deren Promotor das EE enthält. Analysen mit transgenen Pflanzen lassen außerdem vermuten, dass LHY *LCL1* positiv beeinflusst und dass *LCL1* seine eigene Expression hemmt. Somit wäre denkbar, dass *LCL1* eine Funktion als *slave oscillator* einnehmen könnte.

7 Literatur

- Ahmad, M. und Cashmore, A.R.** (1993). *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P., Kay, S.A.** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880-883.
- Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Más, P., Harmer, S.L., Kay, S.A.** (2002). Critical role for *CCA1* and *LHY* in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**, 757-761.
- Aoki, S., Kato, S., Ichikawa, K., Shimizu, M.** (2004). Circadian expression of the PpLhcb2 gene encoding a major light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* **45**(1), 68-76.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelierie, F., Thomas, D., Hay, R.T.** (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2689-96.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M.S., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C.** (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* **110**, 369-378.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.-P., Grossniklaus, U., Chua, N.-H.** (2001). LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **15**, 2613-25.
- Baranowskij, N., Frohberg, C., Prat, S., Willmitzer, L.** (1994). A novel DNA binding protein with homology to MYB oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J.* **16**, No. 22, 5383-5392.
- Batschauer, A.** (1998). Photoreceptors of higher plants. *Planta* **206**, 479-492.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant. Mol. Biol.* **20**, 1195-97.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheiman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., Baldwin, A.S.** (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunit of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.* **6**, 1899-1913.
- Bilaud, T., Koering, C.E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S.M., Gilson, E.** (1996). The telobox, a MYB-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucl. Acid Res.* **24**, No. 7.
- Bognar, L.K., Hall, A., Adam, E., Thain, S.C., Nagy, F., Millar, A.J.** (1999). The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14652-57.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-94.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., Ohad, N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**, 419-427.

- Briggs, W.R. und Olney M.A.** (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* **125**, 85-88.
- Briggs, W.R. und Christie, J.M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**, 204-210.
- Carré, I.A. und Kim, J.-Y.** (2002). MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J. Exp. Bot.* **53**, 1551-57.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.-W., Wei, N.** (1998a). *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* **10**, 673-683.
- Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, X.-W., Wei, N.** (1998b). Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant J.* **15**, 69-77.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T.** (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**, 1586-97.
- Chen, C.M., Wang, C.T., Ho, C.H.** (2001). A plant gene encoding a MYB-like protein that binds telomeric GGTTTAG repeats *in vitro*. *J. of Biol. Chem.* **276**, No 19, 16511-19.
- Cheng, C.-L., Acedo, G.N., Dewdney, J., Goodman, H.M., Conkling, M.A.** (1991). Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* **96**, 275-279.
- Cheng, Q., Cant, C.A., Moll, T., Hofer-Warbinek, R., Wagner, E., Birnstiel, M.L., Bach, F.H., de Martin, R.** (1994). NK-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 13551-57.
- Chiao, P.J., Miyamoto, S., Verma, I.M.** (1994). Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 28-32.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., Briggs, W.R.** (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Covington, M.F., Panda, S., Liu, X.L., Strayer, C.A., Wagner, D.R., Kay, S.A.** (2001). ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1305-15.
- Deng, X.-W., Caspar, T., Quail, P.H.** (1991). *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **5**, 1172-82.
- Dowson-Day, M. und Millar, A.J.** (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J.* **17**, 63-71.
- Dunlap, J.C.** (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Eriksson, M.E., Hanano, S., Southern, M.M., Hall, A., Millar, A.J.** (2003). Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Planta* **218**, 159-162.
- Feng, W., Benke, A.L., Lee, J.H., Stanford, D.R., Hopper, A.K.** (1999). Antagonistic effects of NES and NLS motifs determine *S. cerevisiae* Rna1p subcellular distribution. *J. Cell Sci.* **112**, 339-347.

- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A., Fromageot, P.** (1991). Specific DNA binding by c-Myb: Evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* **253**, 1140-43.
- Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C., Ballard, D.W.** (1992). I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1339-53.
- Glossop, N.R.J., Lyons, L.C., Hardin, P.E.** (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* **286**, 766-771.
- Görlich, D., Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607-660.
- Gorton, H.L., Williams, W.E., Binns, M.E., Gemmell, C.N., Leheny, E.A., Shepherd, A.C.** (1989). Circadian stomatal rhythms in epidermal peels from *Vicia faba*. *Plant Physiol.* **90**, 1329-34.
- Green R.M., und Tobin, E.M.** (1999). Loss of the circadian clock associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 4176-79.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., Peterson, T.** (1994). The MYB-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in *maize* floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**(3), 543-553.
- Haasen, D., Köhler, C., Neuhaus, G., and Merkle, T.** (1999). Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucin-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **20**, 695-705.
- Haasen, D.** (2001). Nuclear export of proteins in plants: Functional characterisation of receptors and substrates from *Arabidopsis thaliana*. Doktorarbeit, Freiburg.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., Pines, J.** (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* **17**, 4127-38.
- Hall, A., Kozma-Bognar, L., Toth, R., Nagy, F., Millar, A.J.** (2001). Conditional circadian regulation of PHYTOCHROME A gene expression. *Plant Phys.* **127**, 1808-18.
- Harmer S.L., Hogenesch, S.B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-13.
- Harmer, S.L., Panda, S., Kay, S.A.** (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell Biol.* **17**, 215-253.
- Harmer, S.L. und Kay, S.A.** (2005). Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1926-40.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., Hodge, S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2122-27.
- Hemm, M.R., Herrmann, K.M., Chapple, C.** (2001). AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends Plant Sci.* **6**, No. 4.
- Hirayama, T. und Shinozaki, K.** (1996). A cdc5+ homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13371-76.

- Hoffman, P.D., Batschauer, A., Hays, J.B. (1996). *At-PHH1*, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* related to microbial photolyases and plant blue light photoreceptors. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 259-265.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 789-798.
- Humbert-Lan, G. und Pieler, T. (1999). Regulation of DNA binding activity and nuclear transport of B-Myb in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **274**(15), 10293-300.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M.E., Kim, C., Apel, K., Quail, P.H. (2004). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **205**, 1937-41.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., Watanabe, A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Echer, J.R., Cashmore, A.R. (2001). An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* **410**, 487-490.
- Jin, H. und Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**, 577-585.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Merthens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., Martin, C. (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **19**, No. 22, 6150-61.
- Kaczorowski, K.A., Quail, P.H. (2003). *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell* **15**, 2654-65.
- Kaffman, A. und O'Shea, E.K. (1999). Regulation of nuclear localisation: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 291-339.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of Simian Virus 40 large T antigen. *Nature* **311**, 33-38.
- Kersten, B., Bürkle, L., Kuhn, E., Gialvalisco, P., Konthur, Z., Lueking, A., Walter, G., Eickhoff, H., Schneider, U. (2002). Large-scale plant proteomics. *Plant Mol. Biol.* **48**, 133-141.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., Quail, P.H. (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**, 3033-44.
- Kim, W.Y., Geng, R., Somers, D.E. (2003a). Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**, 4933-38.
- Kim, J.-Y., Song, H.-R., Taylor, B.L., Carre, I.A. (2003b). Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *EMBO J.* **22**, No. 4, 935-944.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Karter, K., Schäfer, E., Nagy, F. (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**, 1445-56.
- Kleinig, Maier (1999). *Zellbiologie*. 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag.

- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Orzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Arez, J., Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**(2), 263-276.
- Kranz, H., Scholz, K., Weisshaar, B. (2000). *c-MYB* oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J.* **21**(2), 231-235.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell Res.* **242**, 540-547.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., Horinouchi, S., (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9112-17.
- Kuno, N., Møller, S.G., Shinomura, T., Xu, X.M., Chua, N.-H., Furuya, M. (2003). The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2476-88.
- Lanford, R.E. und Butel, J.S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**, 801-813.
- Lee, K., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* **289**, 107-110.
- Lee, M.M. und Schiefelbein, J. (2001). Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Dev.* **128**, 1539-46.
- Lee, M.M. und Schiefelbein, J. (2002). Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**, 611-618.
- Lin, C., Ahmad, M., Chan, J., Cashmore, A.R. (1996). CRY2: a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiol.* **110**, 1047.
- Lin C. (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14**, 207-225.
- Lipsick, J.S. (1996). One billion years of MYB. *Oncogene* **13**, 223-235.
- Liu, X.L., Covington, M.F., Fankhauser, C., Chory, J., Wagner, D.R. (2001). *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* **13**, 1293-1304.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* **16**, 6762-71.
- Lu, C.-A., Ho, T.-h.D., Ho, S.-L., Yu, S.-M. (2002). Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -Amylase gene expression. *Plant Cell* **14**, 1963-80.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., Mizuno, T. (2002). The *APRR1/TOC1* quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with *APRR1*-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* **43**, 58-69.
- Martin, C. und Paz-Arez, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**, No. 2.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., Quail, P.H. (2000). Direct targeting of light signals to a promotor element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.

- Más, P., Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Oyama, T., Kay, S.A.** (2003). Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 223-236.
- Mathews, S. und Sharrock, R.A.** (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* **20**, 666-671.
- Matsushika, A., Makino, A., Kojima, M., Mizuno, T.** (2000). Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1002-12.
- Matsushita, T., Nobuyoshi, M., Nagatani, A.** (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**, 571-574.
- McClung, C.R., Hsu, M., Painter, J.E., Gagne, J.M., Karlsberg, S.D., Salome, P.A.** (2000). Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiol.* **123**, 381-392.
- McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A., Millar, A.J.** (2000). The ELF3 *zeitnehmer* regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* **408**, 716-720.
- Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H.D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeeken, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A., Bouchez, D., Jones, J.J.D., Pereira, A., Wisman, E., Bevan, M.** (1999). Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in *R2R3 MYB* genes. *Plant Cell* **11**, 1827-40.
- Merkle, T., Leclerc, D., Marshallsay, C., Nagy, F.** (1996). A plant in vitro system for the nuclear import of proteins. *Plant J.* **10**, 1177-86.
- Merkle, T.** (2001). Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* **213**, 499-517.
- Merkle, T.** (2004). Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr. Genet.* **44**, 231-260.
- Meyer, B.E. und Mailm, M.H.** (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **8**, 1538-47.
- Michael, T.P. und McClung, C.R.** (2002). Phase-specific circadian clock regulatory elements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 627-638.
- Michael, T.P., Salomé, P.A., McClung, C.R.** (2003). Two *Arabidopsis* circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**, 6878-83.
- Millar, A.J.** (2004). Input signals to the plant circadian clock. *J. Exp. Bot.* **55**, No. 395, 277-283.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.-R., Carré, I.A., Coupland, G.** (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **2**, 629-641.
- Morse, D., Hastings, J.W., Roenneberg, T.** (1994). Different phase responses of the two circadian oscillators in *Gonyaulax*. *J. Biol. Rhythms* **9**, 263-274.
- Nachury, M.V., Weis, K.** (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9622-27.

- Nagy, F. und Schäfer, E.** (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 329-355.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2005). Pseudo-response regulators, PRR9, PRR7, and PRR5, play together essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**(5), 686-698.
- Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P., Martin, C.** (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a MYB-related transcription factor. *Nature* **369**(6482), 661-664.
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y.** (1992). Solution structure of a DNA-binding unit of MYB: A helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6428-32.
- Oppenheimer, D.G., Hermann, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., Marks, M.D.** (1991). A MYB gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* **67**(3), 483-493.
- Pilgrim, M.L. und McClung, C.R.** (1993). Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **103**, 553-564.
- Quail, P.H.** (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 85-93.
- Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B., Grotewold, E.** (1999). *Maize R2R3 MYB* genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**, 427-444.
- Ribbeck, K. und Görlich, D.** (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20**, 1320-30.
- Richards, S.A., Loundsbury, K.M., Carey, K.L., Macara, I.G.** (1996). A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. *J. Cell Biol.* **134**, 1157-68.
- Riechmann, J.L., Ratcliffe, O.** (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 423-434.
- Romero, I., Fuentes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., Paz-Arez, J.** (1998). More than 80 *R2R3-MYB* regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**(3), 273-284.
- Rose, A., Patel, S., Meier, I.** (2004). The plant nuclear envelope. *Planta* **218**, 327-336.
- Rosinski, J.A. und Atchley, W.R.** (1998). Molecular evolution of the MYB family of transcription factors: Evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.* **46**, 74-83.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sakamoto, K. und Nagatani, A.** (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* **10**, 859-868.
- Salomé, P.A. und McClung, C.R.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* clock. *J. Biol. Rhythms* **19**, 425-435.

- Salomé, P.A. und McClung, C.R.** (2005). PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **17**, 791-803.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A., Coupland, G.** (1998). *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*, an *Arabidopsis* gene encoding a MYB transcription factor, regulates circadian rhythmicity and photoperiodic responses. *Cell* **93**, 1219-29.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., Wisman, E.** (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 113-123.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T., Ballard, D.W.** (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11259-63.
- Schopfer, Brennike** (1999). *Pflanzenphysiologie*. 5. Auflage, Springer-Verlag.
- Sharrock, R.A. und Quail, P.H.** (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution, and different expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* **3**, 1745-57.
- Shearman, L.P., Sathyanarayanan, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., Van der Horst, G.T.J., Hastings, M.H., Reppert, S.M.** (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013-1019.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I., Paz-Arez, J.** (1995). Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J.* **14**(8), 1773-84.
- Solano, R., Fuertes, A., Sánchez-Pulido, L., Valencia, A., Paz-Arez, J.** (1997). A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity of plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, No. 5, 2889-2895.
- Somers, D.E., Webb, A.A.R., Pearson, M., Kay, S.** (1998). The short-period mutant, *toc-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev.* **125**, 485-494.
- Somers, D.E.** (1999). The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Phys.* **121**, 9-19.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., Kay, S.A.** (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 319-329.
- Stacey, M.G., Hicks, S.N., Von Arnim, A.G.** (1999). Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localisation of *Arabidopsis* COP1. *Plant Cell* **11**, 349-363.
- Stacey, M.G., Kopp, O.R., Kim, T.H., Von Arnim, A.G.** (2000). Modular domain structure of *Arabidopsis* COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localisation signal in planta. *Plant Physiol.* **124**, 979-989.
- Staiger, D. und Apel, K.** (1999). Circadian clock-regulated expression of an RNA-binding protein in *Arabidopsis*: characterisation of a minimal promoter element. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 811-819.

- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B.** (2001). The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-456.
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, L.A., Kay, S.A.** (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., Greene, W.C.** (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1921-15.
- Tajima, F. und Nei, M.** (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* **1**(3), 269-285.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., Martin, C.** (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.
- Thomas, B., Vince-Prue, D.** (1996). *Photoperiodism in plants*. Academic Press, London.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid Res.* **22**, 4673-80.
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., Kozma-Bognar, L.** (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **127**, 1607-16.
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S., Bäuerle, P.A.** (1995). Phosphorylation of human I kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**, 2876-83.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-39.
- Von Arnim, A.G. und Deng, W.-W.** (1993). Ring finger motif of *Arabidopsis thaliana* COP1 defines a new class of zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **268**, 19626-31.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**, 428-438.
- Wang, Z.-Y., Kenigsbusch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., Tobin, E.M.** (1997). A MYB-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Wang, Z.-Y. und Tobin, E.M.** (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-17.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581-590.

- Williams, C.E. und Grotewold, E.** (1997). Differences between plant and animal MYB domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric MYB domains have novel DNA binding specificities. *J. Biol. Chem.* **272**, 563-571.
- Willy, P.J., Kobayashi, R., Kadonaga, J.T.** (2000). A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* **290**, 982-985.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., Nagatani, A.** (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J. Cell Biol.* **145**, 437-445.
- Young, M.W., und Kay, S.A.** (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 702-715.
- Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H., Chung, I.K.** (2000). Sequence-specific DNA recognition by the MYB-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J. Biol. Chem.* **275**, No. 31, 24208-14.
- Zabel, U. und Bäuerle, P.A.** (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* **61**, 255-265.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' -> 3'
LCL1	
X112-31	gag ctc gag cta aga gct taa gtg ttc atg acc
X112-52	ata gaa ttc atg acc tca acc aat ccg gtg
LCL1-5'5	at acc cgg gaa aca atg acc tca acc aat ccg gtg
3-MYB1	gag ctc gag tta agc att ttt cga tgc ctt ttg agg
X112-5'7	cg cgg atc caa aca atg acc tca acc aat ccg gtg
LCL1-3'1	ggg cat tga ggg agc ttg ttt cg
NLS-Mutation	
LCL1-3'5	gca gct ttg ttg tta ggc cta ggg ggt gga aca tg
LCL1-5'10	cct agg cct aac aac aaa gct gct cat cca tat cct c
NES-Mutation	
X112-3'2	gag ctc gag tta cat gcg gcc ttt gct gtc
X112-3'3	gag ctc gag tta aac agt ttc gaa att tat agg atc
X112-5'3	at agg atc ctc gag atg tcg ctt cac gtt tcc
X112-3'5	gt ttc ggc att tgc agg atc cat ttc ctt gag c
X112-5'6	g gat cct gca aat gcc gaa act gtt ttg ctg ttg atg
X112-3'6	caa gtt cgc tgt ggc gtt tct cat caa cag c
X112-3'7	gt ttc ggc att tgc agg atc cgc ttc ctt ggc ctt ttt cat gcg gcc ttt gct gtc
X112-5'8	g aga aac gcc aca gcg aac ttg tca aac cct g
X112-3'9	ga cgc gtt cgc tgt ggc gtt tct cat caa cag c
X112-5'9	ata gaa ttc gaa act gtt ttg ctg ttg atg aga aac ctc aca g
X112-5'10	aac gcc aca gcg aac gcg tca aac cct gac ttt gaa cct ac
X112-5'11	gct gct gca gct atg aga aac gcc aca gcg aac gcg tca aac cct gac ttt g
X112-3'11	gtt tct cat agc tgc agc agc agt ttc ggc att tgc agg atc
LCL1-Promotor	
X112-3'4	tga ccc ggg tat cgg tat ttt att caa gat aga gat ct
X112-5'4	ggc aag ctt aac ccg tcc agc cag gca aca
X112-5'5	atc aag ctt tcc tcg cca acg gtt agg atc
knockout Analyse	
X112-3'10	tt agg cct agg ggg tgg aac atg tgc taa a
X112-5'12	cct tgt cga aga ttc gac gaa atc cct ttc g
LB3	tag cat cag aat ttc ata acc aat ctc gat aca c
QRB3	cgc cat ggc ata tgc tag cat gca taa ttc

LCL2	
LCL2-5'1	cat gaa ttc atg act gtt cct ggt ctc gga cct t
LCL2-3'1	gag ctc gag tta tag atg att act tgc ata tgg gtc
LCL2-31	gag ctc gag tta tag atg att act tgc ata tgg gtc
LCL2-3'2	gag ctc gag tgg ctg gct cac cag aga cac t
LCL2-5'3	ctc ctc aaa ttc tat tca tgg tct cta g
LCL3	
LCL3-51	cat gaa ttc atg gtg act gta aac cct agc caa gct
LCL3-3'1	gag ctc gag tta gac atg acc tgt tgt ttt agg
LCL3-31	gag ctc gag tta gac atg acc tgt tgt ttt agg
LCL3-5'3	at acc cgg gaa aca atg gtg act gta aac cct agc caa act
LCL3-3'3	cgg ggt acc act ggc gtt gta aga tga tat caa c
LCL3-3'MYB	gag ctc gag tta agt aaa ttt agg agc ttt ttg tgg ata tgg gtg
LCL4	
LCL4-51	cat gaa ttc atg agt tta cca agc tcc gat gga
LCL4-3'1	gag ctc gag tta gag gtg gcc tga tgt gtt g
LCL4-31	gag ctc gag cta ttt caa agc ttt agc gct gta tg
LCL4-5'3	gaa gaa gaa gaa tcg cga ttt cga gct c
LCL5	
021902	cat gaa ttc atg agc tcg tcg ccg tca aga aat cca
LCL5-3'1	gag ctc gag tta cac atg gcc tct cgt ttc ag
021903	gag ctc gag tca tat gat aag agg act ttc ctc tgc
LCL5-5'3	gg gaa ttc cat atg agc tcg tcg ccg tca aga aat cca
LCL5-5'4	ata tct aga aaa caa tga gct cgt cgc cgt caa gaa atc ca
LCL5-3'4	gag ctc gag tat gat aag agg act ttc ctc tgc
LCL5-3'5	cca atg agt aaa ctt gct agc tga tgg ctc
RNAi	
LCL1-3'1	ggg cat tga ggg agc ttg ttt cg
LCL1-5'1	atg tcg ctt cac gtt tcc
LCL1-5'4	at act cga gga tcc atg tcg ctt cac gtt tcc
LCL2-5'2	ctg caa cta cca ggg tc
LCL2-3'3	ggg tga atg gcc aac att tcc atg gtc tc
LCL3-5'2	gct cct aaa ttt act ctt tct tct tc
LCL3-3'2	ggg atg tgg ctt tcc aca act ttc ttg g
LCL4-5'2	tat acc tct ctc ccg tct tc
LCL4-3'2	ggg cgg cat cac tct atg tgg ctt ttc
LCL5-5'2	atg cca ctt caa gtt tcc acg
LCL5-3'2	ggg acc gtg aag cac tgg agg atg
LCL5-3'3	gag ggt acc atc gat acc tgt aag cac tgg agg ctg
LHY	
LHY-3'1	gag ctc gag tca tgt aga agc ttc tcc ttc c
LHY-5'2	ggt gat tca tac acc cca atg
LHY-5'3	ata gaa ttc ggt cct gtt atg gat act aat aca tct gga gaa g
LHY-3'3	ga aga gct cat tgg ggt tga tga atc acc aga ctt ccc gac act cgc

CCA1	
CCA1-5'1	ata gaa ttc atg gag aca aat tcg tct gga gaa g
CCA1-3'1	gag ctc gag tca tgt gga agc ttg agt ttc caa ccg ca
CCA1-5'2	g cca ttg ggg agc tca ata aca agt tct c
CCA1-3'2	tgt tat tga gct ccc caa tgg cac tag cac agg g
CCA1-3'3	tcc gga tcc tca tgt gga agc ttg agt ttc caa ccg ca
CCA1-3'4	gag ctc gag tta ctg gag aag aga gct tgg aag g
EPR1	
EPR1-5'1	ata gaa ttc atg gcc gct gag gat cga agt g
EPR1-3'1	gag ctc gag cta gca tat acg tgc tct ttg g
LIP13	
L13-5'1	cat gaa ttc atg gct tca agt tca act tca ttc ccg tta acc acc gcg cca
L13-3'1	c aaa ctc ttt cgc tgc ttc tgc
L13-5'2	gca gct gac aaa gcg cga gag gca gca gaa g
L13-3'2	tcg cgc ttt gtc agc tgc aac ttt agc
LIP13-3'3	gag ctc gag tca atc atc gtc gat gta gat ggt ctc ttg c
LIP26	
LIP26-5'1	ata gaa ttc atg tgg ggt act gga tgg agc atg aac
LIP26-3'1	gag ctc gag ggt att acc aaa tat gat gaa act ctc tta tcc ttg
EE	
CBS-5'1	aat tca caa aaa atc taa acc cca aaa aaa atc tat gac tca aaa aaa atc tat gac tc
CBS-3'1	tcg aga gtc ata gat ttt ttt tga gtc ata gat ttt ttt tgg ggt tta gat ttt ttt tg
EEMUT-5'1	gat ccc cca tgg tta aac cag aat tca cgt aaa ccg act cta aac cta gag cag ctg caa acc ttg ggg tac cga gct
EEMUT-3'1	cg gta ccc caa ggt ttg cag ctg ctc tag ctt tag agt cgg ttt acg tga att ctg gtt taa cca tgg gg
sonstige Primer	
5'pB42	cca gcc tct tgc tga gtg gag atg
3'pB42	acc aaa cct ctg gcg aag aag tcc
EYFP-5'3	gac cac tac cag cag aac a
p35S-5'1	cta tcc ttc gca aga ccc ttc ctc
Oligo-dT	t20g + t20a + t20c

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
am	vormittags
AS	Aminosäure(n)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BME	β -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin bzw. Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col	Ökotyp Columbia
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
deion	deionisiert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gal	Galaktose
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glc	Glukose
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GUS	β -Glucuronidase
H	Histidin (His)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
l	Liter
L	Leucin (Leu)
LMB	Leptomycin B

μ	Präfix für mikro- (10^{-6})
m	Präfix für milli- (10^{-3}) bzw. Meter
M	Molarität (mol/l Lösung)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
n	Präfix für nano- (10^{-9})
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl β-D-Galaktopyranosid
p	Plasmid bzw. Präfix für pico- (10^{-12})
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert
pm	nachmittags
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	<i>salt sodium citrate</i>
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Ethyldiamin
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Enzymaktivität (Units) bzw. Uracil
u.	und
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
% (v/v)	Volumenprozent
W	Tryptophan (Trp)
wt	Wildtyp
% (w/v)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
Y2H	Hefe (<i>Yeast Two-Hybrid</i>)
YC	C-terminaler Teil von YFP
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
YN	N-terminaler Teil von YFP
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
z.B.	zum Beispiel

8.3 Publikationen

Merkle, T., Schmied, K.C. (2004). Noch mehr Schalter für die circadiane Uhr: Eine Familie von MYB1R Proteinen. 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen - Dabringhausen 2004, Präsentation.

Schmied, K.C., Dewald, M., Haasen, D., Weisshaar, B., Merkle, T. (2004). Regulation of signal transduction by nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research - Berlin 2004, Abstract Book, T03-034.

Schmied, K.C., Merkle, T. (2005). A MYB1R protein family as co-regulator of the circadian oscillator. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen - Dabringhausen 2005, Poster Nr. 56.

Schmied, K.C., Merkle, T. (2005). A small family of LHY/CCA1-*like* (LCL) MYB1R transcription factors: potential co-regulators of the circadian oscillator. (in Vorbereitung)

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Publikationen dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, kenntlich gemacht habe. Außerdem erkläre ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat und dass sie, abgesehen von den zu Anfang angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist.

Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Thomas Merkle betreut worden.

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

Bielefeld, den 18.07.2005